



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE MEDICINA
BIOMEDICINA

**POTENCIAL AUTORREACTIVO DE CÉLULAS B INDUCIDAS POR IgY DE
PALOMA, UN MODELO DE RUPTURA DE TOLERANCIA RELACIONADA CON
NEUMONITIS POR HIPERSENSIBILIDAD**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

ARANDA URIBE IVAN SAMMIR

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: M. EN C. ERASMO MARTÍNEZ CORDERO
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM
COMITÉ TUTOR: DR. ENRIQUE ORTEGA SOTO
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS, UNAM,
DR. KAREN MANOUTCHARIAN AIRAPETYAN
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS, UNAM,

MÉXICO, CD. MX. FEBRERO, 2018



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE MEDICINA
BIOMEDICINA

**POTENCIAL AUTORREACTIVO DE CÉLULAS B INDUCIDAS POR IgY DE
PALOMA, UN MODELO DE RUPTURA DE TOLERANCIA RELACIONADA CON
NEUMONITIS POR HIPERSENSIBILIDAD**

TESIS

DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

ARANDA URIBE IVAN SAMMIR

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: M. EN C. ERASMO MARTÍNEZ CORDERO
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM
COMITÉ TUTOR: DR. ENRIQUE ORTEGA SOTO
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS, UNAM,
DR. KAREN MANOUTCHARIAN AIRAPETYAN
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS, UNAM,

MÉXICO, CD. MX. FEBRERO, 2018.


Lic. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 06 de noviembre de 2017, aprobó el siguiente jurado para la presentación del examen para obtener el grado de **DOCTOR EN CIENCIAS** del alumno **ARANDA URIBE IVAN SAMMIR**, con número de cuenta **300340356**, con la tesis titulada **"POTENCIAL AUTORREACTIVO DE CÉLULAS B INDUCIDAS POR IgY DE PALOMA, UN MODELO DE RUPTURA DE TOLERANCIA RELACIONADA CON NEUMONITIS POR HIPERSENSIBILIDAD"**, realizada bajo la dirección del **M. EN C. ERASMO MARTÍNEZ CORDERO**:

Presidente: DRA. CLARA INÉS ESPITIA PINZÓN
Vocal: DR. JOSÉ ALVARO AGUILAR SETIÉN
Secretario: DR. ENRIQUE ORTEGA SOTO
Suplente: MED. CIR. LUIS GUILLERMO LLORENTE PETERS
Suplente: DR. KAREN MANOUTCHARIAN AIRAPETIAN

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, Cd, Mx., a 22 de enero de 2018


DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA
COORDINADOR DEL PROGRAMA



AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) por aceptarme como estudiante de Doctorado.

Al CONACyT por la beca otorgada para realizar mis estudios de Doctorado

Al Comité Tutor:

M. en C. Erasmo Martínez Cordero por sus comentarios durante mi formación.

Dr. Enrique Ortega Soto, por su invaluable apoyo en la elaboración del manuscrito publicado, comentarios y sugerencias durante mi formación.

Dr. Karen Manoutcharian Airapetian por el punto de vista crítico durante mis evaluaciones, comentarios y sugerencias durante mi formación.

AGRADECIMIENTOS

A la nueva familia que Dios me ha regalado, Evelyn y Sammir. Evelyn gracias por compartir conmigo y dejarme escucharte.

A la familia que ha estado en diversos momentos de mi vida. Mi papá Benito Aranda por escucharme e inculcarme propósitos en la vida. Mi mamá por demostrar tenacidad ante la vida. Mi hermana Yazmin por ser mi compañera en desvelos anhelados y también en las pesadillas.

ÍNDICE

1. RESUMEN.....	1
2. ABSTRACT.....	3
3. INTRODUCCIÓN.....	4
3.1. TOLERANCIA INMUNOLÓGICA.....	4
MECANISMOS DE TOLERANCIA CENTRAL.....	4
DELECIÓN CLONAL DE LT.....	4
DELECIÓN CLONAL DE LB.....	5
EDICIÓN DEL RECEPTOR.....	7
3.2 MECANISMOS DE TOLERANCIA PERIFERICA.....	8
ANERGIA.....	8
LT ANÉRGICOS.....	8
LB ANÉRGICOS.....	9
CÉLULAS T REGULADORAS.....	10
3.3 AUTOINMUNIDAD.....	12
PROCESOS DE LA RESPUESTA INMUNE INNATA EN LA AUTOINMUNIDAD.....	12
PROCESOS DE LA RESPUESTA INMUNE ADAPTATIVA EN LA AUTOINMUNIDAD.....	14
3.4 MECANISMOS PROPUESTOS PARA LA INDUCCIÓN DE AUTOINMUNIDAD.....	15
ACTIVACIÓN POLICLONAL.....	15
MIMETISMO MOLECULAR.....	16
COMPLEJOS INMUNES (ICs/CICs).....	17
3.5 AUTOANTICUERPOS.....	19
LB AUTORREACTIVOS.....	19

FORMACIÓN DE AUTOANTICUERPOS.....	20
FACTOR REUMATOIDE (AUTOANTICUERPOS anti-Fcγ) Y POSIBLES ANTÍGENOS.....	21
3.6 AUTOINMUNIDAD Y NEUMONITIS POR HIPERSENSIBILIDAD ASOCIADA A PALOMAS.....	23
IgY.....	25
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN.....	27
5. HIPOTESIS.....	28
6. OBJETIVO GENERAL.....	28
7. OBJETIVOS SECUNDARIOS.....	28
8. METODOLOGÍA.....	29
8.1 PURIFICACIÓN Y ANÁLISIS DE IgY.....	29
8.2 ESQUEMA DE INMUNIZACIÓN EN MURINOS BALB/c.....	29
8.3 ESQUEMA DE INMUNIZACIÓN INTRA-TRAQUEAL.....	29
8.4 ESQUEMA SUBCUTÁNEO A DE INMUNIZACIÓN.....	30
8.5 ESQUEMA SUBCUTÁNEO B DE INMUNIZACIÓN.....	31
8.6 DEPLECIÓN CON ANTICUERPO MONOCLONAL ANTI-CD25.....	31
8.7 ELISA.....	33
8.8 IDENTIFICACIÓN DE ANTICUERPOS IgM E IgG ANTI-IgY Y ANTI-Fcγ.....	33
8.9 IDENTIFICACIÓN DE CÉLULAS Treg.....	33
8.10 ANALISIS ESTADÍSTICO.....	34
9. RESULTADOS.....	34
9.1 CARACTERIZACIÓN DE LA IgY.....	34

9.2 PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-IgY EN CEPA BALB/c INMUNIZADOS INTRA-TRAQUEALMENTE	35
9.3 RESPUESTA HUMORAL EN CEPA BALB/c TRATADOS CON EL ESQUEMA A DE INMUNIZACIÓN SUBCUTÁNEA	36
9.4 RESPUESTA HUMORAL EN CEPA BALB/c TRATADOS CON EL ESQUEMA B DE INMUNIZACIÓN SUBCUTÁNEA.....	37
ANTICUERPOS IgG.....	37
ANTICUERPO IgM.....	39
9.5 PARTICIPACIÓN DE LAS CÉLULAS T REGULADORAS EN MURINOS BALB/c INMUNIZADOS CON IgY DE PALOMA.....	40
PROPORCIÓN DE CÉLULAS CD4+	40
PROPORCIÓN DE CÉLULAS CD8+.....	41
PROPORCIÓN DE CÉLULAS CD4+CD25+	42
PROPORCIÓN DE Foxp3+ EN LA POBLACIÓN CD4+CD25+.....	43
9.6 DEPLECIÓN MEDIANTE ANTICUERPO MONOCLONAL ANTI-CD25 CLONA PC61.....	45
9.7 RESPUESTA HUMORAL POSTERIOR A LA DEPLECIÓN CON EL ANTICUERPO ANTI-CD25 EN TRES PUNTOS DEL MODELO DE PRODUCCIÓN DE IgG ANTI-FCγ.....	46
PERÍODO DE EVALUACIÓN DE NIVEL DE ANTICUERPOS DE LA SEMANA 7 A 9.....	46
PERÍODO DE EVALUACIÓN DE NIVEL DE ANTICUERPOS DE LA SEMANA 11 A 13.....	47
PERÍODO DE EVALUACIÓN DE NIVEL DE ANTICUERPOS DE LA SEMANA 16 A 19.....	49
COMPARACIÓN ENTRE EL NIVEL DE AUTOANTICUERPO IgG ANTI-FCγ EN DOS FASES EXPERIMENTALES EMPLEANDO EL ESQUEMA DE INMUNIZACIÓN B.....	51
COMPARACIÓN DE LA FRECUENCIA DE FOXP3+ EN LA POBLACIÓN CD4+CD25+ EN DOS FASES EXPERIMENTALES BAJO EL ESQUEMA DE INMUNIZACIÓN B.....	52
10. DISCUSIÓN.....	53

11. CONCLUSIONES	62
12. PERSPECTIVAS	63
13. LITERATURA CITADA	64
14. ANEXO	76
ARTÍCULO REQUISITO	76

RESUMEN

ANTECEDENTES. En modelos experimentales y enfermedades autoinmunes la presencia del autoanticuerpo IgG anti-Fc γ refleja el curso e intensidad de la respuesta inmune. Es interesante que en neumonitis por hipersensibilidad (NH) asociada a palomas se haya reportado un incremento de IgG anti-Fc γ . Por otro lado, la disminución de la población de las células T reguladoras (Treg CD4+CD25+Foxp3+) está asociada a mecanismos de ruptura de tolerancia, como el incremento en el nivel de IgG anti-Fc γ . Sin embargo, aún no se ha explorado el papel de las Treg en NH asociada a la exposición a palomas y su influencia en la producción de IgG anti-Fc γ . Hasta hoy, se desconoce el antígeno que activa las células B productoras de IgG anti-Fc γ . Por ello evaluamos si el antígeno IgY de paloma que tiene una similitud con la IgG, tiene la capacidad de inducir una respuesta humoral a la región Fc de inmunoglobulina G.

OBJETIVO. Desarrollar un modelo de producción de IgG anti-Fc γ en la cepa BALB/c, al inducir ruptura de tolerancia a la región Fc γ de inmunoglobulina mediante la inmunización de IgY de paloma.

METODO. Se purificó IgY proveniente de huevo de paloma (*Columba livia*) y se determinó su integridad y pureza mediante SDS-PAGE. La IgY se empleó en tres esquemas de inmunización: I) vía intratraqueal con administración semanal de IgY en solución salina durante 22 semanas, II) vía subcutánea con esquema A, que consiste en la administración semanal de IgY emulsificado con adyuvante de Freund durante 22 semanas y III) vía subcutánea con esquema B que consiste en la administración semanal de IgY emulsificada con adyuvante de Freund durante las tres primeras inmunizaciones y las siguientes inmunizaciones únicamente IgY en PBS. Mediante ELISA fue evaluada el nivel de IgG anti-IgY e IgG anti-Fc γ en el plasma de ratones de la cepa BALB/c inmunizados. Posteriormente, en un grupo de ratones tratados con el esquema de inmunización B, se evaluó mediante citometría de flujo la frecuencia de las células Treg. Para corroborar la asociación entre las células Treg y la producción de IgG anti-Fc γ , fue administrado el anticuerpo monoclonal anti-CD25 clona PC61 en tres etapas de la cinética de IgG anti-Fc γ . Posteriormente fue evaluada la respuesta humoral mediante ELISA. La disminución de la población de células Treg fue verificada mediante citometría de flujo.

RESULTADOS. En el caso de la inmunización por mucosas, el nivel de IgG anti-Fc γ apenas fue significativo durante una semana ($p=0.05$). En cambio, con el esquema subcutáneo A, desde la 7^a semana la IgG anti-Fc γ se incrementó gradualmente ($p<0.003$). Mientras que bajo el esquema B se produjo una abrupta producción de IgG anti-Fc γ en la 18^a semana ($p=0.028$). Adicionalmente, el

grupo experimental inmunizado con el esquema B mostró una disminución en la población CD4+CD25+Foxp3+ en las primeras semanas ($p < 0.0080$), para finalmente alcanzar valores normales a partir de la 18ª semana. Para corroborar la asociación entre el nivel de IgG anti-Fc γ y las células Treg, se depleto esta población en tres etapas de la cinética de IgG anti-Fc γ . Sorpresivamente, el nivel del autoanticuerpo fue similar en el grupo experimental depletado y no depletado ($p > 0.05$).

CONCLUSIONES. Nuestro modelo constituye una herramienta útil para el estudio de los mecanismos asociados a la ruptura de tolerancia de la región Fc γ . A su vez, esto sugiere que la IgY es un antígeno con la capacidad de activar directa/indirectamente la población de células B autorreactivas productoras de IgG anti-Fc γ . Además, los resultados sugieren una compleja participación de un grupo heterogéneo de células Treg y otras células reguladoras en términos funcionales.

ABSTRACT

BACKGROUND. The presence of IgG anti-Fc γ autoantibody may mirror the course and intensity of the immune response. In relation to hypersensitivity pneumonitis related with pigeon, it has been reported an increase of IgG anti-Fc γ . On the other hand, the decrease of regulatory T cells is associated with mechanisms of breakage of immune tolerance, it and also has been studied in hypersensitivity pneumonitis. However, the role of Treg in NH related with pigeon and their participation during the production of IgG anti-Fc γ has not been described. Until now, the antigen with the capacity to activate B cells for production of IgG anti-Fc γ is unknown. Hence, we evaluated if the antigen pigeon IgY have the capacity to induce the humoral response against the region Fc γ . **OBJECTIVE.** To develop a model of production of IgG anti-Fc γ in the murine BALB/c, by administration of pigeon IgY. The main goal is promote the breakage immune tolerance to region Fc of immunoglobulin G. **METHODS.** The antigen pigeon IgY was purified from egg pigeon and was evaluated for integrity and purity using SDS-PAGE. The pigeon IgY antigen was inoculated into mice BALB/c using three different immunization schemes, and the level of IgG anti-IgY and IgG anti-Fc γ was evaluated using ELISA in each case. After that, solely to group of mice immunized with the scheme B (mice were inoculated with IgY emulsified with Freund's adjuvant in 3 of 22 immnizations) the frequency of Tregs was evaluated using flow cytometry. Furthermore, the association between the frequency of Treg and the level of IgG anti-Fc γ was corroborated employing the administration of the monoclonal anti-CD25 antibody clone PC61. After that, the humoral response was evaluated using ELISA and the frequency of Tregs was measured by flow cytometry. **RESULTS.** The immunization via mucoses promoted a low production of IgG anti-Fc γ during one week ($p=0.05$). In contrast, the producci3n of IgG anti-Fc γ gradually increased from the 7th week ($p<0.003$) with the scheme of immunization A. Using the scheme immunization B a sharply increasing of IgG anti-Fc γ was produced in the 18th week ($p=0.028$). Moreover, the experimental group immunized with the scheme B, showed a decrease in the population of Treg cells during the first weeks of the experimental phase. Finally, we studied the association between the frequency of Treg and the level of IgG anti-Fc γ . Unexpectedly, the experimental group depleted did not show a differences with respect to experimental group without depletion ($p>0.05$). **CONCLUSIONS.** Our model is useful tool to study the mechanisms associated with the breakage immuneof tolerance to the Fc region of immunoglobulin G. This suggests that the IgY pigeon is an antigen with capacity to activate autoreactive B cells. The results suggest a complex participation of heterogeneous group of Treg.

INTRODUCCIÓN

TOLERANCIA INMUNOLÓGICA

El sistema inmune de los vertebrados consta de un conjunto de procesos fisiológicos cuyo objetivo es proteger al hospedero de los diversos agentes extraños. Para ello ha desarrollado la capacidad de reconocer los elementos propios y no inducir los mecanismos celulares y moleculares de eliminación sobre las poblaciones celulares propias [1, 2]. Este conjunto de procesos se denomina tolerancia inmunológica y está dividido en dos ramas: tolerancia central que es realizada en los órganos linfoides primarios y la tolerancia periférica que se lleva a cabo en circulación y órganos linfoides secundarios. Una de las funciones de la tolerancia inmunológica es la regulación del sistema inmune ya que se encarga de modular la respuesta al suprimir la respuesta efectora de las células autorreactivas mediante moléculas y/o células efectoras [3].

MECANISMOS DE TOLERANCIA CENTRAL

La tolerancia central es un proceso altamente específico que tiene lugar en el timo y la médula ósea y consiste en tres procesos: deleción clonal, edición del receptor y anergia. Estos se desarrollan por primera vez durante la etapa fetal en la hematopoyesis, posterior a la formación de los progenitores linfoides comunes de células B y células T [3, 4]. Aunque, las células T y B se originan durante la hematopoyesis en la médula ósea solamente el LB (Linfocitos B/célula B) termina su maduración en este órgano linfoide primario, mientras que los LT (Linfocitos T/célula T) migran y completan su desarrollo en el timo [2, 5–7]

DELECIÓN CLONAL DE LT

Los mecanismos de inducción de la tolerancia central inician con la formación del TCR (T cell receptor), para dar paso a dos fases importantes la selección positiva y la selección negativa [7, 8]. La fase de **selección positiva se desarrolla** en la corteza del timo y consiste en la selección de la población de células T cuyo TCR es capaz de reconocer con intermedia o baja afinidad al complejo péptido propio-MHC (complejo mayor de histocompatibilidad; MHC) que es presentado por células epiteliales tímicas corticales (cortical thymic epithelial cells; cTEC). Las cTEC se distinguen de otras células presentadoras de antígeno (antigen presenting cell; APC) por usar principalmente a la catepsina-L, mientras que las APC de médula ósea y las células medulares tímicas (mTECs) usan catepsina-S para la degradación de CD74, la deficiencia de catepsina L produce una disminución en la frecuencia de timocitos CD4+ [8–11]. Otro factor característico de las cTECs, es que expresan la

subunidad $\beta 5t$ en su timoproteosoma, su deficiencia resulta en la disminución de timocitos positivos únicos CD8+ [10].

Luego de que el timocito CD4+ o CD8+, ha superado la selección positiva hay una segunda fase de depuración denominada selección negativa que constituye el evento principal en la selección clonal. En este evento hay apoptosis de la población de células doble positivas o timocito CD4+ o CD8+ cuyo TCR reconoce con alta afinidad al péptido propio (autoantígeno) [12]. La presentación de los antígenos es realizado por cTECs en la zona cortical, mientras que en la zona medular es realizada por mTECs y células dendríticas (DC) [13, 14]. Lo anterior, ha producido controversia acerca del sitio donde son eliminadas los LT, ya que en los diversos modelos para explorar el proceso de eliminación clonal se inducen mecanismos particulares y por consecuencia microambientes que bien pueden favorecer la participación de un grupo de células o moléculas involucradas en la eliminación clonal y por ende extrapolar su aportación [8, 14].

Por ejemplo, se ha reportado que en la corteza del timo el proceso de apoptosis de las células doble positivas mediado por Bim, es inducido primordialmente por DCs [15, 16]. Además, se ha descrito que la inactivación de las proteínas apoptóticas Bim y Nur77 pueden rescatar de la selección clonal a LT autorreactivos [16–18]. Sin embargo, en los modelos de murinos transgénicos Bcl-2 y Bcl-2 BH3 utilizados para inducir la inactivación de Bim el fenotipo autoinmune es diferente [18]. El fenotipo autoinmune del modelo transgénico Bcl2-BH3 es más agresivo ya que hay mayor inflamación, infiltración de linfocitos en órganos no linfoides, auto-anticuerpos y una mayor población de LT CD4+ con la capacidad de expresar IFN- γ ; respecto al murino transgénico Bcl-2 e individuos control. Sin embargo, los murinos transgénicos Bcl-2 BH3, pueden alcanzar una sobrevivencia de 1 año, lo que sugiere que otros mecanismos de la tolerancia central y periférica son factores elementales para contener efectos autoinmunes patológicos. En este sentido, es interesante que en el modelo Bcl-2 BH3, haya incremento de poblaciones de células Treg (T reguladoras) [18].

DELECCIÓN CLONAL DE LB

Las células B experimentan eliminación clonal y el proceso cuenta con características distintivas respecto a las células T. La más evidente es que la **selección positiva** y **negativa** de los LB son eventos que tienen lugar en la médula ósea [19–21]. En el caso de la selección positiva existen dos posturas, una indica que la célula B no tiene un evento de selección positiva como el que experimentan los LT, ya que solamente la formación del pre-BCR, permite la maduración del LB [19]. Sin embargo, una estrategia podría dar evidencias de que existe una selección positiva en LB y que incluso ocurre en ausencia de un antígeno, ya que es viable el desarrollo del LB sin la presencia

de la cadena pesada y cadena ligera del **BCR**. En un *modelo de activación*, se diseñó la proteína recombinante MAHB, que posee la región citoplasmática de las moléculas coestimuladoras Ig α e Ig β (CD79a/CD79b). Las glicoproteínas CD79a y CD79b, tienen un motivo ITAM que permite la señalización vía Lck. Cuando se estudió el desarrollo del LB en médula ósea en cepas de ratones incapaces de ensamblar el pre-BCR, pero que expresaban MAHB (CD79a/CD79b) se observó que las células continuaban con su desarrollo [22].

A pesar de que no se ha definido el sitio donde se realiza la selección positiva ha sido viable realizar algunas exploraciones. Utilizando murinos deficientes (S1P3 $+/$ -) y con knockout en el receptor S1P3 (S1P3 $-$ -) se determinaron algunas características de los microambientes de poblaciones de células B en diversas etapas de su desarrollo. Por ejemplo, en el caso de las células B inmaduras autorreactivas a pesar de expresar el receptor S1P3 no mostraron quimiotaxis a S1P (esfingosina-1-fosfato), lo que podría estar asociado a la especificidad del receptor por su antígeno. Además, se demostró que el receptor S1P3 promueve la migración de LB en transición (B220 $^{+}$ IgM $^{+}$ IgD mid) a la estructura de los sinusoides de la médula ósea. La propuesta relevante de este trabajo fue que S1P3 dirige a los LB inmaduros no autorreactivos a la estructura de los sinusoides, es decir, un microambiente en la médula ósea que es importante para su desarrollo antes de que los LB egresen de la médula ósea [23].

Respecto al nicho en que tiene lugar la selección negativa y las células participantes en este proceso se han realizado inferencias a partir de diversas evidencias experimentales. Por ejemplo, en modelo murino inmunizado intraperitonealmente con la globina de gallina acoplado al hapteno-(4-hidroxi-3-nitrofenilo)-acetilo se observó la presencia de LB en centros germinales con fenotipo IgG low CD38 low . Además, los LB IgG low CD38 low expresaron más RNAm de Bcl-xL, Bcl-6 y Fas, respecto a los LB de memoria (IgG+CD38 $^{+}$), sugiriendo que la eliminación clonal se realiza mediante la vía Fas-FasL y confirmando que el fenotipo CD38 low son propias de células B de centros germinales (centros germinales; GC) [24].

Una cuestión intrigante es que célula induce la muerte del LB, [25–27] de acuerdo al trabajo realizado por el grupo de Vinuesa, se ha observado que en las zonas adjuntas a los centrocitos de los centros germinales hay T $_{FH}$ (LT cooperadoras foliculares; T $_{FH}$), que expresan Fas-L. Además, en las zonas adjuntas los LB procesan y presentan el antígeno en el contexto del MHC-II a las T $_{FH}$, a la vez que las T $_{FH}$ sintetizan IL-4 e IL-21. Eventualmente, estas citocinas podrían favorecer la maduración de los LB posterior a la selección negativa ejercida por los T $_{FH}$.

Igualmente, se ha descrito una asociación entre la eliminación de FDC (células dendríticas foliculares, FDC) y la disminución de células B autorreactivas en los centros germinales de los ganglios linfáticos secundarios y terciarios, lo que implica que las FDC probablemente inducen apoptosis durante la selección negativa a células B [25–27]. Aunque, estos hallazgos no se han demostrado en médula ósea; no se puede descartar la participación de T_{FH} en el establecimiento de la tolerancia central. Ya que se ha reportado la presencia de T_{FH} en médula ósea e incluso el incremento de su proporción en enfermedades autoinmunes [28].

Por otro lado, se considera que el LB al tener mayor diversidad de su receptor (BCR), que está dada por recombinación de los segmentos génicos V(D)J e hipermutación somática y contar con una menor restricción del reconocimiento de un antígeno; presentan un mayor número de clonas autorreactivas que escapan de la selección negativa respecto a las células T [29]. También se ha sugerido, que es innecesaria la expresión del gen AIRE en células de la médula ósea, pero poco se sabe de los antígenos propios que son requeridos para el reconocimiento por el BCR [20].

EDICIÓN DEL RECEPTOR

Un mecanismo exclusivo de LB es la edición del receptor, se sugiere que entre 25-50% de los LB experimentan este evento [30]. Posterior a que el LB inmaduro ha tenido el encuentro con el autoantígeno pueden pasar 1 ó 2 días para que sufra apoptosis. En este intervalo de tiempo los genes activadores de RAG son transcritos, y aquellos LB que presenten una alta afinidad por el autoantígeno tienen la oportunidad de reemplazar la cadena ligera (IgL) original por otra IgL que expresa un primer rearrreglo de los segmentos génicos V/J. Si posterior a la edición del receptor el BCR ya no presenta una alta afinidad por el antígeno propio, el LB continúa con su proceso de desarrollo. Se han realizado diversos reportes que han develado más información acerca de este mecanismo [31–33], aquí presentamos dos puntos interesantes de este mecanismo [30, 31]:

- a) En la edición del receptor es factible que el rearrreglo de los segmentos génicos sea realizado en la cadena pesada (IgH), lo que tiene un significado poco claro ya que una de las ventajas de la edición del receptor es tratar de no perder el gasto energético invertido en tratar de tener una IgH funcional [30], ya que de esta manera con *solo* modificar a la IgL se obtiene mayor diversidad al crear una especificidad adicional.
- b) En muchas ocasiones parece que edición del receptor en LB, puede ser sinónimo de exclusión alélica. Exclusión alélica es el resultado posterior a la edición del receptor en el que los LB expresan sólo un tipo de BCR, es decir todos los BCR presentes en la membrana están constituidos por el mismo tipo de IgH e IgL (“una célula-un anticuerpo”). Sin

embargo, se ha demostrado que aproximadamente el 10% de los LB maduros expresan dos cadenas de Igk, es decir; “una célula B-dos anticuerpos” [(31)]. Este evento definido como inclusión alélica, es la presencia de más de un rearrreglo de una IgH con una IgL de tipo “A” o una de tipo “B” [30, 31]. Consecuentemente, la inclusión alélica está asociado a LB autorreactivos. La edición del receptor al representar una competencia de las IgLs por ensamblarse con la IgH, existirá un punto en el que las células que ya tienen menos BCRs con una menor afinidad por el auto-antígeno se les permita continuar con su desarrollo escabulléndose de la selección negativa [30].

MECANISMOS DE TOLERANCIA PERIFERICA

ANERGIA

Este concepto describe un estado funcional de silenciamiento, que fue primordialmente descrito en células B pero que igualmente las células T presentan (Figura A-a). En ambos casos las poblaciones celulares proliferan pobremente ante estímulos mitogénicos. En el caso de los LB *in vivo* hay una baja producción de anticuerpos en presencia de mitógeno y antígeno, hay una reducción del 90-95% de IgM pero no de IgD. En condiciones *in vitro*, la estimulación de las células B en ausencia de células T, se produce un estado anergico, esta condición es reversible bajo una interacción del BCR e interacción con la célula T [34–36].

En el caso de las células T, *in vitro* ha sido descrito que la estimulación del TCR en ausencia de la segunda señal (coestimuladora) resulta en una nula respuesta. *In vivo*, cuando el autoantígeno es localizado en el timo las células T reactivas pueden presentar un estado anérgico ante una subsecuente exposición al antígeno, en este caso la población de células T en estado silente es incapaz de producir IL-2 y proliferar bajo la señal de moléculas coestimuladoras y del antígeno [34, 37].

La anergía, es un evento que al igual que la deleción clonal inicia durante la etapa fetal. Sin embargo, el efecto en una fase madura del individuo es notorio ya que este proceso puede desarrollarse en circulación y en órganos linfoides secundarios, porque representa un estado silente de la población de células que emergieron de la médula ósea.

LT ANÉRGICOS

El LT anérgico ha sido explorado mediante diversos modelos experimentales *in vitro* con la estimulación del TCR mediante agonista en ausencia de una APC, estimulación mediante anti-CD3, tratamiento de ionomicina seguido de cultivo en alta densidad y coestimulación con anti-CTLA-4

[38]. En modelos *in vivo*, también se ha explorado la anergia, por ejemplo; en murino transgénico inmunizado con antígenos peptídicos solubles, cuyas células son transferidas a un individuo singénico al que posterior a 24 horas se inmuniza con el antígeno [37]. En todos estos modelos se produce un estado de hipo-respuesta promovido por la presentación de antígenos en condiciones de activación sub-óptima, resultando en una ineficiente señalización vía TCR, baja producción de IL-2, IL-3 y de proliferación.

Sin embargo, se ha planteado que tolerancia adoptiva o anergia *in vivo* presenta ciertas diferencias respecto a lo observado cuando este proceso es estudiado en condiciones *in vitro*. La tolerancia adoptiva es un subestado de anergia en que las células estimuladas por un antígeno de manera constante son incapaces de producir todas las citocinas con excepción de IL-10 [34, 37], puede ser revertido por la estimulación de CD25 y/o CD134 [39]. En el caso de la *tolerancia adoptiva* el bloqueo de los estímulos del TCR es a nivel de Zap-70 de la molécula de andamiaje LAT y respecto a la señalización *downstream* no es requerido Fyn [35].

LB ANÉRGICOS

Mediante modelos transgénicos α -HELtgHELtg y ArsA1, se ha propuesto que las células B CD93⁺CD23⁺IgM^{low} representan una población anérgica [45, 36]. Una característica de esta población de células B autorreactivas, es presentar un incremento en la expresión de los genes *Egr2*, *Nab2* y *Nrgn*. Cada uno de los factores de transcripción tienen un papel asociado a la señalización mediada por calcio; *Egr2* induce un incremento de calcio intracelular, *Nab2* funge como un regulador, y *Nrgn* participa en la señalización dependiente de Ca²⁺ intracelular [36]. Al respecto, probablemente puede estar asociado a la elevada concentración basal de Ca²⁺ que presentan la población de células B autorreactivas, las cuales no presentan un incremento de Ca²⁺ posterior a la estimulación [36]. Otra característica importante es que las células B anérgicas tienen una sobrevivencia (1-5 días) menor respecto a LB convencionales (40 días), necesitando de requerimientos mayores de BAFF (Factor de activación de LB) [36].

Respecto al sitio donde yacen los LB anérgicos, se ha reportado que experimentan exclusión folicular, es decir al carecer de receptores quimiotácticos como CXCR5, solo pueden alojarse en el borde de los folículos de los centros germinales en ganglios linfáticos secundarios [36] (Figura A-c). Aunque, en modelos transgénicos los LB reactivos a ssDNA, parecen no mostrar ningún problema para incorporarse a los folículos [45, 36]. Tal vez esto dependa del grado de autorreactividad que presentan.

Respecto a las vías de señalización en los LB anérgicos, se ha descrito que la expresión de CD79a/CD79b es comparable a la población de LB convencionales, aunque presentan inadecuada activación [36, 40]. Lo que puede estar asociado a desensibilización por una prolongada exposición al antígeno y una inefectiva agregación del complejo BCR [41]. En cuanto a las vías de activación de NF- κ B y JNK son bloqueadas pero la fosforilación de ERK es normal, aunque se ha reportado una sobre-expresión *Erk* [36, 42]. La vía de señalización calcio/calcineurina está dañado, pero es lo bastante funcional para utilizar NF-AT para mantener la posibilidad de inducir un programa de regulación negativo [35].

CÉLULAS T REGULADORAS

Las células reguladoras están conformadas por diversas poblaciones como LB CD19+CD5+, LT CD8+CD25+ y LT CD4+CD25+FoxP3+ [43–45]. Pero, el prototipo de célula reguladora es el LT CD4+CD25+FoxP3+ (**Treg**) que ha sido identificada en murinos y en humanos sanos [46]. Se han determinado Treg *naturales* que tienen su origen en timo y Treg *inducidas* o *adaptativas*, que se encuentran en circulación y que posterior a un estímulo expresan CD25, siendo ese momento cuando desarrollan su función supresora [46, 47]. Precisamente CD25 es un receptor de activación y al igual que otros receptores utilizados para identificar células Treg como CD122 (IL-2 β R), CTLA-4, GITR, LFA-1 y LFA-3; son expresados transitoriamente previa activación, dificultando el análisis de la población de células Treg [48].

Las Treg para realizar su función reguladora necesitan migrar a los tejidos inflamados, sitios infectados y tumores. Por ello expresan receptores de homing, de adhesión y de quimiocinas; básicamente similares al perfil de células T efectoras. En ganglios linfáticos la mayoría de las células Treg (80%) son FoxP3+ y expresan CCR7 en altos niveles, mientras las células T FoxP3- expresan ligeramente más CCR4, CCR6, CXCR4 y CXCR5 [49].

Una característica interesante de las células Treg es que necesitan de una concentración de antígeno 10 a 100 más baja para activarse respecto a LT naïve y LT autorreactivos [50], lo que concuerda, con los registros *in vivo* donde se muestra un estado de hipo-proliferación continuo presuntamente dado por el reconocimiento del antígeno propio y de microorganismos comensales. Lo que está asociado a que las células Treg puedan suprimir la función de otros LT, sin importar si estas comparten especificidad por el Ag [50]. En cuanto a los mecanismos utilizados para inducir supresión podemos mencionar:

Producción de citocinas. Sintetizan citocinas inhibitorias como: IL-10, TGF- β e IL-35 [50–52].

Mecanismos de apoptosis. Durante la interacción célula-célula utiliza moléculas citolíticas como granzima A/B y perforina a través de TRAIL-DR5 induciendo apoptosis [50].

Perturbación directa de las rutas metabólicas. Realizan transferencia de AMPc a través de uniones gap. El AMPc inhibe la producción de IL-2 en consecuencia la proliferación. Las Treg, suprimen la expresión de CD80/CD86 sobre APC estimuladas por la enzima 2,3-dioxigenasa, esta cataboliza el triptófano en “kynurenines” un metabolito altamente tóxico [50].

Moléculas inhibitoras. CTLA-4 actúa sobre el motivo YMMN en los residuos 170-173 de CD28, esta región se caracteriza por unirse a PI3K, Grb2 y Gads. LAG-3 es otra proteína inhibitora de la maduración de DC asociada a la unión con MHC-II. [52, 53].

CD39 y CD73 son 5-ectonucleotidasas, ectoenzimas que catalizan la generación de adenosina pericelular liberando una señal negativa a las células efectoras por interacción con el receptor A2A de adenosina al incrementar AMPc del LT blanco [50].

Competencia de IL-2. El uso del receptor CD25 para competir por IL-2 local, la cual es requerida para la supervivencia de diversas células [47] (Figura A-b).

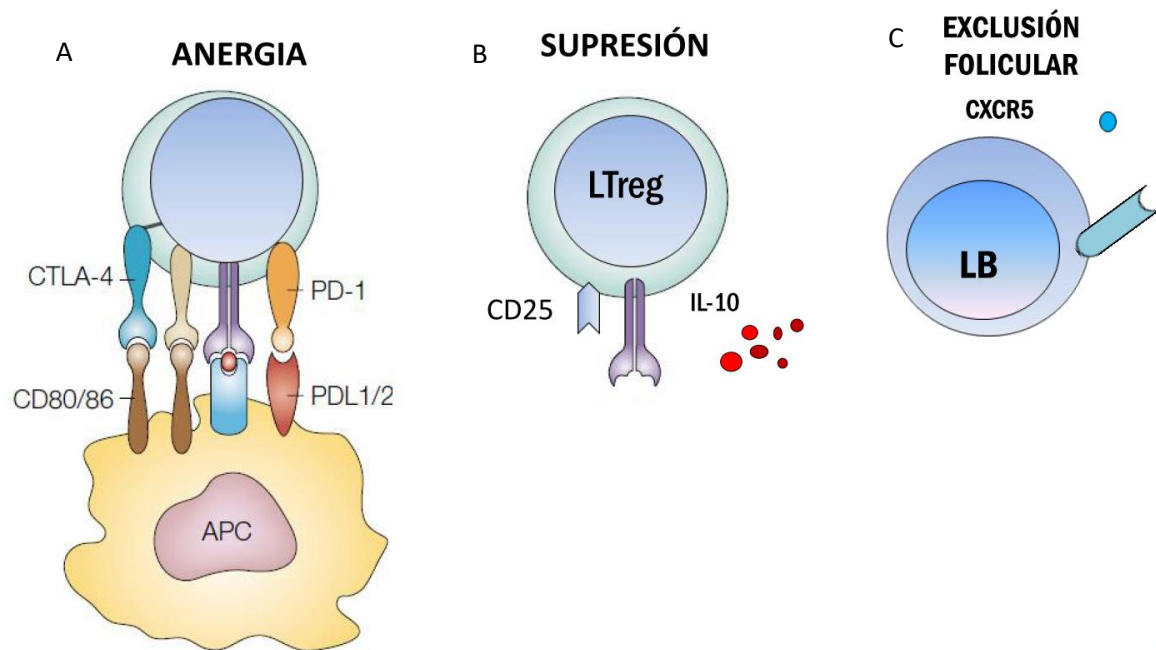


Figura A. Mecanismos de tolerancia periférica a) anergia, b) supresión mediado por células T reguladoras y c) exclusión folicular

AUTOINMUNIDAD

Cuando el sistema inmune monta el conjunto de procesos moleculares y celulares contra elementos propios (autoantígenos), hay un proceso de autoinmunidad. Esto implica el reconocimiento de los autoantígenos (por el TCR y el BCR) y la eventual activación de la población de las células T autorreactivas y las células B autorreactivas. Los procesos autorreactivos participan en el establecimiento de la tolerancia central. Sin embargo, la autorreactividad suele asociarse con una condición fisiopatológica denominada enfermedad autoinmune [3, 54].

Las enfermedades autoinmunes tienen un carácter multifactorial ya que diversos factores causales como: predisposición genética, condiciones ambientales, factores hormonales, infección por agentes patógenos y factores nocivos (tabaco, inhalación de agentes químicos) pueden promover una reacción autorreactiva al autoantígeno blanco y eventualmente daño al tejido. Cuando los autoantígenos se encuentran en tejidos de un órgano específico la fisiopatología se denomina enfermedad autoinmune órgano específica, en el caso de que los autoantígenos se encuentren en diversos órganos se denomina enfermedad autoinmune sistémica [55–58].

El carácter multifactorial de la autoinmunidad, ha implicado que su estudio tenga que ser abordado desde diversas perspectivas. Sin embargo, ha sido posible establecer una serie de características que comparten este grupo de fisiopatologías, como son la participación de elementos de la inmunidad innata como los receptores de reconocimiento de patrones (PRR) como los receptores tipo Toll [59]; las células presentadoras de antígeno [60], incremento de cuerpos apoptóticos [61], así como elementos de la inmunidad adaptativa como incremento en el nivel diversos autoanticuerpos [62].

PROCESOS DE LA INMUNIDAD INNATA ASOCIADOS A LA AUTOINMUNIDAD

En las enfermedades autoinmunes existen diversos agentes etiológicos, que pueden promover la activación de las poblaciones autorreactivas de LT y LB [63, 64]. Sin embargo, la activación de las poblaciones autorreactivas no constituyen un proceso trivial (menor), ya que en condiciones fisiológicas los mecanismos de tolerancia periférica mantienen en estado de anergia a los linfocitos autorreactivos que se encuentran en circulación [65]. Aun así, se ha reportado en sujetos sanos y cepas murinas la presencia de autoanticuerpos en circulación, denominados *autoanticuerpos naturales*. Algunos autores sugieren que este grupo de autoanticuerpos son principalmente de clase IgM y de perfil polirreactivo, neutralizan agentes patógenos al reconocer patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) y presentan ligera a mediana afinidad a los autoantígenos [66, 67].

Sin embargo, en un momento de la interacción con un agente patógeno, los anticuerpos polirrectivos pueden reconocer epitopes similares localizados en un antígeno y/o en un autoantígeno. Generando un evento de reacción cruzada y la producción de autoanticuerpo con mayor reactividad a un autoantígeno, como en el caso de los anticuerpos anti-DNA y anti-RNA [68, 69].

En el ejemplo anterior ha sido brevemente descrito el desarrollo de un proceso autoinmune. En general, la autoinmunidad al igual que en la respuesta inmune “convencional” inicia con la activación de la respuesta inmune innata [70], y subyacente a estos mecanismos se promueve la respuesta inmune adaptativa con ello la activación de la población de LT y LB autorreactivos. En este contexto mencionaremos algunos elementos de la inmunidad innata y su papel en la inducción de autorreactividad:

- a) Los mecanismos subyacentes de la respuesta inmune innata promueven la respuesta inmune adaptativa. En el que al menos tres elementos participan: 1) *la activación de células presentadoras de antígeno* [71, 72]. Por ejemplo, los macrófagos y las células dendríticas inicialmente participan en la vía innata mediante el proceso de fagocitosis o endocitosis para, 2) la eventual *producción de citocinas proinflamatorias* [73] y 3) *la participación de receptores de reconocimiento de patrones* (Receptores de reconocimiento de patrones; PRR) como los TLR (Toll like receptor, receptores tipo Toll) que constituyen parte del fenotipo de las poblaciones de células de la inmunidad innata (macrófagos, DC) y de la inmunidad adaptativa como los LT y LB [59, 74, 75].
- b) La activación de la población de *células autorreactivas de LT y LB*, no necesariamente implica patología. Ya que se ha descrito que la producción de autoanticuerpos “naturales” (IgM polirreactivos) que permiten la homeostasis al reconocer PAMPs y autoantígenos [76, 77]. Aunque, interesantemente algunos reportes han descrito la producción transitoria de *autoanticuerpos* como los de tipo factor reumatoide de clase IgM e IgG en condiciones fisiológicas, previo al desarrollo de enfermedades reumáticas o de perfil autoinmune [78, 79]. Los elevados niveles de anticuerpos establecen condiciones que permiten la formación de ICs los cuales pueden a su vez activar el sistema del complemento promoviendo la depuración de estos complejos en condiciones fisiológicas o bien un microambiente inflamatorio en el que hay daño celular y de tejido en condiciones fisiopatológicas [75, 80–82].

PROCESOS DE LA RESPUESTA INMUNE ADAPTATIVA EN LA AUTOINMUNIDAD

La población de células presentadoras de antígeno (APCs), representan un puente entre la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa. En el caso de las DCs y los macrófagos, como primera línea de defensa eliminan a los agentes patógenos mediante el proceso de fagocitosis y/o endocitosis. Esto implica el reconocimiento de los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) mediante los receptores de reconocimiento de patrones [83, 84]. En el contexto de la autoinmunidad en pacientes y en diversos modelos experimentales, se ha reportado que las APCs tras la liberación de neoantígenos/antígenos cripticos junto con la exposición crónica se promueven la activación de LT y LB autorreactivos (Figura B). En general, el ADN y el ARN, junto con otros antígenos nucleares y cuerpos apoptóticos son los principales blancos en este tipo de reacciones autoinmunes [11, 69, 85–87].

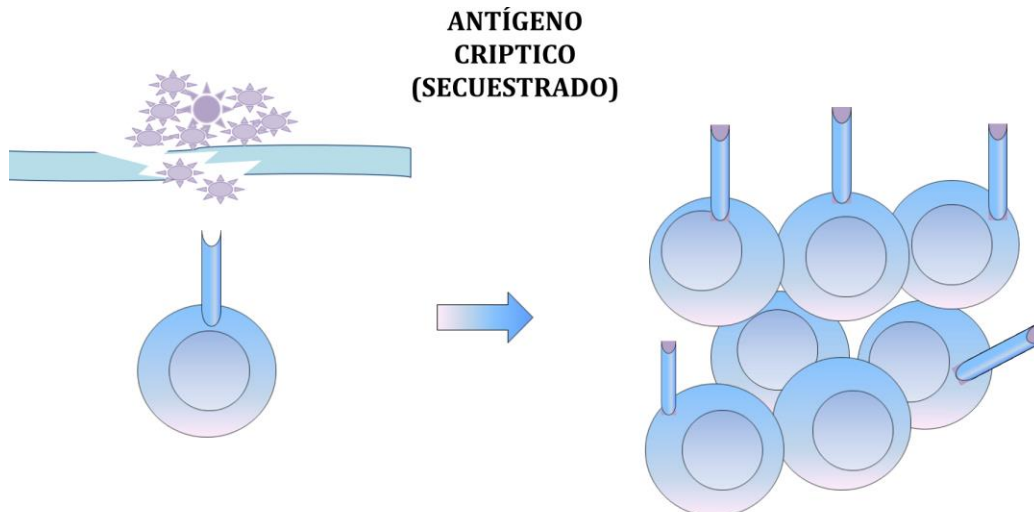


Figura B. Mecanismos de ruptura de tolerancia liberación de antígenos cripticos

Una de las condiciones que favorecen una mayor exposición de los autoantígenos a las APCs, es el incremento en la formación de NETs (redes extracelulares de neutrófilos). A la vez se favorece una exposición más prolongada de antígenos como ADN y ARN bacterianos, lo que puede llevar a un proceso de mimetismo molecular y reacción cruzada por parte de anticuerpos reactivos [88, 89]. También, se ha identificado en pacientes con diabetes tipo I y en la cepa murina NOD, una población de DCs denominada merocítica con fenotipo $CD11+CD11b^{-/low}$ productoras de IFN- α/b , IL-12 e IL10, cuyo organelo merosoma al ser menos ácido favorece que los antígenos sean procesados lentamente. Dicha condición favorece una exposición gradual y prolongada, esta condición podría activar la población de linfocitos autorreactivos [72].

Otra vía alterna en el que la participación de las APCs puede generar una respuesta autoinmune es la falla en los mecanismos de apoptosis en la propia APC. Por ejemplo en un modelo transgénico en el que el mecanismo de apoptosis fue selectivamente inhibida en DCs se observó un incremento en el que la depleción de la población de DCs CD11high y pDC promueven hipergammaglobunemia y un incremento en el fenotipo Th1 y Th17.

Por otro lado, la participación de las APC conlleva a la activación de las células T y eventualmente la generación de la memoria inmunológica. Esto implica la estimulación de las células T naïve, las cuales se diferencian en células T efectoras, células residentes de memoria y de memoria central. Por lo que, la exposición del antígeno secundario expande clonas que ayudaran a una respuesta inmediata. En el caso de condiciones autorreactivas la población de células T autorreactivas promueven la activación de las células B autorreactivas [90]. Por ejemplo, las células T foliculares promueven la diferenciación a células plasmáticas de vida larga en los centros germinales o de vida corta en las zonas extrafolliculares. Por otro lado, se ha descrito que en términos generales las células Th1 y Th17 promueven un ambiente proinflamatorio mediante la secreción de citocinas como IL-6, IFN- γ e IL-17, que pueden promover la quimiotaxis y diferenciación de los neutrófilos. Sin embargo, las interacciones que pueden establecerse son más complejas. Por ejemplo, las células Th2 efectoras generalmente están asociadas a la activación de una respuesta humoral y su participación en eventos autorreactivos se excluye, se ha demostrado su intervención mediante transferencia adoptiva en un modelo murino de artritis reumatoide [91, 92].

MECANISMOS PROPUESTOS PARA LA INDUCCION DE AUTOINMUNIDAD

ACTIVACIÓN POLICLONAL

La activación policlonal consiste en la estimulación de diversas clonas de LB promovida por un agente infeccioso como los virus (*Epstein Bar*) y/o bacterias [93, 94] (Figura C). Por ejemplo, los LPS (lipopolisacaridos) antígenos presentes en la membrana de bacterias gram-negativas promueven la activación de poblaciones de linfocitos autorreactivos [86, 95]. Una ruta inicia cuando las células presentadoras de antígeno reconocen y presentan vía MHC al antígeno (como el LPS) a la clona de LT autorreactiva estimulando a los LB autorreactivos con ello la producción de autoanticuerpos [86].

Otra alternativa, es la estimulación directa de los LB autorreactivos mediante el reconocimiento de PAMPs (LPS, DNA y RNA bacteriano) vía TLR4 (reconocimiento de LPS), TLR7 y TLR9

(reconocimiento de DNA y RNA, proveniente de cromatina); y con ello la producción de autoanticuerpos como el factor reumatoide. Además, el LB tiene la capacidad de procesar y presentar antígenos vía MHC y activar a la clona de LT autorreactivos promoviendo la producción de autoanticuerpos [96, 97].

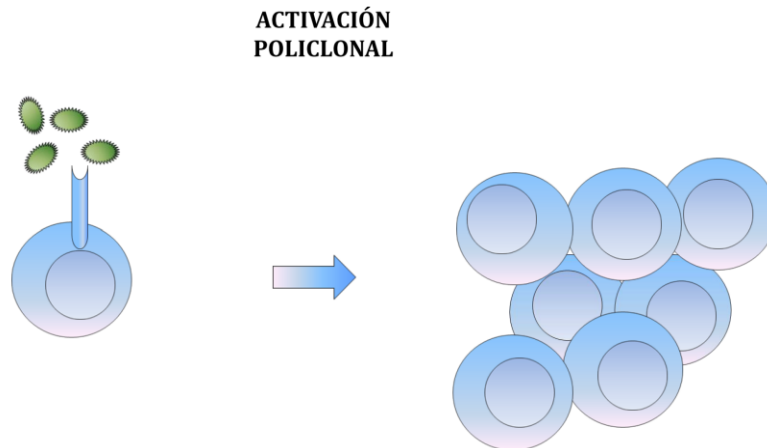


Figura C. Mecanismos de ruptura de tolerancia activación policlonal

MIMETISMO MOLECULAR

Una de las explicaciones al desarrollo de la autoinmunidad, es que estas son favorecidas en un evento de mimetismo molecular. Este evento se suscita cuando los antígenos y los antígenos propios (autoantígenos) presentan una similitud estructural (Figura D). Diversos reportes en enfermedades infecciosas y parasitosis sugieren que la reacción cruzada entre antígenos y autoantígenos está asociada al desarrollo de una patología autoinmune. Por ejemplo, hay una asociación de enfermedades reumáticas del corazón previo a una infección *Streptococcus spp.* o *Trypanosoma cruzi*. En el caso de esclerosis múltiple posterior a la infección viral, en la artritis de Lyme posterior a la infección con *Coxsackie virus* [98, 99].

Hay dos explicaciones del porque hay una similitud entre epitopes provenientes del hospedero y un agente infeccioso. Una de ellas es que las biomoléculas comparten un origen filogenético y en consecuencia también una similitud estructural y funcional. Una segunda explicación es que el mimetismo molecular forma un factor de virulencia más de los agentes microbianos. Por lo tanto los microorganismos han desarrollado esta estrategia para evitar ser reconocidos y eliminados por el sistema inmune.

Una vía por la cual el mimetismo molecular puede ser inducido es mediante la autoantigenésis, en la cual tras una modificación protransduccional en el que hay una alteración en la estructura y la

función biológica de una proteína. Por ejemplo, en artritis reumatoide hay citrulinación de proteínas como la fibrina y colágena. Además es factible que en condiciones como inflamación crónica se produzca modificaciones postransduccionales generando más blancos para los diversos tipos de clonas de linfocitos autorreactivos. Por ejemplo, durante la apoptosis y la NETosis pueden contribuir en las modificaciones postransduccionales al ofrecer un nuevo microambientes de perfil “fisiopatológico”, sumada a un mayor tiempo de exposición de los autoantígenos provenientes de los cuerpos apoptóticos. El que haya semejanzas entre los epítopes de antígenos y autoantígenos, favorece la autorreactividad, activación de LB y LT autorreactivos, esto es suficiente para inducir autoinmunidad [100].

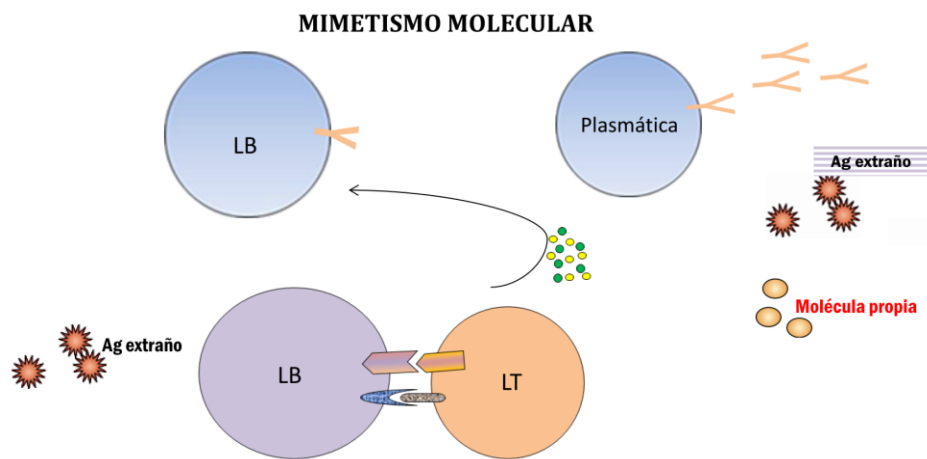


Figura D. Mecanismos de ruptura de tolerancia mimetismo molecular

COMPLEJOS INMUNES (ICs/CICs)

Uno de los elementos de la respuesta humoral son los complejos ICs o CICs, que se forman tras la unión de un anticuerpo a un antígeno soluble (CICs) o celular (ICs), en condiciones fisiológicas la formación de estos complejos permiten inactivar y destruir moléculas y/o células extrañas. Ejemplos de estos procesos son la activación del complemento, inducción de la fagocitosis y la apoptosis celular dependiente de anticuerpos. En general, la formación de IC inicia con la producción de anticuerpo reactivo a cualquier antígeno, su eliminación es asociada a CR1 presente en eritrocitos y proteínas del complemento como C1q, C4b, C3b y C3b1. Los eritrocitos transportan

a través del sistema circulatorio los ICs, hasta llevarlos al hígado y bazo, en este punto el sistema monocito-fagocítico se encarga de la depuración de los ICs [101].

Sin embargo, en patologías crónicas los eritrocitos pueden favorecer un incremento en el nivel de los ICs promoviendo su acumulación en células endoteliales en riñón y vasos sanguíneos. La prevalencia del antígeno promueve la acumulación de IC, la cual dispara la activación de diversas poblaciones celulares como las pDC que producen citocinas generando un microambiente proinflamatorio, la activación de células T efectoras e incremento de anticuerpo tras la activación de LB. Paradójicamente, los ICs promueven que el complemento, fagocitosis y apoptosis celular dependiente de anticuerpo, dañen células inocuas y tejido [102, 101].

Un factor causal de la producción de ICs, es la presencia de antígenos como los nucleosomas/DNA/CpG no metiladas que al ser reconocidas por el TLR9 disparan una *fuerte activación* de las clonas de LB autorreactivos. Por lo anterior, una condición permisiva de la formación de ICs es la activación de LB autorreactivos que eventualmente producirán autoanticuerpos. A su vez, los continuos y elevados niveles de anticuerpo/autoanticuerpo generan la formación de ICs. Eventualmente, este microambiente promueve la síntesis de IFN- γ y una respuesta efectora tipo “Th1” y la promoción de LB que producen primordialmente anticuerpos de de clase IgG2a e IgG3, cuya participación y presencia ha sido frecuentemente descrita en enfermedades por IC y condiciones autoinmunes [75]. Además, la propia presencia de ICs constituye una condición permisiva de la producción de los autoanticuerpos tipo factor reumatoide, es decir anticuerpos de clase IgM, IgA e IgG anti-Fc γ (IgG anti-Fc γ). La generación de estos anticuerpos puede deberse a que los ICs al ser procesados y presentados por las APCs activan una población de LT autorreactivos específicos a la región Fc γ [103].

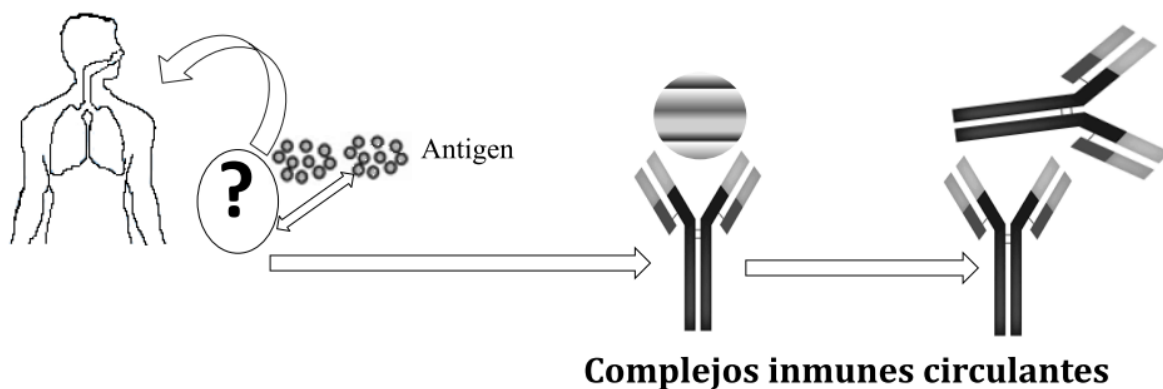


Figura E. Mecanismos de ruptura de tolerancia formación de complejos inmunes

AUTOANTICUERPOS

LB AUTORREACTIVOS

Los linfocitos B autorreactivos son una población celular que logró eludir los mecanismos de eliminación de la selección negativa, se estima que en circulación representa el N% [63]. En condiciones fisiológicas los LB autorreactivos con fenotipo CD5+ son productores de autoanticuerpos polirreactivos de clase IgM que reconocen PAMPs y autoantígenos [104, 105]. En el caso de los autoantígenos estos son eliminados mediante el sistema fagocito-monocito al transportarlos al bazo. Además se ha identificado mediante ensayos *in vitro* que la población de LB autorreactivos IgG+ de memoria provenientes de sujetos sanos producen autoanticuerpos polirreactivos específicos a insulina, LPS y (ANAs); cuya frecuencia es del 22.7% y es menor respecto a la producida (6.2%) por la población de LB autorreactivos naive [106].

Por otro lado, en diversas fisiopatologías (enfermedades malignas y enfermedades infecciosas) principalmente enfermedades autoinmunes y modelos experimentales se ha reportado la activación e incremento de LB autorreactivos. En este microambiente la población de LB autorreactivos cursan por una serie de procesos iniciando con el reconocimiento vía BCR de los autoantígenos, cambio de isotipo, hipermutación somática y maduración de la afinidad produciendo autoanticuerpos monorreactivos [63, 107].

Otra característica que podría permitir la identificación de LB autorreactivos es la presencia de receptores de sobrevida. Por ejemplo, en enfermedades autoinmunes como en el síndrome de Sjögren, lupus eritematoso sistémico y artritis reumatoide se han encontrado en suero altas concentraciones del ligando BAFF que es una proteína miembro de la superfamilia de TNF que favorece el incremento y activación de LB. En modelos experimentales han demostrado que BAFF tiene un papel más relevante en una etapa temprana de la ruptura de tolerancia que conlleva a la autoinmunidad. Mientras que posterior al cambio de isotipo, la interacción de LB con el LT es el factor relevante en la ruptura de tolerancia y no el incremento de BAFF [108, 109].

Por lo anterior, es factible identificar las subpoblaciones autorreactivas mediante la frecuencia de alguno de los tres receptores de BAFF (BR3, TACI y BCMA), la disminución en la frecuencia de receptores inhibitorios (CD22, CD32b) así como la sobreexpresión de receptores de activación (como CD19, CD40) presentes en los LB. Por ejemplo, en los modelos transgénicos AM14xMRL/lpr y AM14xAct1^{-/-} de artritis reumatoide se ha reportado que la población de LB

productoras de autoanticuerpos anti-nucleares y anti-Fc γ expresan un fenotipo CD22^{low}CD44^{low} y CD22^{low}CD44⁺CD138⁺ respectivamente [110].

Además, se ha demostrado que elementos del sistema inmune innato como el complemento participan en la ruptura de tolerancia de LB anérgicos [62]. Por ejemplo, en la cepa Ars1/A1 al ser estimulado con el complejo Ars-CCG-C3dg se activo la población de LB anérgico vía CD21. Descartándose el papel del complejo BCR porque no hay cambios en la expresión de CD19, lo que sugiere que no es necesaria la participación de LT para inducir ruptura de tolerancia en LB autorreactivos [96]. Sin embargo, como se demostró en el modelo TKO después del cambio de isotipo, la participación del LT en la ruptura de tolerancia y establecimiento de la autoinmunidad patológica es vital [111].

Formación de Autoanticuerpos

En diversos modelos autoinmunes y en pacientes, se ha descrito la presencia de autoanticuerpos los cuales suelen estar asociados al curso de una patología o incluso aparecer y/o incrementar su nivel previo al desarrollo de una enfermedad autoinmune. Además, es interesante que no solo durante el desarrollo de una enfermedad autoinmune se produzcan o se incremente el nivel de autoanticuerpos. Lo cual puede estar asociado a las diversas vías en las que se puede activar un población de LB autorreactivos como lo son: 1) la reacción cruzada inducida vía mimetismo molecular [98], 2) activación policlonal por agentes patógenos [112], 3) continua y elevada exposición de antígenos en circulación como cuando hay liberación de antígenos crípticos o de cuerpos apoptóticos y 4) aberraciones en los mecanismos encargados de establecer tolerancia central y periférica como la población de células T reguladoras [113].

En este sentido, los mecanismos mencionados pueden estar asociados a otro tipo de condiciones patológicas como infección, cáncer o una predisposición genética. Incluso la activación de una población de LB autorreactivos productores de autoanticuerpos naturales que eventualmente desarrollan hipermutación somática y afinidad de la maduración, no implica el establecimiento de una enfermedad autoinmune. Por ejemplo en el caso de la activación policlonal puede generarse la producción transitoria de diversos autoanticuerpos como IgG anti-Fc γ y anticuerpos reactivos a PAMPs. Para luego incrementarse la producción de un anticuerpo específico a un antígeno el cual mostrará un nivel más elevado y continuo respecto a IgG anti-Fc γ . Este tipo de comportamiento ha sido descrito en diversos estudios en los que posterior a la administración de vacunas como el toxoide tetánico se observó un desarrollo en la producción de autoanticuerpo anti-IgG [78, 79, 114]. De manera similar en modelos experimentales, se ha reportado que la administración de un antígeno

promueve la producción de autoanticuerpos. Por ejemplo, la administración de fosforilcolina en cepa BALB/c induce la producción transitoria de anticuerpo anti-dsDNA.

Por otro lado, los autoanticuerpos pueden ser un reflejo de la presencia e intensidad de una condición autoinmune u otra patología asociada a la producción de autoanticuerpos. Por lo tanto, los mecanismos y la cinética de los autoanticuerpos constituyen un marcador con un valor clínico que pueden ser usados para predecir el desarrollo de una enfermedad. En el caso de modelos experimentales y pacientes con una enfermedad establecida, los autoanticuerpos pueden constituir una herramienta para clasificar una enfermedad. En el caso de la anemia perniciosa la presencia de autoanticuerpos anti-H/K ATPasa puede ayudar a determinar si es una patología autoinmune o no autoinmune. En el caso de la artritis reumatoide en numerosos estudios se ha probado el valor predictivo de los autoanticuerpos anti-Fc γ , por ejemplo algunos reportes muestran la aparición de autoanticuerpos anti-citrulinados y de IgG anti-Fc γ , seis y cuatro años antes del comienzo de las manifestaciones clínicas [115–117].

Factor Reumatoide (autoanticuerpos anti-Fc γ)

En el periodo de 1940 a 1960 diversos estudios describieron un anticuerpo con la propiedad de reconocer los dominios γ_2 y γ_3 de la porción Fc de IgG. Previamente se había descrito que estos anticuerpos se encontraban en pacientes con cirrosis y bronquitis crónica. Pero estudios posteriores mostraron una asociación entre artritis reumatoide y la presencia de este autoanticuerpo, por ello a los anticuerpos con reactividad a la porción Fc γ (autoanticuerpos anti-Fc γ) se les denominó como factor reumatoide. Sin embargo, la presencia de este autoanticuerpo ha sido reportado en enfermedades autoinmunes, infecciones, condiciones malignas, administración de vacunas (efecto de adyuvante) (**Tabla I**) y en sujetos sanos, por lo que su función y participación en cualquiera de las condiciones mencionadas resulta complicado interpretar [95, 118, 119].

En este contexto, algunos estudios han señalado que la población de LB autorreactivos B1 con fenotipo CD5+, son los productores de los autoanticuerpos naturales anti-Fc γ de clase IgM, en condiciones fisiológicas presentan ligera reactividad a PAMPs y mediana a Fc γ , por ello son conocidos como autoanticuerpos polirreactivos. Por lo que se ha sugerido que contribuyen en la eliminación de agentes patógenos mediante el reconocimiento de PAMPs o bien que participan en la depuración de anticuerpos IgG participando en un proceso de homeostasis [120, 121].

Sin embargo, hay reportes que indican que el LB autorreactivo asociada a condiciones patológicas produce principalmente IgG anti-Fc γ (anticuerpo monorreactivo) y tiene un fenotipo CD5-. El

receptor CD5 está asociado a mecanismos de regulación negativa en LT como LB, esto sugiere dos opciones: la clona de LB CD5+, sufre una aberración disparando la producción de IgG anti-Fc γ y con ello el inicio de mecanismos autoinmunes o bien la población de LB autorreactiva asociada a condiciones patológicas tiene un fenotipo CD5- [68, 77, 121]. En este sentido, los modelos experimentales y las diferentes patologías indican que el surgimiento de una clona B autorreactiva y por ende la producción de autoanticuerpos anti-Fc γ puede ser potenciada por alguno de los procesos que mencionamos a continuación:

- 1) *Activación policlonal*, los LB autorreactivos productores de IgG anti-Fc γ pueden ser estimulados por el efecto mitógeno de los agentes infecciosos (EBV o de los adyuvantes después de su reconocimiento vía TLRs (TLR4, TLR9) al inducir una fuerte activación [93].
- 2) *Inducción de una respuesta específica a un neoantígeno* derivado de una modificación postransduccional a nivel de glicosacaridos en la región Fc γ . Por ejemplo, una deficiencia en el contenido de galactosa en el dominio C3, desencadena la formación de neoepitopes [100, 122, 123].
- 3) *Mimetismo anti-idiotipo*, se ha sugerido que los anticuerpos anti-Fc γ corresponden con la imagen interna de proteínas bacterianas y herpes virus. De tal manera que hay mimetismo en la región funcional al sitio de unión Fc γ [122]
- 4) *Reacción cruzada*, se observado una asociación entre la presencia de autoanticuerpos anti-Fc γ y previo a la respuesta humoral específica a un antígeno de un agente infeccioso [78].
- 5) *Formación de complejos inmunes circulantes*. Estudios han descrito que los productos finales de la glicación avanzada inducen su reconocimiento por anticuerpos y la eventual formación de complejos inmunes. Posterior a la formación de ICs, estos son procesados y presentados por las APCs a los LT autorreactivos [103, 122]. En este caso, las APCs presentan epitopes para la región Fc γ activando a la

En todos los mecanismos mencionados, hemos descrito que la activación de LB autorreactivos como un elemento fundamental para la producción de autoanticuerpos anti-Fc γ . Una vía que puede promover la producción de IgG anti-Fc γ tras a una exposición prolongada de los antígenos es la formación de ICs. Por ejemplo, en condiciones crónicas como la infección o bien la repetida exposición a un agente químico o condición ambiental se generan anticuerpos que reconocen a neoantígenos provenientes de cuerpos apoptóticos, células y tejidos dañados. Promoviendo la formación de ICs que son procesados por APCs y que asociado al transcurso del tiempo se

incrementa la probabilidad de que vía MHC se presenten epitopes específicos a LT autorreactivos, que eventualmente activaran LB productores de autoanticuerpos anti-IgG [57, 81, 103].

TABLA I. Factores asociados a la producción de autoanticuerpo IgG anti-Fcy

FACTOR ASOCIADO	CLASE DE AUTOANTICUERPO	MODELO EXPERIMENTAL	ENFERMEDAD	AUTOR/REFERENCIA
EBV	IgM	Pacientes	Mononucleosis	Henle, G., et al. 1979/(124)
DNA bacteriano metilado	IgG 2a ^a	Cepa transgénica AM14 RF		Leadbetter et al. 2002/(75)
LPS/Carbohidrato	IgM	Cepa C57/bl6	Enfermedad de Lyme	Kujala, G. A. et al. 1987/(125)
<i>Plasmodium berghei/falciparum</i>	IgM	Pacientes	Malaria	Hook, R. R. et al. 2003./ Sansan, H. 2016./(126)(127)
Alcoholismo	IgM/IgA	BALB/c	Alcoholismo	Nowak, U. et al. 2007.(128)
Tabaquismo	IgM-IgA	Pacientes	Tabaquismo	Masdottir, B. et al. 2000./(129)
Cáncer	IgM-IgA	Pacientes	Cáncer	Thorbjörn Jónsson, et al. 1991/(130)
Irradiación/quimioterapia	IgM	Pacientes	Cáncer de mama y pulmonar	Rossen, R. D. et al. 1976./(131)
Advanced glycation end product (pentosidine)	NM	Pacientes	Artritis reumatoide	Hein, Gert E. et al. 2005./(132)
Cambios en los patrones de glicosilación	NM	Pacientes	Artritis reumatoide	Goulabchand, R., T. et al. 2014/(133)
Galactosilación Hipogalactosilación Hiposialización				
Vacunas (como tetanos toxoide, viruela, tifoidea, difteria)	IgM	Pacientes		Symmons, D. P. et al.1993/(79)
Adyuvante (pristano, etc)	IgM, IgG			Israeli, E., N. et al.2009./(134)

*NM no mencionado/nefelometría

Autoinmunidad y Neumonitis por hipersensibilidad asociada al contacto con palomas

La neumonitis por hipersensibilidad es un síndrome inducido por la inhalación y subsecuente sensibilización a una gran variedad de antígenos provenientes de diversas fuentes como los sistemas de aire acondicionado, materiales mohosos, compostas, compuestos químicos presentes en aerosoles y complejos proteicos de origen animal [135]. En estas fuentes ha sido factible identificar a los agentes inductores como a) microorganismos patógenos *Saccharomonospora viridis*, *Thermoactinomyces spp*, *Mycobacterium avium*, etc., b) compuestos químicos como difenilmetano disocianato, c) como complejos proteicos provenientes del bagazo de caña/madera y d) complejos proteicos provenientes de los polvos de las excretas de paloma. Por lo tanto, la

neumonitis por hipersensibilidad comprende todo un grupo de enfermedades respiratorias y el nombre de la enfermedad está asociado al antígeno causal [136, 137]. Por ejemplo, en la enfermedad de los cuidadores de paloma (breeder's disease) los pacientes previamente inhalaban complejos proteicos provenientes de las heces de palomas, descamaciones y tejido sanguíneo [138, 139].

Respecto a los síntomas presentes en la neumonitis por hipersensibilidad se ha reportado la presencia de disnea, tos, dificultad respiratoria, defectos pulmonares localizados e infiltrados intersticiales causados por la acumulación de LT en los pulmones. De acuerdo a las características clínicas mencionadas la forma aguda, subaguda y crónica pueden estar asociadas con el tiempo de exposición y/o progresar a través de estas fases y finalmente culminar en fibrosis. En este sentido, hay controversias para poder distinguir la neumonitis por hipersensibilidad de los cuadros de fibrosis idiopática/neumonías intersticiales comunes (FI/NIC). Aunque, probablemente existe una diferencia entre los mecanismos moleculares y celulares que montan estas condiciones patológicas. Lo cual puede estar reflejado porque en el caso de la FI/NIC se emplean agentes antifibroticos para contrarrestar la fisiopatología. Mientras que en neumonitis por hipersensibilidad se emplean agentes inmunosupresores, la remoción del agente inductor mejora la condición del paciente y posterior al trasplante pulmonar hay un mejor pronóstico [137, 140]. En el contexto inmunológico se cree que al comienzo de la patología predominan las reacciones de hipersensibilidad III y IV lo que implica un complejo inflamatorio asociado a este síndrome. En el que hay citocinas proinflamatorias y un decrecimiento de los mecanismos de control de la respuesta inmune [140].

En la neumonitis por hipersensibilidad asociada al contacto con palomas se ha descrito la **forma aguda** en el que la exposición intermitente a los altos niveles del antígeno de paloma (heces, bloom y suero de paloma) probablemente comienzan la formación de depósitos de complejos inmunes. Con el posterior desarrollo de síntomas luego de 6 a 12 horas de exposición e inflamación peribronquiolar. En la **forma subaguda** la repetida exposición de bajos niveles de antígeno se caracteriza por el desarrollo de fiebre, disnea, fatiga y tos; son desarrollados en un rango de semanas a meses. Esta condición puede progresar una fibrosis parenquimatosa que una característica de la forma crónica. En la **forma crónica** la persistente exposición de antígenos que se encuentran en el polvo de las heces, proteínas del suero y epitelio de paloma producen fibrosis predominante en lóbulos superiores, formación de micronódulos, enfisema y en radiografía en los lóbulos pulmonares se observa "honeycombing" [140, 141].

Uno de los elementos de la respuesta inmune asociada al curso de la neumonitis por hipersensibilidad es la presencia de anticuerpos específicos a los antígenos causales. En el caso de

neumonitis por hipersensibilidad asociada al contacto con palomas hay reportes que indican que el 40% al 50% las personas expuestas al antígeno de paloma presentan una producción de anticuerpos específicos. Al respecto diversos grupos de investigación han identificado anticuerpos reactivos a complejos proteicos presentes en diversos extractos de heces fecales como la mucina, queratina presente en el bloom/descamaciones e inmunoglobulinas presentes en la yema de huevo, tejido sanguíneo y heces [142–144]. Es interesante que los individuos en contacto con antígeno de paloma presentan un incremento en la producción de anticuerpos reactivos a IgG (autoanticuerpos anti-Fc γ), lo cual puede estar asociado a un evento de reacción cruzada entre la inmunoglobulina IgY y la IgG de mamífero [145].

IgY

La IgY es una glicoproteína presente en yema de huevo, tejido sanguíneo y tejido linfóide de anfibios, reptiles y aves. La IgY pertenece a la familia de las superinmunoglobulinas fungiendo como receptor de LB (BCR) cuando se encuentra anclada a la membrana. Inicialmente se consideró que la IgY en su forma soluble al encontrarse en mayor concentración (5mg/ml) respecto a los anticuerpos aviarios de clase IgD, IgM (0.61mg/ml) e IgA (1.25mg/ml) en suero de las aves, correspondía a un homólogo de la inmunoglobulina mamífero de clase IgG (150 kDa). Además, la IgY (180-200 kDa), tiene función de anticuerpo y está formada por dos cadenas pesadas (cada una 65-68 kDa) y dos cadenas ligeras (cada una 25 kDa) [146, 147].

Sin embargo, la inmunoglobulina IgY presenta características estructurales que le confieren propiedades fisicoquímicas e inmunológicas diferentes a la IgG de mamíferos (**Tabla II y Figura F**). Una de las diferencias más importantes es que la IgY, no cuenta con un dominio extra Cv4 en la región Fc de inmunoglobulina y aunque presenta mayor flexibilidad en las interfaces de los dominios Cv1-Cv2 y Cv3-Cv4, no hay una región de bisagra como en el caso de inmunoglobulinas de clases IgD, IgA, e IgG. Lo anterior sugiere que hay una semejanza con los anticuerpos IgM e IgE de mamíferos, aunque una diferencia respecto a la IgM es que la IgY es producida en una respuesta secundaria. Estudios filogenéticos han sugerido que la IgY es un anticuerpo que evolutivamente precede a la IgG e IgE, siendo más cercana a esta última. En este sentido, la IgY al igual que la IgE participa en las reacciones anafilácticas [147, 148].

TABLA II. Comparación entre las inmunoglobulinas IgY, IgG e IgE

	IgG	IgE	IgY	IgY (ΔFc)
Especies	Mamíferos	Mamíferos	Aves, reptiles, anfibios, peces pulmonados	Aves anseriformes, anfibios, peces pulmonados
Peso molecular (kDa)	150	200	180	118
Peso de la cadena pesada (kDa)	50	75	68	
Punto isoelectrico	6.4-9.0	5.2-5.8	5.7-7.6	5.2-7.3
Coefficiente de extinción	1.40	1.62	1.36	1.38
Número de dominios C	4	4	3	2
Región de la bisagra	Si	No	Si	Si
Porcentaje de carbohidratos	2-4	12	4	0.6
Fuente	suero	suero	yema	yema
Concentración (mg/ml)	10-12	10 ⁻⁴	15-25	1-4 3-12
Unión al complemento	si	no	no	no
Unión a Factor reumatoide	si	no	no	no
Media anafilaxis	no	si	si	no
Unión a proteína A	si	no	no	no
Unión a proteína G	si	no	no	no
Estabilidad a temperaturas > 65°C	si	no	no	

[149]

La glicosilación es otra característica distintiva de la IgY, al igual que su homólogo IgG presenta sitios de glicosilación en los dominios CH3 y CH2. Sin embargo, diversos estudios han reportado que el patrón de N-glicosilación en la inmunoglobulina aviar es más análogo a la IgE, en el caso de la IgY de paloma se han identificado que las estructuras Gal α 1-4Gal. Además, se ha confirmado que los complejos tipo N-glicanos han confirmado que la IgY de gallina y la IgG de mamífero son más semejantes respecto al tipo de glicosilación en la IgY de paloma, porque no hay complejos triantennarios o ramas con β/α -galactosilación [150, 151]. Otra característica asociada al tipo de glicosilación de la IgY de paloma es que probablemente puede favorecer/promover su

reconocimiento por receptores de leucocitos. Además, en el caso de las aves se han identificado dos isoformas IgY e IgY(Δ Fc) identificado en patos, pero no en otras aves como gallinas, avestruz y paloma [152]. Por lo anterior es natural que haya inmunoglobulinas de clase IgY de especies que tengan una mayor capacidad inmunogénica, lo cual puede estar dado por características estructurales que cada una de las inmunoglobulinas aviarias han desarrollado [148, 150, 153, 154].

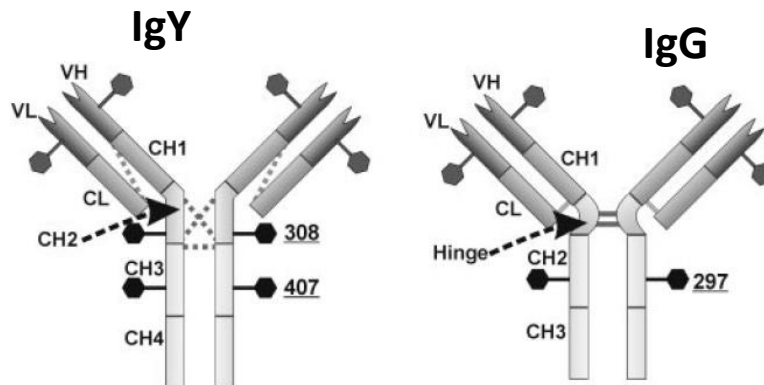


Figura F. Comparación entre IgY e IgG

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

En condiciones fisiológicas, de infección, malignas y autoinmunes se ha observado la presencia del autoanticuerpo IgG anti-Fc γ . Entre los mecanismos asociados a su producción se encuentran: 1) el mimetismo molecular, 2) la activación policlonal, 3) la liberación de antígenos crípticos, 4) formación de neoepitopes y 5) las aberraciones en los mecanismos de tolerancia. Igualmente su aparición ha sido descrita en diversos modelos experimentales. Sin embargo, no ha sido identificado el agente inductor de la producción de este autoanticuerpo.

En el caso de neumonitis por hipersensibilidad asociada a la exposición con palomas, se ha reportado la presencia de diversos anticuerpos específicos a glicoproteínas presentes en ambientes que contienen “polvo” con excretas, bloom y suero de paloma. De manera interesante, se ha reportado que la IgG anti-Fc γ es uno de los anticuerpos que se incrementa en esta patología asociada a la exposición de palomas. Sin embargo, se desconoce el antígeno específico que activa la población de células B autorreactivas productoras de IgG anti-Fc γ . Dado que el blanco del autoanticuerpo es la Fc γ de inmunoglobulina, es probable que la inmunoglobulina IgY al presentar una similitud estructural y encontrarse en las diversas fuentes que constituyen al “polvo” contaminado; sea el factor desencadenante de la activación de LB autorreactivos.

Además, en neumonitis por hipersensibilidad que se caracteriza por presentar una exacerbada respuesta inmune se ha identificado la alteración de la función y disminución de la frecuencia de la células T reguladoras (Treg CD4+CD25+Foxp3+). Sin embargo, en neumonitis por hipersensibilidad asociada a la paloma no se conoce con precisión el papel de las Treg y su asociación con la producción del autoanticuerpo IgG anti-Fcγ.

Por ello, en este estudio se pretende diseñar un modelo experimental en la cepa murina BALB/c en el que se evaluará la capacidad inmunogénica de la IgY de paloma para inducir la ruptura de tolerancia a la región Fcγ y su asociación con la frecuencia de la población de células Treg.

Con el desarrollo de nuestro modelo de producción de autoanticuerpo IgG anti-Fcγ será viable estudiar las células participantes y los mecanismos implicados en la ruptura de tolerancia a la región Fcγ de inmunoglobulina. En el caso particular de la neumonitis por hipersensibilidad asociada a la exposición por palomas, se abrirá un nuevo campo en el que podrá analizarse la respuesta humoral autorreactiva y su correlación con la fisiopatología. Por ejemplo, se podría evaluar si la producción de las clases de autoanticuerpos reflejan el curso de la enfermedad e igualmente se podrían diseñar terapias inmunológicas al conocer que células presentan anomalías y/o realizar inoculación de poblaciones de células reguladoras específicas que puedan subsanar la patología.

HIPOTESIS

La respuesta inmune contra IgY de paloma inducirá ruptura de tolerancia a la fracción Fcγ en ratón BALB/c, induciendo la producción de los autoanticuerpos anti-Fcγ.

OBJETIVO GENERAL

- Establecer un modelo murino en la cepa BALB/c donde se induce ruptura de tolerancia a la región Fcγ de IgG, mediante la inmunización con IgY de paloma.

OBJETIVOS SECUNDARIOS

- Evaluar la cinética de producción de anticuerpo reactivo a IgY y reactivo a Fcγ.
- Determinar la proporción de células Treg en la fase de mayor producción, mayor afinidad y de descenso de Ac anti-Fc, y establecer la correlación entre estas variables.
- Corroborar mediante un ensayo de depleción empleando el anticuerpo monoclonal anti-CD25 que la disminución en el nivel de autoanticuerpo anti-Fcγ está asociado con la población de células Treg.

METODOLOGÍA

Purificación y análisis de IgY

Mediante el kit comercial basado en un método de deslipidación y precipitación (Pierce™ Chicken IgY Purification Kit; No. 44918 Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA) se purificó el antígeno IgY a partir de yema de huevos de paloma (*Columba livia*) que fueron donados por el Departamento de Reproducción de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM. Su concentración se evaluó mediante un kit basado en el método de Lowry (DC Protein Assay Bio-Rad; 500-0114, Life Science Research, Hercules, CA, USA.). En el cual se utilizó como curva patrón albumina bovina fracción V (Sigma-aldrich catalog No. S5512, Saint Louis, MO, USA.) y se realizó la lectura con una absorbancia de 620nm en el espectrofotómetro (Multiskan Labsystem). La identificación y homogeneidad del antígeno IgY se realizó por SDS-PAGE. Las condiciones de corrido fueron 100V, 80mA durante 2.5 horas; los geles fueron teñidos en azul de Coomassie. Se analizó la IgY por electroforesis de minigel de poliacrilamida al 12% bajo condiciones no reductoras y reductoras.

Esquema de inmunización en murinos BALB/c

Murinos de la cepa BALB/c con una edad 4-6 semanas y un peso de 18 a 20 mg fueron proporcionados por el bioterio del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) y mantenidos en condiciones de barrera. Todos los procedimientos, fueron realizados de acuerdo a los protocolos aprobados por el Comité de Bioética del INER. Se emplearon tres esquemas de inmunización:

Esquema de inmunización intra-traqueal

Cada murino fue anestesiado vía inhalatoria con sevoflurano (Sevorane 4458; Pisa). Posteriormente vía intra-traqueal mediante una cánula a los ratones del grupo experimental (n=4) se le administró 10 µg del antígeno IgY en un volumen de 100 µl de solución salina. En el caso del grupo control únicamente se administró 100 µl de solución salina. El grupo experimental y control fueron tratados semanalmente como se describió hasta la última fase del estudio en la semana 22 y en la siguiente semana se realizó el sacrificio. Previo a la inmunización intra-traqueal se punzo un fragmento de la cola, enseguida se colecto la muestra sanguínea que fue tratada con 12.5 µl anticoagulante EDTA (22.5 µg/µl) y se almaceno el plasma a -20°C hasta su uso.



Esquema Intratraqueal

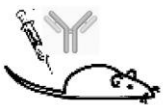


Día	semanas																						
0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
Inmunización vía intra-traqueal con IgY paloma (25µg/25 µl solución salina)																						Los ratones fueron sacrificados y la sangre fue colectada	

FIGURA 1A. Esquema de inmunización intratraqueal. Administración semanal del antígeno IgY de paloma durante 22 semanas en un grupo murino de la cepa BALB/c (n=4).

Esquema subcutáneo A de inmunización

Semanalmente el antígeno IgY fue administrado vía subcutánea en la región dorsal de cada individuo del grupo experimental (n=4) hasta la última fase del estudio en la semana 22 y en la siguiente semana se realizó el sacrificio. En la primera inmunización se administraron 50µg de IgY emulsificados en adyuvante completo de Freund y 25µg de IgY emulsificados en adyuvante incompleto de Freund para las siguientes inmunizaciones. En el caso del grupo control (n=4) estos fueron tratados con PBS (Figura 1B). Todas las inmunizaciones fueron realizadas con adyuvante completo de Freud en la primera inmunización y las subsecuentes con adyuvante incompleto de Freud. Previo a cada inmunización de cada individuo del grupo experimental y grupo control, se realizó la punción de un fragmento menor a 5mm de la cola y obtuvo la muestra sanguínea que fue tratada con anticoagulante EDTA para obtener el plasma que fue almacenado a -20°C hasta su uso.



Esquema A



Día 0	semanas																						
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
Inmunización IgY paloma (50µg/50 µl PBS) + Adyuvante complete de Freud 50µl	Cada semana los ratones fueron sangrados de la cola y posteriormente inmunizados con IgY (25 µg/50 µl PBS) + 50µl adyuvante incompleto de Freund																						Los ratones fueron sacrificados y la sangre fue colectada

FIGURA 1B. Esquema subcutáneo A de inmunización. Administración subcutánea semanal del antígeno IgY de paloma durante 22 semanas en un grupo murino de la cepa BALB/c (n=4).

Esquema subcutánea B de inmunización

En este esquema (Figura 1C), el antígeno IgY fue administrado semanalmente vía subcutánea en la región dorsal a cada uno de los ratones del grupo experimental (n=30). En las semanas 2, 4, 12, 16, 18 y 23; 4 a 6 ratones fueron sacrificados para obtener el plasma y el bazo. Para la primera inmunización 50 µg de IgY fueron emulsificados con adyuvante completo de Freund (50µl:50µl), en la segunda y tercera inmunización se emplearon 25 µg de IgY emulsificado, en las subsecuentes inmunizaciones se administró IgY sin emulsificar. Para el grupo control (n=30) se administró PBS emulsificado con adyuvante completo de Freund, para la segunda y tercera administración el PBS fue emulsificado con adyuvante incompleto de Freund y para el resto de las inmunizaciones solo se administraron 100µl de PBS.

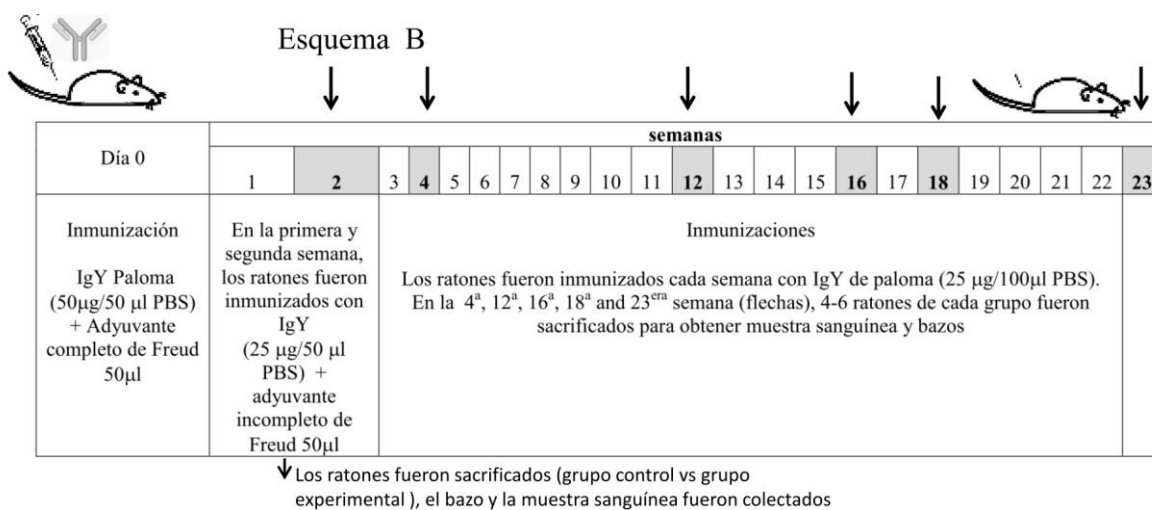


FIGURA 1C. Esquema subcutáneo B de inmunización. Administración subcutánea semanal del antígeno IgY de paloma durante 22 semanas en un grupo murino de la cepa BALB/c (n=4-6).

Depleción con anticuerpo monoclonal anti-CD25

Se delecto parcialmente la población de células Treg en ratones de la cepa BALB/c del grupo experimental (n=15) y el grupo control (n=15) que fueron tratados de acuerdo al esquema de inmunización B (Figura 1D). Durante las semanas 7, 11 y 16 posterior al inicio de la inmunización con IgY, a 5 ratones de cada grupo se les administró vía intra-peritoneal 200 µg del anticuerpo monoclonal anti-CD25 (PC61; LEAF™Biolegend Catalog 102031). La administración del anticuerpo anti-CD25 se realizó dos días después de la inmunización correspondiente con IgY (semana 7, día 51; semana 11, día 79 y semana 16, día 114). Se obtuvo el plasma por amputación de

un fragmento menor a 0.5mm de la cola del ratón en la semana correspondiente de inmunización con IgY (semana 7, 11 y 16) y en los días 4, 7 y 10 posterior a la administración del anticuerpo anti-CD25. La depleción fue confirmada por citometría de flujo en el día 10 posterior al inicio del tratamiento con el anticuerpo anti-CD25, mediante el análisis de la población de células CD4+CD25+ provenientes del bazo [10-12].

Para realizar un análisis comparativo, paralelamente ratones de la cepa Balb/c fueron tratados de acuerdo al esquema de inmunización B pero sin el tratamiento de depleción con el anticuerpo anti-CD25, el cual constó de un grupo experimental (n=15) y un grupo control (n=15). Igualmente se obtuvo el plasma y se sacrificaron 5 ratones de cada grupo, en los mismos tiempos en que se realizó la extracción del grupo experimental y control que recibió el tratamiento de depleción con el anticuerpo monoclonal anti-CD25.

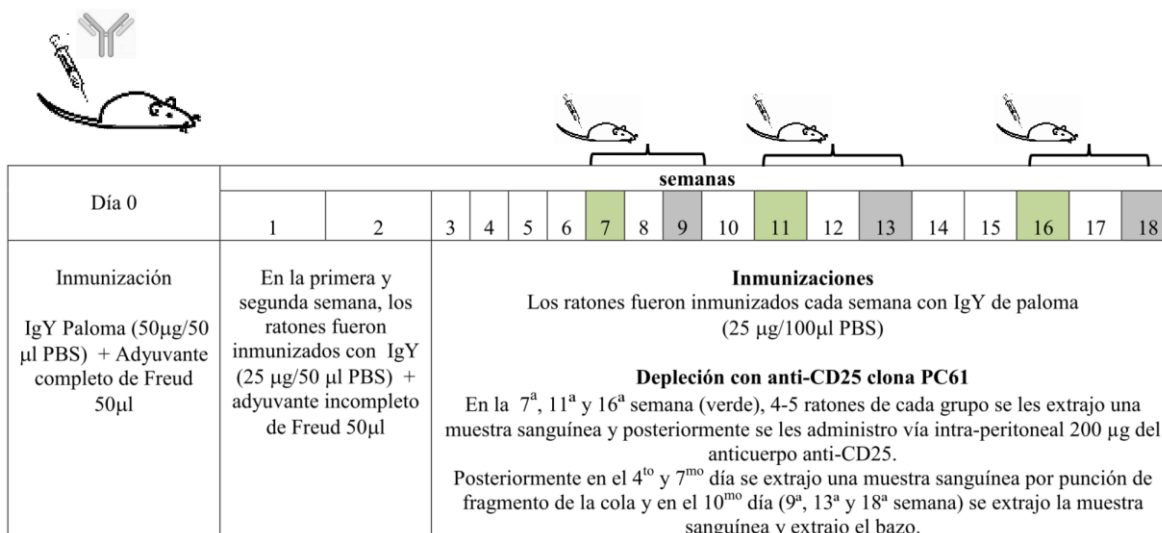


FIGURA 1D. Ensayo de depleción mediante anticuerpo monoclonal anti-CD25 clona PC61, bajo el esquema subcutáneo B de inmunización. Administración subcutánea semanal del antígeno IgY de paloma en tres grupos murinos de la cepa BALB/c (n=4-5). Empleados para analizar el nivel de IgG anti-Fcy y la frecuencia de células CD4+CD25+Foxp3+. Eventualmente se comparó con un grupo inmunizado bajo el esquema B subcutáneo sin depleción y con dos grupos control con y sin tratamiento de depleción.

OBTENCIÓN DE PLASMA

La obtención de plasma se realiza por amputación de un fragmento menor a 0.5mm de la cola del ratón, obteniendo aproximadamente de 50 a 100 µl de sangre, se adiciona 12.5 ml de una solución de EDTA (22.5 µg/µl) y se homogeniza suavemente y centrifuga a 4 000 rpm durante 15 minutos a 20°C. Se colecta el plasma y almacena a -20°C hasta su uso.

ELISA

Identificación de anticuerpos IgM e IgG anti-IgY y anti-Fc γ

Se identificaron anticuerpos reactivos a IgY mediante la incubación de la IgY de paloma en una placa de poliestireno de 96 pozos (Thermo Fisher Scientific; Pierce™ 8-Well Polystyrene Strip Plates, Rockford, IL, USA, USA), mientras que en la identificación de los anticuerpos anti-Fc γ la placa de poliestireno fue incubada con Fc γ murino (Jackson ImmunoResearch; ChromPure Mouse IgG Fc; 015-000-008 West Grove, PA, USA). En ambos casos, el antígeno fue incubado en una concentración de 5 μ g/ml en 100 μ l de buffer de carbonatos (pH=9.6, 0.05M) por tres horas a 37°C en agitación. Luego, se lavó con PBS-Tween 0.05% pH 7.2 (PBS-T) y bloqueó con PBS-T-albúmina 3% (albúmina bovina fracción V, BSA; Sigma) por 2 horas a 37°C en agitación suave. Posteriormente se incubó 100 μ l del plasma en PBS-T-BSA 3%, por 1 hora (dilución 1:50 para identificar anti-Fc γ , y dilución 1:6400 para identificar anti-IgY). Después se procedió a incubar por 1 hora con 100 μ l de la fracción F(ab')₂ de cabra anti-IgG de ratón biotilado (Jackson ImmunoResearch; catalog No. 115-066-072, West Grove, PA, USA.) en una dilución 1:30 000, enseguida se incubó con estreptoavidina peroxidasa en una dilución 1:10 000 (Sigma-Aldrich S5512 Saint Louis, MO, USA.). Posterior a cada lavado se realizaron 3 lavados con PBS-T. Se adicionó revelador (Sigma-Aldrich; catalog No. P5412, Saint Louis, MO, USA.), y se detuvo la reacción posterior a 12 minutos.

Identificación de Treg

En el sacrificio se extrajo el bazo, enseguida se homogenizaron las células en RPMI 5% SFB, se tamizaron (mesh nylon strainer 70 μ m Becton Dickinson) y aislaron de eritrocitos y detrito celular mediante buffer de lisis y gradiente de densidad por centrifugación (Lymphoprep™ axis-shield Prod. No. 1114547, Oslo, Norway.). Las células mononucleares fueron teñidas con el kit de detección de células Treg (MACS Miltenyi Biotec 130-094-164, Auburn, Ca, USA.). La tinción fue realizada con anticuerpos anti-CD4 conjugados con FITC y anti-CD25 conjugado con PE por 10 minutos a 4°C. Después de esto, las células fueron lavadas usando Buffer FACS y permeabilizadas por 30 minutos antes de la tinción intracelular con anti-Foxp3 conjugado con APC por 15 minutos a 4°C. Se adquirieron 100, 000 eventos mediante el citómetro FACSAria II en la Unidad de Citometría de Flujo del INER. Se identificó la población de células mononucleares al seleccionar una región que comprendió entre 80,000 a 85,000 eventos y analizo la población de células CD4+CD25+Foxp3+ mediante el software FlowJo 7.2. Este procedimiento se utilizó para

identificar la población de células Treg en las semanas 2, 4, 12, 16, 18 y 23; posteriores al inicio de la inmunización con IgY.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los análisis estadísticos fueron realizados usando el software Prism (GraphPad Software, San Diego, CA). Se empleó la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney. Un valor de $p \leq 0.05$ fue considerado como significativo. Los datos son presentados con medianas e intervalos de confianza 95%.

RESULTADOS

Caracterización de la IgY

La inmunoglobulina IgY fue aislada de yema de huevo de paloma mediante un proceso de deslipidación y precipitación. Se procedió a cuantificar la concentración de la inmunoglobulina y en todos lotes utilizados la concentración fue de 8 a 10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ por un volumen de 20 a 25 ml de yema de huevo de paloma. Se realizó una estimación de la pureza mediante electroforesis en condiciones nativas en gel de acrilamida donde no se observó degradación de la inmunoglobulina IgY. En condiciones reductoras se observaron dos bandas (Figura 2A), una con un peso de 70 kDa y la segunda con un peso de 25 kDa, las cuales corresponden con el peso de las cadenas pesadas y ligeras de la inmunoglobulina IgY.

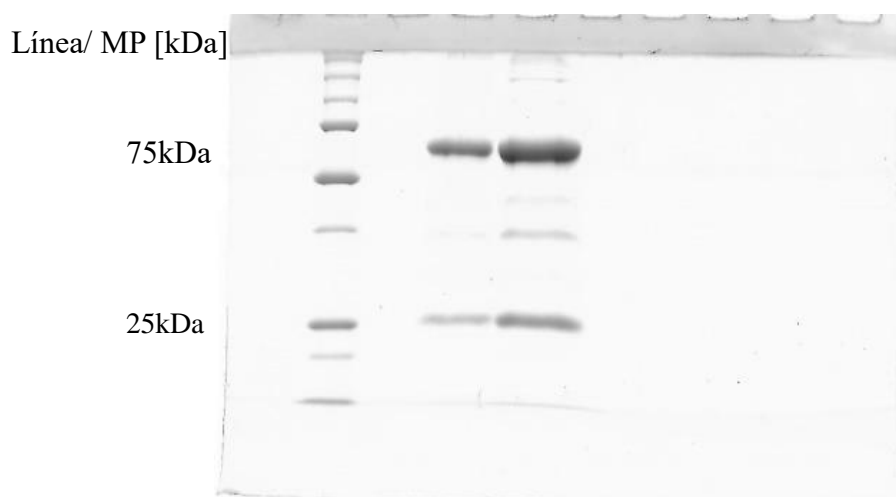


Figura 2A. Purificación de IgY de paloma (A) SDS-PAGE (condiciones reductoras) de IgY de paloma proveniente de yema de huevo. Línea 2: Marcador de peso molecular, Línea 4 and 5: IgY purificada (5 μg and 10 μg respectivamente).

Producción de anticuerpos anti-IgY en cepa BALB/c inmunizados intra-traquealmente

En la primera aproximación para desarrollar un modelo de producción de autoanticuerpos anti-Fc γ , en condiciones similares a neumonitis por hipersensibilidad asociada a la exposición del antígeno de paloma, se administró intra-traquealmente IgY de paloma. En este esquema a partir de la 5^a semana la producción de anticuerpo IgG anti-IgY mostró un incremento constante por 14 semanas, posteriormente durante 3 semanas el nivel de IgG anti-IgY disminuyó y volvió a incrementarse gradualmente en la 17 semana manteniéndose la máxima producción del anticuerpo por 6 semanas de manera relativamente constante (Figura 3A).

En cambio, cuando el suero de este mismo grupo de ratones inmunizados con IgY fue utilizado para identificar autoanticuerpos anti-Fc γ (IgG anti-Fc γ) hubo un ligero incremento en la producción de IgG anti-Fc γ en la 7 semana y el nivel de autoanticuerpo anti-Fc γ presentó valores similares durante 10 semanas. Después de este punto, la producción de IgG anti-Fc γ mostró una disminución y presentó niveles similares a las primeras 4 semanas de inmunización. Aunque, se observó un ligero incremento en la producción del autoanticuerpo las diferencias no fueron significativas (Figura 3B).

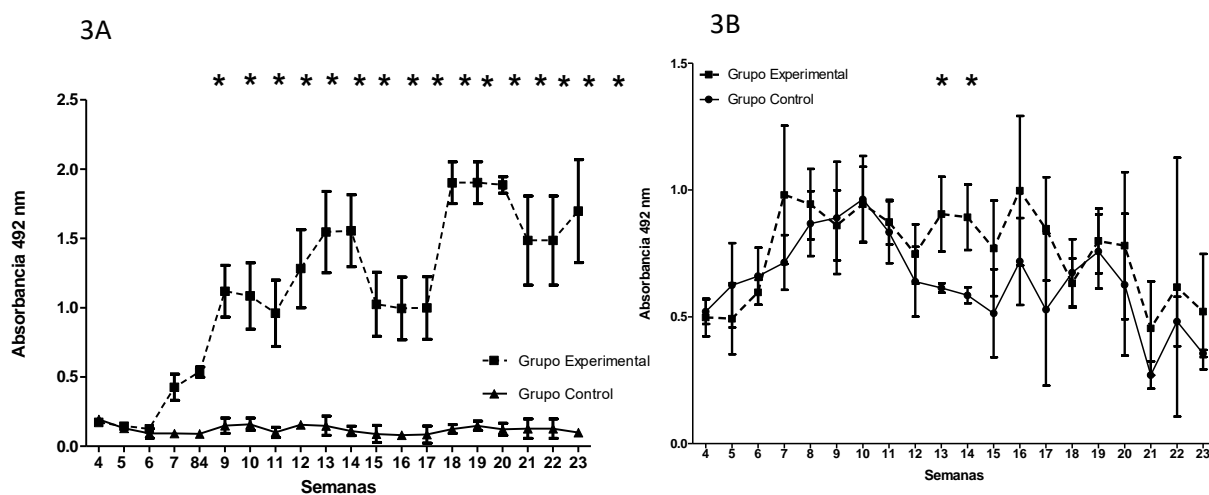


Figura 3. Cinética de la producción de anticuerpos en cepa murina BALB/c inmunizada de acuerdo al esquema A de inmunización.. 3A) La producción de IgG anti-IgY y los 3B) autoanticuerpos IgG anti-Fc γ fueron evaluados mediante ELISA. Las medianas son mostradas con el intervalo de confianza al 95% (n=4). Los análisis estadísticos fueron realizados usando la prueba no paramétrica U de Mann Whitney, dos colas. *p<0.05

Respuesta humoral en cepa BALB/c tratados con el esquema A de inmunización subcutánea

Paralelamente un grupo de ratones fueron inmunizados subcutáneamente ya que esta vía constituye una forma efectiva para inducir una respuesta humoral. De esta manera se utilizó una metodología que permitió una mejor aproximación para evaluar la capacidad de la IgY para inducir una respuesta humoral autorreactiva. Por ello utilizamos el esquema A de inmunización, en este la producción de anticuerpo IgG anti-IgY fue significativa ($p < 0.03$) se incrementó gradualmente hasta la 9 semana, durante las siguientes 6 semanas el nivel de IgG anti-IgY presento valores similares. Posteriormente, en la semana 14 hubo descenso de IgG anti-IgY manteniéndose estos niveles por 3 semanas, después de este periodo la producción de IgG anti-IgY se incrementó gradualmente manteniendo este comportamiento hasta la fase final del estudio (Figura 4A).

Respecto a la producción de autoanticuerpo IgG anti-Fc γ , el grupo control mostró un mayor nivel de IgG anti-Fc γ respecto a los niveles de anticuerpo anti-IgY. En el grupo experimental después de la 4ª semana, la producción de autoanticuerpo se incrementó durante 7 semanas a partir de este punto se observó la fase de meseta que se prolongó hasta la semana 18, comenzando con la fase de declinación del nivel de IgG anti-Fc γ (Figura 4B).

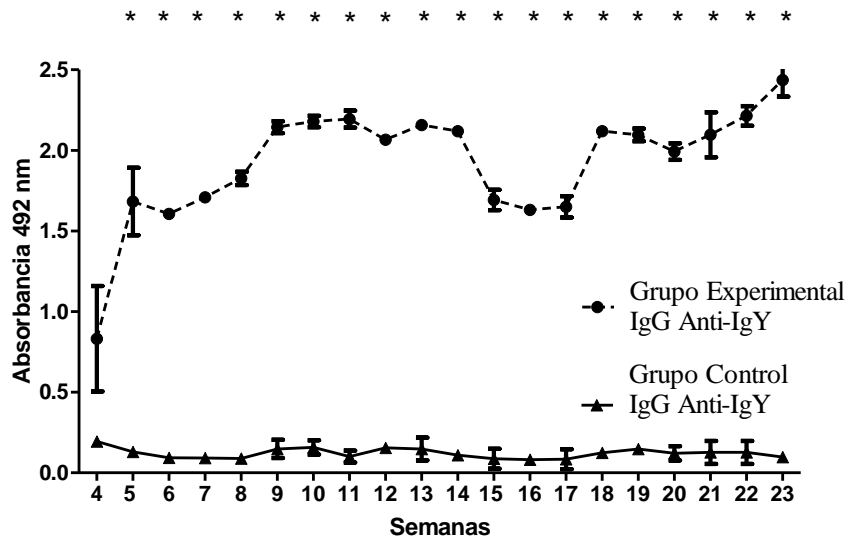


Figura 4A. Cinética de la producción de anticuerpos en cepa murina BALB/c inmunizada de acuerdo al esquema A. La producción de IgG anti-IgY fue evaluado mediante ELISA. Las medianas son mostradas con el intervalo de confianza al 95% (n=4). Los análisis estadísticos fueron realizados usando la prueba no paramétrica U de Mann Whitney, dos colas. * $p < 0.003$, ($p = 0.0286$).

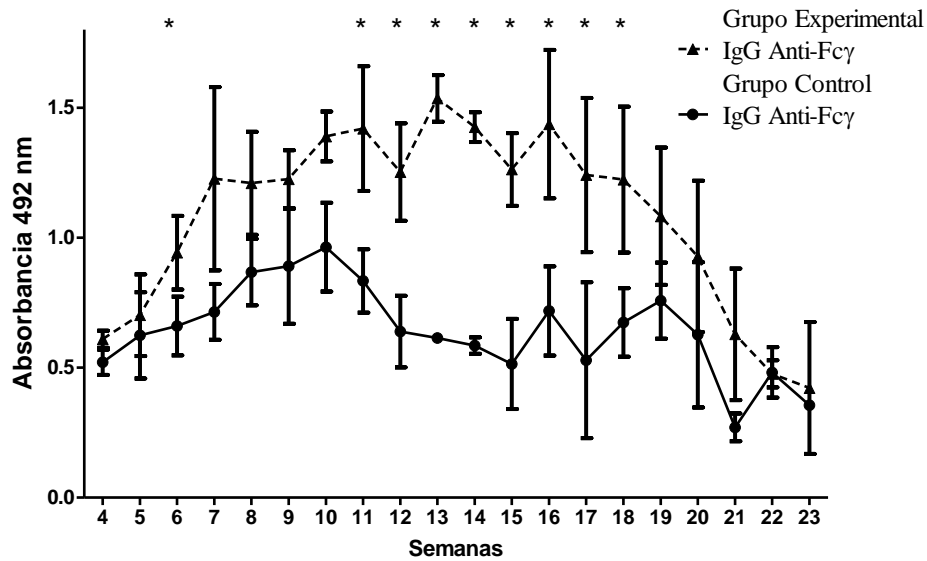


Figura 4B. Administración semanal de IgY con adyuvante promueve la producción de IgG anti-Fc γ . La producción de autoanticuerpos IgG anti-Fc γ fueron evaluados mediante ELISA. Las medianas son mostradas con el intervalo de confianza al 95% (n=4). Los análisis estadísticos fueron realizados usando la prueba no paramétrica U de Mann Whitney, dos colas. *p<0.003, p=0.0286.

Respuesta humoral en cepa BALB/c tratados con el esquema B de inmunización subcutánea.

Anticuerpos IgG

Con el esquema de inmunización A, en el que se administró semanalmente IgY emulsificado en adyuvante incompleto; se indujo producción de autoanticuerpos anti-Fc γ . Sin embargo, estudios han reportado que diversos adyuvantes tienen la capacidad de producir un incremento en el nivel de autoanticuerpos. Para descartar el efecto del continuo uso del adyuvante incompleto, se evaluó la producción de anticuerpos anti-Fc γ bajo el esquema de inmunización B en el que se utilizó adyuvante de Freund solo en las 3 primeras inmunizaciones. En el esquema B, se observó que la producción de anticuerpo IgG anti-IgY (Figura 1C) después de la 2^a semana de inmunización se incrementó y alcanza la fase de la meseta en la 4^a semana, esta fase presentó valores relativamente similares durante 14 semanas. Durante la semana 18 de iniciada la administración de IgY, el nivel de IgG anti-IgY disminuyó ligeramente hasta la semana 23 pero mantuvo la diferencia significativa respecto al grupo control (p<0.0320) (Figura 5A).

Respecto a los niveles de IgG anti-Fc γ en plasma, se encontró un ligero incremento gradual de la segunda hasta la semana 16 de iniciado el esquema de inmunización B, justamente a partir de este punto el nivel del autoanticuerpo IgG anti-Fc γ fue significativo (p<0.0320) respecto al grupo

control y alcanzó la máxima producción en la semana 18 ($p < 0.0320$). Posterior a este punto hubo un descenso en el nivel de IgG anti-Fc γ hasta la semana 23 pero conservando la diferencia significativa respecto al grupo control ($p < 0.0096$) (Figura 5B).

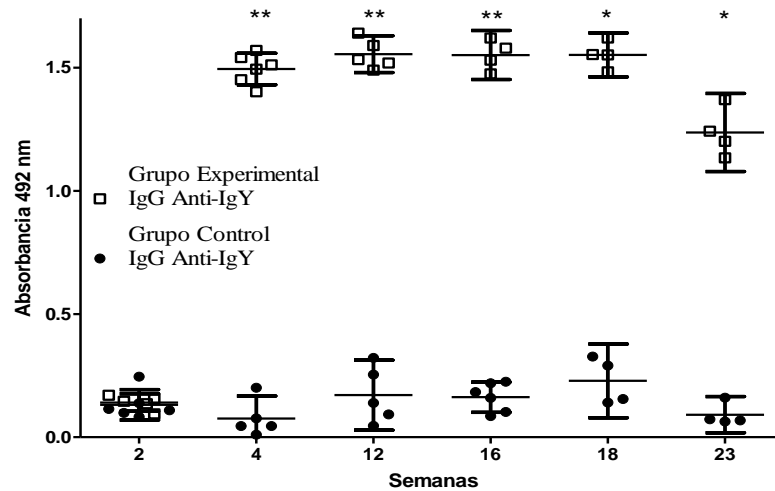


Figura 5A. Cinética de la producción de anticuerpos en cepa murina BALB/c inmunizada de acuerdo al esquema A. La producción de autoanticuerpos IgG anti-IgY fueron evaluados mediante ELISA. Las medianas son mostradas con el intervalo de confianza al 95% ($n=4$). Los análisis estadísticos fueron realizados usando la prueba no paramétrica U de Mann Whitney, dos colas. * $p < 0.003$, $p=0.0286$.

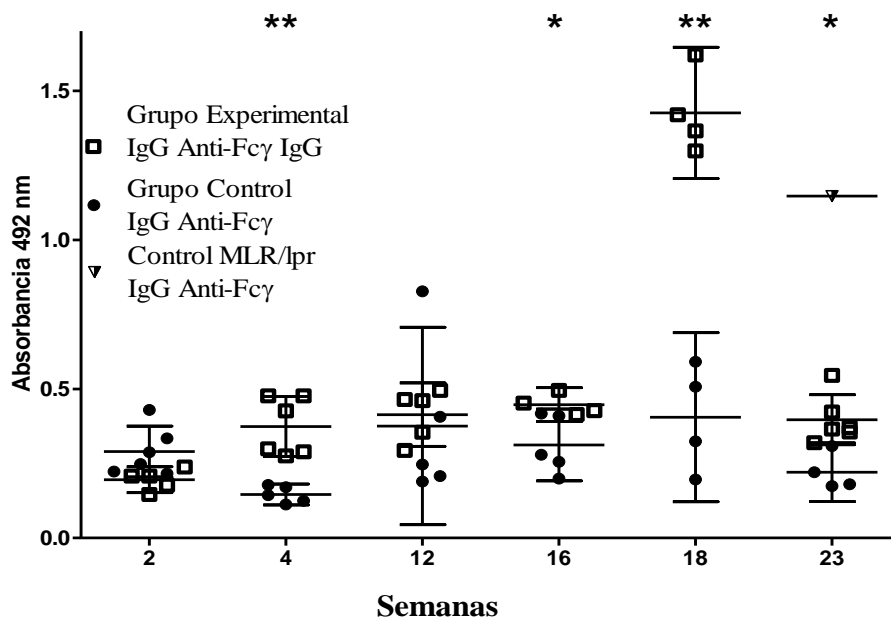


Figura 5B. Administración semanal de IgY promueve la producción de IgG anti-Fc γ . La producción de autoanticuerpos IgG anti-Fc γ fueron evaluados mediante ELISA. Las medianas son mostradas con el intervalo de confianza al 95% ($n=4-6$). Los análisis estadísticos fueron realizados usando la prueba no paramétrica U de Mann Whitney, dos colas. * $p < 0.003$, $p=0.0286$.

Anticuerpo IgM

En el grupo murino inmunizado con el esquema A se determinó el nivel de IgM anti-Fc γ en plasma el cual presentó un incremento del autoanticuerpo desde la primera semana de iniciada la inmunización continuando con este comportamiento hasta alcanzar el máximo nivel de IgM anti-Fc γ en la 5 semana, a partir de este punto la producción del autoanticuerpo declino hasta no mostrar una diferencia significativa respecto al grupo control (Figura 6A).

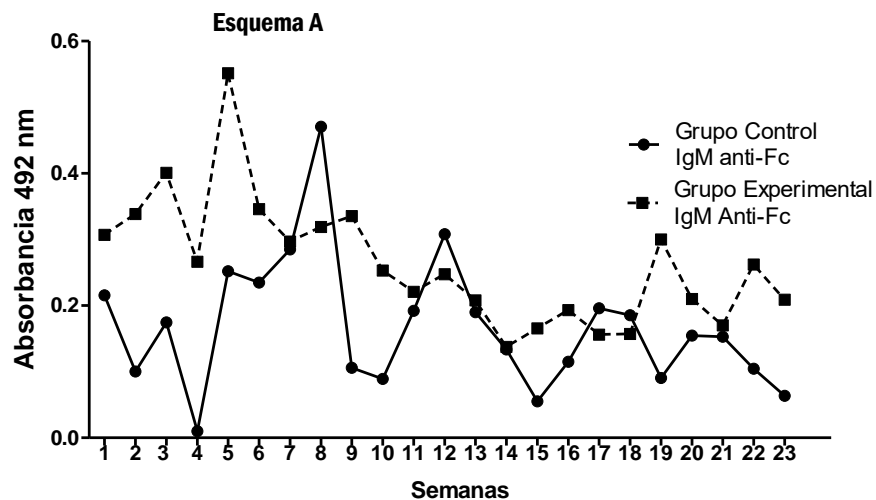


Figura 6A. Cinética de la producción de anticuerpos en cepa murina BALB/c inmunizada de acuerdo al esquema A. La producción de autoanticuerpos IgM anti-Fc γ fueron evaluados mediante ELISA. Los análisis estadísticos fueron realizados usando la prueba no paramétrica U de Mann Whitney, dos colas (n=4). *p<0.003, p=0.0286.

Por otro lado, en el grupo murino inmunizado con el esquema B el nivel de IgM anti-Fc γ mostró valores similares al grupo control, fue hasta la semana 16 que hubo un incremento en la producción del autoanticuerpo, alcanzando la máxima producción en la semana 18 para finalmente descender en la semana 23. Sin embargo, en ninguno de los seis puntos evaluados la diferencia fue significativa (Figura 6B).

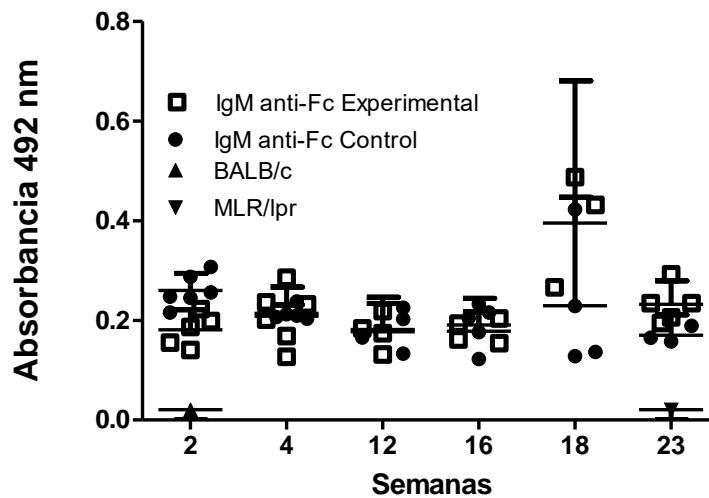


Figura 6B. Cinética de la producción de anticuerpos en cepa murina BALB/c inmunizada de acuerdo al esquema B. La producción de autoanticuerpos IgM anti-Fcγ fueron evaluados mediante ELISA. Las medianas son mostradas con el intervalo de confianza al 95% (n=4-6). Los análisis estadísticos fueron realizados usando la prueba no paramétrica U de Mann Whitney, dos colas.

Respecto a la producción de anticuerpo IgM anti-IgY el grupo inmunizado con el esquema B no presento una diferencia con el grupo control en ningún punto evaluado.

Participación de las células T reguladoras en murinos BALB/c inmunizados con IgY de paloma

Para conocer si la población de células Treg está asociado a la disminución autoanticuerpos IgG anti-Fcγ, evaluamos la proporción de la población de células T reguladoras (CD4+CD25+Foxp3+) del bazo en el grupo de ratones tratados con el esquema B de inmunización.

Proporción de células CD4+

Se observaron fluctuaciones en la frecuencia de la población CD4+ a lo largo de la fase de estudio. Sin embargo, la frecuencia del grupo control y experimental mostraron valores similares que estuvieron comprendidos dentro del rango normal (grupo experimental 22.24, CI=17.66-30.21; grupo control 26.16, CI= 18.31-33.07). Aunque, el grupo experimental (20.90, CI= 18.18-26.30) posterior a la 2ª semana de inmunización presento una ligera disminución durante 14 semanas, que significo el 1.1 % en la semana 16 (19.80%, CI= 14.81-22.39), y del 10% respecto al grupo control

pareado (29.80%, CI= 18.77- 35.35) ($p=0.0556$), posterior a este punto hubo incremento en la población CD4+ del grupo experimental con valores muy similares al grupo control (Figura 7).

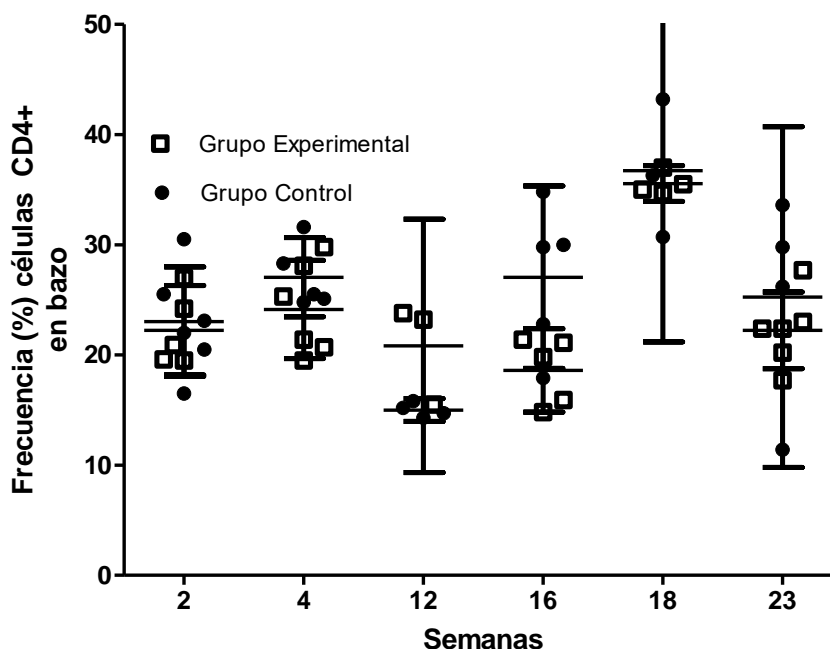


Figura 7. Frecuencia de la población de células CD4+ en bazo. La frecuencia de la población de células CD4+ mostró una fluctuación a lo largo de la fase de estudio, pero siempre con valores dentro del rango normal. Las medianas son mostradas con el intervalo de confianza al 95% ($n=4-6$). Los análisis estadísticos fueron realizados usando la prueba no paramétrica U de Mann Whitney, dos colas.

Proporción de células CD8+

La frecuencia de la población de células CD8+ presentó fluctuaciones durante toda la fase de estudio (grupo experimental 4.708%, CI= 3.246-7.185; grupo control 5.677%, CI=3.721-7.633), la mayor diferencia se registró durante la 4ª semana en el que la población CD8+ fue mayor en el grupo control ($p=0.0173$). Sin embargo, a excepción de este punto el comportamiento en la frecuencia de la población CD8+ entre el grupo experimental y control fue semejante. En ambos grupos a partir de la semana 16 se incrementó ligeramente la proporción de la población CD8+ (Figura 8).

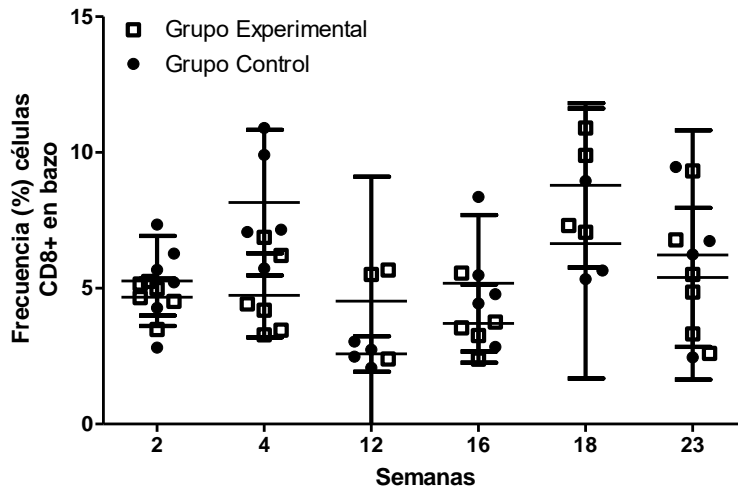


Figura 8. Frecuencia de la población de células CD8+ en bazo. La frecuencia de la población de células CD8+ mostró una fluctuación a lo largo de la fase de estudio, pero siempre con valores dentro del rango normal. Las medianas son mostradas con el intervalo de confianza al 95% (n=4-6). Los análisis estadísticos fueron realizados usando la prueba no paramétrica U de Mann Whitney, dos colas.

Proporción de células CD4+CD25+

La frecuencia de la población doble positiva CD4+CD25+ presentó fluctuaciones a lo largo de la fase de estudio el grupo experimental y el grupo control mostraron un comportamiento semejante con valores dentro del rango normal (grupo experimental 2.019%, CI= 1.35-2.94; grupo control 1.70%, CI= 1.38-2.51). La población CD4+CD25+ en ambos grupos presentó la menor frecuencia durante la cuarta semana, posteriormente la población CD4+CD25+ del grupo experimental (2.9%, CI= 2.339-2.498%) presentó un incremento que fue ligeramente mayor al grupo control (2.730%, CI= 2.498-3.002) en la semana 18. Aunque, la población CD4+CD25+ del grupo experimental (2.370%, CI=1.725-2.822) continuó siendo ligeramente mayor respecto al grupo control (1.740%, CI= 0.6759-2.389) hasta la semana 23 esta tendencia no fue significativa ($p=0.0667$) (Figura 9).

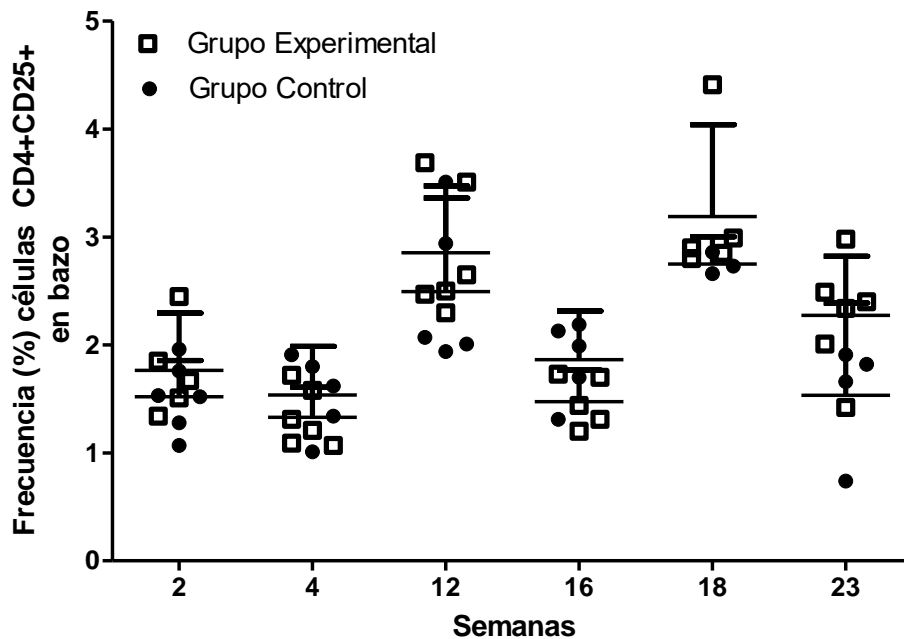


Figura 9. Frecuencia de la población de células CD4+CD25+ en bazo. La frecuencia de la población de células CD4+CD25+ mostró una fluctuación a lo largo de la fase de estudio, pero siempre con valores dentro del rango normal. Las medianas son mostradas con el intervalo de confianza al 95% (n=4-6). Los análisis estadísticos fueron realizados usando la prueba no paramétrica U de Mann Whitney, dos colas.

Proporción de Foxp3+ en la población CD4+CD25+

El grupo experimental mostró reducción significativa ($p=0.0043$) en la expresión de Foxp3+ en la población CD4+CD25+ (Treg) respecto al grupo control (29.90%, CI= 16.88-48.08 vs 79.30%, CI= 73.47-86.26), en la segunda semana posterior al inicio de la inmunización con IgY manteniendo este comportamiento en la cuarta semana. Posteriormente, el grupo experimental mostró un incremento en la expresión de Foxp3+ en la población CD4+CD25+ y en la 12 semana el promedio 85.05% (CI=83.44-87.83) fue muy similar al del grupo control (85.60%, CI=83.68-89.16). Interesantemente, durante la 16 semana la proporción de Foxp3+ en el grupo experimental mostró un ligero decrecimiento del 10.70% con respecto al grupo control (70.10%, CI= 57.80-74.80, v.s 80.80%, CI=79.10-82.08) ($p=0.0079$). Cabe señalar, que este evento coincidió con la fase de incremento significativo del autoanticuerpo IgG anti-Fc γ evaluado en el plasma de este grupo de ratones (Figura 10A y 10B).

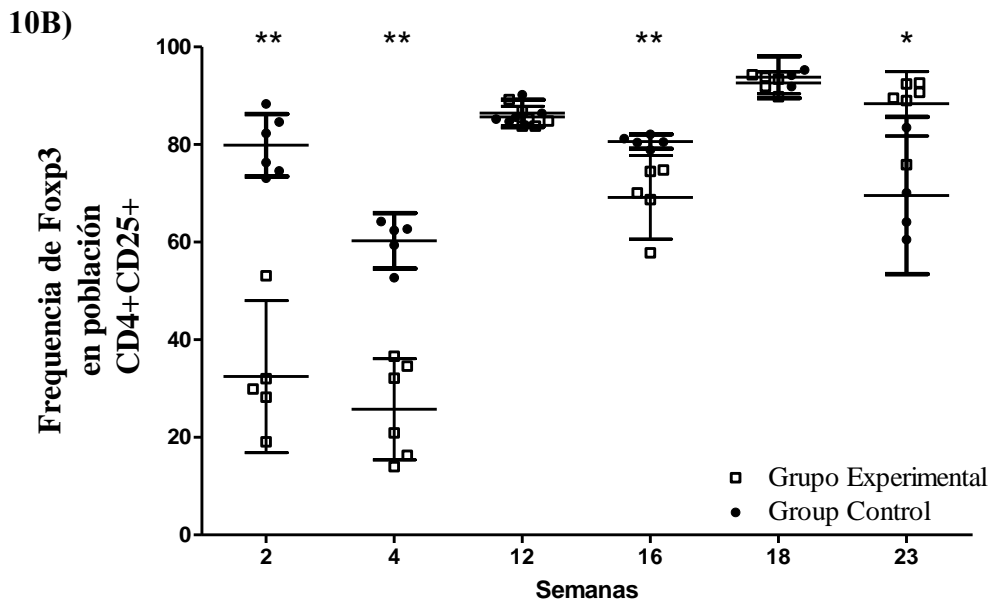
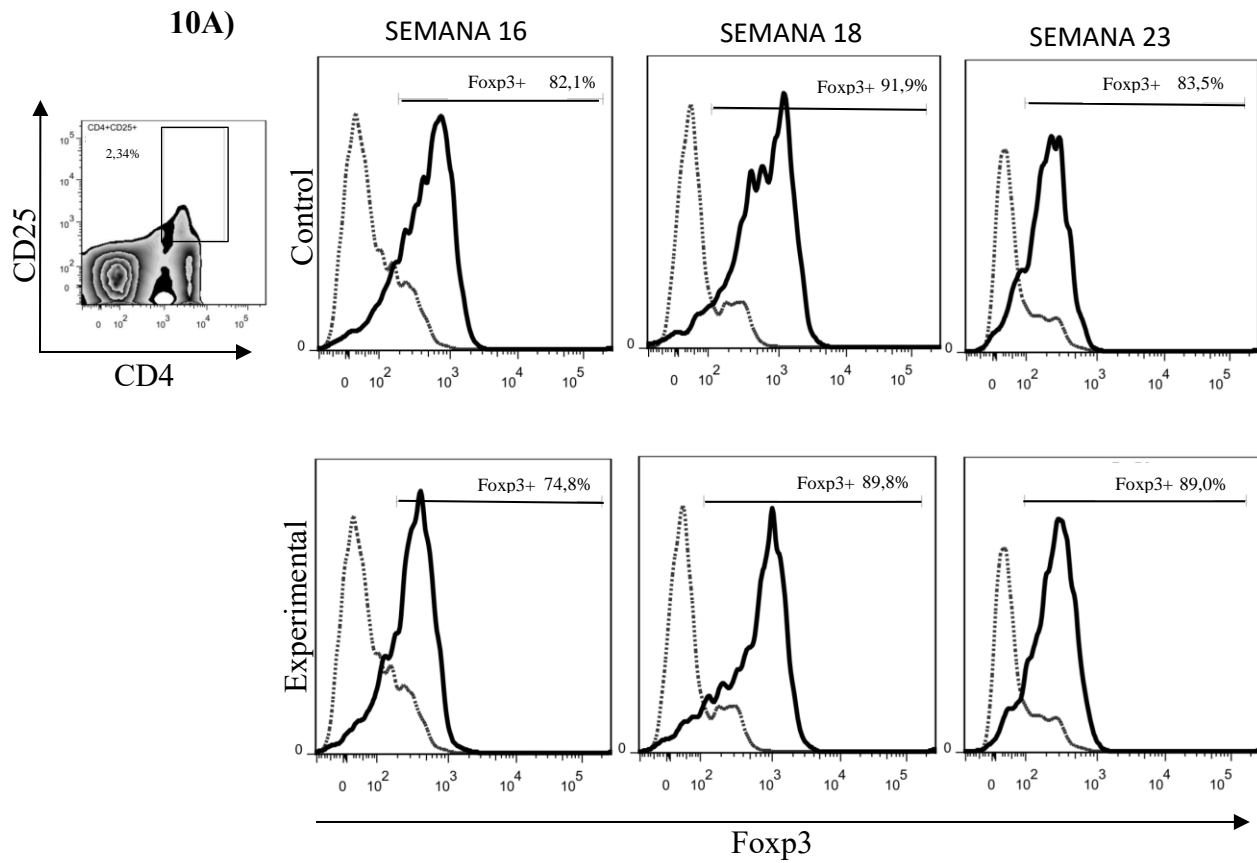


Figura 10. Proporción de Foxp3+ en la población celular CD4+CD25+, disminuye en la 16ª semana. A) Histogramas representativos mostrando la expresión de Foxp3 en la población CD4+CD25+. B) Porcentaje de la expresión Foxp3+ dentro de la población CD4+CD25+ en bazo de murinos BALB/c inmunizados de acuerdo al esquema B. La frecuencia de las células T reguladoras disminuyó gradualmente en las primeras semanas, posteriormente alcanzó el valor normal. Las medianas son mostradas con el intervalo de confianza al 95% (n=4-6). Los análisis estadísticos fueron realizados usando la prueba no paramétrica U de Mann Whitney, dos colas. * $p < 0.020$, ** $p < 0.0080$.

Depleción mediante anticuerpo monoclonal anti-CD25 clona PC61

Para corroborar que el tratamiento de depleción con el anticuerpo monoclonal anti-CD25 fue eficiente se analizó la población CD4+CD25+ en los tres grupos experimentales y controles tratados de acuerdo al esquema B de inmunización. Como se esperaba 10 días después de iniciada la administración del anticuerpo anti-CD25, la proporción de la población CD25+Foxp3+ proveniente de la población CD4+ fueron significativamente menores en todos los casos respecto a los grupos sin tratamiento. En los que se registró una disminución de la población CD4+CD25+ del 75 al 90% (Figura 11).

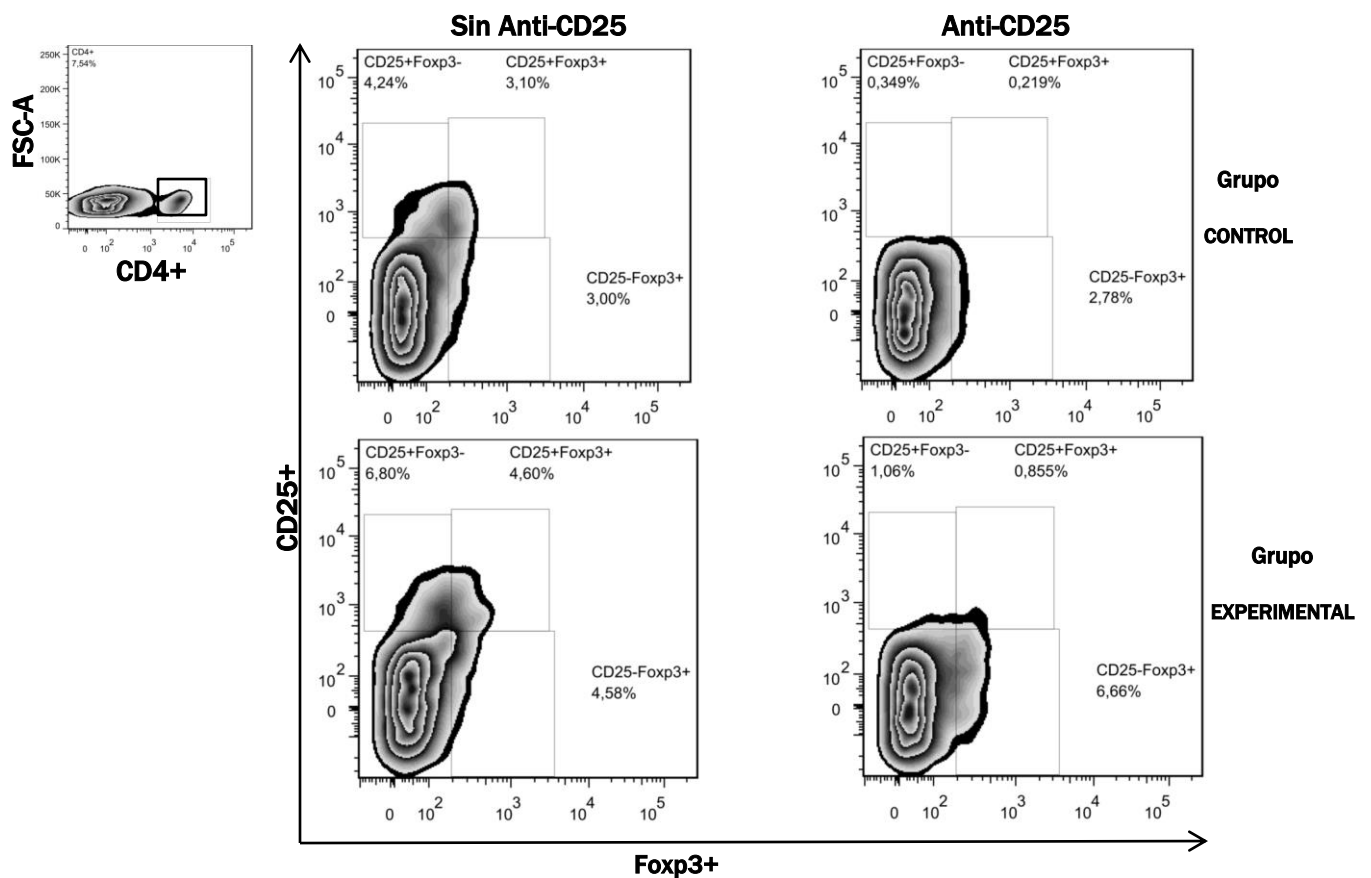


Figura 11. Dot plots representativos provenientes del grupo experimental y grupo control, con depleción mediante la administración del anticuerpo monoclonal anti-CD25 clona PC61 y sin depleción.

Respuesta humoral posterior a la depleción con el anticuerpo anti-CD25 en tres puntos del modelo de producción de IgG anti-Fc γ

Para identificar si la frecuencia de la población de las células T reguladoras (CD4+CD25+Foxp3+) se encuentra asociado a la producción de IgG anti-Fc γ , se depletó mediante el anticuerpo anti-CD25 en las fases previas de producción de autoanticuerpos (semana 7-9 y semana 11-13); y el inicio del comienzo del punto en que incrementó el nivel de IgG anti-Fc γ (semana 16-18).

Respuesta humoral post-depleción en fases previas de producción de IgG anti-Fc γ

Período de evaluación de nivel de anticuerpos de la semana 7 a 9

Este período de análisis inicio en la semana 7 y concluyo en la semana 9 (día 61), el nivel de IgG anti-IgY del grupo experimental mantuvo una diferencia significativa respecto al grupo control (p=0.0079), posterior a la administración del anticuerpo anti-CD25. De manera semejante, la producción del anticuerpo IgG anti-IgY del grupo experimental y control que no recibieron tratamiento con anti-CD25, mostraron una cinética similar y mantuvieron una diferencia significativa. Respecto a los niveles de IgG anti-IgY el grupo experimental depletado y el grupo experimental sin depleción mostraron valores semejantes (Figura 12A).

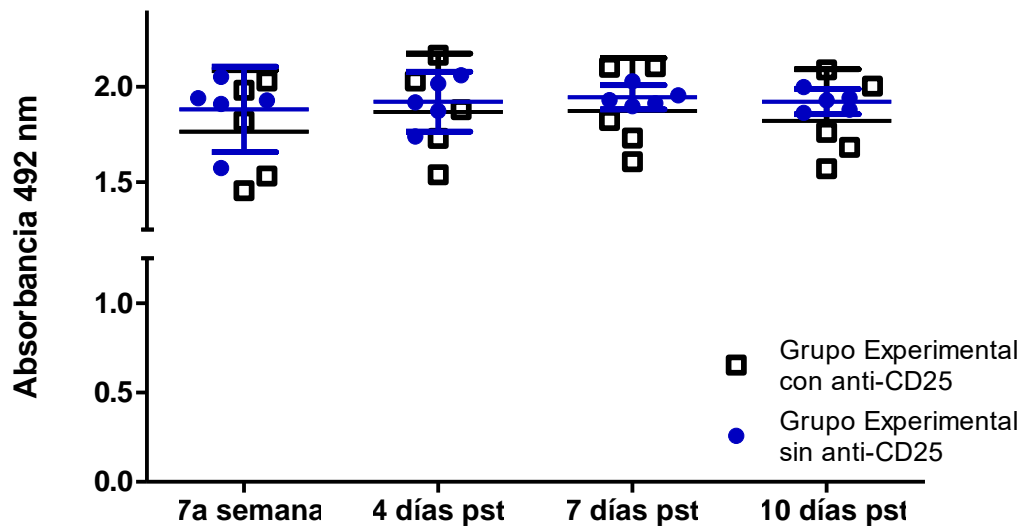


Figura 12A. Comparación del nivel de IgG anti-IgY de la 7ª a la 9ª semana mediante ELISA, en un grupo experimental inmunizado con el esquema B vs grupo experimental inmunizado con esquema B con depleción mediante anticuerpo monoclonal anti-CD25 PC61. Las medianas son mostradas con el intervalo de confianza al 95% (n=5-6). Los análisis estadísticos fueron realizados usando la prueba no paramétrica U de Mann Whitney, dos colas.

Respecto a la producción de autoanticuerpo IgG anti-Fc γ el grupo experimental mostró un nivel ligeramente más alto respecto al grupo control. Sin embargo, si se descartará el valor del individuo que presentó la mayor producción de autoanticuerpo no existiría diferencia entre estos dos grupos. De manera similar los grupos que recibieron tratamiento con anti-CD25 mostraron el mismo comportamiento, siendo ligeramente más alto el nivel de IgG anti-Fc γ del grupo experimental; en el que igualmente un individuo mostró una producción de autoanticuerpo notable respecto al resto del grupo. El tratamiento con el anticuerpo anti-CD25 en el grupo experimental no mostró una diferencia respecto al grupo experimental sin tratamiento en ninguno de los cuatro puntos evaluados comprendidos entre la semana 7ª y 9ª semana (Figura 12 B).

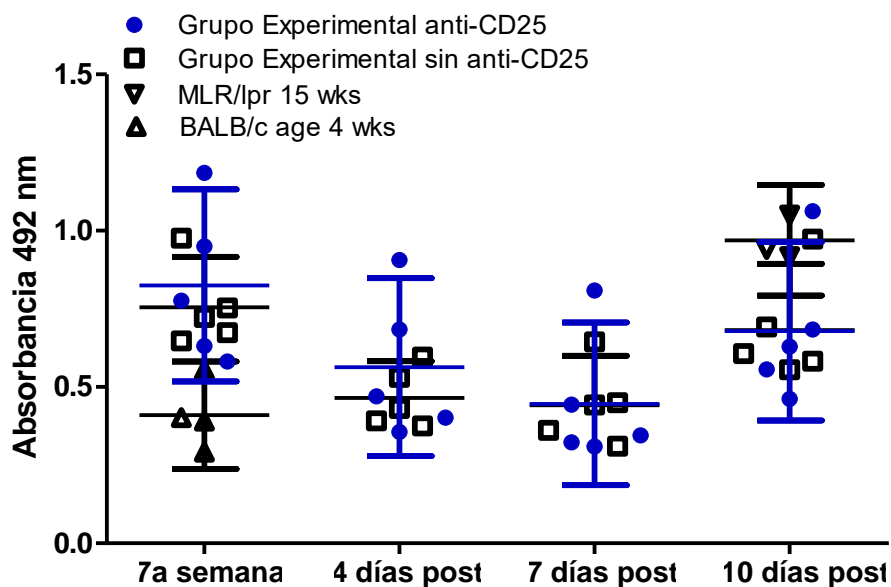


Figura 12B. Comparación del nivel de IgG anti-Fc γ de la 7ª a la 9ª semana mediante ELISA, entre un grupo experimental inmunizado con el esquema B y grupo experimental inmunizado con esquema B con depleción mediante anticuerpo monoclonal anti-CD25 PC61. Las medianas son mostradas con el intervalo de confianza al 95% (n=5-6). Los análisis estadísticos fueron realizados usando la prueba no paramétrica U de Mann Whitney, dos colas.

Período de evaluación de nivel de anticuerpos de la semana 11 a 13

El análisis de la producción de anticuerpos inicio en la semana 11 y concluyo en la semana 13 (día 89). En el caso de la producción de IgG anti-IgY el grupo experimental depletado y el grupo experimental sin depleción mantuvieron una diferencia significativa respecto a los grupos controles con y sin depleción ($p < 0.05$). En este sentido, el tratamiento con el anticuerpo monoclonal anti-

CD25, no mostró una diferencia entre los grupos experimentales en el comportamiento ni en el nivel de IgG anti-IgY ($p>0.05$) (Figura 13A).

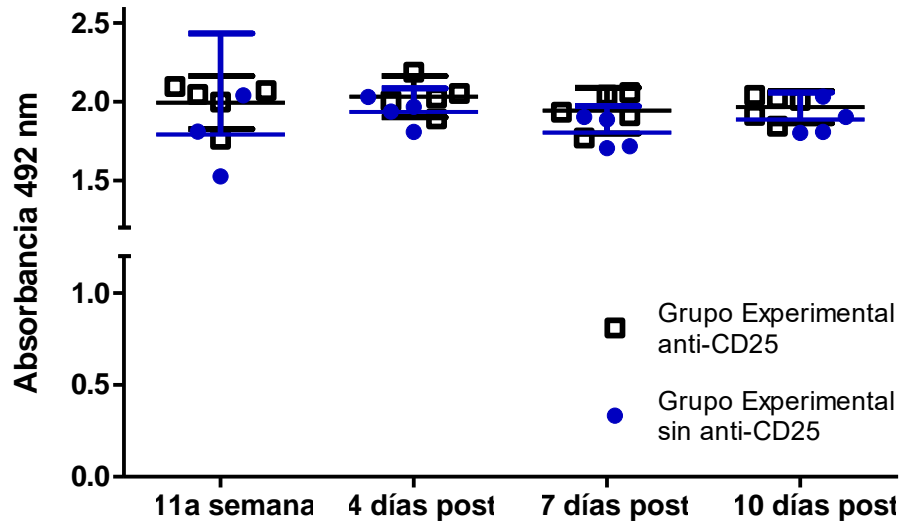


Figura 13A. Comparación del nivel de IgG anti-IgY de la 11ª a la 13ª semana mediante ELISA, en un grupo experimental inmunizado con el esquema B vs grupo experimental inmunizado con esquema B con depleción mediante anticuerpo monoclonal anti-CD25 PC61. B. Las medianas son mostradas con el intervalo de confianza al 95% ($n=4-5$). Los análisis estadísticos fueron realizados usando la prueba no paramétrica U de Mann Whitney, dos colas.

Respecto a la producción de autoanticuerpo IgG anti-Fc γ la cinética y el nivel fueron similares en el grupo experimental al que le fue administrado anticuerpo anti-CD25 y el grupo experimental que no recibió el tratamiento de depleción. En ambos grupos, el nivel de IgG anti-Fc γ , fue ligeramente mayor en el cuarto día posterior a la administración del anticuerpo anti-CD25. Sin embargo, solo el grupo experimental sin depleción mostró una diferencia significativa respecto al grupo control, posterior a este punto en el día 7 el 50% de los individuos mostraron niveles más altos de IgG anti-Fc γ y para el día 10 el nivel de autoanticuerpo fue semejante al grupo control.

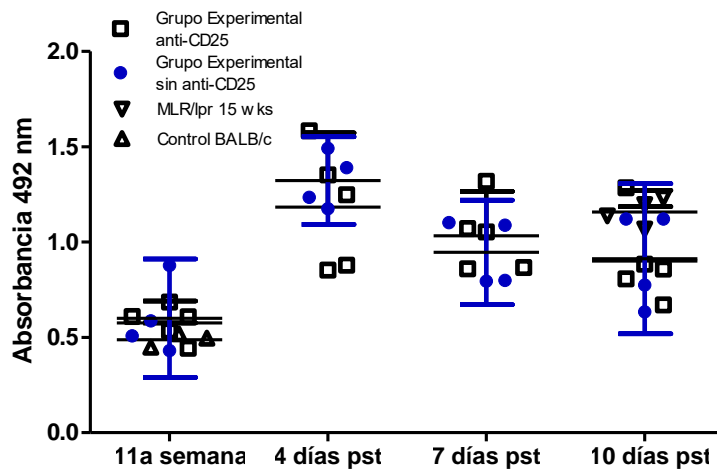


Figura 13B. Comparación del nivel de IgG anti-Fc γ de la 11^a a la 13^a semana mediante ELISA, en un grupo experimental inmunizado con el esquema B vs grupo experimental inmunizado con esquema B con depleción mediante anticuerpo monoclonal anti-CD25 PC61. No hubo diferencia en la producción de IgG anti-Fc γ . Las medianas son mostradas con el intervalo de confianza al 95% (n=4-5). Los análisis estadísticos fueron realizados usando la prueba no paramétrica U de Mann Whitney, dos colas.

Aunque de manera grupal la producción de IgG anti-Fc γ en el grupo experimental depletado no fue significativamente mayor al grupo control depletado (Figura 13B).

Período de evaluación de nivel de anticuerpos de la semana 16 a 18

En esta fase de estudio que se encuentra en el rango de inicio de producción de autoanticuerpo IgG anti-Fc γ , el nivel de IgG anti-IgY en el grupo experimental tratado con anticuerpo anti-CD25 y el grupo experimental sin este tratamiento mantuvieron el nivel significativo respecto a los grupos controles respectivos como en las dos fases anteriores de estudio. Además, la producción de IgG anti-IgY en los dos grupos experimentales presentaron valores similares (Figura 14A).

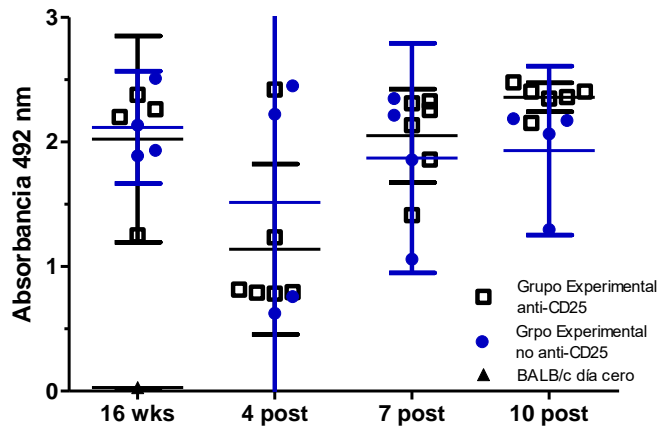


Figura 14A. Comparación del nivel de IgG anti-IgY de la 16^a a la 18^a semana mediante ELISA, en un grupo experimental inmunizado con el esquema B vs grupo experimental inmunizado con esquema B con depleción mediante anticuerpo monoclonal anti-CD25 PC61. Las medianas son mostradas con el intervalo de confianza al 95% (n=4-5). Los análisis estadísticos fueron realizados usando la prueba no paramétrica U de Mann Whitney, dos colas.

Respecto a la producción de autoanticuerpo IgG anti-Fcγ el grupo experimental con tratamiento de depleción con anti-CD25 y el grupo experimental sin tratamiento mostraron niveles y una cinética semejante (Fig 14B). Adicionalmente, el grupo experimental depletado mostró un nivel mayor de IgG anti-Fcγ en los cuatro puntos evaluados respecto al grupo control (p=0.0571). El grupo experimental que no fue depletado en tres de los cuatro puntos evaluados, mostró una diferencia significativa respecto al grupo control (p=0.0286).

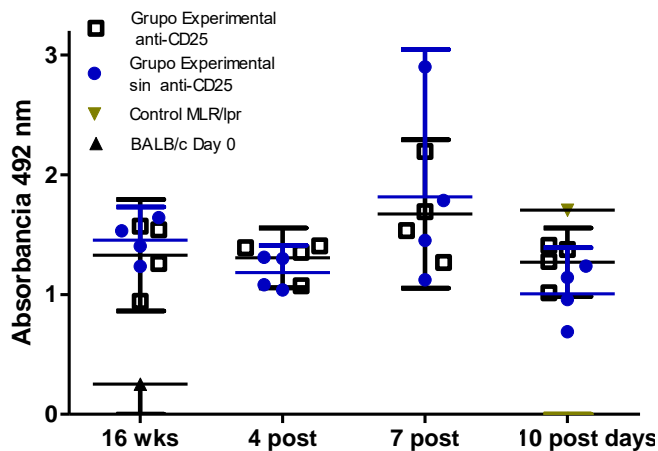


Figura 14B. Comparación del nivel de IgG anti-Fcγ de la 16^a a la 18^a semana mediante ELISA, en un grupo experimental inmunizado con el esquema B vs grupo experimental inmunizado con esquema B con depleción mediante anticuerpo monoclonal anti-CD25 PC61. Las medianas son mostradas con el intervalo de confianza al 95% (n=4-5). Los análisis estadísticos fueron realizados usando la prueba no paramétrica U de Mann Whitney, dos colas.

Comparación entre el nivel de autoanticuerpo IgG anti-Fc γ en dos fases experimentales empleando el esquema de inmunización B

Para corroborar que la cinética de producción de autoanticuerpo IgG anti-Fc γ mediante el esquema de inmunización B es reproducible, comparamos el nivel de IgG anti-Fc γ en los puntos evaluados (grupos experimentales evaluados en semana 2, 4, 12, 16, 18 y 23) en la primera fase de estudio, con el nivel registrado en la segunda fase de estudio “ ensayos de depleción mediante el anticuerpo anti-CD25” (grupos experimentales no tratados con anti-CD25, semanas 7, 9, 11, 13, 16 y 18). En ambos períodos de evaluación, hubo un comportamiento similar en la producción de autoanticuerpo, ya que el nivel de IgG anti-Fc γ presento un incremento gradual que alcanzo la máxima producción de IgG anti-Fc γ de la semana 16 a la 18. La diferencia entre ambas fases de estudio fue el punto en que se observó el mayor nivel de IgG anti-Fc γ , alcanzándolo en el primer ensayo durante la semana 18 y en la semana 16 para el segundo período de evaluación. Además, las pruebas estadísticas no mostraron una diferencia significativa entre los puntos evaluados (Figura 15).

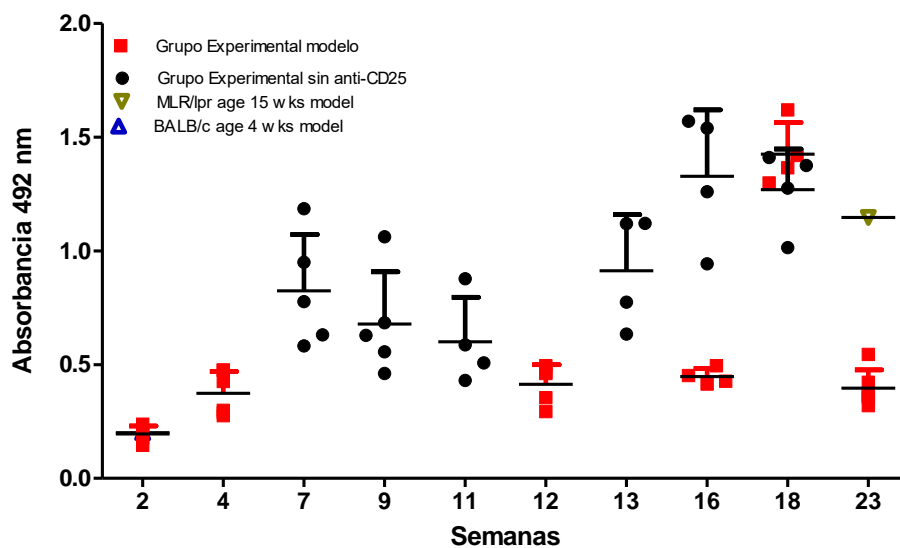


Figura 15. Comparación del nivel de IgG anti-Fc γ mediante ELISA, de la fase experimental 1 (semanas 2, 4, 12, 16, 18 y 23) y la fase experimental de depleción (semanas 7, 9, 11, 13, 16, 18*). La cinética de la producción del autoanticuerpo IgG anti-Fc γ muestran un comportamiento similar. Hay un incremento gradual del nivel de IgG anti-Fc γ hasta alcanzar el máximo nivel entre la 16ª y 18ª semana. Las medianas son mostradas con el intervalo de confianza al 95% (n=4-5). Los análisis estadísticos fueron realizados usando la prueba no paramétrica U de Mann Whitney, dos colas. *tabulado en la semana 18 en la gráfica

Comparación de la frecuencia de Foxp3+ en la población CD4+CD25+ en dos fases experimentales bajo el esquema de inmunización B

En la segunda fase de estudio (semana 9 a la 18), no hubo diferencias entre las frecuencias de la población CD4+CD25+ del grupo experimental y control evaluados en la semana 13 (1.7%, CI= 1.098-2.127 vs 1.33%, CI= 0.8689-1.922) y 18 (1.67%, CI=0.6631-2.757 vs 1.28%, CI= 0.5597-2.40%).

Aunque, hubo una ligera menor frecuencia de la población CD4+CD25+ en la segunda fase de estudio en las semanas 13 (p= 0.0095) y 18 (p= 0.0357), respecto a la primera fase experimental. El comportamiento fue parecido a los registrados en la semana 12 (2.575, CI= 2.232-3.474 vs 2.07%, CI= 1.627-3.361) y 18 (2.90%, CI= 2.339-4.041 vs 2.73, CI= 2.498-3.002) de la primera fase de estudio, en los cuales no hay diferencia entre el grupo experimental y control.

La expresión de Foxp3+ en la población CD4+CD25+ de la segunda fase de estudio, (semana 13: 81.9%, CI=79.97-84.28 vs 86.0%, CI= 81.16-89.76) (semana 18: 80.9%, CI=77.4-85.4 vs 81.2%, CI= 67.01%-95.63%) fue similar al registrado durante la semana 12 (85.05%, CI=83.44-87.83 vs 85.6%, CI= 83.68-89.16) y 18 (93.4%, CI= 90.38-94.9 vs 94.2%, CI= 89.49-98.11) de la primera fase de estudio.

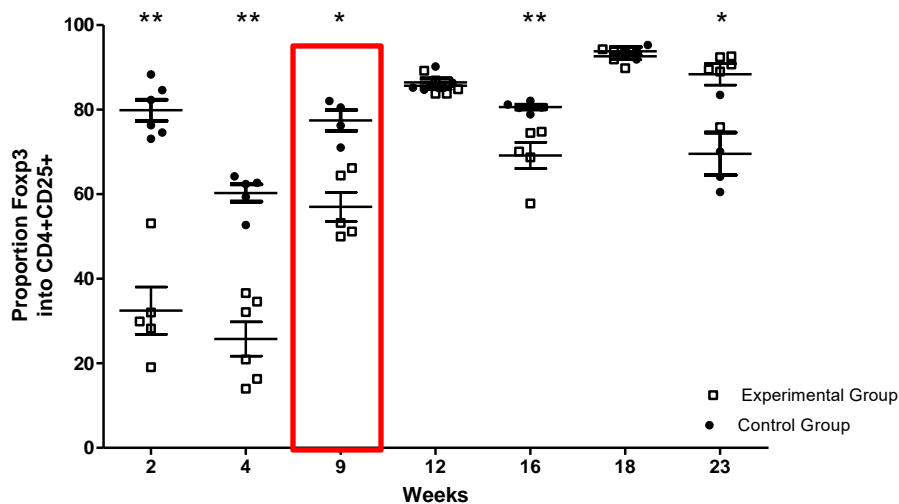


Figura 16. Frecuencia de Fosp3+ en la población CD4+CD25+ en bazo de murinos BALB/c al esquema B. La frecuencia de las células T reguladoras disminuyo gradualmente en las primeras semanas, posteriormente alcanzó el valor normal. Las medianas son mostradas con el intervalo de confianza al 95%. Los análisis estadísticos fueron realizados usando la prueba no paramétrica U de Mann Whitney, dos colas. *p<0.020, **p<0.0080.

Interesantemente, en la semana 9 en la que no hubo evaluación en la primera fase, el grupo experimental (53.20%, CI= 47.45-66.55) presento una menor expresión de Foxp3+ en la población CD4+CD25+, respecto al grupo control (78.35%, CI= 69.57-85.31) (p=0.0159). Lo que concuerda con el comportamiento de la primera fase experimental, en los que durante la 2ª y 4ª semana hay una declinación de la población de células Treg, para posteriormente presentar una frecuencia normal de la expresión de Foxp3 en la semana 12 (Figura 16).

DISCUSIÓN

La autoinmunidad es el reconocimiento de elementos propios en el que posterior a la activación de la población de linfocitos autorreactivos, se promueven funciones efectoras que pueden inducir una patología a nivel de un órgano específico o a nivel sistémico [54]. En la autoinmunidad humoral, la activación de la población de LB autorreactivos conlleva a un incremento en el nivel de la producción de autoanticuerpos [19, 86, 155, 156]. Precisamente, la presencia y nivel de los autoanticuerpos pueden predecir el curso de una enfermedad ya sea de carácter autoinmune o alguna otra condición patológica asociada a la producción de autoanticuerpos [157, 158].

En el caso de la neumonitis por hipersensibilidad asociada a la exposición de palomas, diversos estudios han descrito un incremento en la producción de anticuerpos específicos a una variedad de antígenos presentes en el “polvo” compuesto de materia fecal, bloom y suero de la paloma [139, 143, 159]. De manera interesante, se ha descrito la presencia de autoanticuerpos específicos a la región Fc γ de inmunoglobulina [160, 161]. En este sentido la IgY de paloma al tener una similitud estructural con la IgG de mamífero y estar presente en las diversas fuentes (excremento, bloom y suero) del “polvo contaminado”[146, 147], la convierten en un candidato idóneo que podría inducir la activación de las células B autorreactivas que producen autoanticuerpo anti-Fc γ . Por ello, fue analizada la capacidad inmunogénica de la IgY de paloma para generar anticuerpos anti-IgY y autoanticuerpos anti-Fc γ . Para ello fueron empleados tres esquemas de inmunización: a) intratraqueal, b) subcutánea A y c) subcutánea B.

En el esquema de inmunización intratraqueal fue observada una rápida y fuerte respuesta inmune, en el que en términos generales el nivel de IgG anti-IgY continuo incrementándose hasta la semana 23. Aunque, el reto inmunológico fue realizado de manera constante durante 23 semanas (la cuarta parte de vida de un ratón; [162]), esta produjo una débil respuesta inmune a la fracción Fc γ de inmunoglobulina durante la semana 13 a 14. Sugiriendo que en la estimulación inmune por la vía de las mucosas, es necesario la administración de una mayor concentración del antígeno IgY (mediante un mayor número de inoculaciones, más de 22; o la administración mayor a 25

µg/semanales por 22 semanas=550 µg) o la administración de un adyuvante para la preservación del antígeno que permitiera la exposición de epitopes inductores de la activación de LB autorreactivos.

Por lo anterior, fue evaluada la capacidad inmunogénica de la IgY en un grupo experimental en el que la administración del antígeno fue conjugada con el adyuvante de Freud. En este caso al emplear el esquema subcutáneo de inmunización A (administración constante de adyuvante) la producción de anticuerpo IgG anti-IgY mostró un comportamiento semejante a la cinética del esquema de inmunización intratraqueal. Sin embargo, en el esquema de inmunización subcutánea A, el nivel de IgG anti-IgY fue más intenso ya que desde la 5^a semana alcanzo un nivel semejante a la mostrada en la 13^a semana bajo el esquema intratraqueal.

Lo anterior indica que la IgY de paloma, al igual que otras inmunoglobulinas aviarias [163], tiene la capacidad inmunogénica para inducir la activación de una población de células B. Por lo tanto, la exposición constante durante 22 semanas de los determinantes antigénicos de la inmunoglobulina IgY a células presentadoras de antígeno como las células dendríticas, macrófagos y las células B promovieron la presentación de diversos determinantes antigénicos a las células T efectoras [87]. En el caso particular de las células B [97] se ha descrito que la estimulación constante puede favorecer la activación policlonal [62, 99, 164] y consecuentemente la producción de IgG anti-IgY. Adicionalmente, la presencia de IgG reactivo a IgY indica el cambio de isotipo de IgM y con ello una respuesta dependiente de células T.

Uno de los eventos que probablemente se suscitaron durante la administración del antígeno IgY es la selección de un epitope inmunodominante proveniente del antígeno IgY de paloma, ya que la respuesta se intensificó de manera relativamente constante hasta la fase final del estudio. También, es factible que se haya generado un proceso conocido como “spreading epitope”, en el cual hay diversificación de epitopes derivados de una primera respuesta dirigida a un antígeno lo cual genera diversas clonas de células B [165].

Por lo anterior, es probable que la estimulación de distintas clonas de células B conllevaron a la activación de la clona de células B autorreactivas productoras de IgG anti-Fcγ. Una explicación alterna de la intensa respuesta humoral es que bajo la administración constante de adyuvante incompleto de Freud (esquema subcutáneo A de inmunización) se favorece por tiempos más prolongados la presencia del antígeno al protegerlos de los mecanismos enzimáticos de degradación [134, 166], favoreciendo una mayor exposición de los diversos epitopes a las células presentadoras de antígeno.

Además, varios estudios han demostrado que el adyuvante incompleto de Freud cuenta con ligandos que interactúan con receptores de reconocimiento de patrones como los receptores tipo Toll (TLR) que favorecen la inflamación mediante la producción de citocinas proinflamatorias en el que están involucrados los efectos ejercidos por las células T efectoras [74, 134, 166]. En el caso particular de la activación vía TLR se han reportado dos fenómenos interesantes. En uno de ellos las células B generan autoanticuerpos e incluso cambio de isotipo mediante una respuesta independiente de células T al coligarse los receptores TLR y BCR [167]. El segundo hecho interesante el cual se ha reportado en un modelo murino, es la generación extrafolicular de células plasmáticas productoras de IgG anti-Fc γ cuya activación es dependiente de la señal generada vía MyD88 por los TLR7 y TLR9. En este segundo caso la producción de IgG anti-Fc γ puede ser generada independientemente de las células T, aunque su participación intensifica el nivel del autoanticuerpo IgG anti-Fc γ [168, 169].

Bajo el esquema de inmunización A como en otros modelos experimentales y condiciones patológicas, la respuesta humoral de clase IgM anti-Fc γ se incrementó de la primera a la quinta semana [170, 171]. La producción de autoanticuerpo IgG anti-Fc γ , a diferencia del esquema de inmunización intratraqueal; presentó un incremento gradual del nivel del autoanticuerpo anti-Fc γ desde la 4^a hasta la 9^a semana manteniendo una fase de meseta de la 11^a hasta la 18^a semana ($p=0.0286$) para posteriormente declinar la producción de IgG anti-Fc γ . Por lo anterior, mediante el esquema subcutáneo A de inmunización fue factible promover la ruptura de tolerancia a la fracción Fc γ de inmunoglobulina, lo que eventualmente implicó un incremento en la producción de autoanticuerpo IgG anti-Fc γ .

Como mencionamos es factible que se haya generado un proceso conocido como “epitope spreading”, en el cual hay diversificación de epitopes provenientes de una primera respuesta general dirigida a un epitope dominante. Y eventualmente la estimulación de distintas clonas de células B, conllevaron a la activación de la clona de células B autorreactivas productoras de IgG anti-Fc γ . Igualmente es posible que la presencia prolongada del antígeno IgY que guarda una similitud con la IgG, promovió la activación de clonas de células B autorreactivas mediante reacción cruzada por mimetismo molecular [165]. Sin embargo, en múltiples reportes se ha descrito que el uso prolongado del adyuvante favorece la producción de diversos autoanticuerpos entre ellos la IgG anti-Fc γ [134, 166, 172], como hemos mencionado hay mecanismos que inducen la producción de autoanticuerpo IgG anti-Fc γ en el que la vía inducida por TLRs promueve producción de autoanticuerpo a través de una respuesta dependiente y/o independiente de células T [169].

Además, en un caso particular se ha reportado la inducción de tolerancia al administrar adyuvante [81].

Es por ello que para corroborar que la producción de autoanticuerpo IgG anti-Fc γ es debido al antígeno IgY de paloma y no al efecto del adyuvante, se utilizó el esquema subcutáneo B de inmunización. En este se emplearon dos reforzamientos con adyuvante y en las siguientes inmunizaciones únicamente IgY de paloma. La producción de IgG anti-IgY alcanzó la meseta a partir de la 4ª semana, manteniendo la diferencia significativa hasta el final de la fase experimental. En cambio, el nivel del autoanticuerpo IgG anti-Fc γ se incrementó lenta y gradualmente hasta iniciar una fuerte respuesta dirigida a la fracción Fc γ de inmunoglobulina en la 16ª semana y alcanzar el máximo nivel en la semana 18. Lo anterior, señala que la presencia de IgY de paloma induce la ruptura de tolerancia a la fracción Fc γ de inmunoglobulina y con ello la producción de autoanticuerpo IgG anti-Fc γ , descartando así el efecto del adyuvante. Bajo este esquema de inmunización también fue evaluada la producción de IgM anti-Fc γ , durante el período de evaluación no hubo un incremento en el nivel de este autoanticuerpo. Sin embargo, la presencia de IgG anti-Fc γ indica que la población de LB autorreactivos es dependiente de las células T.

Por otro lado, se han reportado otros modelos murinos de producción de autoanticuerpo. Por ejemplo se ha descrito que tras emplear un antígeno homólogo (HSP70tg) proveniente de *Toxoplasma gondii*, el nivel de autoanticuerpo se mantiene elevado incluso cuando el nivel de IgG dirigido al antígeno homólogo (IgG anti-HSP70tg) comenzó a declinar entre la 5ª y la 7ª semana posterior al inicio de la inmunización [170]. En contraste, en nuestro modelo el nivel de anticuerpo dirigido al antígeno homólogo (IgG anti-IgY) mantuvo una elevada producción durante 20 de las 23 semanas de la fase experimental. Mientras que el máximo nivel de autoanticuerpo IgG anti-Fc γ tuvo una duración de 2 semanas (16ª a la 18ª semana). Por otra parte, en un modelo murino inducido mediante pristano la aparición de autoanticuerpo IgG anti-Fc γ comenzó 5 semanas después de la administración del adyuvante [173]. En contraste, en nuestro modelo la aparición del autoanticuerpo fue observada de manera más tardía, a partir de la 16ª semana inicio el incremento de IgG anti-Fc γ .

Por otro lado, las diferencias descritas pueden estar dadas porque las cepas empleadas en esos modelos son más susceptibles que la cepa BALB/c que utilizamos en nuestro de modelo. Al respecto, los estudios comparativos muestran que una de las diferencias entre las cepas susceptibles a condiciones autoinmunes y la cepa BALB/c es la aparición más tardía de la respuesta humoral en esta última [170]. Además, una de las razones originales de emplear la cepa BALB/c en nuestro

modelo de producción de IgG anti-Fc γ es considerar que los sujetos no presentan una predisposición a desarrollar este tipo de autoanticuerpo.

Por todo lo anterior, es factible considerar que en nuestro modelo los procesos responsables de la producción de IgG anti-Fc γ , puedan reflejar los mecanismos de ruptura de tolerancia desarrollados durante la neumonitis por hipersensibilidad asociada a la exposición crónica del antígeno IgY de paloma. También resulta interesante que del mismo modo que en pacientes con artritis reumatoide los niveles más altos de IgG anti-Fc γ aparezcan en condiciones crónicas [78], a diferencia de otros modelos inducidos mediante diversos agentes (biológicos y químicos), en los que la producción de IgG anti-Fc γ es casi simultánea o posterior a dos semanas de iniciado el tratamiento [173].

Aunque, no estudiamos los mecanismos detallados que permitieron que la inmunización subcutánea de IgY indujera un elevado nivel transitorio de IgG anti-Fc γ en plasma. Es probable que diversos factores pudieran activar la población de células B autorreactivas. Por ejemplo:

- 1) Se conoce que la prolongada inmunización con un antígeno filogenéticamente relacionado puede promover un proceso de mimetismo molecular, reacción cruzada y eventualmente la producción de autoanticuerpos [99, 164, 165]. Por lo tanto, la ruptura de tolerancia a la fracción Fc γ en la cepa murina BALB/c posterior a la inmunización con IgY de paloma es un evento factible.
- 2) La administración prolongada de un antígeno favorece la activación policlonal de las células B [95, 112], en nuestro caso la activación de la clona B autorreactiva específica a la fracción Fc γ .
- 3) Las modificaciones estructurales, como los cambios en la secuencia de aminoácidos, por ejemplo causados por modificaciones post-transduccionales pueden ser favorecidos durante una constante estimulación de la respuesta inmune haciendo factible la generación de neoepitopes de la IgG [100, 123]. Con ello la activación indirecta de la población de células B autorreactivas.
- 4) La presencia constante de un antígeno favorece la formación de complejos inmunes circulantes [80, 81, 103], en nuestro modelo constituidos por IgG acoplado a la IgY. Este complejo al ser reconocido por las células presentadoras de antígeno muestran epítopes que activan las células T autorreactivas, las cuales eventualmente activan la población de células B autorreactivas.
- 5) Se ha reportado que la presencia de complejos inmunes circulantes en los que participa inmunoglobulina IgG2a, promueven la activación de células plasmáticas foliculares y

extrafoliculares. Estas últimas caracterizadas por ser células plasmáticas de vida corta y productoras de autoanticuerpos como la IgG anti-Fc γ [168]. Adicionalmente, ha sido reportado que la ausencia de las células T reguladoras foliculares (T_{FR}) facilitan que las células dendríticas foliculares activen a las células T foliculares y con ello el establecimiento de centro germinales y eventualmente células plasmáticas extrafoliculares productoras de IgG anti-Fc γ [174, 175].

Una peculiaridad interesante de nuestro modelo fue la intensa producción transitoria de IgG anti-Fc γ (16^a a la 18^a semana), aunque esto parece extraño el comportamiento ha sido previamente descrito en sujetos que fueron vacunados [79, 114]. Además, también se ha reportado la formación de células plasmáticas de vida corta productoras de IgG anti-Fc γ en artritis reumatoide. Una explicación plausible para estos fenómenos, podría ser la formación de complejos inmunes con la capacidad de inducir la población de células B autorreactivas [79, 114, 116], en el que eventualmente los mecanismos homeostáticos promueven la supresión de la población de las células B.

Por otro lado, se han realizado diversos estudios enfocados en la “tecnología de la IgY aviaria” cuya principal aplicación es emplear principalmente la IgY de gallina en la creación de vacunas y anti-venenos. Estos hallazgos han señalado la generación de efectos secundarios adversos como las reacciones alérgicas y las anafilactoides, generados al emplear inmunoglobulinas [163, 176–179]. En este contexto, los resultados de nuestro modelo sugieren la posibilidad de que la IgY aviaria pueda inducir la producción de autoanticuerpos, lo cual estaría asociado a un mecanismo de hipersensibilidad tipo III en el que se generan complejos inmunes circulantes. Con base en todo lo anterior, se adoptó el esquema subcutáneo B de inmunización para los siguientes análisis en los cuales se evaluó la frecuencia de la población de células T reguladoras CD4+CD25+Foxp3+. Nuestro objetivo fue estudiar el mecanismo que pudiera estar asociado a la supresión de la producción del autoanticuerpo IgG anti-Fc γ . Ya que los reportes de enfermedades autoinmunes y modelos experimentales señalan la participación de la población de células Treg CD4+CD25+Foxp3+ en la supresión de células B autorreactivas productoras IgG anti-Fc γ [90, 180-182].

Por lo que fue evaluada la frecuencia de la población de células Treg a lo largo de la fase de estudio. Para ello analizamos la población celular CD4+ del grupo experimental proveniente del bazo, la cual disminuyó gradualmente hasta la 16^a semana (p= 0.0556). Lo que podría sugerir la asociación entre la población CD4+ en el comienzo de la producción de IgG anti-Fc γ , ya que

estos dos eventos se suscitaron al mismo tiempo. En el caso de la población CD4+CD25+ hubo una fluctuación en su frecuencia a lo largo de la fase de estudio, pero sin un cambio significativo respecto al grupo control. Sin embargo, en esta población CD4+CD25+ disminuyó la proporción de Foxp3+. En la 16ª semana la población CD4+CD25+ del grupo experimental presentó una menor proporción de Foxp3+ respecto al grupo control, coincidiendo con el inicio de la producción de IgG anti-Fcγ. Aunque esto sugiere una asociación entre el decrecimiento de la población Tregs y la producción de autoanticuerpo, la disminución de Foxp3+ en la población CD4+CD25+ durante las primeras semanas de la fase experimental fueron más bajas respecto a la 16ª semana. Además, la expresión de Foxp3 en la población CD4+CD25+ del grupo experimental se incrementó gradualmente en las semanas siguientes hasta que en la 18ª semana la expresión de Foxp3 fue normal, momento en el cual la producción de IgG anti-Fcγ alcanzó el máximo nivel de producción.

Lo anterior sugiere que la frecuencia de la población de células Treg durante la máxima producción de IgG anti-Fcγ, mantuvo valores normales pero probablemente fueron funcionalmente incapaces de suprimir la producción del autoanticuerpo IgG anti-Fcγ, este comportamiento ha sido previamente reportado en pacientes con enfermedades crónicas autoinmunes [183]. Otra explicación respecto a la baja frecuencia de las células Treg en las primeras semanas de inmunización es que corresponden con una etapa permisiva que favorece la activación de las células B autorreactivas productoras de IgG anti-Fcγ. Esto podría estar asociado con la participación de mecanismos de regulación de la inmunidad innata, como la cascada del complemento. Al respecto, se ha reportado que la formación de complejos inmunes (en nuestro modelo el complejo inmune estaría constituido por IgG acoplado a IgY) favorecen los mecanismos de activación de la vía clásica del complemento. En el que eventualmente el elemento C3b puede acoplarse a un receptor inhibitorio presente en células Treg promoviendo la disminución de Foxp3 [184, 185].

Por ello nuestra siguiente estrategia fue corroborar la participación de las células Treg en la declinación de IgG anti-Fcγ. Para ello se depletó la población de células Treg mediante el anticuerpo monoclonal anti-CD25 clona PC61 y se consideró que el efecto del tratamiento es de 10 días [186, 187]. La depleción se realizó en dos etapas previas a la fase de producción de IgG anti-Fcγ (semana 7 a 9, y semana 11 a 13) y en la etapa inicial de producción del autoanticuerpo (semana 16 a 18). Posterior al inicio del ensayo de depleción, esperábamos identificar un incremento en el nivel del autoanticuerpo IgG anti-Fcγ. Sin embargo, no hubo una diferencia entre el grupo experimental y el grupo experimental depletado. Además, debe considerarse que el grupo experimental de la fase experimental 1 y los grupos experimentales (con y sin tratamiento) de fase experimental de depleción presentaron una cinética y nivel similar de IgG anti-Fcγ (Figura 15).

Por otro lado, la proporción de Foxp3 en la población CD4+CD25+ en la fase experimental 1 (correspondiente a semanas 2, 4, **12**, 16, **18** y 23) y la fase experimental de depleción (correspondiente a semanas 7, 9, 11, **13**, 16 y **18***) mostraron una tendencia similar (Figura 16). Estos resultados entre las dos fases experimentales confirman la reproducibilidad del fenómeno inducido por la IgY.

Finalmente en estos análisis, debe considerarse que en todos los individuos del grupo se observó mediante el análisis de FlowJo que la depleción fue realizada correctamente. Ante los resultados mostrados sugerimos las siguientes explicaciones

- a) La población de células Treg durante la cinética de producción de IgG anti-Fc γ presentan una anomalía para suprimir la población de células B autorreactivas [188]. Al respecto, en diversos modelos murinos knockout se ha observado que la baja densidad de moléculas inhibitorias promueven un incremento en la población de células T foliculares cooperadoras (T_{FH}) y con ello la activación de células B autorreactivas. Por ejemplo, se ha observado en modelos experimentales en los que se deleto o suprimió la expresión de CTLA-4 una desregulación en los centros germinales de las T_{FH}. En este mismo estudio se ha inferido que la vía de acción de CTLA-4 es independiente de las moléculas B7.1 y B7.2.; y por ende la propia señalización de CTLA-4 induce la supresión/inhibición de las células B autorreactivas [189]. Adicionalmente, en pacientes con artritis reumatoide se ha reportado una disminución de CTLA-4 [188].

Otra probable anomalía que podrían sufrir las células Treg es una deficiencia en la supresión que ejercen sobre el receptor Fc γ RIIb. Aunque aún no se ha identificado el mecanismo preciso se ha reportado que en el modelo K/BxNsf hay una reducción de Fc γ RIIb en las células plasmáticas asociado [190].

- b) Durante la fase experimental de nuestro modelo, las células B autorreactivas presentan un fenotipo que las protege de los principales mecanismos de supresión ejercidos por la población CD4+CD25+Foxp3+. Por ejemplo, previamente se ha reportado que en pacientes con artritis reumatoide las células B productoras de IgG anti-Fc γ , tienen una menor expresión de Fas porque hay una mayor endocitosis de la molécula, por lo que la apoptosis de las células Treg es un mecanismo menos relevante en la supresión de la población de células B autorreactivas [183].

En el caso del modelo K/BxNsf, se ha descrito la presencia de células plasmáticas autorreactivas que se caracterizan por presentar una disminución en la expresión de

CXCR4, esta condición impide el homing de esta población autorreactiva y su acumulación en los centros germinales y la eventual producción de IgG anti-Fc γ [190]. Adicionalmente, en términos generales se ha descrito que las células B autorreactivas tienen una menor expresión de receptores de homing [191, 190] y una menor densidad de receptores de sobrevivencia como los receptores de BAFF [108].

- c) Los datos de nuestro modelo *in vivo* podrían sugerir que las células Treg suprimen/inhiben otra población de células B convencionales durante un período mayor de la fase experimental. Es decir, las células Treg tienen como primer blanco suprimir la población de células B “convencionales” productoras de IgG anti-IgY. Constituyendo la producción de IgG anti-Fc γ un efecto secundario, las células Treg no están enfocadas en erradicar la producción de este autoanticuerpo.
- d) Existen otras poblaciones celulares que directa o indirectamente podrían ser el principal supresor de la población de células B autorreactivas. Por ejemplo, se ha reportado en lupus eritematoso sistémico que la población de células T CD8+CD28- se encargan de suprimir la población de LT efectora [192], lo que eventualmente llevaría a la supresión de los linfocitos autorreactivos asociados con la producción de autoanticuerpos.
- e) La población de LB autorreactivos productores de autoanticuerpos modulan la función de la población de células Treg, y promueven un ambiente proinflamatorio. Se ha reportado, que los LB tienen la capacidad de alterar la frecuencia y función de las células Treg, al promover un microambiente proinflamatorio [193], lo cual está asociado a una disminución de la población CD4+ y un incremento en la población CD4+CD25+Foxp3+ [193].

Mediante el ensayo de depleción con el anticuerpo monoclonal anti-CD25, la única diferencia que podría sugerir una asociación entre la población de células Treg y la respuesta humoral fue observada en el ensayo de la 16^a semana. En el cuarto día después de iniciado el tratamiento con anti-CD25, el nivel de IgG anti-IgY disminuyó y posteriormente alcanzó el nivel de producción previo a la depleción. En cambio, la producción del autoanticuerpo IgG anti-Fc γ mantuvo el mismo nivel de producción después del cuarto día.

Por lo anterior, en nuestro modelo de ruptura de tolerancia la frecuencia de la población de células Treg podría no incidir directamente en la declinación de la producción de autoanticuerpo IgG anti-Fc γ , por lo que es factible que mecanismos inhibitorios mediados por receptores como Fc γ RIIb (CD32b) participen en la supresión de la población de las células B autorreactivas productoras de IgG anti-Fc γ [194]. Además, diversos reportes han señalado que las células B autorreactivas

expresan una menor proporción de receptores de activación y coestimulación respecto a las células B convencionales, por lo tanto bajo condiciones de competencia las células B autorreactivas presentan una menor sobrevivencia y por ende hay una declinación abrupta de la producción de IgG anti-Fc γ . Por ejemplo, se ha reportado que BAFF y APRIL son ligandos indispensables para el desarrollo de las células B [108, 109].

Con este modelo hemos demostrado que la IgY de paloma tiene la capacidad inmunogénica de activar la población de células B autorreactivas productoras de IgG anti-Fc γ . Nuestro objetivo principal fue demostrar que la inmunización con IgY tiene la capacidad de inducir la producción de autoanticuerpo IgG anti-Fc γ y eventualmente establecer un modelo con el cual poder analizar los diversos mecanismos asociados a la ruptura de tolerancia a la fracción Fc γ de inmunoglobulina.

En este sentido, debe considerarse que estudios comparativos de los esquemas de inmunización intranasal y subcutáneo han descrito que el nivel de IgG antígeno específico es semejante y que el comportamiento en la cinética de producción es similar [195–197]. Sin embargo, entre las diferencias descritas entre la estimulación de mucosas y la realizada vía subcutánea, se indica que las células participantes en la inmunización de las mucosas es de perfil Th1, mientras que en la vía subcutánea se promueve una respuesta de perfil Th2 [195]. Un dato interesante es que diversos estudios han reportado la producción de autoanticuerpos IgA anti-Fc γ , incluso años antes del comienzo de la patología extra-articular [78, 116, 117, 198]. Por ejemplo, se ha reportado que en enfermedades pulmonares la asociación entre la aparición del autoanticuerpo anti-Fc γ con la exposición a agentes infecciosos y/o la exposición a agentes nocivos como el tabaco [78, 199].

CONCLUSIONES

Por lo anterior, debe considerarse que nuestro modelo de producción de autoanticuerpo IgG anti-Fc γ constituye una herramienta para el estudio de los mecanismos asociados a la ruptura de tolerancia de la fracción Fc γ de inmunoglobulina. Un hallazgo interesante fue la asociación entre la frecuencia de la población de células Treg y producción del autoanticuerpo. En el que el mecanismo exacto a estos eventos resulta desconocido pero en los que probablemente involucra la formación de complejos inmunes, y que serán abordados en el siguiente proyecto. El siguiente objetivo es identificar los mecanismos de supresión que conllevan a la declinación del autoanticuerpo. Además es necesario implementar el modelo en el que mediante la estimulación de las mucosas se identifique el incremento en el nivel de autoanticuerpo IgG anti-Fc γ y analizar si hay otros mecanismos fisiopatológicos e inmunológicos asociados a la ruptura de tolerancia de la fracción

Fc γ de inmunoglobulina y a la neumonitis por hipersensibilidad asociada a la exposición de palomas.

PERSPECTIVAS

Los complejos inmunes circulantes pueden promover la activación de la población de células autorreactivas T y autorreactivas B, con ello la producción de autoanticuerpo anti-Fc γ . Su declinación probablemente está dada por mecanismos de supresión asociados a receptores inhibitorios (como Fc γ RIIb). Nuestro siguiente objetivo será estudiar la asociación entre los complejos inmunes y los mecanismos celulares y moleculares que se suscitan previo, durante y posterior a la respuesta humoral autoinmune reactiva a Fc γ .

LITERATURA CITADA

1. Ayres, J. S., and D. S. Schneider. 2012. Tolerance of Infections. *Annu. Rev. Immunol.* 30: 271–294.
2. Kyewski, B., and L. Klein. 2006. a Central Role for Central Tolerance. *Annu. Rev. Immunol.* 24: 571–606.
3. Goodnow, C. C., J. Sprent, B. F. de St Groth, and C. G. Vinuesa. 2005. Cellular and genetic mechanisms of self tolerance and autoimmunity. *Nature* 435: 590–597.
4. Walker, L. S. K., and A. K. Abbas. 2002. the Enemy Within: Keeping Self-Reactive T Cells At Bay in the Periphery. *Nat. Rev. Immunol.* 2: 11–19.
5. Haddad, R., P. Guardiola, B. Izac, C. Thibault, J. Radich, A. Delezoide, C. Baillou, M. Lemoine, J. C. Gluckman, and B. Canque. 2004. Molecular characterization of early human T / NK and B-lymphoid progenitor cells in umbilical cord blood. *Blood* 104: 3918–3926.
6. Lu, L. W., and D. G. Osmond. 1997. Apoptosis during B lymphopoiesis in mouse bone marrow. *J. Immunol.* 158: 5136–5145.
7. Miosge, L. A., and C. C. Goodnow. 2005. Genes, pathways and checkpoints in lymphocyte development and homeostasis. *Immunol. Cell Biol.* 83: 318–335.
8. Paul, W. E. 2008. *Fundamental Immunology*, 5th ed. Philadelphia, PA.
9. Daisuke Kitamura. 2008. *How the Immune system recognizes self and nonself*, (Daisuke Kitamura, ed). Springer, Shinano, Japan.
10. Klein, L., M. Hinterberger, G. Wirnsberger, and B. Kyewski. 2009. Antigen presentation in the thymus for positive selection and central tolerance induction. *Nat. Rev. Immunol.* 9: 833–844.
11. Wraith, D. C. 2006. Avidity and the Art of Self Non-Self Discrimination. *Immunity* 25: 191–193.
12. Stritesky, G. L., S. C. Jameson, and K. A. Hogquist. 2012. Selection of Self-Reactive T Cells in the Thymus. *Annu. Rev. Immunol.* 30: 95–114.
13. Pollard, M. 2006. *Autoantibodies and Autoimmunity*,. Wiley-VCH, Weinheim, Germany.
14. Xing, Y., and K. A. Hogquist. 2012. T-Cell Tolerance : Central and Peripheral. 1–16.
15. Baldwin, T. a, M. M. Sandau, S. C. Jameson, and K. a Hogquist. 2005. The timing of TCR alpha expression critically influences T cell development and selection. *J. Exp. Med.* 202: 111–121.
16. McCaughy, T. M., T. A. Baldwin, M. S. Wilken, and K. A. Hogquist. 2008. Clonal deletion of thymocytes can occur in the cortex with no involvement of the medulla. *J. Exp. Med.* 205: 2575–84.
17. Hu, Q. N., and T. A. Baldwin. 2015. Differential Roles for Bim and Nur77 in Thymocyte Clonal Deletion Induced by Ubiquitous Self-Antigen. *J. Immunol.* 194: 2643–2653.
18. Burger, M. L., K. K. Leung, M. J. Bennett, and A. Winoto. 2014. T cell-specific inhibition of multiple apoptotic pathways blocks negative selection and causes autoimmunity. *Elife* 3: 1–22.
19. Meffre, E., and H. Wardemann. 2008. B-cell tolerance checkpoints in health and autoimmunity. *Curr. Opin. Immunol.* 20: 632–638.
20. Basten, A., and P. A. Silveira. 2010. B-cell tolerance: Mechanisms and implications. *Curr. Opin. Immunol.* 22: 566–574.
21. Benschop, R. J., E. Brandl, a C. Chan, and J. C. Cambier. 2001. Unique signaling properties of B cell

- antigen receptor in mature and immature B cells: implications for tolerance and activation. *J. Immunol.* 167: 4172–9.
22. Bannish, G., E. M. Fuentes-Pananá, J. C. Cambier, W. S. Pear, and J. G. Monroe. 2001. Ligand-independent Signaling Functions for the B Lymphocyte Antigen Receptor and Their Role in Positive Selection during B Lymphopoiesis. *J. Exp. Med.* 121400: 1583–1596.
23. Donovan, E. E., R. Pelanda, and R. M. Torres. 2010. S1P3 confers differential S1P-induced migration by autoreactive and non-autoreactive immature B cells and is required for normal B-cell development. *Eur. J. Immunol.* 40: 688–698.
24. Takahashi, Y., H. Ohta, and T. Takemori. 2001. Fas is required for clonal selection in germinal centers and the subsequent establishment of the memory B cell repertoire. *Immunity* 14: 181–192.
25. Vinuesa, C. G., I. Sanz, and M. C. Cook. 2009. Dysregulation of germinal centres in autoimmune disease. *Nat. Rev. Immunol.* 9: 845–857.
26. Hao, Z., G. S. Duncan, J. Seagal, Y. Su, C. Hong, N. Chen, A. Elia, A. Wakeham, W. Y. Li, G. a Wood, S. Casola, K. Rajewsky, and T. W. Mak. 2012. Fas Receptor Expression in Germinal-Center B cells is essential for T and B Lymphocyte Homeostasis. *Immunity* 29: 615–627.
27. Yu, D., S. Rao, L. M. Tsai, S. K. Lee, Y. He, E. L. Sutcliffe, M. Srivastava, M. Linterman, L. Zheng, N. Simpson, J. I. Ellyard, I. A. Parish, C. S. Ma, Q. J. Li, C. R. Parish, C. R. Mackay, and C. G. Vinuesa. 2009. The Transcriptional Repressor Bcl-6 Directs T Follicular Helper Cell Lineage Commitment. *Immunity* 31: 457–468.
28. Yu, H., J. Zhang, R. Fu, H. Liu, H. Wang, K. Ding, Y. Wang, L. Li, H. Wang, and Z. Shao. 2013. Increased frequency of bone marrow T follicular helper cells in patients with immune-related pancytopenia. *Clin. Dev. Immunol.* 2013: 730450.
29. Ray, S. K., C. Putterman, and B. Diamond. 1996. Pathogenic autoantibodies are routinely generated during the response to foreign antigen: a paradigm for autoimmune disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93: 2019–24.
30. Manuscript, A. 2008. B cell receptor editing in tolerance and autoimmunity. *Ann. New York Acad. o Sci.* 1217: 96–121.
31. Casellas, R., Q. Zhang, N.-Y. Zheng, M. D. Mathias, K. Smith, and P. C. Wilson. 2007. Igkappa allelic inclusion is a consequence of receptor editing. *J. Exp. Med.* 204: 153–160.
32. Huang, H., J. F. Kearney, M. J. Grusby, C. Benoist, and D. Mathis. 2006. Induction of tolerance in arthritogenic B cells with receptors of differing affinity for self-antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103: 3734–9.
33. Sabouri, Z., P. Schofield, K. Horikawa, E. Spierings, D. Kipling, K. L. Randall, D. Langley, B. Roome, R. Vazquez-Lombardi, R. Rouet, J. Hermes, T. D. Chan, R. Brink, D. K. Dunn-Walters, D. Christ, and C. C. Goodnow. 2014. Redemption of autoantibodies on anergic B cells by variable-region glycosylation and mutation away from self-reactivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111: E2567-75.
34. Dewitte, W., and J. A. H. Murray. 2003. T cell anergy. *Annu. Rev. Immunol.* 54: 305–334.
35. Choi, S., and R. H. Schwartz. 2007. Molecular mechanisms for adaptive tolerance and other T cell anergy models. *Semin. Immunol.* 19: 140–152.
36. Cambier, J. C., S. B. Gauld, K. T. Merrell, and B. J. Vilen. 2007. B-cell anergy: from transgenic models to naturally occurring anergic B cells? *Nat. Rev. Immunol.* 7: 633–43.
37. Chappert, P., and R. H. Schwartz. 2010. Induction of T cell anergy: Integration of environmental cues and

- infectious tolerance. *Curr. Opin. Immunol.* 22: 552–559.
38. Romagnani, S. 2006. Regulation of the T cell response. *Clin. Exp. Allergy* 36: 1357–1366.
39. Mondino, A., and D. L. Mueller. 2007. mTOR at the crossroads of T cell proliferation and tolerance. *Semin. Immunol.* 19: 162–172.
40. O’Neill, S. K., A. Getahun, S. B. Gauld, K. T. Merrell, I. Tamir, M. J. Smith, J. M. Dal Porto, Q. Z. Li, and J. C. Cambier. 2011. Monophosphorylation of CD79a and CD79b ITAM motifs initiates a SHIP-1 phosphatase-mediated inhibitory signaling cascade required for B cell anergy. *Immunity* 35: 746–756.
41. Walter, F. T., P. Office, and T. R. Melbourne. 1996. Commentary Clonal Anergy of B Cells: A Flexible, Reversible, and Quantitative Concept. *Immunology* 183: 1953–1956.
42. Bléry, M., L. Tze, L. a Miosge, J. E. Jun, and C. C. Goodnow. 2006. Essential role of membrane cholesterol in accelerated BCR internalization and uncoupling from NF-kappa B in B cell clonal anergy. *J. Exp. Med.* 203: 1773–83.
43. Sakaguchi, S., F. Powrie, and R. M. Ransohoff. 2012. Tolerance in Autoimmune Disease. *Nat. Immunol.* 18: 54–58.
44. Mizoguchi, A., E. Mizoguchi, H. Takedatsu, R. S. Blumberg, and A. K. Bhan. 2002. Generates IL-10-Producing Regulatory B Cell Subset Characterized by CD1d Upregulation. *Cell* 16: 219–230.
45. Sakaguchi, S. 2005. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat. Immunol.* 6: 345–52.
46. Sakaguchi, S. 2004. Naturally arising CD4+ regulatory T cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune response. *Annu. Rev. Immunol.* 22: 531–562.
47. Josefowicz, S. Z., L. F. Lu, and A. Y. Rudensky. 2012. Regulatory T cells: mechanisms of differentiation and function. *Annu. Rev. Immunol.* 30: 531–564.
48. Corthay, A. 2009. How do regulatory t cells work? *Scand. J. Immunol.* 70: 326–336.
49. Förster, R., A. C. Davalos-Misslitz, and A. Rot. 2008. CCR7 and its ligands: balancing immunity and tolerance. *Nat. Rev. Immunol.* 8: 362–71.
50. Sakaguchi, S., T. Yamaguchi, T. Nomura, and M. Ono. 2008. Regulatory T Cells and Immune Tolerance. *Cell* 133: 775–787.
51. Mills, K. H. G., and P. McGuirk. 2004. Antigen-specific regulatory T cells-their induction and role in infection. *Semin Immunol* 16: 107–117.
52. Sakaguchi, S., K. Wing, Y. Onishi, P. Prieto-Martin, and T. Yamaguchi. 2009. Regulatory T cells: How do they suppress immune responses? *Int. Immunol.* 21: 1105–1111.
53. Walker, L. S. K. 2013. Treg and CTLA-4: Two intertwining pathways to immune tolerance. *J. Autoimmun.* 45: 49–57.
54. Mueller, D. L., and M. K. Jenkins. 1997. Autoimmunity : When self-tolerance breaks down. 255–257.
55. Hewagama, A., and B. Richardson. 2009. The genetics and epigenetics of autoimmune diseases. *J. Autoimmun.* 33: 3–11.
56. Davies, A. J. S. 2008. Immunological tolerance and the autoimmune response. *Autoimmun. Rev.* 7: 538–543.
57. Ryan, K. R., S. D. Patel, L. a Stephens, and S. M. Anderton. 2007. Death, adaptation and regulation: the

- three pillars of immune tolerance restrict the risk of autoimmune disease caused by molecular mimicry. *J. Autoimmun.* 29: 262–71.
58. Anaya, J., M. García-carrasco, and R. Cervera. 2005. Autoinmunidad y Enfermedad Autoinmune. *Med. Interna (Bucur)*. 546.
59. Baccala, R., K. Hoebe, D. H. Kono, B. Beutler, and A. N. Theofilopoulos. 2007. TLR-dependent and TLR-independent pathways of type I interferon induction in systemic autoimmunity. *Nat. Med.* 13: 543–51.
60. Lukacs-Kornek, V., and S. J. Turley. 2011. Self-antigen presentation by dendritic cells and lymphoid stroma and its implications for autoimmunity. *Curr. Opin. Immunol.* 23: 138–145.
61. Prasad, K. V, and B. S. Prabhakar. 2012. Apoptosis and autoimmune disorders. *Autoimmunity* 36: 323–30.
62. Racanelli, V., M. Prete, G. Musaraj, F. Dammacco, and F. Perosa. 2011. Autoantibodies to intracellular antigens: Generation and pathogenetic role. *Autoimmun. Rev.* 10: 503–508.
63. Shlomchik, M. J. 2008. Sites and stages of autoreactive B cell activation and regulation. *Immunity* 28: 18–28.
64. Chan, O., and M. J. Shlomchik. 1998. A new role for B cells in systemic autoimmunity: B cells promote spontaneous T cell activation in MRL-lpr/lpr mice. *J. Immunol.* 160: 51–59.
65. Takahashi, T., Y. Kuniyasu, M. Toda, N. Sakaguchi, M. Itoh, M. Iwata, J. Shimizu, and S. Sakaguchi. 1998. Immunologic self-tolerance maintained by CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state. *Int. Immunol.* 10: 1969–1980.
66. Mannoor, K., A. Matejuk, Y. Xu, M. Beardall, and C. Chen. 2012. Expression of natural autoantibodies in MRL-lpr mice protects from lupus nephritis and improves survival. *J. Immunol.* 188: 3628–38.
67. Quintana, F. J., E. Buzas, Z. Prohászka, A. Bíró, J. Kocsis, G. Füst, A. Falus, and I. R. Cohen. 2004. Knock-out of the histidine decarboxylase gene modifies the repertoire of natural autoantibodies. *J. Autoimmun.* 22: 297–305.
68. Satoh, M., A. Kumar, Y. S. Kanwar, and W. H. Reeves. 1995. Anti-nuclear antibody production and immune-complex glomerulonephritis in BALB/c mice treated with pristane. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92: 10934–10938.
69. Voynova, E. N., A. I. Tchorbanov, T. A. Todorov, and T. L. Vassilev. 2005. Breaking of tolerance to native DNA in nonautoimmune mice by immunization with natural protein/DNA complexes. *Lupus* 14: 543–550.
70. Lang, K. S., A. Burow, M. Kurrer, P. A. Lang, and M. Recher. 2007. The role of the innate immune response in autoimmune disease. *J. Autoimmun.* 29: 206–212.
71. Millar, D. G., K. M. Garza, B. Odermatt, A. R. Elford, N. Ono, Z. Li, and P. S. Ohashi. 2003. Hsp70 promotes antigen-presenting cell function and converts T-cell tolerance to autoimmunity in vivo. *Nat. Med.* 9: 1469–1476.
72. Angelica, M. D., and Y. Fong. 2011. Breaking T cell tolerance to beta cell antigens by merocytic dendritic cells. *Cell. Mol. Life Sci.* 68: 520–529.
73. Luu, V. P., M. I. Vazquez, and A. Zlotnik. 2014. B cells participate in tolerance and autoimmunity through cytokine production. *Autoimmunity* 47: 1–12.
74. Meyer-Bahlburg, A., and D. J. Rawlings. 2008. B cell autonomous TLR signaling and autoimmunity. *Autoimmun. Rev.* 7: 313–316.

75. Leadbetter, E. a, I. R. Rifkin, A. M. Hohlbaum, B. C. Beaudette, M. J. Shlomchik, and A. Marshak-Rothstein. 2002. Chromatin-IgG complexes activate B cells by dual engagement of IgM and Toll-like receptors. *Nature* 416: 603–607.
76. Zhou, Z. H., Y. Zhang, Y. F. Hu, L. M. Wahl, J. O. Cisar, and A. L. Notkins. 2007. The Broad Antibacterial Activity of the Natural Antibody Repertoire Is Due to Polyreactive Antibodies. *Cell Host Microbe* 1: 51–61.
77. Wang, Z., Z. J. Chen, J. Wheeler, S. Shen, and a L. Notkins. 2001. Characterization of murine polyreactive antigen-binding B cells: presentation of antigens to T cells. *Eur. J. Immunol.* 31: 1106–14.
78. Malmström, V., A. I. Catrina, and L. Klareskog. 2016. The immunopathogenesis of seropositive rheumatoid arthritis: from triggering to targeting. *Nat. Rev. Immunol.* 17: 60–75.
79. Symmons, D. P., and K. Chakravarty. 1993. Can immunisation trigger rheumatoid arthritis? *Ann. Rheum. Dis.* 52: 843–4.
80. Nordström, E., E. Möller, and M. Abedi-Valugerdi. 1998. Induction of IgG rheumatoid factor (RF) production by antibody-antibody (RF-like) immune complexes: the role of T cells, complement and Fc gamma receptors. *J. Autoimmun.* 11: 131–40.
81. Rifkin, I. R., E. a Leadbetter, B. C. Beaudette, C. Kiani, M. Monestier, M. J. Shlomchik, and a Marshak-Rothstein. 2000. Immune complexes present in the sera of autoimmune mice activate rheumatoid factor B cells. *J. Immunol.* 165: 1626–33.
82. Turk, Z., S. Ljubic, N. Turk, and B. Benko. 2001. Detection of autoantibodies against advanced glycation endproducts and AGE-immune complexes in serum of patients with diabetes mellitus. *Clin. Chim. Acta* 303: 105–115.
83. Aderem, a, and D. M. Underhill. 1999. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu. Rev. Immunol.* 17: 593–623.
84. Heath, W. R., and F. R. Carbone. 2009. Dendritic cell subsets in primary and secondary T cell responses at body surfaces. *Nat. Immunol.* 10: 1237–1244.
85. Gilbert, M. R., N. J. Wagner, S. Z. Jones, A. B. Wisz, J. R. Roques, K. N. Krum, S.-R. Lee, V. Nickeleit, C. Hulbert, J. W. Thomas, S. B. Gauld, and B. J. Vilen. 2012. Autoreactive preplasma cells break tolerance in the absence of regulation by dendritic cells and macrophages. *J. Immunol.* 189: 711–20.
86. Radbruch, A. (Andreas), and P. E. Lipsky. 2006. *Current concepts in autoimmunity and chronic inflammation*.
87. Kissler, S., S. M. Anderton, and D. C. Wraith. 2001. Antigen-presenting cell activation: a link between infection and autoimmunity? *J. Autoimmun.* 16: 303–8.
88. Cañas, C. A., F. Cañas, F. Bonilla-Abadía, F. E. Ospina, and G. J. Tobón. 2015. Epigenetics changes associated to environmental triggers in autoimmunity. *Dep. Intern. Med.* 6934: 1–11.
89. D??ring, Y., H. D. Manthey, M. Drechsler, D. Lievens, R. T. A. Megens, O. Soehnlein, M. Busch, M. Manca, R. R. Koenen, J. Pelisek, M. J. Daemen, E. Lutgens, M. Zenke, C. J. Binder, C. Weber, and A. Zerneck. 2012. Auto-antigenic protein-DNA complexes stimulate plasmacytoid dendritic cells to promote atherosclerosis. *Circulation* 125: 1673–1683.
90. Dhaeze, T., P. Stinissen, A. Liston, and N. Hellings. 2015. Humoral autoimmunity: A failure of regulatory T cells? *Autoimmun. Rev.* 14: 735–741.
91. Lafaille, J. J., F. V Keere, A. L. Hsu, J. L. Baron, W. Haas, C. S. Raine, and S. Tonegawa. 1997. Myelin basic protein-specific T helper 2 (Th2) cells cause experimental autoimmune encephalomyelitis in

- immunodeficient hosts rather than protect them from the disease. *J. Exp. Med.* 186: 307–12.
92. Maffia, P., J. M. Brewer, J. A. Gracie, A. Ianaro, B. P. Leung, P. J. Mitchell, M. Smith, I. B. McInnes, P. Garside, and K. M. Smith. 2010. Inducing Experimental Arthritis and Breaking Self-Tolerance to Joint-Specific Antigens with Trackable, Ovalbumin Specific T-Cells. *J. Immunol.* .
93. Rickinson, A. B., and D. J. Moss. 1997. Human Cytotoxic T Lymphocyte Responses To Epstein-Barr Virus Infection. .
94. Atta, A. M., E. M. Carvalho, S. M. B. Jerônimo, and M. L. B. Sousa Atta. 2007. Serum markers of rheumatoid arthritis in visceral leishmaniasis: Rheumatoid factor and anti-cyclic citrullinated peptide antibody. *J. Autoimmun.* 28: 55–58.
95. Posnett, D. N., and J. Edinger. 1997. When do microbes stimulate rheumatoid factor? *J. Exp. Med.* 185: 1721–1723.
96. Fossati, L., J. Merino, and S. Izui. 1990. CD4+ T cells play a major role for IgM and IgG anti-DNA production in mice infected with *Plasmodium yoelii*. *Clin. Exp. Immunol.* 79: 291–296.
97. Martin, F., A. C. Chan, and O. D. N. A. Way. 2004. Pathogenic Roles of B Cells in Human Autoimmunity : Insights from the Clinic The pathogenic roles of B cells in human autoimmune. *Heal. (San Fr.* 20: 517–527.
98. Karlsen, A. E., and T. Dyrberg. 1998. Molecular mimicry between non-self, modified self and self in autoimmunity. *Semin. Immunol.* 10: 25–34.
99. Rashid, T., and A. Ebringer. 2012. Autoimmunity in rheumatic diseases is induced by microbial infections via crossreactivity or molecular mimicry. *Autoimmune Dis.* 1: 1–9.
100. Doyle, H. A., and M. J. Mamula. 2012. Autoantigenesis: The evolution of protein modifications in autoimmune disease. *Curr. Opin. Immunol.* 24: 112–118.
101. Karsten, C. M., and J. Köhl. 2012. The immunoglobulin, IgG Fc receptor and complement triangle in autoimmune diseases. *Immunobiology* 217: 1067–1079.
102. Zhou, Z.-H., Y. Zhang, Y.-F. Hu, L. M. Wahl, J. O. Cisar, and A. L. Notkins. 2007. The broad antibacterial activity of the natural antibody repertoire is due to polyreactive antibodies. *Cell Host Microbe* 1: 51–61.
103. Sutton, B., A. Corper, V. Bonagura, and M. Taussig. 2000. The structure and origin of rheumatoid factors. *Immunol. Today* 21: 177–183.
104. Ochsenbein, A. F., T. Fehr, C. Lutz, M. Suter, F. Brombacher, H. Hengartner, and R. M. Zinkernagel. 2011. Control of Early Viral and Bacterial Distribution and Disease by Natural Antibodies. *Science* (80-.). 2156.
105. Baumgarth, B. N., O. C. Herman, G. C. Jager, L. E. Brown, L. A. Herzenberg, and J. Chen. 2000. B-1 and B-2 Cell – derived Immunoglobulin M Antibodies Are Nonredundant Components of the Protective Response to Influenza Virus Infection. 192.
106. Tiller, T., M. Tsuiji, S. Yurasov, K. Velinzon, M. C. Nussenzweig, and H. Wardemann. 2007. Autoreactivity in human IgG+ memory B cells. *Immunity* 26: 205–13.
107. Keenan, R. a, A. De Riva, B. Corleis, L. Hepburn, S. Licence, T. H. Winkler, and I.-L. Mårtensson. 2008. Censoring of autoreactive B cell development by the pre-B cell receptor. *Science* 321: 696–9.
108. Varin, M. M., L. Le Pottier, P. Youinou, D. Saulep, F. Mackay, and J. O. Pers. 2010. B-cell tolerance breakdown in Sjögren's Syndrome: Focus on BAFF. *Autoimmun. Rev.* 9: 604–608.

109. Thien, M., T. G. Phan, S. Gardam, M. Amesbury, A. Basten, F. MacKay, and R. Brink. 2004. Excess BAFF rescues self-reactive B cells from peripheral deletion and allows them to enter forbidden follicular and marginal zone niches. *Immunity* 20: 785–798.
110. Giltiay, N. V., Y. Lu, J. L. Cullen, T. N. Jørgensen, M. J. Shlomchik, and X. Li. 2013. Spontaneous loss of tolerance of autoreactive B cells in Act1-deficient rheumatoid factor transgenic mice. *J. Immunol.* 191: 2155–63.
111. Johnson, A. C., L. M. Davison, N. V. Giltiay, C. Vareechon, X. Li, and T. N. Jørgensen. 2012. Lack of T cells in Act1-deficient mice results in elevated IgM-specific autoantibodies but reduced lupus-like disease. *Eur. J. Immunol.* 42: 1695–1705.
112. Padgett, K. A., C. Selmi, T. P. Kenny, P. S. C. Leung, D. L. Balkwill, A. A. Ansari, R. L. Coppel, and M. E. Gershwin. 2005. Phylogenetic and immunological definition of four lipoylated proteins from *Novosphingobium aromaticivorans*, implications for primary biliary cirrhosis. *J. Autoimmun.* 24: 209–219.
113. Wing, K., and S. Sakaguchi. 2010. Regulatory T cells exert checks and balances on self tolerance and autoimmunity. *Nat. Immunol.* 11: 7–13.
114. Tarkowski, A., C. Czerkinsky, and L. A. Nilsson. 1985. Simultaneous induction of rheumatoid factor- and antigen-specific antibody-secreting cells during the secondary immune response in man. *Clin Exp Immunol* 61: 379–387.
115. Shi, J., L. a van de Stadt, E. W. N. Levarht, T. W. J. Huizinga, D. Hamann, D. van Schaardenburg, R. E. M. Toes, and L. a Trouw. 2014. Anti-carbamylated protein (anti-CarP) antibodies precede the onset of rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 73: 780–3.
116. Song, Y. W., and E. H. Kang. 2009. Autoantibodies in rheumatoid arthritis: Rheumatoid factors and anticitrullinated protein antibodies. *QJMed* 103: 139–146.
117. Hwang, J., J.-U. Song, and J. K. Ahn. 2016. Decline of Pulmonary Function Is Associated With the Presence of Rheumatoid Factor in Korean Health Screening Subjects Without Clinically Apparent Lung Disease: A Cross-Sectional Study. *Medicine (Baltimore)*. 95: e3668.
118. Newkirk, M. M. 2002. Rheumatoid Factors: Host Resistance or Autoimmunity? *Clin. Immunol.* 104: 1–13.
119. Westwood, O. M. R., P. N. Nelson, and F. C. Hay. 2006. Rheumatoid factors: What’s new? *Rheumatology* 45: 379–385.
120. Haas, K. M., J. C. Poe, D. A. Steeber, and T. F. Tedder. 2005. B-1a and B-1b cells exhibit distinct developmental requirements and have unique functional roles in innate and adaptive immunity to *S. pneumoniae*. *Immunity* 23: 7–18.
121. Baumgarth, N. 2010. The double life of a B-1 cell : self-reactivity selects for protective effector functions. *Nat. Publ. Gr.* 11: 34–46.
122. Edwards, J. C. W., G. Cambridge, and V. M. Abrahams. 1999. Do self-perpetuating B lymphocytes drive human autoimmune disease? *Immunology* 97: 188–196.
123. Doyle, H. a, M.-L. Yang, M. T. Raycroft, R. J. Gee, and M. J. Mamula. 2014. Autoantigens: novel forms and presentation to the immune system. *Autoimmunity* 47: 220–33.
124. Henle, G., E. T. Lennette, M. A. Alspaugh, and W. Henle. 1979. Rheumatoid factor as a cause of positive reactions in tests for Epstein-Barr virus-specific IgM antibodies. *Clin. Exp. Immunol.* 36: 415–22.
125. Kujala, G. A., A. C. Steere, and J. S. th Davis. 1987. IgM rheumatoid factor in Lyme disease: correlation with disease activity, total serum IgM, and IgM antibody to *Borrelia burgdorferi*. *J Rheumatol* 14: 772–776.

126. Hook, R. R., T. J. Green, and M. K. Stuart. 2003. Rheumatoid factor-like IgM in *Plasmodium berghei* (Apicomplexa: Haemosporida) infections of BALB/c mice. *Folia Parasitol. (Praha)*. 50: 176–182.
127. Sansan, H. 2016. Levels of Rheumatoid Factor in *Plasmodium Falciparum* Malaria in Children and Its Association with Gender, Age and Parasite Density. *Int. J. Immunol.* 4: 46.
128. Nowak, U., K. Gill, E. Skamene, and M. M. Newkirk. 2007. Rheumatoid factor induction in murine models of liver injury. *Clin. Exp. Immunol.* 147: 324–329.
129. Masdottir, B., T. Jónsson, V. Manfredsdottir, A. Víkingsson, A. Brekkan, and H. Valdimarsson. 2000. Smoking, rheumatoid factor isotypes and severity of rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*. 39: 1202–5.
130. Thorbjörn Jónsson, Jón Thorsteinsson and Valdimarsson, H. 1991. Rheumatoid Factor Isotypes and Cancer Prognosis. *Cancer* 69: 2160–2165.
131. J.J. Twomey, R.D. Rossen, V. M. L. 1976. Rheumatoid factor and tumor-host interaction. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 73: 2106–2108.
132. Hein, G. E., M. Köhler, P. Oelzner, G. Stein, and S. Franke. 2005. The advanced glycation end product pentosidine correlates to IL-6 and other relevant inflammatory markers in rheumatoid arthritis. *Rheumatol. Int.* 26: 137–141.
133. Goulabchand, R., T. Vincent, F. Batteux, J. François Eliaou, and P. Guilpain. 2014. Impact of autoantibody glycosylation in autoimmune diseases. *Autoimmun. Rev.* 13: 742–750.
134. Israeli, E., N. Agmon-Levin, M. Blank, and Y. Shoenfeld. 2009. Adjuvants and autoimmunity. *Lupus* 18: 1217–1225.
135. Girard, M., Y. Lacasse, and Y. Cormier. 2009. Hypersensitivity pneumonitis. *Allergy* 64: 322–34.
136. Lacasse, Y., and Y. Cormier. 2006. Hypersensitivity pneumonitis. *Orphanet J. Rare Dis.* 1: 25.
137. Churg, A., A. Bilawich, and J. L. Wright. 2017. Pathology of Chronic Hypersensitivity Pneumonitis: What Is It? What Are the Diagnostic Criteria? Why Do We Care? *Arch. Pathol. Lab. Med.* arpa.2017-0173-RA.
138. Cramer, C., V. Schlönsen, E. Bendstrup, Z. A. Stokholm, J. M. Vestergaard, M. Frydenberg, and H. A. Kolstad. 2016. Risk of hypersensitivity pneumonitis and interstitial lung diseases among pigeon breeders. *Eur. Respir. J.* 48: 818–825.
139. Mcsharry, Anderson, and Boyd. 2000. A review of antigen diversity causing lung disease among pigeon breeders. *Clin. Exp. Allergy* 30: 1221–1229.
140. Takemura, T., T. Akashi, Y. Ohtani, N. Inase, and Y. Yoshizawa. 2008. Pathology of hypersensitivity pneumonitis. *Curr. Opin. Pulm. Med.* 14: 440–54.
141. Barrios, R. 2008. Hypersensitivity pneumonitis. *Arch Pathol Lab Med* 132: 199–203.
142. Manifestations, C. 1993. Relationships Between Characteristics Exposure to Pigeon Antigens *. 1059–1063.
143. Rodrigo, M. J., M. I. Benavent, M. J. Cruz, M. Rosell, C. Murio, C. Pascual, F. Morell, and S. De Bioquímica. 2000. Detection of specific antibodies to pigeon serum and bloom antigens by enzyme linked immunosorbent assay in pigeon breeder ' s disease. *Occup Env. MED* 57: 159–164.
144. Edwards, J. H., J. J. Barboriak, and J. N. Fink. 1970. Antigens in Pigeon Breeders' Disease. 729–734.

145. Aguilar León, D. E., V. Novelo Retana, and E. Martínez-Cordero. 2003. Anti-avian antibodies and rheumatoid factor in pigeon hypersensitivity pneumonitis. *Clin. Exp. Allergy* 33: 226–232.
146. Fred Davison, B. K. and K. A. S. 2008. *Avian Immunology*, 1st ed. (K. B. & S. K. Davison F, ed). Elsevier Inc., San Diego, CA, USA.
147. Warr, G. W., K. E. Magor, and D. A. Higgins. 1969. Warr, Magor, Higgins, 1995, IgY clues to the origins of modern antibodies.pdf. .
148. Guo, Y., M. Gao, H. Zhang, P. Zhao, X. Zhang, X. Luo, B. Ma, and J. Wang. 2014. Molecular characterization and B cell membrane expression analysis of Fc fragment gene of goose IgY. *Res. Vet. Sci.* 97: 288–291.
149. Kovacs-Nolan Y., J. . M. 2004. Avian egg antibodies:basic and potential applications. *Avian Poult. Biol. Rev.* 15: 25–46.
150. Suzuki, N., and Y. C. Lee. 2004. Site-specific N-glycosylation of chicken serum IgG. *Glycobiology* 14: 275–292.
151. Suzuki, N., T. H. Su, S. W. Wu, K. Yamamoto, K. H. Khoo, and Y. C. Lee. 2009. Structural analysis of N-glycans from gull egg white glycoproteins and egg yolk IgG. *Glycobiology* 19: 693–706.
152. Magor, K. E., G. W. Warr, D. Middleton, M. R. Wilson, and D. A. Higgins. 1992. Structural relationship between the two IgY of the duck, *Anas platyrhynchos*: molecular genetic evidence. *J. Immunol.* 149: 2627–2633.
153. Taylor, A. I., B. J. Sutton, and R. A. Calvert. 2010. Mutations in an avian IgY-Fc fragment reveal the locations of monocyte Fc receptor binding sites. *Dev. Comp. Immunol.* 34: 97–101.
154. Warr, G. W., K. E. Magor, and D. A. Higgins. 1995. IgY: clues to the origins of modern antibodies. *Immunol. Today* 16: 392–398.
155. Abbas, A. K., J. Lohr, B. Knoechel, and V. Nagabhushanam. 2004. T cell tolerance and autoimmunity. *Autoimmun. Rev.* 3: 471–475.
156. Zouali, M., and G. Sarmay. 2004. B lymphocyte signaling pathways in systemic autoimmunity: implications for pathogenesis and treatment. *Arthritis Rheum.* 50: 2730–41.
157. Leslie, D., D. Leslie, P. Lipsky, P. Lipsky, A. L. Notkins, and A. L. Notkins. 2001. Autoantibodies as predictors of disease. *Infect. Immun.* 108: 1417–1422.
158. Bizzaro, N. 2007. Autoantibodies as predictors of disease: The clinical and experimental evidence. *Autoimmun. Rev.* 6: 325–333.
159. Nademi, Z., S. Todryk, and C. Baldwin. 2013. Characteristics of antibody responses in Pigeon Fanciers' Lung. *Mol. Immunol.* 54: 227–232.
160. Aranda, I. S., E. Ortega, and E. Martinez. 2016. Experimental induction of autoantibodies to IgG by pigeon IgY. *J Immunol* 2182.
161. Araiza, Mariana Tellez, Aguilar-León. 2008. IgM, IgG and IgA Rheumatoid factors in pigeon hypersensitivity pneumonitis. *J. Clin. ...* 21: 315–321.
162. Harlanisrael. 2005. BALB/c. 1–20.
163. Díaz, P., C. Malavé, N. Zerpa, H. Vázquez, G. D'Suze, Y. Montero, C. Castillo, A. Alagón, and C. Sevcik. 2014. IgY pharmacokinetics in rabbits: Implications for IgY use as antivenoms. *Toxicon* 90: 124–133.
164. Soulas, P., A. Woods, B. Jaulhac, A. M. Knapp, J. L. Pasquali, T. Martin, and A. S. Korganow. 2005.

- Autoantigen, innate immunity, and T cells cooperate to break B cell tolerance during bacterial infection. *J. Clin. Invest.* 115: 2257–2267.
165. Vanderlugt, C. L., and S. D. Miller. 2002. Epitope Spreading in Immune-Mediated Diseases: Implications for Immunotherapy. *Nat. Rev. Immunol.* 2: 85–95.
166. Rose, N. R. 2008. The adjuvant effect in infection and autoimmunity. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* 34: 279–282.
167. Song, Y. W., and E. H. Kang. 2010. The pathogenic role of rheumatoid factor in rheumatoid arthritis R review. *Int. J. Clin. Rheumatol.* 5: 651–658.
168. Fujio, K., T. Okamura, S. Sumitomo, and K. Yamamoto. 2012. Regulatory T cell-mediated control of autoantibody-induced inflammation. *Front. Immunol.* 3: 1–8.
169. Herlands, R. A., S. R. Christensen, R. A. Sweet, U. Hershberg, and M. J. Shlomchik. 2008. T Cell-Independent and Toll-like Receptor-Dependent Antigen-Driven Activation of Autoreactive B Cells. *Immunity* 29: 249–260.
170. Chen, M., F. Aosai, H. S. Mun, K. Norose, H. Hata, and A. Yano. 2000. Anti-HSP70 autoantibody formation by B-1 cells in *Toxoplasma gondii*-infected mice. *Infect. Immun.* 68: 4893–4899.
171. Lee, B. Y. S., P. M. Starkey, and S. Gordon. 1985. Heart-specific autoantibodies following murine Coxsackievirus B3 myocarditis. *J. Exp. Med.* 161: 1112–1121.
172. Kuroda, Y., D. C. Nacionales, J. Akaogi, W. H. Reeves, and M. Satoh. 2004. Autoimmunity induced by adjuvant hydrocarbon oil components of vaccine. *Biomed. Pharmacother.* 58: 325–337.
173. Wernhoff, P., P. Olofsson, and R. Holmdahl. 2003. The Genetic Control of Rheumatoid Factor Production in a Rat Model of Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheum.* 48: 3584–3596.
174. Ols, M. L., J. L. Cullen, A. Turqueti-Neves, J. Giles, and M. J. Shlomchik. 2016. Dendritic Cells Regulate Extrafollicular Autoreactive B Cells via T Cells Expressing Fas and Fas Ligand. *Immunity* 45: 1052–1065.
175. Das, A., B. A. Heesters, A. Bialas, J. O’Flynn, I. R. Rifkin, J. Ochando, N. Mittereder, G. Carlesso, R. Herbst, and M. C. Carroll. 2017. Follicular Dendritic Cell Activation by TLR Ligands Promotes Autoreactive B Cell Responses. *Immunity* 46: 106–119.
176. Taylor, A. I., S. M. Fabiane, B. J. Sutton, and R. A. Calvert. 2009. The crystal structure of an avian IgY-Fc fragment reveals conservation with both mammalian IgG and IgE. *Biochemistry* 48: 558–562.
177. Sevcik, C., P. Díaz, and G. D’Suze. 2008. On the presence of antibodies against bovine, equine and poultry immunoglobulins in human IgG preparations, and its implications on antivenom production. *Toxicon* 51: 10–16.
178. White, J. 2010. Venomous animals: clinical toxinology. In *Molecular, Clinical and Environmental Toxicology* vol. 2. A. Luch, ed. 233–291.
179. Gopalakrishnakone, P., L. D. Possani, E. F. Schwartz, and R. C. Rodríguez De La Vega. 2015. Scorpion venoms. *Scorpion Venoms* 1–575.
180. Ludwig-Portugall, I., E. E. Hamilton-Williams, C. Gottschalk, and C. Kurts. 2008. Cutting edge: CD25+ regulatory T cells prevent expansion and induce apoptosis of B cells specific for tissue autoantigens. *J. Immunol.* 181: 4447–4451.
181. Liu, Y., A. Liu, N. Iikuni, H. Xu, F.-D. Shi, and A. La Cava. 2014. Regulatory CD4+ T cells promote B cell energy in murine lupus. *J. Immunol.* 192: 4069–73.

182. van Herwijnen, M. J. C., L. Wieten, R. van der Zee, P. J. van Kooten, J. P. Wagenaar-Hilbers, A. Hoek, I. den Braber, S. M. Anderton, M. Singh, H. D. Meiring, C. A. C. M. van Els, W. van Eden, and F. Broere. 2012. Regulatory T cells that recognize a ubiquitous stress-inducible self-antigen are long-lived suppressors of autoimmune arthritis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109: 14134–9.
183. Rapetti, L., K.-M. Chavele, C. M. Evans, and M. R. Ehrenstein. 2013. B cell resistance to Fas-mediated apoptosis contributes to their ineffective control by regulatory T cells in rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 74: 294–302.
184. Strainic, M. G., E. M. Shevach, F. An, F. Lin, and M. E. Medof. 2013. Absence of signaling into CD4⁺ cells via C3aR and C5aR enables autoinductive TGF- β 1 signaling and induction of Foxp3⁺ regulatory T cells. *Nat. Immunol.* 14: 162–71.
185. Kwan, W., W. van der Touw, E. Paz-Artal, M. O. Li, and P. S. Heeger. 2013. Signaling through C5a receptor and C3a receptor diminishes function of murine natural regulatory T cells. *J. Exp. Med.* 210: 257–68.
186. Tenorio, E. P., J. E. Olgu??n, J. Fern??ndez, P. Vieyra, and R. Saavedra. 2010. Reduction of Foxp 3+ cells by depletion with the PC61 mAb induces mortality in resistant BALB/c mice infected with toxoplasma gondii. *J. Biomed. Biotechnol.* 2010.
187. Setiady, Y. Y., J. A. Coccia, and P. U. Park. 2010. In vivo depletion of CD4+FOXP3+ Treg cells by the PC61 anti-CD25 monoclonal antibody is mediated by Fc γ RIII+ phagocytes. *Eur. J. Immunol.* 40: 780–786.
188. Flores-Borja, F., E. C. Jury, C. Mauri, and M. R. Ehrenstein. 2008. Defects in CTLA-4 are associated with abnormal regulatory T cell function in rheumatoid arthritis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105: 19396–19401.
189. Sage, P. T., A. M. Paterson, S. B. Lovitch, and A. H. Sharpe. 2014. The coinhibitory receptor CTLA-4 controls B cell responses by modulating T follicular helper, T follicular regulatory, and T regulatory cells. *Immunity* 41: 1026–1039.
190. Jang, E., W. S. Cho, M.-L. Cho, H.-J. Park, H.-J. Oh, S. M. Kang, D.-J. Paik, and J. Youn. 2011. Foxp3+ regulatory T cells control humoral autoimmunity by suppressing the development of long-lived plasma cells. *J. Immunol.* 186: 1546–1553.
191. Bugatti, S., B. Vitolo, R. Caporali, C. Montecucco, and A. Manzo. 2014. B Cells in Rheumatoid Arthritis : From Pathogenic Players to Disease Biomarkers. 2014.
192. Vuddamalay, Y., and J. P. M. van Meerwijk. 2017. CD28- and CD28lowCD8+ regulatory T cells: Of mice and men. *Front. Immunol.* 8: 1–7.
193. Hamel, K. M., Y. Cao, S. Ashaye, Y. Wang, R. Dunn, M. R. Kehry, T. T. Glant, and A. Finnegan. 2011. B cell depletion enhances T regulatory cell activity essential in the suppression of arthritis. *J. Immunol.* 187: 4900–6.
194. Clatworthy, M. R., S. K. Harford, R. J. Mathews, and K. G. C. Smith. 2014. Fc γ RIIb inhibits immune complex-induced VEGF-A production and intranodal lymphangiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111: 17971–17976.
195. Fiorino, F., E. Pettini, G. Pozzi, D. Medaglini, and A. Ciabattini. 2013. Prime-boost strategies in mucosal immunization affect local IgA production and the type of Th response. *Front. Immunol.* 4: 1–8.
196. Kharb, S., and S. Charan. 2011. Mucosal immunization provides better protection than subcutaneous immunization against Pasteurella multocida (B:2) in mice preimmunized with the outer membrane proteins. *Vet. Res. Commun.* 35: 457–461.
197. Waugh, C. A., P. Timms, D. Andrew, G. Rawlinson, J. Brumm, K. Nilsson, and K. W. Beagley. 2015.

Comparison of subcutaneous versus intranasal immunization of male koalas (*Phascolarctos cinereus*) for induction of mucosal and systemic immunity against *Chlamydia pecorum*. *Vaccine* 33: 855–860.

198. Vallbracht, I., and K. Helmke. 2005. Additional diagnostic and clinical value of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies compared with rheumatoid factor isotypes in rheumatoid arthritis. *Autoimmun. Rev.* 4: 389–394.

199. Shaw, M., B. F. Collins, L. A. Ho, and G. Raghu. 2015. Rheumatoid arthritis-associated lung disease. *Eur. Respir. Rev.* 24: 1–16.

Immunization of BALB/c mice with pigeon IgY induces the production of anti-IgG autoantibodies

Ivan Sammir Aranda-Uribe^{a,b}, Enrique Ortega^c and Erasmo Martínez-Cordero^b

^aFacultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Posgrado Ciencias Biológicas, México City, México; ^bLaboratorio de Autoinmunidad, Unidad de Investigación INER, México City, México; ^cInstituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México City, México

ABSTRACT

The breakdown of immunological tolerance due to the activation of autoreactive B and T cells triggers physiopathological processes. An example of such conditions is the production of IgG autoantibodies specific for the Fc portion of IgG (anti-Fc γ IgG). Previous reports have shown that patients with pigeon-related hypersensitivity pneumonitis exhibit an increase in the serum levels of anti-Fc γ IgG. There is no *in vivo* model for the study of this condition and the immunological mechanisms of tolerance breakdown associated with sensitization by pigeon antigens are still unknown. In this work, we show that the repeated immunization of BALB/c mice with pigeon IgY during 16-weeks induces the production of anti-Fc γ IgG and keeps their high levels for seven weeks. The late appearance of anti-Fc γ IgG autoantibodies in the plasma is similar to what has been reported in other experimental autoimmune models. With the occurrence of anti-Fc γ IgG, there is a reduction in the proportion of Foxp3+ cells (regulatory T cells, Tregs) within the population of splenic CD4+CD25+T cells. Thus, our data showed that the immunization of BALB/c mice with IgY promotes the production of anti-Fc γ IgG along with a decrease in Tregs in the spleen. We propose that immunization of mice with pigeon antigens, like IgY can provide a model to study the immunological mechanisms involved in the development of pigeon-related hypersensitivity pneumonitis.

ARTICLE HISTORY

Received 5 February 2017
Revised 31 May 2017
Accepted 17 June 2017

KEYWORDS

Autoantibody; rheumatoid factor; molecular mimicry; regulatory T cells; pigeon IgY; hypersensitivity pneumonitis; bird fancier's lung; pigeon breeder's disease

Introduction

Autoimmunity is a complex process in which a rupture of tolerance leads to the activation of self-reactive B and T cells resulting in the production of antibodies specific for self-molecules (autoantibodies) or of effector T cells specific for self-antigens. IgG is one of the most frequent and interesting targets of autoantibodies. Autoantibodies specific for the Fc portion of IgGs (anti-Fc γ IgG) have been frequently found in several conditions, including autoimmune diseases, advanced age, different infectious and inflammatory disorders, as well as in some neoplasms [1–4]. Different experimental models have reported the appearance of anti-Fc γ autoantibodies after the immunization of animals with proteins that have homology to self-antigens, such as collagen II and HSP70. In such cases, the production of anti-Fc γ IgG autoantibodies has been observed as a secondary event after the initial generation of antibodies against the foreign antigen [5–7]. However, the mechanisms associated with the production of anti-Fc γ autoantibodies have not been clearly defined.

Anti-Fc γ IgG autoantibodies have been detected in patients with hypersensitivity pneumonitis induced by pigeon antigen [8,9]. Pigeon antigen is a complex mixture of pigeon droppings, bloom (keratin microparticles from feather) and serum found in the environmental dust of pigeon-breeding places and in parks with flocks of them, as well as

in feather duvets. Several reports have shown that the inhalation of this "dust" can induce a humoral immune response against pigeon antigens, such as mucin and keratin [9–11], and it has been shown that patients with hypersensitivity pneumonitis develop antibodies against components of the pigeon serum [12,13].

IgY is the major immunoglobulin class present in birds, reptiles and amphibians, and it is phylogenetically and functionally related to the mammalian IgG [14,15]. Several studies have reported the presence of immunoglobulins in faeces [16–18], so it is common to find IgY in pigeon's droppings and therefore in the pigeon antigen. Due to structural similarities between regions of IgG and IgY, it is feasible that IgY is responsible for stimulating the production of anti-Fc γ autoantibodies in individuals exposed to dust with pigeon antigens.

B cell activation that results in antibody production against protein antigens, including the production of autoantibodies, requires T cell cooperation. T cell activity is regulated by a subset of CD4+T cells known as regulatory T cells (Tregs) that are crucial for maintaining immunological tolerance [19]. Several clinical and experimental autoimmunity studies have shown the existence of quantitative and functional alterations in these cells [20]. It is relevant to mention that an impaired function of Tregs has been reported in patients with hypersensitivity pneumonitis

CONTACT Erasmo Martínez Cordero  emartinezcordero@hotmail.com  Laboratorio de Autoinmunidad, Unidad de Investigación Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER), Mexico City, Mexico

© 2017 Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group

[21,22], but the precise role of Tregs in pigeon-related hypersensitivity pneumonitis and the production of anti-Fc γ autoantibodies has not been analyzed yet.

We show that the immunization of BALB/c mice with purified pigeon IgY induces the production of anti-Fc γ IgG autoantibodies, providing us with a model to study the breakdown of immunological tolerance to IgG in patients with pigeon-related hypersensitivity pneumonitis. In addition, we demonstrate that the appearance of anti-Fc γ IgG autoantibodies is associated with a decrease in the frequency of Treg (CD4 + CD25 + Foxp3+) cells in the spleens of immunized mice, which suggests a role for these cells in maintaining immunological tolerance.

Materials and methods

Purification and analysis of IgY

The immunoglobulin Y (IgY) was purified from pigeon (*Columba livia*) egg yolks using a commercial kit (PierceTM Chicken IgY Purification Kit, cat. no. 44918, Thermo Scientific Pierce, Rockford, IL) following the instructions of the manufacturer. The concentration of purified IgY was determined using a kit based on the method of Lowry (Protein Assay Kit, cat. no. 500-01 14, Bio-Rad, Hercules, CA). The purity and molecular weight of the protein chains were assessed by SDS-PAGE. The molecular weight was estimated with molecular weight markers (Precision Plus ProteinTM, cat. no.161-0373, Bio-Rad, Hercules, CA).

Mice

Male BALB/c mice (aged 4–6 weeks) were obtained from the animal facility at the Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) and maintained under barrier conditions with food and water *ad libitum*. All procedures were performed according to protocols approved by the Bioethics Committee of the INER.

Two immunization schemes were used (Figure 1(B)). For the scheme A, the control and experimental groups included 4 animals each ($n=4$), while for the scheme B, the test groups were of 30 mice each ($n=30$). For the immunization scheme A, the antigen (IgY) was subcutaneously inoculated to mice from the experimental group every seven days until their sacrifice at the 23rd week. Fifty micrograms of IgY in complete Freund's adjuvant was used for the first immunization and 25 μ g of IgY in incomplete Freund's adjuvant for the subsequent inoculations. The mice from the control group were injected with PBS in adjuvant and both the control and experimental mice were bled weekly. These animals were restrained in a plastic chamber with their tails exposed, to allow an easy removal of the tip with sharp dissection scissors. Fifty microlitres of blood was collected in a plastic tube containing 12.5 μ l of EDTA solution (22.5 μ g/ μ l). After centrifugation, the plasma was collected and kept at -20°C until analyzed [23,24].

For the immunization scheme B (Figure 1(B)), the antigen (IgY) was inoculated subcutaneously to mice of the experimental group ($n=30$) every week. We employed

50 μ g of IgY in complete Freund's adjuvant for the first immunization, 25 μ g of IgY in incomplete Freund's adjuvant for immunization on the first and second weeks and 25 μ g of IgY in PBS (without adjuvant) for subsequent inoculations. To obtain the blood and the spleen, 4–6 mice from the control and experimental groups were sacrificed at 2, 4, 12, 16, 18 and 23 weeks. The plasma was collected from each animal and kept at -20°C until analyzed. Mice in the control group ($n=30$) were injected only with PBS and adjuvant, with the Freund's complete adjuvant for the first administration and with the Freund's incomplete adjuvant for the 2nd and 3rd administration. Afterwards, they were only injected with PBS.

ELISA

The antibodies against IgY (anti-IgY) were detected using pigeon IgY as antigen adsorbed to the solid phase, while the autoantibodies specific for Fc γ (anti-Fc γ) were detected using the commercial mouse Fc γ fragments (Jackson ImmunoResearch; ChromPure Mouse IgG Fc; cat. no. 015-000-008, West Grove, PA) as antigen. In both cases, wells of polystyrene plates (Costar E.I.A./R.I.A. 8 well strips flat bottom, cat. no 2580, Corning Incorporated Costar^R Kennebunk, ME) were coated with 100 μ l of IgY or Fc γ (5 μ g/ml) in a sodium carbonate buffer (0.05 M, pH =9.6) during 3 hours at 37°C and with slow agitation and afterwards they were blocked with PBS-Tween with bovine serum albumin (3%) for 2 hours. After washing, 100 μ l of plasma from the experimental animals (in an optimal dilution for IgY and Fc γ) was added to the wells and incubated for 1 hour. After washing, 100 μ l of biotin-conjugated goat F(ab')₂ specific for mouse F(ab')₂ (dilution 1:30 000, Jackson ImmunoResearch; cat. no. 115-066-072, West Grove, PA) was added and subsequently incubated for one hour. After another washing step, 100 μ l of peroxidase-conjugated streptavidin (dilution 1:10 000, Sigma-Aldrich; cat. no. S5512, St. Louis, MO) was added and incubated for one hour. After each incubation step, the plates were washed three times with PBS-Tween-albumin 3%. Finally, 100 μ l of citrate buffer (0.1 M, pH = 5.0) with 0.4 mg/ml *o*-phenylenediamine and 10 μ l H₂O₂ (30%) was added and the reaction was stopped after 12 minutes with sulphuric acid 2.5 N. The absorbance was read at 492 nm using a microplate reader. The plasma of MRL/lpr mice (age 15 weeks) was used as a positive control for the identification of anti-Fc γ IgG autoantibodies.

Determination of Foxp3 + CD4 + CD25 + cells by flow cytometry

Four to six mice from the control and experimental groups under immunization scheme B were sacrificed at weeks 2, 4, 12, 16, 18 and 23, and the spleens were obtained. Spleens were disrupted and single-cell suspensions were obtained. The mononuclear cells were isolated from the suspension using density gradient centrifugation with LymphoprepTM (Axis-Shield, cat. no.1114547, Oslo, Norway) and stained with a commercial Treg detection kit (Miltenyi Biotec, cat.

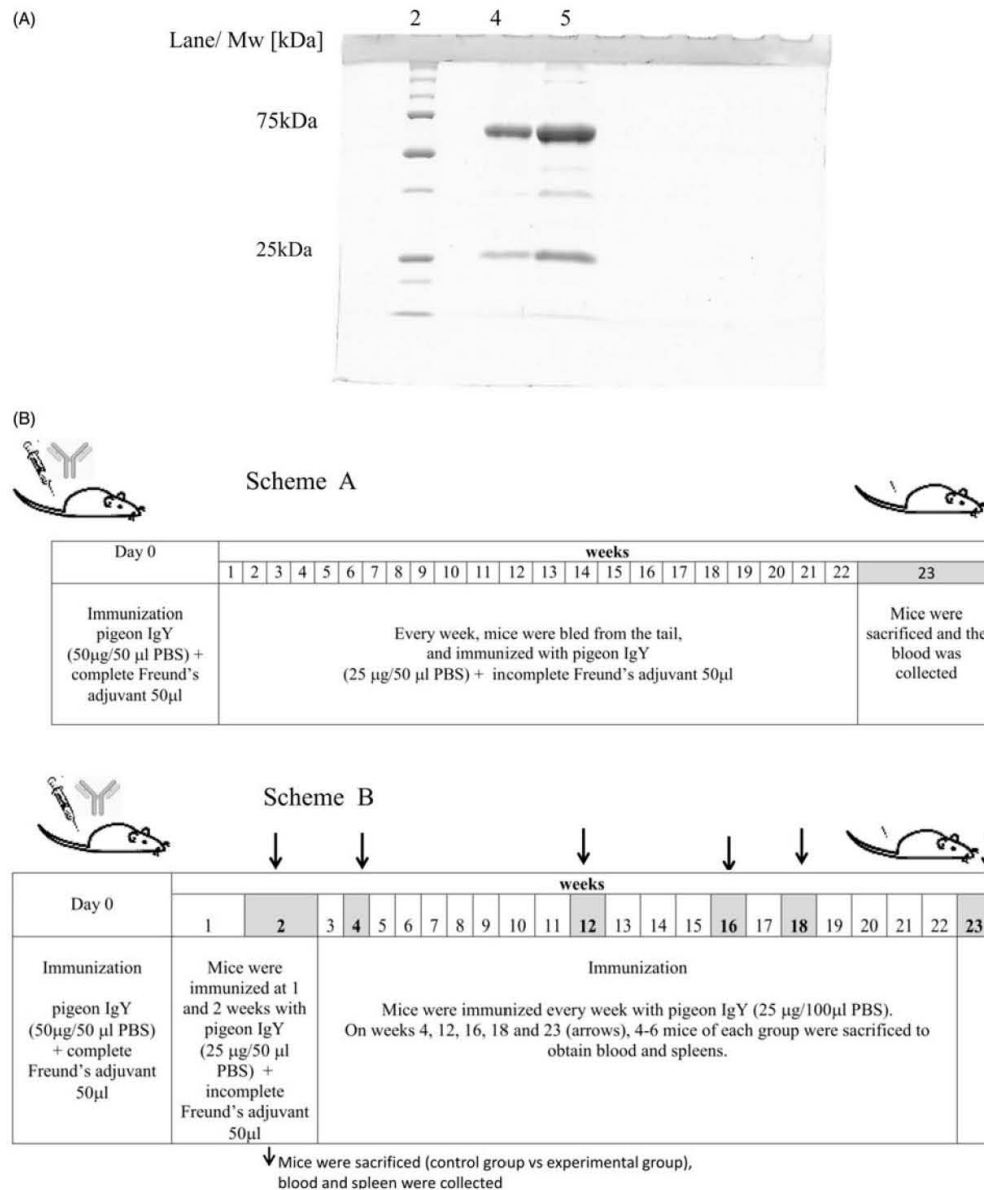


Figure 1. Purification of pigeon IgY and immunization of BALB/c mice. (A) SDS-PAGE of pigeon IgY from egg yolk. Lane 2: molecular weight markers. Lanes 4 and 5: purified pigeon IgY (5 µg and 10 µg, respectively). (B) Immunization schemes: in scheme A, BALB/c mice were immunized with 50 µg of pigeon IgY/100 µl PBS emulsified with complete Freund's adjuvant at day 0. Subsequently, mice were boosted with 25 µg of pigeon IgY/100 µl PBS emulsified with incomplete Freund's adjuvant weekly (days 7, 14, 21, etc.) for 22 weeks to subsequently sacrifice the animals in the 23rd week. Mice were bled every week before being immunized. BALB/c mice from the control group were injected with PBS and adjuvant only. In scheme B, BALB/c mice of the experimental group were immunized with 50 µg of pigeon IgY/100 µl PBS emulsified with complete Freund's adjuvant at day 0. Subsequently, mice were boosted with 25 µg of pigeon IgY/100 µl PBS emulsified with incomplete Freund's adjuvant at 1st and 2nd week and with 25 µg of pigeon IgY/100 µl PBS (without adjuvant) on weeks 3, 4, 5, 6, etc. to complete 22 weeks. At weeks 2, 4, 12, 16, 18 and 23, four to six mice were sacrificed to collect sera and spleens. The mice of the control group were injected with 100 µl PBS with or without adjuvant.

no. 130-094-164, Bergisch Gladbach, Germany). The staining was carried out for 10 minutes at 4 °C using anti-CD4 antibodies conjugated with FITC and anti-CD25 antibodies conjugated with PE. Afterwards, the cells were washed using FACS buffer and permeabilized for 30 minutes before doing

an intracellular staining with anti-Foxp3 conjugated with APC for 15 minutes at 4 °C. The events (100,000) were acquired with a FACSAria II cytometer at the Flow Cytometry Unit of the INER and the data were analyzed with the FlowJo software.

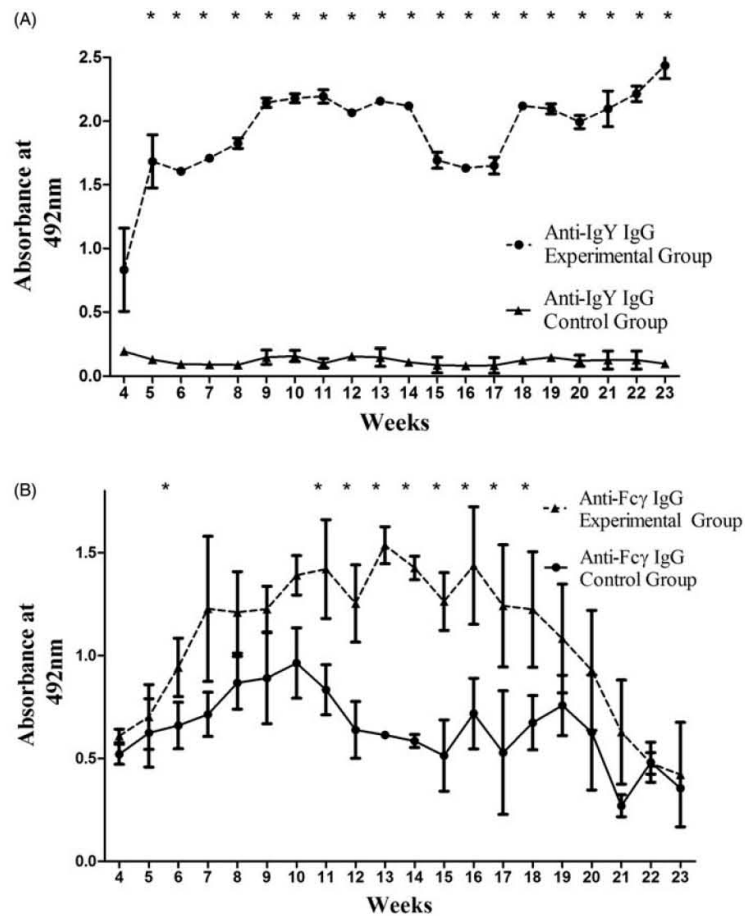


Figure 2. Weekly administration of IgY plus adjuvant promotes the production of anti-IgY IgG and anti-Fc γ IgG. Kinetics of antibody production in BALB/c mice immunized according to scheme A of immunization. The experimental and control group BALB/c mice were bled and the plasma was collected. The production of anti-IgY IgG antibodies (A) and anti-Fc γ IgG autoantibodies (B) was evaluated with ELISA. All data are representative of two independent experiments and are shown as the median and 95% confidence interval ($n=4$). Statistical analysis was performed using non-parametric Mann-Whitney U -test, two-tailed. $**p < .003$, $p = .0286$.

Statistical analysis

The statistical analysis was performed using the Prism software (GraphPad Software, San Diego, CA) by the nonparametric Mann-Whitney U -test. A p value $\leq .05$ was considered as significant. The data are presented as medians with their 95% confidence intervals.

Results

Purification of pigeon IgY for the immunization of BALB/c mice

The purity of pigeon IgY was evaluated using SDS-PAGE. Coomassie blue staining revealed the presence of two bands with molecular weights of 75 kDa and 25 kDa corresponding to the heavy and light chains of the pigeon IgY molecule (Figure 1(A)).

Levels of anti-IgY IgG antibody and anti-Fc γ IgG autoantibody in BALB/c mice immunized weekly with pigeon IgY

To simulate chronic exposure to an avian antigen, we subjected the mice to weekly immunizations with pigeon IgY with a constant use of adjuvant (immunization scheme A). Under this scheme, we found a steady increase in the anti-IgY IgG in the plasma of immunized animals from week 4 until week 9, and an elevated level was maintained until week 14. At 15–17 weeks, the level of anti-IgY decreased slightly, but the elevated levels were recovered from week 18 onwards (Figure 2(A)). The plasma of the control mice did not show reactivity against the pigeon IgY molecule.

The plasma from both the control and the immunized groups of mice (scheme A) was analyzed for the presence of anti-mouse Fc γ IgG autoantibodies. The control group showed a small degree of reactivity against the Fc γ , a higher reactivity than with the IgY. In contrast, a gradual increase

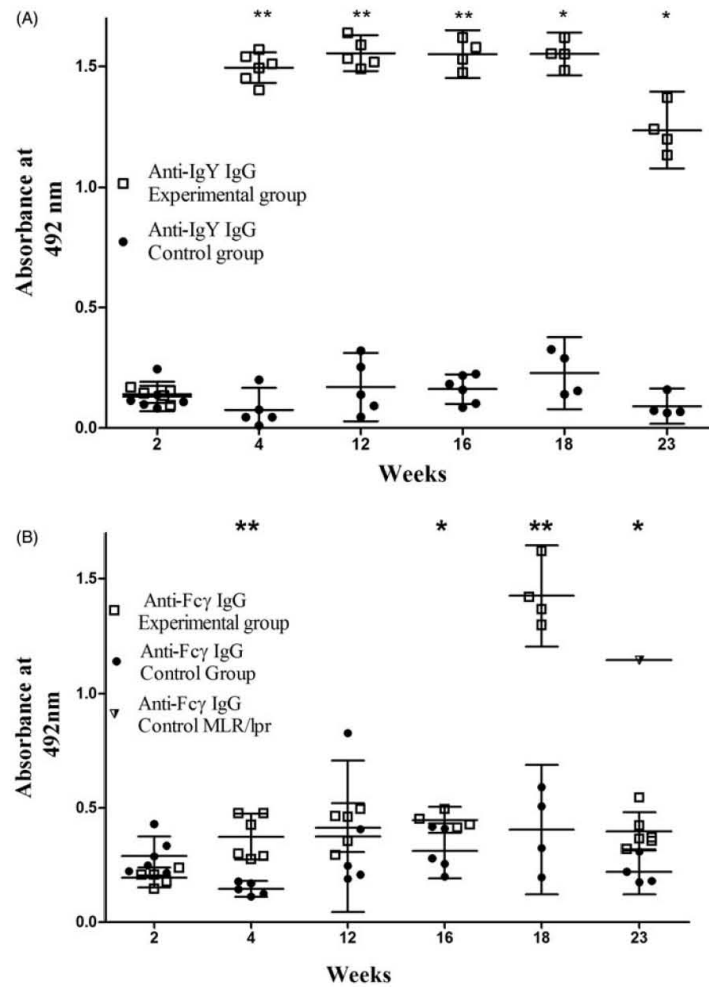


Figure 3. Weekly administration of pigeon IgY in BALB/c without the use of adjuvant induces a sharp increase in the level of IgG anti-Fc γ antibodies at week 18. Kinetics of antibody production in BALB/c mice immunized according to the scheme B of immunization. The experimental and control group BALB/c mice were bled and the plasma was collected. The production of anti-IgY IgG antibodies (A) and anti-Fc γ IgG autoantibodies (B) was evaluated with ELISA. MRL/lpr serum was used as control positive for anti-Fc γ IgG. All data are representative of two independent experiments and are shown as the median and their 95% confidence interval ($n = 4-6$). Statistical analysis was performed using non-parametric Mann-Whitney U -test, two-tailed. * $p < .0320$, ** $p < .0096$.

in the levels of anti-Fc γ IgG was observed in the plasma of mice of the experimental group immunized with IgY (Figure 2(B)). After 11 weeks, the level of anti-Fc γ antibodies was found to be significant compared to the plasma of the control group. Beginning at week 7, the levels of anti-Fc γ antibodies maintained a plateau until week 16. After week 18, the levels of anti-Fc γ IgG antibodies started to decrease and became non-significant compared to their levels in the plasma of the control group (non-immunized mice).

As shown in Figure 2(B), weekly immunizations with IgY plus the adjuvant induced a biphasic anti-Fc γ IgG autoantibodies response. To investigate whether this effect is dependent on the continuous use of the incomplete adjuvant, we evaluated the production of anti-Fc γ IgG

autoantibodies in mice immunized with IgY under a different scheme. The adjuvant was used only during the first three immunizations, and from week 4 onwards, the immunizations were done with IgY in PBS (scheme B, see Materials and methods). Within these groups, 4-6 mice were sacrificed at weeks 2, 4, 12, 16, 18 and 23 (Figure 1(B)). The plasma from the sacrificed mice was used to evaluate the presence of anti-IgY and anti-Fc γ antibodies and their spleens were used to determine the proportion of Foxp3+ cells within the population of CD4+ CD25+ cells.

The production of anti-IgY IgG in the immunized group reached the plateau during the 4th week and maintained this level for up to 18 weeks (Figure 3(A)). After 18 weeks, a slight decrease in the levels of anti-IgY IgG was evident, but

it remained significant ($p < 0.032$) when compared to the control group until the final stages of the protocol in the 23rd week.

The plasma levels of the anti-Fc γ IgG in both the experimental and control groups showed similar low values in the second week, but they gradually increased in the experimental group from week 2 until week 16. At week 18, there was a sharp significant increase in the levels of anti-Fc γ IgG ($p = .028$). The increment did not last, the levels of anti-Fc γ autoantibodies had decreased by week 23, but the differences remained significant when compared to the control group ($p = .004$) (Figure 3(B)).

Frequency of CD4 + CD25 + Foxp3 + Treg cells in the spleens of BALB/c mice immunized with pigeon IgY

The spleens of mice immunized with pigeon IgY under the immunization scheme B were used to evaluate the proportion of Treg (CD4 + CD25 + Foxp3+) cells (Figure 4). During the research work (weeks 2–23) in both the experimental and control groups, the proportion of CD4+ cells within the mononuclear cells in the spleens of mice remained fairly constant (experimental group median = 22.24%, CI = 17.6–30.2; control group median = 26.16%, CI = 18.3–33.0). The proportion of CD4 + CD25 + cells was also similar between the immunized and the control groups (experimental group median = 2.019%, CI = 1.35–2.94; control group median = 1.70%, CI = 1.38–2.51), not beyond the normal values according to previous reports. It was interesting that the percentage of Foxp3+ cells within the CD4 + CD25 + population (Tregs) in the immunized group was significantly smaller ($p = .0043$) during the second week with the pigeon IgY when compared to the control group (median = 29.90%, CI = 16.88–48.04, vs. median = 79.30%, CI = 73.47–86.26). Thereafter, the experimental group showed an increase in Foxp3 expression into the CD4 + CD25 + population, and on the 12th week, the proportion of Foxp3+ cells into the CD4 + CD25 + population of the immunized group showed a median frequency of 85.05% (CI = 83.44–87.83), very similar to the control group median of 85.60% (CI = 83.68–89.16). It is interesting that on the 16th week, the proportion of Foxp3+ cells in the CD4 + CD25 + population of the immunized group (median = 70.10%, CI = 57.80–74.80) showed a slight but significant decrease compared to the control group (median = 80.80%, CI = 79.10–82.08) ($p = .0079$). It is noteworthy that this event overlapped with the sharp increase in anti-Fc γ IgG in the sera of mice from the experimental group.

Discussion

The anti-IgG antibody production has been reported as a frequent serological finding in a variety of physiopathological settings. Clinical and experimental observations have emphasized the presence of several predisposing factors, different triggering conditions, and a variety of control mechanisms when IgG autoantibodies appear. In this study, we

show that continuous (weekly) immunization of mice with pigeon IgY induces the production of anti-Fc γ IgG autoantibodies. This result could provide us with a model for the study of the mechanisms involved in the production of anti-Fc γ IgG autoantibodies detected in patients with hypersensitivity pneumonitis associated with exposure to avian antigen [8].

We used two immunization schemes, in scheme A the mice were treated with the complete Freund's adjuvant along the first week and all the subsequent immunizations were done with the Freund's incomplete adjuvant (weeks 2–23). This immunization scheme produced a strong and fast anti-IgY antibody response, along with the gradual appearance of anti-Fc γ IgG autoantibodies in the plasma. The autoantibodies remained at high levels for 7–8 weeks and started to decline after 18 weeks. It is noteworthy that this decline of anti-Fc γ IgG autoantibodies in the plasma levels was not observed in the anti-IgY antibodies, which remained elevated until the end of the experiments at week 23. The different kinetics of the responses observed in the anti-IgY and the anti-Fc γ suggest that the antibodies reacting to each antigen are different.

The gradual appearance of the anti-Fc γ IgG autoantibodies in the plasma of mice immunized with IgY plus the adjuvant is in accordance with previous studies reporting that the constant presence of adjuvant favours the production of autoantibodies such as anti-Fc γ IgG [25,26]. It was found that the presence of pigeon IgY and not the continuous and prolonged exposure to the incomplete Freund's adjuvant was the cause for inducing the production of anti-Fc γ IgG autoantibodies. To test this result, we used a different immunization scheme (scheme B) using the adjuvant only in the first three treatments. The second immunization scheme also produced high plasma levels of anti-Fc γ autoantibodies, suggesting that this result is related to the immune response against pigeon IgY and not to the effect caused by the adjuvant itself.

Our work has shown that immunization with pigeon IgY induces the production of autoantibodies, and this adverse reaction (the production of anti-Fc γ IgG) must be acknowledged and analyzed if avian IgY is employed for immunotherapies, as well as other considerations [27,28]. For example, it has been reported in normal human plasma that antibodies against bird immunoglobulins may occasionally inhibit IgY antivenoms. Autosensitization is an additional alternative where the presence of cross-reactive anti-IgG may eliminate some benefits of IgY antivenom treatments [28]. On the other hand, the immunogenic capacity of the avian IgY might be associated with certain hypersensitivity responses such as allergic and anaphylactoid reactions that can be induced when immunoglobulins are employed for antivenoms or vaccines [29,30].

Even if we have not studied the detailed mechanisms where pigeon IgY induces the production of anti-Fc γ IgG, it seems likely that the plasma levels of anti-Fc γ IgG are the result of several factors that can activate B cells [31,32]. In this context, the production of anti-Fc γ IgG autoantibodies may be a subsequent event after the formation of circulating immune complexes [33].

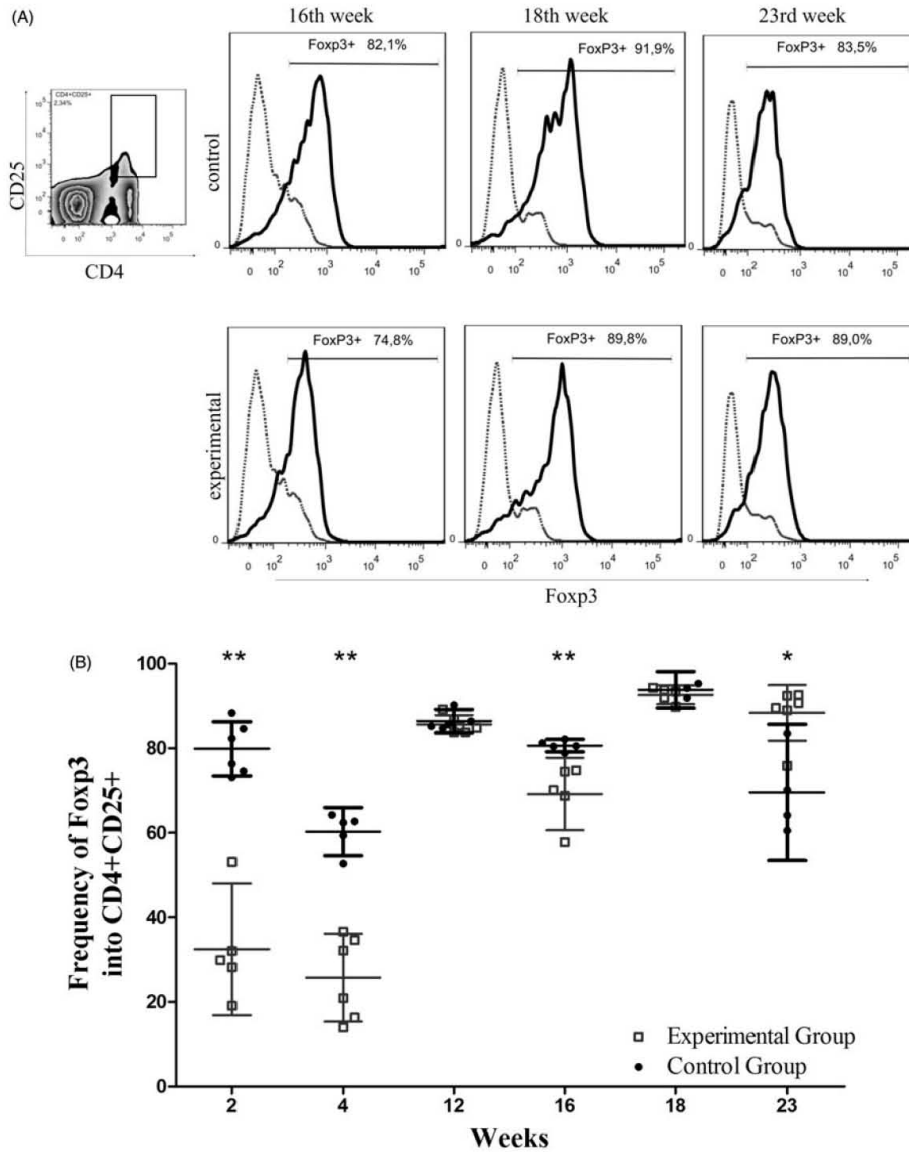


Figure 4. The proportion of Foxp3+ cells in the CD4+CD25+ population of the experimental group showed a slight decrease with respect to control group at week 16. (A) Representative histograms of experimental and control group showing the expression of Foxp3 into CD4+CD25+ cells in weeks 16, 18 and 23. (B) Proportion of Foxp3+ expression into the CD4+CD25+ T cell population in spleen from BALB/c mice immunized according to the scheme B of immunization (Figure 1B). The frequency of regulatory T cells gradually increased until reaching the normal value. All data are representative of two independent experiments and are shown as the median and 95% confidence interval. Each dot represents an individual mouse. Statistical analysis was performed using non-parametric Mann-Whitney U-test, two-tailed. * $p < .020$, ** $p < .0080$.

Furthermore, it has been proposed that prolonged immunization with a phylogenetically related antigen can result in molecular mimicry, cross-reactivity and, eventually, the production of autoantibodies [32,34–37]. Therefore, anti-Fcγ IgG autoantibody production in mice after immunization with pigeon IgY was not an unexpected finding considering that bird and mammalian immunoglobulins are

phylogenetically related glycoproteins and that they may share some antigen similarities [14,15].

IgG is a well-recognized target for autoantibodies, and it has been proposed that these autoantibodies might be induced after an antigen-driven process in which the antigen is a modified or altered immunoglobulin. These modifications could involve structural, conformational and/or amino

acid sequence changes, and these may explain the development of an immune response against self-IgG [38,39]. In our model, the maximum levels of anti-Fc γ autoantibodies were found at 16–18 weeks of immunization, and even if decreased afterwards, they remained at higher levels than those of the control animals until the 23rd week. Although this is a peculiar phenomenon, the transitory production of anti-Fc γ IgG autoantibodies has been previously described [40,41]. One probable explanation for this phenomenon could be the formation of immune complexes with the capacity to induce a population of autoreactive B cells specific to a particular amino acid sequence [33,38,42].

In addition, that anti-Fc γ IgG autoantibodies can be detected in the circulation of healthy subjects demonstrates the existence of autoreactive B cell clones and furthermore, that a transient imbalance in their regulation can allow the activation of these autoreactive B cell clones [3,33,38]. Even if natural exposure to IgY antigen through inhalation is the most common cause of pigeon hypersensitivity pneumonitis [7], our study has demonstrated that the subcutaneous immunization with pigeon IgY induces the production of anti-Fc γ autoantibodies, and this has been previously reported in the sera of patients with hypersensitivity pneumonitis.

Although comparative studies between intranasal and subcutaneous immunization have shown that the kinetics and the antigen-specific IgG levels in serum are similar, it is possible that the immunological mechanisms involved could be different [43–45]. Previous studies have reported the production of anti-Fc γ IgA autoantibodies at the onset of the extra-articular pathology. In lung diseases, the occurrence of anti-Fc γ autoantibodies is associated with the exposure to infectious agents and/or to the exposure to noxious agents as tobacco [40,41,46]. The exact mechanism is unknown, but it probably involves the formation of immune complexes.

It is usually considered too that subcutaneous immunization is more immunogenic than immunization through mucosal surfaces, but it is possible that other components of pigeon antigen may act as adjuvants increasing the immunogenicity of IgY. Thus, it would be important to compare both routes of immunization with IgY in this model, the kinetics and levels of the induced anti-Fc γ IgG autoantibodies and the immunological mechanisms involved.

In patients with autoimmune diseases, as well as in experimental models of autoimmunity, the participation of Treg (CD4 + CD25 + Foxp3+) cells has been documented before [47–51]. Treg cells that suppress the production of anti-Fc γ IgG could be responsible for maintaining tolerance. Hence, we evaluated the proportion of Treg cells in the experimental animals at different time points during the research. It is important that the proportion of Foxp3+ cells among the CD4 + CD25+ cells showed a decrease at the 16th week, coincident with the appearance of anti-Fc γ IgG in the plasma of the immunized animals. Although this might suggest a relationship between the decrease in Tregs and the production of autoantibodies, the expression of Foxp3 among CD4 + CD25+ cells during the first weeks of immunization was lower than at the 16th week and increased in the following weeks. Thus, the proportion of Tregs was normal at the 18th week when the production of IgG anti-Fc γ was at its

peak. This suggests that even if the proportion of Treg cells remained normal, these cells were functionally incapable of suppressing the production of IgG anti-Fc γ which is similar to what was reported in patients with chronic autoimmune disease [52]. As an alternative, it could be proposed that the low percentages of Foxp3+ cells within the CD4 + CD25+ population during the initial weeks of immunization created a permissive condition that may contribute to the breaking of tolerance at the 18th week.

In addition, the low expression of Foxp3 + CD4 + CD25 + cells during the onset of the production of IgG anti-IgY could be caused by regulatory mechanisms of innate immunity, such as the complement [53,54]. In this context, it is likely that IgG against IgY has produced circulating immune complexes during the first weeks of immunization [33,55]. As a consequence, the classical complement pathway was activated stimulating a decrease in the expression of Foxp3 through the inhibitory receptors on the Tregs [53,54,56,57].

Other factor that could explain a decrease in the levels of anti-Fc γ autoantibodies after 18 weeks is the decay of autoreactive B cells. Several studies have reported that autoreactive B cells express low density of costimulatory molecules and of receptors for essential growth factors [58,59]. Thus, autoreactive B cells have a reduced capacity to survive compared with conventional B cells, and these cells will gradually decline, affecting the production of IgG anti-Fc γ . Additionally, circulating immune complexes might induce the inhibition of autoantibody production by binding to the Fc γ RIIb on autoreactive B cells [60].

In summary, we propose that the production of anti-Fc γ IgG induced by continuous immunization of mice with pigeon IgY provides a useful model for studying the mechanisms involved in the production of rheumatoid factor in patients with hypersensitivity pneumonitis associated with exposure to avian antigen.

Acknowledgments

M. Sc. Ivan Sammir Aranda Uribe is a PhD candidate from the Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México, and received a fellowship (324181) from CONACYT for his doctoral studies. The authors thank Dr. Karen Manoutcharian, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, México City, México; Dr. Lucía Rangel Porta (Departamento de Reproducción, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM) for donation of pigeon eggs, Dr. Adriana Karina Chávez-Rueda for donation of plasma from MRL/lpr mice, Chemist Dámaris Romero Rodríguez for flow cytometry services (Unidad de Citometría de Flujo INER) and workers at the animal facility of the INER for animal care. We acknowledge the Academic Writing Team of the Centro de Estudios de Posgrado, UNAM for their help with this manuscript.

Disclosure statement

The authors declare no conflict of interest.

References

- [1] Ercolini AM, Miller SD. The role of infections in autoimmune disease. *Clin Exp Immunol.* 2009;155:1–15.

- [2] Newkirk MM. Rheumatoid factors: host resistance or autoimmunity? *Clin. Immunol.* 2002;104:1–13.
- [3] Edwards CJ, Cooper C. Early environmental factors and rheumatoid arthritis. *Clin Exp Immunol.* 2006;143:1–5.
- [4] Westwood OMR, Nelson PN, Hay FC. Rheumatoid factors: what's new? *Rheumatology (Oxford).* 2006;45:379–385.
- [5] Kannan K, Ortmann RA, Kimpel D. Animal models of rheumatoid arthritis and their relevance to human disease. *Pathophysiology.* 2005;12:167–181.
- [6] Miles SA, Conrad SM, Alves RG, et al. A role for IgG immune complexes during infection with the intracellular pathogen *Leishmania*. *J Exp Med.* 2005;201:747–754.
- [7] Corrigan VM, Panayi GS. Autoantigens and immune pathways in rheumatoid arthritis. *Crit Rev Immunol.* 2002;22:281–293.
- [8] Araza MT, Aguilar-León DE, Retana VN, et al. IgM, IgG and IgA Rheumatoid factors in pigeon hypersensitivity pneumonitis. *J Clin Lab Anal.* 2007;21:315–321.
- [9] Mcsharry C, Anderson K, Boyd G. A review of antigen diversity causing lung disease among pigeon breeders. *Clin Exp Allergy.* 2000;30:1221–1229.
- [10] Baldwin CJ, Todd A, Bourke SJ, et al. Pigeon fanciers' lung: identification of disease-associated carbohydrate epitopes on pigeon intestinal mucin. *Clin Exp Immunol.* 1999;117:230–236.
- [11] Nademi Z, Todryk S, Baldwin C. Characteristics of antibody responses in Pigeon Fanciers' Lung. *Mol Immunol.* 2013;54:227–232.
- [12] Aguilar León DE, Novelo Retana V, Martínez-Cordero E. Anti-avian antibodies and rheumatoid factor in pigeon hypersensitivity pneumonitis. *Clin. Exp. Allergy.* 2003;33:226–232.
- [13] Todd A, Coan R, Allen A. Pigeon breeders' lung; IgG subclasses to pigeon intestinal mucin and IgA antigens. *Clin Exp Immunol.* 1993;92:494–499.
- [14] Suzuki N, Lee YC. Site-specific N-glycosylation of chicken serum IgG. *Glycobiology.* 2004;14:275–292.
- [15] Warr GW, Magor KE, Higgins DA. IgY: clues to the origins of modern antibodies. *Immunol Today.* 1995;16:392–398.
- [16] Carvalho JJ, Walter MA, Baermann-Stapel Y, et al. Non-invasive monitoring of immunization progress in mice via IgG from feces. *In Vivo (Brooklyn).* 2012;26:63–69.
- [17] Peters IR, Calvert EL, Hall EJ, et al. Measurement of immunoglobulin concentrations in the feces of healthy dogs. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2004;11:841–848.
- [18] Neri P, Tokoro S, Kobayashi R, et al. Specific egg yolk immunoglobulin as a new preventive approach for Shiga-toxin-mediated diseases. *PLoS One.* 2011;6:e26526. doi:10.1371/journal.pone.0026526
- [19] Wing K, Sakaguchi S. Regulatory T cells exert checks and balances on self tolerance and autoimmunity. *Nat Immunol.* 2010;11:7–13.
- [20] Mellanby RJ, Thomas DC, Lamb J. Role of regulatory T-cells in autoimmunity. *Clin Sci.* 2009;116:639–649.
- [21] Girard M, Israël-Assayag E, Cormier Y. Impaired function of regulatory T-cells in hypersensitivity pneumonitis. *Eur Respir J.* 2011;37:632–639.
- [22] Yamasaki H, Ando M, Brazer W, et al. Polarized type 1 cytokine profile in bronchoalveolar lavage T cells of patients with hypersensitivity pneumonitis. *J Immunol.* 1999;163:3516–3523.
- [23] Hoff J. Methods of blood collection in the mouse. *Lab Anim (NY).* 2000;29:53.
- [24] Breslin WL, Strohacker K, Carpenter KC, et al. Mouse blood monocytes: standardizing their identification and analysis using CD115. *J Immunol Methods.* 2013;390:1–8.
- [25] Wernhoff P, Olofsson P, Holmdahl R. The genetic control of rheumatoid factor production in a rat model of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2003;48:3584–3596.
- [26] Israeli E, Agmon-Levin N, Blank M, et al. Adjuvants and autoimmunity. *Lupus.* 2009;18:1217–1225.
- [27] Diaz P, Malavé C, Zerpa N, et al. IgY pharmacokinetics in rabbits: implications for IgY use as antivenoms. *Toxicol.* 2014;90:124–133.
- [28] Sevcik C, Díaz P, D'Suze G. On the presence of antibodies against bovine, equine and poultry immunoglobulins in human IgG preparations, and its implications on antivenom production. *Toxicol.* 2008;51:10–16.
- [29] Alvarez A, Montero Y, Parrilla P, Malabe C, Zerpa N. Scorpion venoms: Poultry IgY alternatives to antivenom production. In: Gopalakrishnakone P, Possani LD, Schwartz EF, de la Vega RCR, editors. *Scorpion venoms*. Berlin: Springer Netherlands; 2015;7:p. 161–173. doi:10.1007/978-94-007-6404-0
- [30] White J. Venomous animals: clinical toxicology. *EXS* 2010; 100:233–291.
- [31] Padgett KA, Selmi C, Kenny TP, et al. Phylogenetic and immunological definition of four lipoylated proteins from *Novosphingobium aromaticivorans*, implications for primary biliary cirrhosis. *J Autoimmun.* 2005;24:209–219.
- [32] Soulas P, Woods A, Jaulhac B, et al. Autoantigen, innate immunity, and T cells cooperate to break B cell tolerance during bacterial infection. *J Clin Invest.* 2005;115:2257–2267.
- [33] Sutton B, Corper A, Bonagura V, et al. The structure and origin of rheumatoid factors. *Immunol Today.* 2000;21:177–183.
- [34] Vanderlugt CL, Miller SD. Epitope spreading in immune-mediated diseases: implications for immunotherapy. *Nat Rev Immunol.* 2002;2:85–95.
- [35] Ehser J, Holdener M, Christen S, et al. Molecular mimicry rather than identity breaks T-cell tolerance in the CYP2D6 mouse model for human autoimmune hepatitis. *J Autoimmun.* 2013;42:39–49.
- [36] Rashid T, Ebringer A. Autoimmunity in rheumatic diseases is induced by microbial infections via crossreactivity or molecular mimicry. *Autoimmune Dis.* 2012;2012:539282. doi:10.1155/2012/539282
- [37] Gorton D, Sikder S, Williams NL, et al. Repeat exposure to group A streptococcal M protein exacerbates cardiac damage in a rat model of rheumatic heart disease. *Autoimmunity.* 2016;49:563–570.
- [38] Edwards JCW, Cambridge G, Abrahams VM. Do self-perpetuating B lymphocytes drive human autoimmune disease? *Immunology.* 1999;97:188–196.
- [39] Matsumoto A, Shikata K, Takeuchi F, et al. Autoantibody activity of IgG rheumatoid factor increases with decreasing levels of galactosylation and sialylation. *J Biochem.* 2000;128:621–628.
- [40] Tarkowski A, Czerkinsky C, Nilsson LA. Simultaneous induction of rheumatoid factor- and antigen-specific antibody-secreting cells during the secondary immune response in man. *Clin Exp Immunol.* 1985;61:379–387.
- [41] Symmons DP, Chakravarty K. Can immunisation trigger rheumatoid arthritis? *Ann Rheum Dis.* 1993;52:843–844.
- [42] Chen M, Aosai F, Mun HS, et al. Anti-HSP70 autoantibody formation by B-1 cells in *Toxoplasma gondii*-infected mice. *Infect Immun.* 2000;68:4893–4899.
- [43] Fiorino F, Pettini E, Pozzi G, et al. Prime-boost strategies in mucosal immunization affect local IgA production and the type of Th response. *Front Immunol.* 2013;4:1–8.
- [44] Kharb S, Charan S. Mucosal immunization provides better protection than subcutaneous immunization against *Pasteurella multocida* (B:2) in mice preimmunized with the outer membrane proteins. *Vet Res Commun.* 2011;35:457–461.
- [45] Waugh CA, Timms P, Andrew D, et al. Comparison of subcutaneous versus intranasal immunization of male koalas (*Phascolarctos cinereus*) for induction of mucosal and systemic immunity against *Chlamydia pecorum*. *Vaccine.* 2015;33:855–860.
- [46] Malmström V, Catrina AI, Klareskog L. The immunopathogenesis of seropositive rheumatoid arthritis: from triggering to targeting. *Nat Rev Immunol.* 2016;17:60–75.
- [47] Vallbracht I, Helmke K. Additional diagnostic and clinical value of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies compared with rheumatoid factor isotypes in rheumatoid arthritis. *Autoimmun. Rev.* 2005;4:389–394.

- [48] Ludwig-Portugall I, Hamilton-Williams EE, Gottschalk C, et al. Cutting edge: CD25⁺ regulatory T cells prevent expansion and induce apoptosis of B cells specific for tissue autoantigens. *J Immunol.* 2008;181:4447–4451.
- [49] Liu Y, Liu A, Iikuni N, et al. Regulatory CD4⁺ T cells promote B cell anergy in murine lupus. *J Immunol.* 2014;192:4069–4073.
- [50] Iikuni N, Lourenco EV, Hahn BH, et al. Cutting edge: regulatory T cells directly suppress B cells in systemic lupus erythematosus. *J Immunol.* 2009;183:1518–1522.
- [51] van Herwijnen MJC, Wieten L, van der Zee R, et al. Regulatory T cells that recognize a ubiquitous stress-inducible self-antigen are long-lived suppressors of autoimmune arthritis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2012;109:14134–14139.
- [52] Rapetti L, Chavele K-M, Evans CM, et al. B cell resistance to Fas-mediated apoptosis contributes to their ineffective control by regulatory T cells in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2015;74:294–302.
- [53] Strainic MG, Shevach EM, An F, et al. Absence of signaling into CD4⁺ cells via C3aR and C5aR enables autoinductive TGF- β 1 signaling and induction of Foxp3⁺ regulatory T cells. *Nat Immunol.* 2013;14:162–171.
- [54] Kwan W, van der Touw W, Paz-Artal E, et al. Signaling through C5a receptor and C3a receptor diminishes function of murine natural regulatory T cells. *J Exp Med.* 2013;210:257–268.
- [55] Rifkin IR, Leadbetter EA, Beaudette BC, et al. Immune complexes present in the sera of autoimmune mice activate rheumatoid factor B cells. *J Immunol.* 2000;165:1626–1633.
- [56] Zhou X, Bailey-Bucktrout SL, Jeker LT, et al. Instability of the transcription factor Foxp3 leads to the generation of pathogenic memory T cells *in vivo*. *Nat Immunol.* 2009;10:1000–1007.
- [57] Williams LM, Rudensky AY. Maintenance of the Foxp3-dependent developmental program in mature regulatory T cells requires continued expression of Foxp3. *Nat Immunol.* 2007;8:277–284.
- [58] Thien M, Phan TG, Gardam S, et al. Excess BAFF rescues self-reactive B cells from peripheral deletion and allows them to enter forbidden follicular and marginal zone niches. *Immunity.* 2004;20:785–798.
- [59] Varin MM, Le Pottier L, Youinou P, et al. B-cell tolerance breakdown in Sjögren's syndrome: focus on BAFF. *Autoimmun Rev.* 2010;9:604–608.
- [60] Clatworthy MR, Harford SK, Mathews RJ, et al. Fc γ RIIb inhibits immune complex-induced VEGF-A production and intranodal lymphangiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2014;111:17971–17976.