



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y
FUNCIONAL DE LAS POBLACIONES DE
LINFOCITOS DE NALT Y NP DE RATÓN.
EFECTO DE LA INMUNIZACIÓN INTRANASAL
CON LA PROTOXINA Cry1Ac**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

MARCO AURELIO RODRÍGUEZ MONROY

DIRECTORA DE TESIS: Dra. LETICIA MORENO FIERROS



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.

RECONOCIMIENTO A LOS APOYOS RECIBIDOS.

El autor fue becario de CONACyT (No. becario: 158319)

Becario del Programa de Apoyo para la Superación Académica de la UNAM (PASPA).

Este trabajo fue financiado por los proyectos CONACyT 43102M y UNAM DGAPA PAPIIT IN221807.

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTORAL

Dra. Leticia Moreno Fierros.

Dr. Leopoldo Flores Romo.

Dr. Rafael Campos Rodríguez.

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Inmunidad de Mucosas de la Unidad de Biomedicina (UBIMED) de la Facultad de Estudios Profesionales Iztacala, U.N.A.M., bajo la tutoría de la Dra. Leticia Moreno Fierros.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, en particular a la F.E.S. Iztacala y a su H. Consejo Técnico, que atendió mis solicitudes de apoyo para la realización de mis estudios.

A la Dra. Leticia Moreno Fierros, por brindarme la oportunidad de pertenecer a su equipo de trabajo, por la confianza, por su paciencia en los malos momentos. Gracias Doctora, porque sin su apoyo no se hubiera podido lograr esto.

A la Dra. Leticia Moreno Fierros, Dra. Martha Legorreta Herrera, Dra. Edda Sciutto Conde, Dr. Leopoldo Flores Romo, Dr. Rafael Campos Rodríguez, Dr. Rogelio Hernández Pando, Dr. Luis Ignacio Terrazas Valdés, Dr. Edelmiro Santiago Osorio, miembros del Comité Tutorial, del Jurado de Examen de Candidatura y del Jurado para Examen de Grado, por las revisiones, los consejos y por su tiempo.

DETRÁS DE UN DOCTORADO

Detrás de un doctorado
Están todos estos años,
Están los sueños y las risas...
Detrás de un doctorado
También están el miedo y el dolor
Hay gente que en un doctorado
Se la vive siempre añorando algo
Algo que tal vez nunca existió,
Algo que no pasó, que no se
explicó...
Algo que simplemente no se publicó.
Añorando algo...
Algo que nunca más volvió.
Detrás de un doctorado,
Están todos aquellos que no se
fueron
Pero también está el espacio
De los que ya partieron...
Y están los amigos
Que antes no lo eran,
Pero hoy están
Y están los amigos que lo fueron
Y que hoy no lo son más.
Detrás de un doctorado,
Me han enseñado
A mirar el mundo
Por el ojo de una aguja,
Detrás de un doctorado,
Están algunos que se dicen
Doctores,
Hombres de ciencia
Esos que no te ven,
Los que no te escuchan,
Los que te miden en SNI,
En factor de impacto
Y en número de publicaciones.
Esos doctores que viven siempre
Solos y dentro de su propia burbuja.
Detrás de un doctorado,
Se van quedando sin vida las viejas
fotos
La de los amigos, la de la familia...
Detrás de un doctorado,
Están la verdad y la ciencia exacta
Detrás de un doctorado
También se esconden la mentira
Y la traición.

El jardín del doctorado,
Se siembra con distancia y se abona
a veces con separación.
Detrás de todos los proyectos,
De las plazas, y de una publicación
Hay sueños de esperanza,
Hay familia que te extraña
Y hay muertos que ya no te hablan
Detrás de un doctorado
Mis ojos se van cansando
De mirar el mundo
Por el ojo de una aguja
Detrás de un doctorado,
Están algunos que se dicen
Doctores,
Los que te miden en SNI,
En postdocs y número de citas
Pero nunca en sueños ni canciones.
Los que se la pasan viviendo
Siempre solos
Encerrados en su propia burbuja...
Detrás del doctorado,
Están todos estos años...
Están mis sueños...
El miedo, el coraje y el dolor
Detrás de un doctorado,
Se vive añorando algo...
Y conforme se acerca uno
A la codiciada meta,
Se descubre con desilusión
Que no sirvió de nada,
De nada!!!
Que te felicitan por tu esfuerzo
Pero que "lástima la plaza ya estaba
Dada"
Que mejor hagas un postdoc
Que no sirvió de nada, de nada
O casi nada
Que no es lo mismo pero es igual

M. R.-C. V
Octubre, 2007

DEDICATORIA

ESTE TRABAJO SE LO DEDICO CON ESPECIAL CARIÑO Y AGRADECIMIENTO A: MARGARITA (COMPAÑERA DE SIEMPRE, POR COINCIDIR EN ESTE MUNDO, EN ESTE ESPACIO Y POR SEGUIR AQUÍ). A MARCO Y MARIO (MIS TERRIBLES ENCANTOS QUE CON SU REBELDÍA SE EMPEÑAN A RATOS EN SER MI CRUZ, PERO AL FINAL DEL CAMINO SERÁN SIEMPRE MI LUZ). A MI MADRE, A MIGUEL Y RAÚL (POR SER MI ESENCIA, MI FUERZA Y MI REFUGIO). A LUPITA (SI LOS ÁNGELES EXISTEN, SEGURO ELLA ES UNO) Y A SUS MUCHACHOS (RIGO Y ARTURO). A ARACELI (POR SER COMO ES). A CÉSAR (MI GEMELO, DE PLACENTA DISTANTE). A ROSY, Y PATY CHEN (AMIGOCHAS). A LA DRA. LETY, MAX, VERDÍN, RITA, GLORIA, ALDO, SAÚL IVÁN, MIGUEL, XAVIER (Q. BAN), LUCIO, ENRIQUE, ALFREDO Y A TODOS LOS QUE HAN SIDO Y SON COMPAÑEROS DEL LAB. DE MUCOSAS (POR SU COMPAÑÍA, POR LOS MALOS Y LOS BUENOS RATOS, POR TODOS ESOS MOMENTOS QUE EN EL QUEHACER DÍA A DÍA HAN INFLUIDO PARA ESTAR DONDE HOY ESTAMOS). A TZAZNÁ (YA VES, CON VÉRTEBRAS DE MENOS PERO SÍ PUDIMOS). A DOÑA MARGARITA (SUEGRA, GRACIAS POR TODO), A MIS FAMILIARES POSTIZOS (PEDRO, NATALIA, RAÚL, LOURDES, NORMA, CLAUDIA, ELOÍSA Y GUEVARITA). A TODOS MIS SOBRINOS (SAMY, SEBAS, ELIER, DONO, JACK, PEDRO, TAVO, ALEX, ISAAC Y HÉCTOR, ABUSADOS EL ORDEN NO IMPORTA, TODOS CABEN IGUAL). A MI PADRE Y ALICIA (PORQUE YO SÉ QUE HAY MUERTOS QUE ALUMBRAN MI CAMINO). COMO LA LISTA SE HACE LARGA Y NO QUIERO DEJAR A NADIE FUERA, DEBO CONCLUIR COMO DICE SILVIO, A TODA LA GENTE QUE YO SÉ QUE ME QUIERE Y A TODA ESA QUE TAMBIÉN SÉ QUE NO ME QUIERE, PORQUE DE ALGUNA U OTRA FORMA SU INTERACCIÓN CONMIGO, ME HA HECHO SENTIR LAS DIFERENTES FACETAS DE LA VIDA, Y POR ESO MISMO, TAMBIÉN SE LO DEDICO A LA VIDA...

*LA VIDA DE UN PÁJARO EN VUELO
LA VIDA DE UN AMANECER
LA VIDA DE UN CRÍO
LA DE UN BOSQUE Y DE UN RÍO
LA VIDA ME HA HECHO SABER.*

*LA VIDA DEL SORDO Y DEL CIEGO
LA VIDA QUE NO SABE HABLAR
LA DEL TRISTE LOCO
LA QUE SABE A POCO
LA VIDA ME HA HECHO SOÑAR.*

*LA VIDA VORAZ QUE SE ENREDA
LA VIDA QUE SALE A JUGAR
LA VIDA CONSCIENTE QUE QUEDA
LA VIDA QUE LATE EN EL MAR.
LA VIDA QUE BROTA DE UN MUERTO
LA VIDA QUE NO SE MURIÓ
LA DE LOS DESIERTOS
LA DE UN LIBRO ABIERTO
LA VIDA ME HA HECHO CUAL YO.*

*LA VIDA QUE ALUMBRA EN EL TRUENO
LA VIDA FINAL DE UN ADIÓS
LA VIDA GOTEANDO DE UN SENO
LA VIDA SECRETA DE UN DIOS.
LA VIDA QUE PENDE DE TODO
LA VIDA DE CADA EMOCIÓN
LA VIDA EN EXCESO
LA VIDA DE UN BESO
LA VIDA ME HA HECHO QUIEN SOY.*

Índice General

Índice de Tablas y Figuras.	3
Lista de Abreviaturas.	4
Resumen.	6
Abstract.	7
Capítulo I. Introducción.	8
El sistema inmune común de mucosas.	9
Tejido linfoide asociado a la nariz (NALT).	10
Adyuvantes en mucosas.	13
Objetivos.	15
Capítulo II. Diferencias fenotípicas y funcionales de linfocitos del NALT y NP de ratón (Publicación).	17
Capítulo III. Efectos de la inmunización intranasal con la protoxina Cry1Ac sobre las diferencias fenotípicas y funcionales de linfocitos del NALT y NP de ratón.	31
Introducción.	32
Cry1Ac como adyuvante mucosal.	33
Material y métodos.	34
Obtención de la protoxina Cry1Ac.	34
Ruta y esquema de inmunización.	35
Prueba de ELISPOT.	35
Análisis estadístico.	36
Resultados.	36
Cry1Ac modifica las poblaciones de linfocitos del NALT y NP.	36
Cry1Ac induce respuestas de células secretoras de anticuerpos específicas en NALT y NP.	39
La inmunización intranasal con Cry1Ac incrementa la expresión de marcadores de activación CD25 y CD69 en linfocitos del NALT y NP.	40
CD25	40
CD69	43
Cry1Ac aumenta la proporción de linfocitos T productores de citocinas en el NALT y NP.	46
Discusión.	49
Capítulo IV. Efecto de la inmunización intranasal con la protoxina Cry1Ac en la expresión de receptores de <i>homing</i> y moléculas de adhesión del NALT y NP.	52
Introducción.	53
Material y métodos.	56

Inmunotinción de la superficie de linfocitos del NALT y NP para determinar la expresión de $\alpha 4\beta 7$, $\alpha 4\beta 1$, $\alpha E\beta 7$, LFA-1 y L-selectina por citometría de flujo.	57
Tinción inmunohistoquímica de MAdCAM-1, VCAM-1 y PNAd, para su localización dentro del NALT.	57
Resultados.	58
Modificación del patrón de expresión de moléculas de adhesión en el NALT, mediado por la inmunización intranasal con Cry1Ac.	58
Efecto de la inmunización intranasal con Cry1Ac en la expresión de receptores de homing en linfocitos T y B del NALT y NP.	61
L-Selectina.	61
$\alpha 4\beta 1$.	63
LFA-1.	64
$\alpha 4\beta 7$.	65
Discusión.	65
Capítulo V. Conclusiones.	69
Referencias.	73

Índice de Tablas y Figuras

Fig 1.1. Comparación del NALT y anillo de Waldeyer.	10
Tabla 3.1. Caracterización fenotípica de la superficie de linfocitos del NALT y NP en ratones control e inmunizados intranasalmente con Cry1Ac.	38
Fig. 3.1. Porcentaje de las poblaciones de linfocitos del NALT y NP.	38
Tabla 3.2. Detección de células secretoras de anticuerpos específicas para Cry1Ac mediante el ensayo de ELISPOT.	39
Tabla 3.3. Porcentaje de expresión de CD25 en las diferentes poblaciones de linfocitos del NALT y NP en ratones control e inmunizados con Cry1Ac.	41
Fig. 3.2. Porcentaje de expresión del marcador de activación CD25 en las poblaciones de linfocitos del NALT y NP	42
Fig. 3.3. Porcentaje de expresión del marcador de activación CD25 en las poblaciones de linfocitos del NALT y NP	43
Tabla 3.4. Porcentaje de expresión de CD69 en las diferentes poblaciones de linfocitos del NALT y NP en ratones control e inmunizados con Cry1Ac.	44
Fig. 3.4. Porcentaje de expresión del marcador de activación CD69 en las poblaciones de linfocitos del NALT y NP.	45
Fig. 3.5. Porcentaje de expresión del marcador de activación CD69 en las poblaciones de linfocitos del NALT y NP.	46
Fig. 3.6. Porcentaje de células T CD3+ productoras de citocinas en el NALT y NP de ratones BALB/c normales e inmunizados intranasalmente con Cry1Ac.	48
Fig. 4.1. Detección inmunohistoquímica de la expresión de las moléculas de adhesión del NALT.	60
Tabla 4.1. Perfil de los receptores de <i>homing</i> en linfocitos T y B del NALT y NP de ratones BALB/c control e inmunizados con Cry1Ac.	62
Fig. 4.2. Porcentaje de expresión de L-selectina en las poblaciones de linfocitos del NALT y NP.	63
Fig. 4.3. $\alpha 4\beta 1$ expresada en la superficie de linfocitos B y T del NALT y NP.	64
Fig. 4.4. Porcentaje de expresión de LFA-1 en las poblaciones de linfocitos del NALT y NP.	65

Lista de Abreviaturas

AFC	Células formadoras de anticuerpos. Del inglés antibodies former cells.
BALT	Tejido linfoide asociado a bronquios. Del inglés bronchial-associated lymphoid tissue.
BFA	Brefeldina A.
BSA	Albúmina de suero bovino. Del inglés bovine serum albumin.
CLNs	Nódulos linfoides cervicales. Del inglés cervical lymph nodes.
CT	Toxina de cólera. Del inglés cholera toxin.
DC	Células dendríticas. Del inglés dendritic cells.
DN	Dobles negativas.
ELISPOT	Técnica inmunoenzimática de lectura de puntos. Del inglés enzyme-linked immunospot.
FCS	Suero fetal de ternera. Del inglés fetal calf serum.
FITC	Isotiocianato de fluoresceína. Del inglés fluorescein isothiocyanate.
GALT	Tejido linfoide asociado a intestino. Del inglés gut-associated lymphoid tissue.
HEV	Vénulas endoteliales altas. Del inglés high endothelial venules.
i.n.	Intranasal.
ICAM-1	Molécula de adhesión intracelular-1. Del inglés intracellular adhesion molecule-1.
IEL	Linfocitos intraepiteliales. Del inglés intraepithelial lymphocytes.
IFN-γ	Interferón gama.
IgA	Inmunoglobulina A.
IgG	Inmunoglobulina G.
IgM	Inmunoglobulina M.
IL	Interleucina.
kDa	Kilodaltones.
LB	Medio Luria-Bertoni.
LFA-1	Antígeno asociado a la función linfocitaria. Del inglés lymphocyte function-associated antigen-1.
LP	Lámina propia. Del inglés lamina propria.
L-Sel	L-selectina.
LT	Toxina termolábil. Del inglés heat-labile toxin.
M	Molar.
mAb	Anticuerpos monoclonales. Del inglés monoclonal antibodies.
MAdCAM-1	Molécula de adhesión celular de la mucosa-1. Del inglés mucosal addressin cell adhesion molecule 1.
MALT	Tejido linfoide asociado a mucosas. Del inglés mucosal-associated lymphoid tissue.

MLN	Nódulo linfoide mesentérico. Del inglés mesenteric lymph node.
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero. Del inglés Messenger ribonucleic acid.
NALT	Tejido linfoide asociado a la nariz. Del inglés nasal-associated lymphoid tissue.
NK	Asesinas naturales. Del inglés natural killers.
NP	Pasajes nasales. Del inglés nasal passages.
PBA	Amortiguador de fosfatos con azida de sodio. Del inglés phosphate buffered with sodium azide.
PBS	Amortiguador de fosfatos en solución salina. Del inglés phosphate-buffered saline.
PBS-T	Amortiguador de fosfatos en solución salina-Tween 20. Del inglés phosphate-buffered saline-Tween 20.
PCB	Amortiguador carbonatado de fosfatos. Del inglés phosphate-carbonate buffer.
pCry1Ac	Protoxina Cry1Ac.
PE	Ficoeritrina. Del inglés Phicoeritrin.
PerCP	Piridin clorofil proteína. Del inglés peridinin chlorophyll protein.
PLN	Nódulos linfáticos periféricos. Del inglés peripheral lymph nodes
PMA	Acetato de forbol miristato. Del inglés phorbol myristate acetate.
PNAd	Adresina de nódulos periféricos. Del inglés Peripheral lymph node addressin.
PP	Placas de Peyer. Del inglés Peyer's patches.
rpm	Revoluciones por minuto.
RPMI-1640	Medio Roswell Park Memorial Institute-1640.
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa. Del inglés reverse transcriptase-polymerase chain reaction.
SDS-PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida-duodecil sulfato de sodio. Del inglés Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis.
TLR	Receptor Toll-like. Del inglés toll-like receptors.
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa. Del inglés Tumor necrosis factor-alpha.
VCAM-1	Molécula de adhesión celular vascular-1. Del inglés vascular cell adhesion molecule.

Resumen.

Las diferencias entre las poblaciones de linfocitos de los compartimentos nasales, NALT y pasajes nasales (NP) no están bien establecidos, por lo que el propósito de este estudio contribuye a su caracterización. Se distinguieron claramente dos poblaciones de células B220^{hi} and B220^{low} en NP. Estas dos poblaciones fueron CD19⁺ pero sólo una fracción de B220^{low} fue CD138⁺. En ambos tejidos se encontró: mayor células B que T, más células CD4⁺ que CD8⁺, una pequeña fracción de células NK (CD3-DX5) y una gran cantidad de células T CD4-CD8-CD3+DX5-. Como era de esperarse en un sitio efector, los NP tuvieron proporciones mayores de células B220⁺, T CD4⁺ y T CD8⁺ que expresaron CD25 y CD69 en comparación con el NALT. La proporción de células T que espontáneamente producen IL-2, IFN- γ e IL-4 fue más alta en NP que en el NALT. Estos datos indican que existen diferencias fenotípicas y funcionales en las poblaciones de linfocitos que residen en el NALT y NP. Cry1Ac es un potente inmunógeno y adyuvante de mucosas. Por la vía intranasal Cry1Ac protege contra la infección de *Naegleria fowleri*, pero sus efectos sobre los linfocitos del NALT y NP no han sido determinados. La inmunización i.n. con Cry1Ac: i) incrementó la proporción de linfocitos que expresan los marcadores de activación CD25 y CD69 en ambos tejidos nasales; ii) aumentó la proporción de células T que espontáneamente producen IL-4, IL-5 e IL-10, y el efecto fue mayor en NP que en el NALT; iii) indujo respuestas específicas de células IgA e IgG en NP; y iv) modificó la expresión de los receptores de homing en las células T y B y de las moléculas de adhesión del NALT. Estos datos contribuyen a explicar la potente inmunogenicidad de Cry1Ac administrada por la vía i.n., además de sustentar que Cry1Ac es una herramienta valiosa para caracterizar la inducción de las respuestas inmunes.

Abstract.

The differences among lymphocyte populations of the nasal compartments NALT and nasal passages (NP) have not been clearly established, so here we contributed to their characterization. Two populations of B cells, B220^{hi} and B220^{low} were clearly distinguished only in NP. Both ^{hi} and ^{low} B220⁺ cells were CD19⁺, but only a fraction of B220^{low} were CD138⁺. In both nasal compartments were found: more B than T cells, more CD4⁺ than CD8⁺ T cells, a small fraction of NK cells (CD3⁻DX5⁺) and a great amount of CD4⁻CD8⁻CD3⁺DX5⁻ T cells. As expected for a mucosal effector site, NP contained major proportions of B220⁺, T CD4⁺ and T CD8⁺ cells expressing CD25 and CD69 in comparison to NALT. Likewise, the proportion of T cells spontaneously producing IL-2, IFN- γ and IL-4, was higher in NP than in NALT. These data indicate that distinctive phenotypic and functional features exist in the lymphocyte populations residing at NALT and NP.

Cry1Ac is a potent mucosal immunogen and adjuvant. Via intranasal (i.n.) route Cry1Ac improves vaccination against *Naegleria fowleri* infection, but their effects on nasal lymphocytes from NALT and NP have not been determined. Here we found that i.n. immunization with Cry1Ac i) increased the proportion lymphocytes expressing the activation markers CD25 and CD69 in both nasal tissues; ii) Increased the proportion of T cells spontaneously producing IL-4, IL-5 and IL-10, and the effect was higher in NP than in NALT; iii) Induced significant specific IgA and IgG cell responses, especially in NP; and iv) Modifies the expression of homing receptors on T and B cells and endothelial adhesion molecules on NALT. These data contribute to explain the potent immunogenicity of Cry1Ac via i.n. route, in addition they sustain that Cry1Ac is a valuable tool to characterize the induction of nasal immune responses.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN.

Introducción.

El sistema inmune común de mucosas

El sistema inmunitario de las mucosas está compuesto de los tejidos linfoides vinculados con las superficies mucosas de los aparatos digestivo, respiratorio y urogenital. Las superficies mucosas constituyen la ruta de entrada de la mayoría de los agentes infecciosos. Por lo tanto, este sistema ha evolucionado dentro de un ambiente antigénico muy diferente del existente en el interior del cuerpo y por tal motivo, presenta varias características que lo diferencian del sistema linfoide sistémico.

El sistema inmune común de mucosas se divide en sitios inductores, donde el antígeno se capta, endocita, procesa y se presenta a los linfocitos T y B, mientras que en los sitios efectores se lleva a cabo la respuesta inmune (1).

En cuanto a su organización el sistema inmune asociado a mucosas puede dividirse en tres compartimentos: 1) linfocitos intraepiteliales (IEL), 2) tejido linfoide difuso (lámina propia, LP) y agregados linfoides organizados como las placas de Peyer (PP). Se piensa que la inducción de la inmunidad en las superficies mucosas ocurre en los agregados especializados de tejido linfoide denominados colectivamente como tejido linfoide asociado a las mucosas (MALT), formado principalmente en el: a) tracto respiratorio por el tejido linfoide asociado a los bronquios (BALT) y a la nasofaringe (NALT), por ejemplo, amígdala palatina, lingual y nasofaringe; b) en el tracto gastrointestinal por el tejido linfoide asociado al intestino (GALT), por ejemplo, las PP, apéndice, nódulos linfáticos mesentéricos, nódulos linfoides aislados y linfocitos intraepiteliales (1).

Tejido linfoide asociado a la nariz (NALT).

Como se mencionó, el MALT en el tracto respiratorio no se restringe a los pulmones. Desde la boca y nariz se pueden observar varios grupos de células inmunocompetentes. En los humanos, las amígdalas son el tejido linfoide más conspicuo de la naso y orofaringe. En roedores se ha identificado un tejido linfoide asociado a la nasofaringe (2), que representa los tejidos linfoides orofaríngeos de las vías respiratorias altas, que se denomina NALT y se considera análoga al anillo de Waldeyer en los humanos (3, 4) (Fig. 1.1).

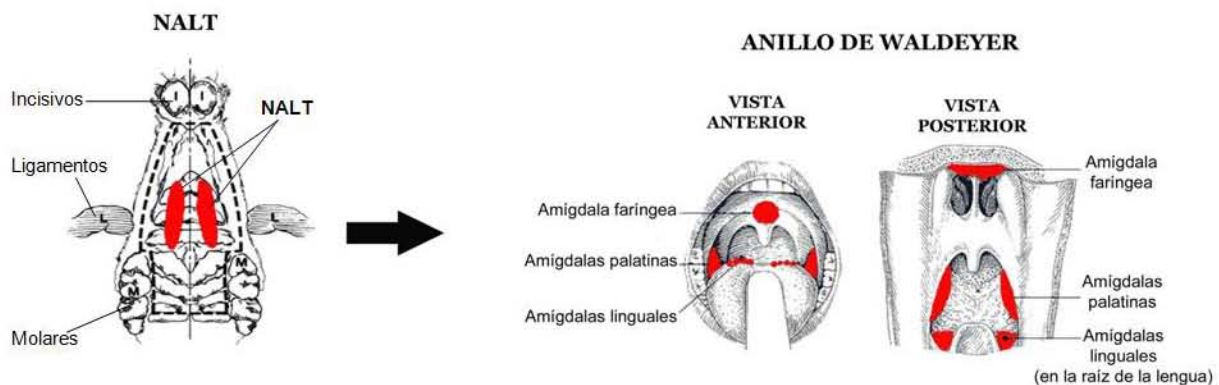


Fig. 1.1. En roedores se ha identificado un tejido linfoide asociado a la nasofaringe, se denomina NALT y representa los tejidos linfoides orofaríngeos de las vías respiratorias altas. Esta estructura se considera análoga al anillo de Waldeyer en los humanos (anillo de tejido linfoide, que comprende las amígdalas linguales las amígdalas palatinas, y amígdalas nasofaríngeas, también llamadas adenoides).

El tejido linfoide asociado a la nariz (NALT) es un órgano que está situado en el piso de la cavidad nasal justo a la entrada del ducto nasofaríngeo. Al igual que el BALT y las PP, el NALT está inmediatamente debajo del epitelio, en este caso el nasal. El epitelio del NALT consiste en un gran número de células ciliadas, pocas células caliciformes y numerosas células M. Las células M se presentan solas o en

grupos y microscópicamente son idénticas a las que se presentan en PP y BALT (5). El epitelio anterior al NALT está infiltrado principalmente con linfocitos T, donde la mayoría pertenecen a los cooperadores. Ocasionalmente se encuentran células dendríticas (DC).

El NALT está compuesto por una red reticular poco definida, donde los linfocitos, macrófagos y DC están presentes. Los linfocitos están organizados en áreas foliculares (área de células B) e interfoliculares (área de células T). Existen vasos linfáticos y sanguíneos. La mayoría de los vasos linfáticos están en la base de las áreas de células B y T. Se presentan numerosas vénulas endoteliales altas (HEV) están presentes en el área de células T (5).

Aunque el NALT no debe ser el único sitio que contribuye significativamente a la estimulación de los precursores mucosos efectores de las vías aéreas, su importancia se debe probablemente a su proximidad a la lámina propia nasal, lo que fortalece la idea de que esta estructura única es un tejido importante para estudiar procesos inmunológicos con antígenos introducidos por vía intranasal (6).

A pesar de su importante función desde el punto de vista inmunológico de esta mucosa, poco se sabe sobre el sistema inmune nasal. Tanto el fenotipo como las funciones de las diferentes poblaciones de linfocitos nasales aún no están bien caracterizadas. Por lo que es importante la generación de conocimiento sobre este tejido para comprender la respuesta inmune bajo condiciones normales o patológicas (por ejemplo, la resistencia y susceptibilidad a infecciones, alergias, anergia y autoinmunidad) así como para el diseño de nuevas inmunoterapias y/o intervenciones profilácticas.

Por otra parte, pocos estudios se han dedicado a la caracterización de la población de linfocitos localizada en el tejido difuso alrededor del NALT, que se ha denominado como linfocitos de los pasajes nasales (NP). Los NP incluyen el tracto nasal y varias partes de la nariz tales como los cornetes nasales, tabique y paredes

laterales, además de linfocitos de estructuras linfoides menos organizadas a lo largo del ducto lagrimal, lámina propia y el epitelio nasal (7).

El NALT y los NP se consideran como sitio inductor y efector respectivamente, a pesar de que las diferencias fenotípicas y funcionales de las poblaciones linfocitarias entre estos compartimentos nasales no están establecidas claramente.

La inmunización intranasal es muy eficiente para inducir respuestas inmunes humorales y celulares en la mucosa respiratoria y en sitios mucosos distantes tales como el tracto genital y el intestino (8-15). También se ha demostrado que esta ruta de inmunización es más efectiva que la oral y la vaginal para inducir respuestas generalizadas a nivel de mucosas y sistémicas (16-20), además de requerir una menor cantidad de inmunógenos (13).

Se considera que el NALT es un tejido importante para la generación de la inmunidad mucosal hacia antígenos inhalados, capaces de diseminar células efectoras a sitios mucosales distintos.

Por tal motivo, se considera que una mayor comprensión de las diferencias fenotípicas y funcionales entre los sitios inductores del NALT y de los sitios efectores, como los pasajes nasales podría facilitar el desarrollo de vacunas nasales. Aunque la inmunización intranasal puede lograr la inducción de respuestas inmunes antígeno específicas a nivel local y sistémico, además de conferir inmunidad protectora, generalmente se requiere emplear alguna estrategia para incrementar las respuestas en mucosas, como el uso de diversos sistemas de entrega de antígeno o el uso de adyuvantes.

Adyuvantes en mucosas.

Existen pocos adyuvantes de la inmunidad de mucosas (21). Las toxinas de cólera (CT) (22, 23) y la termolábil de *Escherichia coli* (LT) (24) tienen efectos adyuvantes cuando se coadministran o se conjugan con proteínas solubles que por sí solas no son inmunogénicas para las mucosas (25). Sin embargo, la aplicación de estas toxinas en humanos no es conveniente por su toxicidad y alto costo de producción. Las formas mutantes no tóxicas de LT y CT que mantienen parcialmente la adyuvanticidad también son excesivamente costosas (25-28). En estudios previos, hemos reportado que la inmunogenicidad y adyuvanticidad de Cry1Ac recombinante tanto a nivel sistémico como de mucosas son tan potentes como las de la toxina del cólera. La administración oral e intraperitoneal intranasal y rectal de la protoxina Cry1Ac induce altas respuestas de anticuerpos a nivel intestinal y sistémico (29-35). Cry1Ac incrementa la inmunidad protectora hacia la meningoencefalitis experimental, por *Naegleria fowleri* en ratón, una enfermedad infecciosa aguda fatal iniciada en la mucosa nasal, Cry1Ac incrementó al 100% la sobrevivencia en ratones retados con una dosis letal de amibas, mientras que los lisados amibianos indujeron hasta un 60% de protección. Interesantemente la administración intranasal de Cry1Ac sola también tuvo efectos protectores contra la infección por *N. fowleri* ya que incrementó los niveles de sobrevivencia de manera similar a la inmunización con lisados amibianos solos (60%) (32). Estos resultados indican que Cry1Ac podría ser una herramienta útil para mejorar las vacunas mucosas.

Por lo tanto consideramos importante caracterizar los efectos de la inmunización intranasal con Cry1Ac en las poblaciones de linfocitos nasales.

Este trabajo está estructurado en cuatro capítulos. El capítulo I, comprende una introducción general. El capítulo II, se refiere a las diferencias fenotípicas y funcionales de las poblaciones de linfocitos tanto del NALT como de los NP, en ratones normales BALB/c. En el capítulo III, se analiza el efecto de la inmunización intranasal con la protoxina Cry1Ac en las poblaciones linfocitarias de ambos tejidos nasales. Por último, el capítulo IV, trata sobre la caracterización del efecto de la inmunización intranasal con la protoxina Cry1Ac en la expresión de receptores de homing en linfocitos del NALT y NP, y sobre el análisis de la expresión de moléculas de adhesión endotelial en NALT.

Objetivos.

- 1) Caracterizar las diferencias fenotípicas y funcionales de las poblaciones de linfocitos tanto del NALT como de los NP, en ratones normales BALB/c.
 - a. Establecer los porcentajes de las poblaciones de linfocitos B220+, CD4+ y CD8+ del NALT y NP, mediante citometría de flujo.
 - b. Determinar el porcentaje de expresión de los marcadores de activación en la superficie de linfocitos B220+, CD4+ y CD8+ del NALT y NP, mediante citometría de flujo.
 - c. Determinar el porcentaje de expresión intracelular de IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IFN- γ y TNF- α de los linfocitos T CD3+ del NALT y NP, mediante citometría de flujo.
- 2) Caracterizar el efecto de la inmunización intranasal con la protoxina Cry1Ac en las poblaciones de linfocitos tanto del NALT como de los NP, en ratones BALB/c.
 - a. Establecer los porcentajes de las poblaciones de linfocitos B220+, CD4+ y CD8+ del NALT y NP de ratones inmunizados por la vía intranasal con Cry1Ac, mediante citometría de flujo.
 - b. Determinar el porcentaje de expresión de los marcadores de activación en la superficie de linfocitos B220+, CD4+ y CD8+ del NALT y NP de ratones inmunizados por la vía intranasal con Cry1Ac, mediante citometría de flujo.
 - c. Determinar el porcentaje de expresión intracelular de IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IFN- γ y TNF- α de los linfocitos T CD3+ del NALT y NP de ratones inmunizados por la vía intranasal con Cry1Ac, mediante citometría de flujo.

- 3) Caracterización fenotípica de los linfocitos del NALT y NP, en cuanto a la expresión de receptores de homing y moléculas de adhesión, así como el efecto de la inmunización intranasal con la protoxina Cry1Ac en la expresión de dichas moléculas.
- a. Establecer el porcentaje de expresión de L-selectina y de las integrinas $\alpha 4\beta 1$, $\alpha 4\beta 7$ y LFA-1 en la superficie de linfocitos B220+, CD4+ y CD8+ del NALT y NP de ratones control e inmunizados con Cry1Ac, mediante citometría de flujo.
 - b. Determinar la expresión de las moléculas de adhesión MAdCAM-1, VCAM-1, ICAM-1 y PNAd en el NALT mediante inmunohistoquímica.

CAPÍTULO II

**DIFERENCIAS FENOTÍPICAS Y FUNCIONALES DE LINFOCITOS DEL
NALT Y NP DE RATÓN.**

(PUBLICACIÓN)

Phenotypic and Functional Differences between Lymphocytes from NALT and Nasal Passages of Mice

M. A. Rodríguez-Monroy*, S. Rojas-Hernández† & Leticia Moreno-Fierros*

*Inmunidad en Mucosas UBIMED, FES-Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Méx., México; and †Departamento Bioquímica, Escuela Superior de Medicina, Instituto Politécnico Nacional, Plan de San Luis y Díaz Mirón, México, D.F.

Received 5 July 2006; Accepted in revised form 5 December 2006

Correspondence to: Leticia Moreno-Fierros, Inmunidad en Mucosas. Lab 9. UBIMED, FES-Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, Avenida de los Barrios 1, Los Reyes Iztacala, Código Postal 54090 Tlalnepantla, Méx., México. E-mail: lemofi@servidor.unam.mx

Abstract

Nasal-associated lymphoid tissue (NALT) and nasal passages (NP) are considered as inductive and effector sites, respectively. The differences among lymphocyte populations of these nasal compartments have not been clearly established. The aim of this work was to contribute to the characterization of NALT and NP lymphocytes in mice. We isolated lymphocytes from both compartments, determined the frequencies of B220⁺ cells as well as CD8⁺, CD4⁺ T cells; and analysed the expression of CD69 and CD25. Besides we analysed the proportion of T cells producing IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IFN- γ and TNF- α . We found differences between NALT and NP. Two populations of B cells, B220⁺^{hi} and B220⁺^{low} were clearly distinguished only in NP, but not in NALT. Both ^{hi} and ^{low} B220⁺ cells expressed CD19, but only a fraction of the B220⁺^{low} population, expressed the plasma cell marker CD138⁺. More B than T lymphocytes, as well as higher frequencies of CD4⁺ than CD8⁺ T cells were found in both compartments. A small fraction of NK cells (CD3⁻DX5⁺) along with a significant proportion of double negative CD4⁻CD8⁻CD3⁺DX5⁻ T cells was detected in both nasal tissues. Furthermore, as expected for a mucosal effector site, NP contained major proportions of B220⁺, T CD4⁺ and T CD8⁺ cells expressing CD25 and CD69 in comparison to NALT. Likewise, the proportion of T cells spontaneously producing IL-2, IFN- γ , and IL-4, was higher in NP than in NALT. These data provide further evidence indicating that distinctive phenotypic and functional features exist in the lymphocyte populations residing at NALT and NP.

Introduction

The nasal mucosa, is an important site for host defense against invading pathogens, as it is the first site of contact with inhaled antigens [1]. In addition to its role in the defense of the upper and lower respiratory tracts, the nasal lymphoid system cooperates with the systemic immune system and affects immune reactions at distant mucosal sites, such as the urogenital tract and the gut [2, 3]. Consequently, new vaccination strategies based on nasal application have been designed and proven to be effective procedures for induction of antigen specific immunity in respiratory and reproductive tissues. However, despite its central role in mucosal immunity, little is known about the nasal immune system. Indeed the phenotype and functions of the different nasal lymphocyte populations are not fully characterized [4]. Thus the generation of an adequate base of knowledge would be

critical to understand immune responsiveness under normal or pathologic conditions (e.g. resistance and susceptibility to infection, allergy, anergy and autoimmunity) as well as for the design of new immune therapeutic and/or prophylactic interventions.

The paired lymphoid cell aggregates of the rodent upper respiratory tract, named nasal-associated lymphoid tissue (NALT), have been recognized as the only well organized mucosal-associated lymphoid tissue in the upper respiratory tract of rodents [1, 5–7], and is believed to be the equivalent of the Waldeyer's ring of humans. NALT, is located at the floor of the nasal cavity just underneath the ciliated respiratory epithelium and consists of a reticular network filled with various types of lymphoid and non-lymphoid cells. Several evidences suggest that NALT may has an important role in the induction of mucosal immune responses after nasal immunization [8]; however relatively little attention has

focused on the mechanisms involved in the induction and expression of immune responses in the nasal mucosa. Besides given the intensity of antigenic exposure at the nasal mucosa, it is clear that local T cell activation events require strict control to maintain tissue homeostasis.

Nasal-associated lymphoid tissue seems to be an important site in lymphocyte recirculation as lymphocytes migrate back to NALT and cervical lymph nodes (CLNs) in far greater number than cells from Peyer's patches and, reciprocally, cells from the CLNs home more successfully to NALT than to Peyer's patches [1, 4, 5, 9]. Furthermore, lymphocyte homing to the NALT seems to be mediated primarily through L-selectin (L-Sel)-peripheral node addressin (PNAd) interactions.

Few studies have characterized the lymphocyte population located in the diffuse tissue around the NALT which has been called nasal passages (NP) lymphocytes. The nasal passages include nasal tract and various parts of the nose such as turbinates, septum and lateral walls and include the lymphocytes from less organized lymphoid structures along the lacrimal duct, lamina propria and the nasal epithelium [1].

Nasal-associated lymphoid tissue and nasal passages lymphocytes are considered as inductive and effector sites, respectively. Despite only few works have systematically characterized NALT lymphocytes along with NP lymphocytes. So the phenotypic and functional differences in lymphocyte populations between these mucosal compartments have not been clearly established.

Thus the aim of this work was to contribute to the phenotypic and functional description of the lymphocyte populations of NALT and NP. We isolated lymphocytes from both compartments from BALB/c mice, and using flow cytometry we determined the frequencies of B220⁺ cells as well as those of CD8⁺, CD4⁺, on CD3⁺ T cells; in addition we analysed the expression of CD69 and CD25 on these lymphocyte populations. Besides, we analysed the proportion of T cells producing IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, and IFN- γ and TNF- α by intracellular cytokine staining.

We found striking differences between the cell surface phenotype of lymphocytes from NALT and NP. Furthermore, the proportion of activated lymphocytes as well as the percentage of T cells spontaneously producing IL-2, IFN- γ , and IL-4, were higher in NP than in NALT. Altogether these data provide further evidence indicating that distinctive phenotypic and functional features exist in the lymphocyte populations residing at the different nasal compartments.

Materials and methods

Animals. Male BALB/c mice used in this study were 6–8 week old; housed in filter-top cages and provided sterile food and *ad libitum*. All procedures with animals

were carried out in accordance with institutionally approved protocols.

Isolation of NALT. Nasal-associated lymphoid tissue and pooled NALT cell suspensions were prepared using a dissection procedure. Blood was withdrawn by cardiac puncture of ether anesthetized mice, then they were killed by cervical dislocation and decapitated, and the lower jaw and tongues were removed. After rinsing with ice-cold sterile phosphate-buffered saline (PBS) to remove blood, the heads were immobilized with pins on a wax dissection slab to reveal the upper palate. Using a zoom stereo microscope (total magnification: 63 \times ; Model SZ6045; Olympus Melville, NY, USA), palates were excised as [10] using a No. 11 scalpel blade (Lance Blades, Sheffield, UK). After the incisions, palates were gripped behind the incisor teeth with fine forceps and gently pulled toward the molar teeth while using the scalpel to gently release tissue between the palates, jawbones, and nasal septum. Palates were placed immediately into a 24-mm Petri dish containing 3.0 ml of ice-cold RPMI-1640 medium supplemented with 5% heat-inactivated fetal bovine serum, 1% penicillin-streptomycin, 1% L-glutamine at pH 7.4, (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA) and the NALT (visible under low angle illumination) was teased gently into the medium to release cells. NALT cell suspensions from individual animals were pooled and cells were washed twice with RPMI-1640 medium by centrifugation (500 g for 10 min at 4 °C) and resuspended in RPMI-1640 medium.

Nasal passage lymphocyte preparation. Nasal passage lymphocytes were prepared from the portion of the nasal cavity remaining after isolation of the NALT (nasal turbinates, septum and lateral walls). In order to avoid the contamination with circulating blood lymphocytes, the components of the isolated nose were placed in a Petri dish and rinsed thoroughly with RPMI-1640 medium thereafter they cut up into small pieces and rinsed again twice with RPMI medium. The pieces of nasal tissue were transferred into a 15 ml conical centrifuge tube containing 3 ml of RPMI-1640 with 440 U/ml of type IV collagenase (Sigma Chemical Co.), and incubated horizontally at 37 °C for 30 min in a shaker incubator at 180 rpm/min. After incubation, the released cells were centrifuged 10 min at 500 g and washed with RPMI-1640 medium. Then cells were suspended in 4 ml of 40% Percoll (Pharmacia Fine Chemicals, Piscataway, NJ, USA) and overlaid onto 4 ml of 70% Percoll. Discontinuous 40%/70% Percoll gradients were centrifuged at 600 g for 25 min at room temperature. Nasal lymphoid cells from the interface were collected, washed and resuspended in complete RPMI medium supplemented with 1% FCS and prepared directly for staining with monoclonal antibodies (mAb).

Flow cytometry. All the phenotypic assays of NALT and NP were performed in parallel. Pooled NALT and

NP cells from seven untreated mice isolated as described above were suspended in 0.5% bovine serum albumin (BSA) that had been dissolved in PBS at a concentration of 10^5 cells/ml followed by incubation at room temperature in the dark with 10 μ l of properly diluted mAb for 30 min. Cells were washed with 0.5% BSA-PBS, suspended in 400 μ l of 1% *p*-formaldehyde in PBS and stored in the dark at 4 °C until analysed. The surface phenotype of cells was analysed using anti-mouse mAb (Becton Dickinson Technologies, Gaithersburg, MD, USA) purchased from PharMingen (San Diego, CA, USA). The mAb used in this study included anti-CD45R/B220⁺ phycoerythrin (PE) (RA3-6B2), anti-CD3⁺ fluorescein isothiocyanate (FITC) (molecular complex 17A2), anti-CD3⁺ peridinin chlorophyll protein (PerCP) (CD3 ϵ chain) (145-2C11), anti-CD4⁺ FITC (L3T4) (6K1.5), and anti-CD8a⁺ PE (Ly-2) (53-6.7). For further analysis of B220⁺ cells we used the mAb anti-CD19 (PE), Biotin anti-CD138 (Syndecan-1) (281-2) and R-(PE)-conjugated Streptavidin. For analysis of NK cells, we used anti-Pan-NK cells (DX5) (FITC) and anti CD4 (APS) for four colour analysis of DX5 expression on DN CD4⁻CD8⁻CD3⁺ cells. For analysis of activation marker expression the mAb used were anti-CD25 (FITC) (IL-2R α chain, p55) (7D4), anti-CD25 (PE) (IL-2R α chain, p55) (7D4), anti-CD69 (FITC) (very early activation antigen) (H1.2F3) and anti-CD69 (PE) (H1.2F3). To perform flow cytometric analyses relative fluorescence intensities were measured using a FACSCalibur cytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) and BD Cell Quest Pro v.5.1.1 software (Becton Dickinson). For each phenotypic characteristic data were collected for 20,000 events. Lymphocyte phenotypes were determined by two, three or four-colour or immunofluorescence. The percentage of cells labelled with each mAb was calculated in comparison with cells stained with isotype control antibody. B and T-cells were analysed within a lymphocyte gate defined by forward and side light scatter. Equivalent gates were used in analyses of cells derived from NALT and NP tissues for comparison. Background staining was controlled by labelled isotype controls (PharMingen) and never exceeded 1.0% of cells. The results represent the percentage of positively stained cells in the total cell population exceeding the background staining signal. Each analysis was performed at least three times for verification, and the data represent the mean \pm standard deviation from three to five experiments using cells of a given tissue from seven mice.

Detection of intracellular cytokines: IL-2, IFN- γ , IL-4, IL-5, IL-10 and TNF- α . The production of cytokines was measured through intracellular staining. Briefly, capped polystyrene Falcon tubes (Becton Dickinson) were used to incubate (1×10^6 cells) lymphocytes of the NALT and NP with 25 ng/ml phorbol myristate acetate (PMA)

(Sigma), 1 μ g/ml ionomycin (Sigma) and 10 μ g/ml Brefeldin A (BFA) (positive control) or BFA only, for 4 h at 37 °C and 5% CO₂. Antibodies to cell surface markers, anti-CD3 PerCP, were added to aliquots of the stimulated and non-stimulated lymphocytes and then incubated 30 min at 4 °C in the dark. After incubation, the cells were then centrifuged for 5 min at 3000 g and supernatants were aspirated without disturbing the pellets. FACS permeabilizing solution (Becton Dickinson) was added to the pellets and incubated for 10 min at room temperature in the dark, cell suspensions were then washed with PBS containing 0.1% BSA and 0.01% sodium azide (PBA), and centrifuged for 5 min at 500 g, the supernatants were removed. The following anti-cytokine monoclonal antibodies used in this study For intracellular staining were rat anti-mouse anti-IL4 (PE), anti-IL5 (PE), anti-IL-10 (PE), anti-TNF-alpha (PE), anti-IL2 receptor (β receptor) (FITC) and anti-IFN- γ (FITC) (Becton Dickinson Technologies) purchased from PharMingen (San Diego, CA). mAb were added to the pellets and cell suspensions were incubated at 4 °C for 30 min in the dark. The samples were washed with PBA and fixed with PBS containing 1% *p*-formaldehyde. Intracellular cytokine in T cells were characterized using a FACSCalibur cytometer (Becton Dickinson) and BD Cell Quest Pro software v.5.1.1 (Becton Dickinson). A minimum of 20,000 cells were analysed.

Statistical analysis. The statistical analysis was performed using Mann-Whitney *U*-test, taking $P < 0.05$ as significant.

Results

Characterization of NALT and NP lymphocytes

Lymphocytes from isolated NALT were obtained as described above. The number of lymphocytes recovered from isolated NALT of normal BALB/*c* mice was $7.2 (\pm 0.7) \times 10^5$ cells for a single mouse. In contrast, the number of cells recovered from nasal passages after NALT removal and following Percoll density gradient separation was higher $1.4 (\pm 0.5) \times 10^6$ cells per mice. The phenotype of NALT and NP lymphocytes analysed by flow cytometry is shown in Fig. 1.

In both NALT and NP B cells were more abundant than T cells. But whereas the percentage of B cells was not notably different between these nasal compartments, a notably differential characteristic in the expression B220⁺ was observed, as two populations of B cells, B220^{hi} and B220^{low} were clearly distinguished only in NP; while NALT contained only B220^{hi} cells (Fig. 1). The percentage of B cells was slightly higher in NP than in NALT, since little more than half (55%) of the lymphocytes in NALT were B220⁺ and this population represented 47% of the lymphocytes in NP. In contrast,

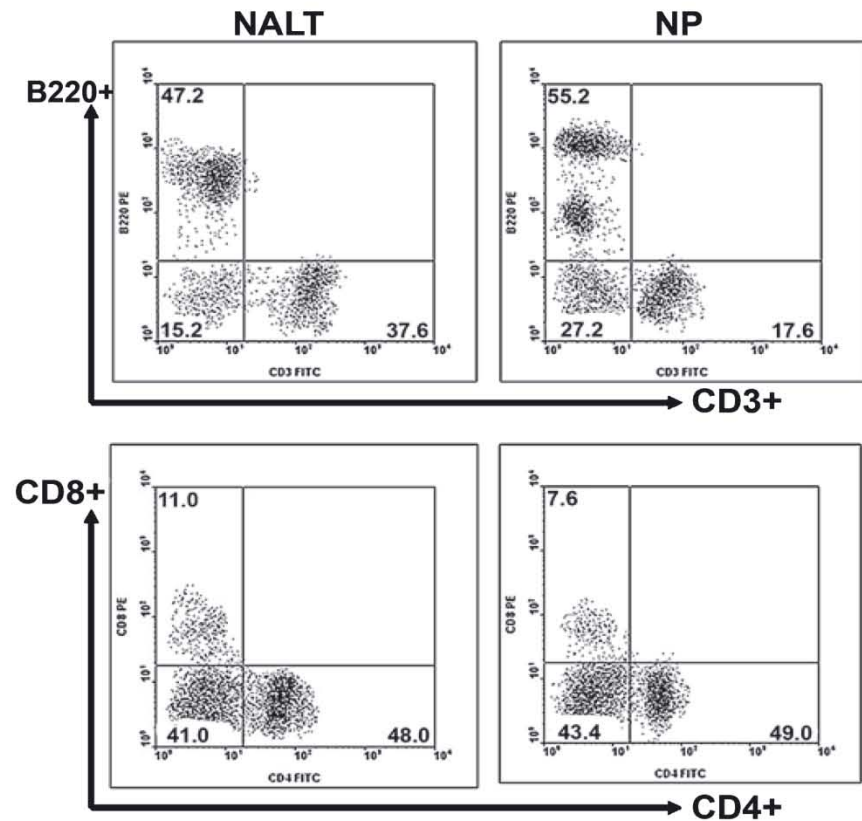


Figure 1 Lymphocyte composition of nasal-associated lymphoid tissue (NALT) and nasal passages (NP). NALT and NP lymphocytes were isolated from normal BALB/c mice. Single cell suspensions (1×10^6 /sample) were stained with fluorochrome-labelled mAbs and analysed by flow cytometry. Plots shown are from five representative experiments, and the mean values are indicated. Numbers in the upper plots refer to percentage of cells within lymphocyte gate while numbers in lower plots represent the relative frequencies in the CD3⁺ population.

Table 1 Surface phenotype of freshly isolated lymphocytes from nasal-associated lymphoid tissue (NALT) and nasal passages (NP).

Cell markers	NALT		NP	
	%	Ratio	%	Ratio
B220 ⁺	47.2 ± 2.9		55.2 ± 1.48	
CD3 ⁺	37.6 ± 2.1		17.6 ± 4.45	
B220 ⁺ /CD3 ⁺				
B220 ⁻ CD3 ⁻	15.2 ± 3.56	1.3	27.2 ± 5.72	3.1
CD4 ⁺	48.0 ± 2.0		49.0 ± 3.54	
CD8 ⁺	11.0 ± 3.2		7.6 ± 2.41	
CD4 ⁺ /CD8 ⁺				
CD4 ⁻ CD8 ⁻ CD3 ⁺	41 ± 4.24	4.4	43.4 ± 4.83	6.4

Lymphocytes isolated from NALT and NP of normal BALB/c mice were stained with fluorochrome-labelled mAbs and analysed by flow cytometry. Data represent the mean percentage of expression ± standard deviation from five independent experiments using pooled cells of a given tissue from seven mice. Values of CD4 and CD8 expression indicate the percentages of gated CD3⁺ cells within the lymphocyte gate.

the proportion of T cells in NALT and NP was markedly different (Table 1). Since NALT contained a much higher percentage of T CD3⁺ cells than NP (37% versus 17% respectively). As a result the B/T cell ratios were higher in NP than in NALT (3.1 versus 1.3 B/T ratios respectively).

Besides in both nasal tissues was detected a population of cells that did not express nor B220⁺ either CD3⁺, but whose size and granularity corresponded to that shown by lymphocytes. The proportion of this population was lower in NALT than NP (15% and 27% respectively) (Fig. 1, Table 1).

On the other hand a similar proportion of CD4⁺ cells, which represented almost a half of total T CD3⁺ cells, were found in both NALT and NP (48% and 49% respectively) (Table 1). Even so, the percentage of CD8⁺ cells was slightly lower in NP than in NALT, consequently the CD4⁺/CD8⁺ ratio was higher in NP than in NALT (6.4 versus 4.4 respectively). In addition, we found that both NALT and NP contained a significant proportion of double negative (CD4⁻, CD8⁻) T CD3⁺ cells; this population was similar in NALT and NP (41% versus 43% respectively) (Fig 1 Table 1).

Only a fraction within B220⁺ CD19⁺ B cells predominantly found in NP express CD138

The finding of the two populations of B220⁺ cells among the NP cells were interesting, therefore in order to determine if both B220^{hi} and ^{low} populations belong to the B cell lineage, they were further characterized by analysing the expression of CD19, CD138

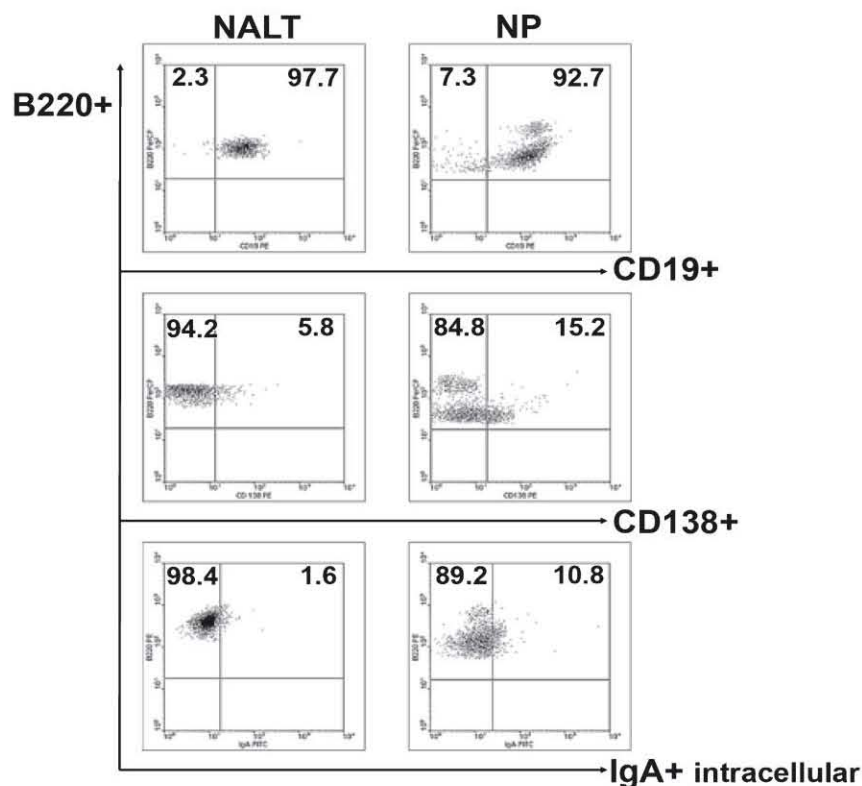


Figure 2 Flow cytometric analysis of the expression of CD19, CD138 and intracellular IgA in B220⁺ cells, in nasal-associated lymphoid tissue (NALT) and nasal passages (NP) lymphocytes isolated from normal BALB/c mice. The representative plots shown were gated on B220⁺ cells within lymphocyte gate. Numbers represent the mean percentage values of expression from three independent experiments. Almost all B220⁺ cells expressed CD19, while only a fraction within the predominant B220^{low} population found in NP expressed CD138.

and IgA. We found that the majority of either ^{hi} or ^{low} B220⁺ cells expressed CD19 indicating that they are B cells (Fig. 2). Whereas a fraction (representing about 15% of B220⁺ cells) within the B220^{low} population, which was observed only in NP, expressed the plasma cell marker CD138, it was not detected within the B220^{hi} populations nor in NALT neither in NP. Despite IgA⁺ cells recorded after intracellular staining did not represent clearly defined populations, their proportions were higher in NP than in NALT. Altogether these data indicate that a fraction of cells within the B220^{low} population, which was predominant in NP but undetected in NALT, seems to correspond to plasma cells, which as expected are more abundant in NP than in NALT.

Low numbers of NK cells (DX5⁺) are detected in NALT and NP but DN CD3⁺ cells do not express DX5

Given that we detected in both nasal tissues relatively high numbers of double negative CD4⁻CD8⁻CD3⁺ cells as well as a considerable proportion of cells that were negative for B220, and CD3, we analysed DX5 expression in these populations to determine if some of them could be either NKT or NK cells. We used the pan-NK cell marker DX5 mAb, which recognize CD49b (very late Ag-2, $\alpha 2$ integrin), because it stains NK cells from

all mouse strains examined and can also be used to define functionally distinct subsets of NK cells [11]. Despite the DN CD4⁻CD8⁻CD3⁺ cells do not appear to be NKT cells as they did not express the NK surface marker DX5, both NALT and NP contained a similar small fraction of NK cells CD3⁻DX5⁺ (Fig. 3)

Flow cytometric analysis of activation marker expression on NALT and NP lymphocytes

As NALT and nasal passages are considered as inductive and effector mucosal sites respectively, we thought that it was important to examine whether there were differences in the number of lymphocytes expressing activation markers at both nasal sites. So we analysed by flow cytometry in lymphocytes isolated from NALT and NP, the proportion of B220⁺, T CD4⁺, and T CD8⁺ lymphocytes expressing the activation markers CD25⁺ and CD69⁺.

The data shown in Fig. 4 indicate the mean percentage values of B220⁺, CD4⁺ and CD8⁺ cells expressing either CD25⁺ or CD69⁺ in the total lymphocyte population of NALT and NP. While the mean percentage values indicating the frequency of either, CD25⁺ or CD69⁺ cells, shown in Table 2 were calculated individually for each gated lymphocyte population expressing the corresponding surface marker (CD4⁺, CD8⁺ or B220⁺).

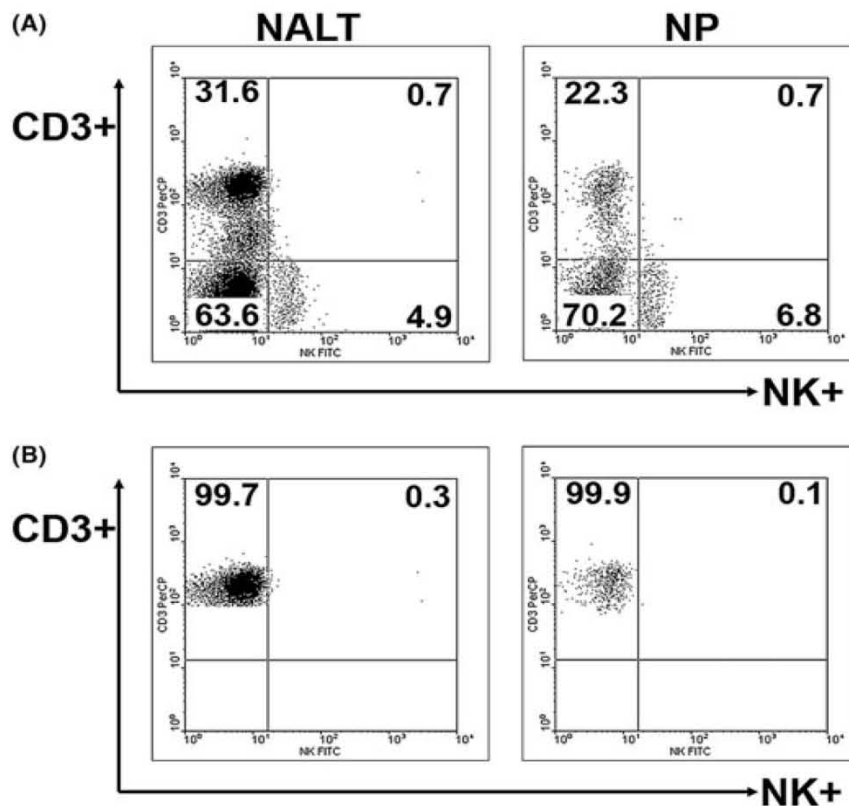


Figure 3 Expression of the NK cell marker DX5 in total lymphocytes and in CD3⁺ DNCD4⁻CD8⁻ cells from nasal-associated lymphoid tissue (NALT) and nasal passages (NP). The expression of DX5 in conjunction with CD4, CD8 and CD3 was assessed by four colour cytometry. The plots shown are representative of three experiments. Numbers refer to the mean percentage values. The upper plots show expression of DX5 and CD3⁺ in total cells within lymphocyte gate; where can be appreciated that both NALT and NP contain a small proportion of NK cells CD3-DX5⁺. The lower plots show DX5 expression on gated CD3⁺ DNCD4⁻CD8⁻ cells; illustrating that they did not express this NK cell marker.

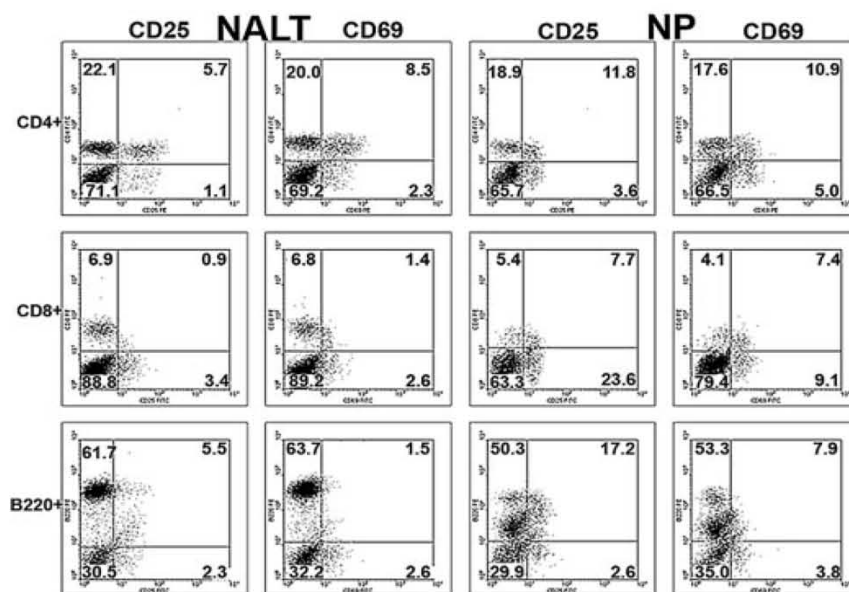


Figure 4 Flow cytometric analysis of activation marker expression on nasal-associated lymphoid tissue (NALT) and nasal passages (NP) lymphocytes. The frequency of B220⁺, CD4⁺ and CD8⁺ cells expressing either CD25⁺ or CD69⁺ was determined within the NALT and NP lymphocyte population isolated from normal BALB/c mice. Cells were stained with fluorochrome conjugated mAbs and analysed by flow cytometry. Dotplots shown are from representative experiments. Numbers represent the mean percentage values of expression of five independent experiments (using pooled cells of six mice per each tissue). The values were calculated for the entire population within lymphocyte gate.

CD25

As expected for an effector mucosal site we found that NP contained higher numbers of B220⁺, T CD4⁺ and T CD8⁺ cells expressing CD25⁺ than NALT. The

percentages of B cells expressing CD25 recorded in NP were thrice higher than those recorded in NALT (25.5 ± 1.17 versus 8.2 ± 2.28 respectively)(Table 2). Indeed in NP B cells comprise the lymphocyte population which registered the highest percentages of CD25

Table 2 Activation marker expression on NALT and NP lymphocytes from BALB/c male mice.

Lymphocytes	Tissue	% of activation marker expression	
		CD25	CD69
CD4 ⁺	NALT	20.5 ± 2.51	29.8 ± 3.11
	NP	38.4 ± 3.4	38.3 ± 3.31
CD8 ⁺	NALT	11.5 ± 1.53	17.1 ± 2.67
	NP	58.8 ± 2.17	64.4 ± 0.96
B220 ⁺	NALT	8.2 ± 2.28	2.3 ± 0.94
	NP	25.5 ± 1.17	12.9 ± 3.14

Percentage of expression of activation markers CD25 and CD69 on gated CD4⁺, CD8⁺ and B220⁺ lymphocytes of NALT and NP from normal BALB/c mice. Numbers represent the mean percentage of expression ± SD of five independent experiments (using pooled cells of six mice per each tissue). The mean percentage values indicating the frequency of either, CD25⁺ or CD69⁺ cells, were calculated individually for each gated lymphocyte population expressing the corresponding surface marker (CD4⁺, CD8⁺ or B220⁺).

expression (17%) (Fig. 4). Likewise the proportion of T CD4⁺ cells expressing CD25⁺ in NP doubled that found in NALT, as its expression was detected in 38.4% of T CD4⁺ lymphocytes in NP versus 20.5% in NALT. Finally, although T CD8⁺ expressing CD25⁺ cells represented a minor lymphocyte population in these nasal tissues, its percentages detected in NP were five times higher than in NALT (58.8 ± 2.17 versus 11.5 ± 1.53 respectively) (Table 2).

CD69

Sustaining that NP are effector sites, we found that they contained higher proportions of activated T and B lymphocytes expressing CD69⁺ than NALT. T CD4⁺ cells were the lymphocyte population which registered the highest percentages of CD69 expression in both NP and NALT (Fig. 4). The percentage of T CD4⁺ CD69⁺ cells was higher in NP than in NALT, although this difference was not too accentuated (38.3 ± 3.31 versus 29.8 ± 3.11% respectively). In contrast NP contained three higher percentages of T CD8⁺ cells expressing CD69⁺ in comparison with NALT (64.4 ± 0.96 versus 17.1 ± 2.67 respectively) (Table 2). Although low numbers of B cells expressing CD69 were recorded in NP (12.9 ± 3.14%), these were six times higher in comparison with those detected in NALT (2.3 ± 0.94) (Fig. 4).

Proportion of cytokine producing T lymphocytes in NALT and NP by intracellular cytokine detection

Although cytokine expression by lymphocytes from murine NALT and NP has been examined in immunized mice, in terms of protein secretion [12] and by RT-PCR

[13], in normal unstimulated mice, it has only been studied at the transcription level by RT-PCR analysis of mRNA [13]. In present work we analysed by flow cytometry the proportion of T cells spontaneously producing IL-2, IFN- γ , IL-4, IL-5, IL-10 and TNF- α in NALT and NP lymphocytes (Fig. 5). Spontaneously cytokine producing T cells were detected in both nasal compartments. Even so, higher proportions of T cells spontaneously producing IL-4, and IL-10, were detected in NP than in NALT; reinforcing the notion that NP is an effector site. Despite the proportion of TNF- α producing T cells detected in NP was very low (3.6%), it was higher to that found in NALT, where its frequency was almost insignificant (0.5%). Most spontaneously cytokine producing T cells recorded in NALT and NP, expressed a Th2 profile. IL-4 producing T cells represented the cytokine producing population which registered the highest percentages; its frequency in NP was one-third higher than in NALT (14% versus 10% respectively). Likewise the proportion of IL-10 producing cells in NP was more than

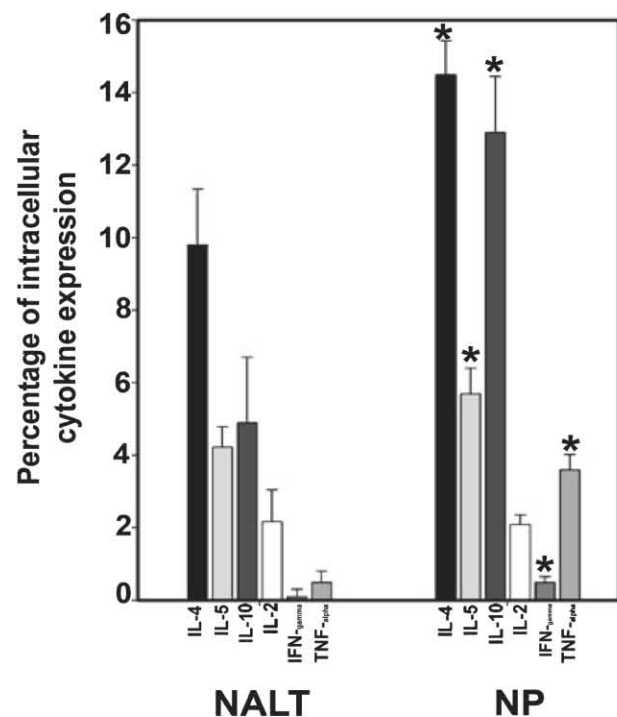


Figure 5 Percentage of T CD3⁺ cells producing intracellular cytokines in nasal-associated lymphoid tissue (NALT) and nasal passages (NP) lymphocytes from normal BALB/c mice. Cells isolated from NALT and NP were cultured with 10 mg/ml brefeldin A for 3 h and stained with mAb anti CD3 PerCP. Thereafter intracellular cytokine staining was performed using fluorochrome conjugated mAbs on fixed permeabilized cells and analysed by Flow cytometry. Data represent mean percentages ± SD of spontaneous cytokine producing CD3⁺ cells, of five independent experiments (using pooled cells of six mice per each tissue). *indicates Significant differences ($P < 0.05$) in the percentage of CD3⁺ cells expressing the corresponding cytokine in NP in relation to NALT.

twice higher than in NALT (13% versus 5% respectively). With regard to IL-5 producing cells similar low percentages were recorded in NALT and NP (around 5%). In contrast similar percentages of T cells spontaneously producing IL-2 and IFN- γ were registered between NALT and NP. Although the percentages of cells producing these cytokines at both nasal tissues were low, (less than 2.5% for IL-2 and not more than 0.5% for IFN- γ), these data indicate that at least a small number of nasal T cells produce Th1 cytokines.

Discussion

The mucosal immune system can be divided into inductive and effector compartments. The NALT is a typical inductive region, and the nasal passages are considered as effector sites. However, the phenotype and functions of the different cellular subpopulations residing at these nasal compartments are not fully characterized.

Present study provides additional knowledge regarding the phenotypic and functional differential properties between NALT and NP lymphocytes. In agreement with the assertion that nasal passages are effector sites, the data achieved, show that NP contain major proportions of activated lymphocytes and cytokine producing T cells than the NALT, the well defined inductive site. Besides we show evidence indicating that distinctive phenotypic characteristics exist between NALT and nasal passages on their B and T lymphocyte proportions. The new information presented here is important, as it is necessary to have a thorough understanding of the unique molecular and cellular properties of the nasal immune system for the development of successful nasal vaccines.

Regarding the phenotypic features of nasal lymphocytes, two main differences were found between NALT and NP. First, although the percentage of B220⁺ cells was similar at both nasal compartments, (approximately 50% of total lymphocytes), a notably distinctive characteristic in the expression B220⁺ was observed, as two populations of B cells, B220⁺^{hi} and B220⁺^{low} were clearly distinguished only in NP, while NALT contained only B220⁺^{hi} cells.

In order to determine the nature, of the two populations B220⁺ found in NP they were further characterized, because although CD45R/B220 is commonly used as a pan-B cell marker in the mouse, not all B220⁺ cells belong to the B cell lineage. For example murine plasmacytoid dendritic cells which represent a unique DC subset able to promptly release large amounts of type I interferon (IFN- $\alpha\beta$) upon viral encounter also express B220⁺^{low} [14]. Therefore we analysed CD19 expression in B220⁺ nasal populations since CD19 provides a more lineage-restricted marker *in vivo*, as it is a direct target gene of the transcription factor pax-5, which is critical for commitment to the B cell lineage [15]. In view of the

fact that almost all B220⁺ detected in NALT and NP also expressed CD19 we consider that both the B220⁺^{low} and ^{hi} populations, belong to the B cell lineage and do not seem to be plasmacytoid dendritic cells, because one characteristic of the surface profile of plasmacytoid DC (B220⁺CD19⁻CD11c+Gr-1.) is the absence of expression of CD19. In the mouse, B-lineage cells express the high molecular weight form of the common leucocyte antigen CD45, termed B220, on their cell surface, which is already present on the earliest identified CD43⁺ pro-B cells and expression is continued in pre-B, immature B and mature B cells, and is only downregulated at the late plasma cell stage [16]. Therefore our data showing that only a fraction of the B220⁺^{low} population expressed CD138⁺, while this plasma cell marker [17] was not detected in B220⁺^{high} populations, suggest that within the B220⁺^{low} population, which was only found in NP, are contained plasmablasts or plasma cells. B cells containing IgA did not represent clearly defined populations, although they were more abundant in NP than in NALT and seemed to display low expression of B220. Altogether these data indicate that only a fraction of the B220⁺^{low} population, which was predominant in NP but undetected in NALT, seem to correspond to plasma cells, which as expected are more abundant in the nasal effector site NP than in NALT.

The second distinctive phenotypic difference found between NALT and NP was that, although more B cells than T cells were found in both nasal tissues, NALT contained a much higher percentage of T CD3⁺ cells than NP (37% versus 17% respectively). Besides in both nasal tissues we detected a population of cells, that did not express B220⁺ neither CD3⁺, but whose size and granularity corresponded to that shown by lymphocytes, and represented about 20% of them. On the other hand we found that in both NALT and NP, half of the total T CD3⁺ cells were CD4⁺ while less than 10% of T cells were CD8⁺. Hiroi *et al.* [8] also have found that the frequency of CD4⁺ T cells was always higher than the CD8⁺ T cells in both NALT and NP. However, in contrast, they recorded higher frequencies of CD4⁺ T cells in NALT (75%) than in NP (50%); and higher frequencies of CD8⁺ cells in NP than in NALT (30% versus 23% respectively). Although it is important to consider that Hiroi *et al.* [8] used in their study C57BL/6 mice, while we used BALB/c mice, since it has been observed that the proportions of B and T cells recorded in mice vary depending on the strain of mice. For instance, coinciding with our results it has been observed that B cells are the most abundant cell population in NALT but the frequency recorded in different mice strains varies from 47 to 78%; likewise the ratio of B:T diverges from 4 to 1, where as the CD4:CD8 ratio varies from 3 to 1.6 [18]. Other divergences in the frequencies of B and T cells recorded by

different researchers in NALT may also be attributable to species and sex differences.

We found that both NALT and NP contained a significant proportion of double negative ($CD4^-$, $CD8^-$) T $CD3^+$ cells; this population represented approximately 40% of $CD3^+$ cells in both tissues and was more abundant than the proportion of $CD4^+$ and $CD8^+$ cells. Atypical cells have been previously described in association with NALT and NP, but at rather different proportions to those recorded by us. Hiroi *et al.* [8], reported in C57BL/6 mice that NP contained higher percentages of $CD4^-$ $CD8^-$ DN T cells (approximately 20% of $CD3^+$ T cells) than NALT (2%). Whereas Rharbaoui *et al.* [19] found in female BALB/c mice that a large fraction of NALT cells (approximately 45% of the total cells) corresponded to $CD3^{low}$ $B220^{low}$ $CD4^-$ $CD8^-$ cells. Based on their results they postulated that the immune responses in NALT may be in part modulated by this unconventional double-negative $B220^{low}$ cell subpopulation, that maintains a tolerogenic milieu by its proapoptotic status and suppressive activity, which can be reverted through stimulation of a TLR signalling cascade. The unconventional $B220^{low}$ $CD3^{low}$ T cell subpopulation detected by Rharbaoui *et al.* [19] partially resembles the phenotype of the double negative T cells recorded by us in NALT and NP, however we did not observe low expression of B220 in this T subpopulation, as they did. On the other hand in marked contrast with our results and with other reports [3, 10], Rharbaoui *et al.* [19] found that instead of B cells, the $B220^{low}$ $CD3^{low}$ subpopulation constituted the majority of cells from NALT.

Whereas some of the $CD4^-$ $CD8^-$ DN $CD3^+$ cells registered by us in both NALT and NP might be related with one of the various described populations of regulatory T cells, and thus may play an important role in the regulation of the immune response to nasal antigens, we consider that, another part may comprise naive cells with potential to differentiate into either Th1 or Th2 cells upon antigenic stimulation.

In support to this notion, several different regulatory cell populations have been identified, including ($\alpha\beta$ TCR+ double-negative, DN $CD4^-$ $CD8^-$ NK1.1-) regulatory T cells (Tregs) which are able to downregulate immune responses *in vitro* and *in vivo*, and thus might play a very important role in controlling the development of autoimmune diseases, transplant rejection, malignancy, and infectious diseases as has been demonstrated in general for various regulatory T cells. [20, 21]. Based on the expression of NK cell markers, DN T cells can be divided further into two subpopulations: NK^+ DN T cells referred to as NKT cells and NK^- DN T cells referred to as DN Tregs. Accordingly with this concept the DN T cells detected by us in NALT and NP might be related with DN Tregs instead of with NKT cells as they did not express the NK marker DX5), however, further

analysis on these cells is required using additional NKT cell surface markers to rule out that they did not belong to any NKT cell population. Because although using anti DX5 antibody we detected clearly in both NALT and NP, a small proportion of $CD3^-$ cells that appear to be NK cells [11], it has been shown that NKT are phenotypically diverse as different subsets of NKT cells have been identified which differ in their expression of a range of cell surface molecules (Vg8, DX5, CD69, CD45RB, Ly6C) [22] and are differentially distributed in a tissue-specific fashion. For example DX5 is expressed only by approximately one-third of DN NKT in spleen [23].

It has been recently shown that the development of functional DN Tregs does not require the thymus [20]. Although currently, the specific location for the maturation of DN Tregs remains unclear, studies have also suggested that some DN T cell populations may develop extrathymically in the appendix, female genital tract, NALT, or the liver [19, 24–26]. Moreover, it has been suggested that the non-regulatory DN T cell subsets develop and mature through the thymus, whereas regulatory DN T cells may preferentially develop outside the thymus [20]. However considering that further studies are still needed to identify cellular markers to differentiate between regulatory DN T cells and non-regulatory DN T cells, along with the fact the numbers of DN T cells found in NALT and NP were too high in comparison with its proportion recorded in other sites, it is reasonable to propose that not all of them serve regulatory functions. In support to this belief the intranasal route is perhaps the most effective for the induction mucosal and systemic immune response [27, 28], indicating that NALT must contain a vast population of naive cells. In agreement it has been shown that the majority of B cells in NALT were unswitched B cells and that helper T cells were in relatively naive state as they expressed ($CD45RB+hi$) [13].

Much less information is available concerning the nasal immune system in comparison with the intestinal immune system. NALT has been compared with other mucosal secondary lymphoid tissues such as PP and BALT as well as with cells found in mucosal intestinal effector sites [13, 28]. NALT and PP share structural and functional properties, although they should not be considered equivalent tissues since they have substantial differences that make to these mucosal-associated lymphoid tissues, unique structures due to the particular adaptations that their anatomically and environmentally distinct locations have conferred them [10, 27]. For example NALT and Peyer's patches had been thought to have similar immunological characteristics and biological functions, as well as to contain the same type of resident immunocompetent cells. However compared with cells obtained from Peyer's patches, NALT cells contain a higher proportion of T cells, especially naive

(CD45RB+hi) T-helper cells, and fewer surface (s)IgA+ cells [13]. In addition recent evidences indicate that the tissue organogenesis and biological functions of NALT and Peyer's patches are different [27, 29]. Emphasizing that more efforts should be aimed at elucidating the distinct cellular, molecular and functional characteristics of the nasal immune system.

Evidence from several sources support the assertion that secondary lymphoid organs contain mostly naive lymphocytes whereas it has recently emerged that at extralymphoid tissues reside effector as well as effector/memory lymphocytes [30]. The activation of naive T cells, with either specific Ag or polyclonal stimuli, results in the differential regulation of a series of cell adhesion/activation molecules. Cells transiently upregulate a range of activation markers, such as CD25 (IL-2R), CD40 ligand (CD40L)2, LFA-1, phagocytic glycoprotein-1 (CD44), and CD69 [31, 32]. In contrast, CD45RB and L-selectin (CD62L) are thought to decrease on T cell activation [33–37].

Given the intensity of antigenic exposure, extremely complex mechanisms are thought to be operating at the level of the nasal immune system to regulate highly specialized processes, such as immune reactivity and mucosal tolerance. In view of the fact that NALT and NP are considered inductive and effector sites respectively, it would be predictable that their lymphocyte populations should exhibit distinct levels of expression of activation markers as well as different proportions of cytokine producing cells.

As expected for an effector mucosal site we found that nasal passages contained major proportions of B220⁺, T CD4⁺ and T CD8⁺ cells expressing CD25⁺ and CD69⁺ in comparison with NALT. It has recently become apparent that memory T cells persist, not only in secondary lymphoid organs but also in a variety of extralymphoid peripheral tissues including the lungs [30, 38, 39], consistent with the idea that peripheral memory T cells play a major role in combating mucosal infections. Indeed it has been recently shown that substantial numbers of virus-specific CD4 and CD8 T cells can be recovered from the lung airways more than 1 year after resolution of either an influenza or Sendai virus infection [38, 40, 41]. These lung-derived T cells are distinct from lymphoid memory T cells in that they express markers characteristic of highly activated T cells, including CD25 and CD69 [38, 40] and some constitutive effector functions. As they produce antiviral cytokines and rapidly acquire cytolytic activity in response to Ag similar to the effector memory cells described by Sallusto *et al.* [42]. Thus it has been speculated that these Ag-specific memory T cells in the lung airways provide a first line of defense against subsequent infection [43].

Despite we performed the characterization of NP lymphocytes in untreated mice, and thus we did not

evaluate any specific immune response, our results showing that NP contains major proportions of lymphocytes expressing the activation markers CD25 and CD69, along with more T cells producing cytokines in relation to NALT, are in agreement with previous studies demonstrating that lymphoid and extralymphoid memory T cells are phenotypically and functionally different [30, 39].

Indeed analysis of surface Ags after Sendai virus infection have indicated that a large majority of the virus-specific CD4⁺ T cells in the lung airways retained a highly activated phenotype and expressed high levels of the acute activation markers CD69 and CD25 on day 41 after infection [44]; this was similar to the activated phenotype of virus-specific CD8 T cells in the lungs described in earlier studies [40]. However, a notably different pattern of surface Ags was detected on CD4 T cells from the parenchymal tissues of the lungs. Since like the BAL cells, the tetramer-specific CD4 T cells from the lung parenchyma expressed CD69 and CD44 at high levels, with reduced CD62L and CD45RB expression. However, these cells were distinct from the BAL cells in that CD25 was absent, and CD11a was expressed at high levels as in the other tissues [44].

Likewise it has been showed that the majority of cytokine-producing memory T cells, are enriched in extralymphoid rather than in lymphoid sites. Despite cytokine expression of murine NALT and NP T lymphocytes had been examined in immunized mice in terms of protein secretion [11, 12], in untreated mice it has only been studied at the transcription level using single cell reverse transcription (RT)-PCR analysis [8], instead of measuring the protein expression. In present work using intracellular cytokine staining and flow cytometry analysis we detected spontaneously cytokine producing T cells in both nasal compartments. In accordance with Hiroi *et al.* [8] we found that NP contained higher proportions of T cells spontaneously producing cytokines in comparison with NALT, as their frequencies of IL-4, IL-10, and TNF- α producing cells were greater in NP. Most spontaneously cytokine producing T cells recorded in both NALT and NP, express a Th2 profile; as higher percentages of IL-4, IL-10 and IL-5 producing T cells were registered in relation to the proportion of IL-2 and IFN- γ producing cells. Following analysis of cytokine-specific mRNA, Hiroi *et al.* [8] also observed a higher frequency of Th2 cell in NP. However, since mRNA for both IFN- γ and IL-6 was detected in 12% of the 50 T CD4⁺ cells assayed from NALT they concluded that this tissue was composed of Th0 and very few Th2 CD4⁺ T cells (4%). The differences in the cytokine profile reported by Hiroi *et al.* [8] in NALT and NP with respect with the results recorded by us, maybe due to the different mouse strain used, since BALB/*c* is known to elicit Th2 biased responses. Alternatively, the discrepancy may be

attributed to the distinct methodological approach employed. Because whereas they used a single-cell RT-PCR assay to analyse at the transcription level IFN- γ , IL-4 and IL-6 cytokine-specific mRNA in isolated CD4⁺ cells, we analysed by flow cytometry the frequency of cytokine producing cells in the entire CD3⁺ lymphocyte population. Besides it must be considered that despite we included in our analysis additional cytokines, such as IL-2, IL-5, IL-10 and TNF- α , we did not analyse IL-6, and thus we were not able to register the described Th0 population producing both IFN- γ and IL-6.

Both Th1 and Th2 cells develop from naive T cells through the same T cell precursor (Th0) phase. Th0 cells can differentiate into Th1 or Th2 cells, depending on the identity of the administered antigens [27]. Accordingly following intranasal immunization or infection polarized Th1 or Th2 or even mixed Th1/Th2 cell mediated responses can be attained depending on the identity of the nasally administered antigen [4, 27, 45]. For example intranasal administration of recombinant *Mycobacterium bacillus* Calmette-Guérin led to Th1 cell-mediated responses [46]. Similarly, primary ovalbumin-specific CD4⁺ T-cell responses in the NALT, draining lymph nodes, and spleen have been reported following infection with group A streptococcus expressing an ovalbumin epitope on its cell surface [47]. In contrast, nasal delivery of protein antigens, given together with cholera toxin, enhances specific Th2 or mixed Th1/Th2 type responses [12, 48, 49].

Despite we found higher numbers of T cells spontaneously expressing a Th2 than a Th1 cytokine profile in both NALT and NP cells, this not exclude the potential of nasal compartment for the induction of Th1 cell responses. Since nasal T cell populations might also comprise naïve T cells. Indeed we observed that the greater part of T cells, were not spontaneously producing any cytokine. Besides the majority of T cells found in both NALT and NP appear to be DN T cells. Thus DN CD3⁺ cells may possibly include terminally differentiated T regulatory lymphocytes in addition to cells with precursor potential for CD4⁺ or CD8⁺ T CD3⁺ lymphocytes. Considering that the ability of the NALT to respond eliciting either Th1 or Th2 immune responses seems to be dependent on antigen type and the presence of mucosal adjuvants, then following stimulation with some microbial antigens, such as certain TLR ligands, nasal DC and macrophages will produce IL-12 and thus might promote that some naïve T cells in NALT can become Th1 cells [45, 50]. However, it rest to be determined if DN CD4⁻CD8⁻ CD3⁺ cells which constitute the predominant T cell population found in NALT and NP display spontaneous cytokine production. Given that it has been reported that cytokine production exhibited by thymocyte subsets or CD3⁺ DN CD4⁻CD8⁻ spleen T

cells is discrete, although it is increased upon stimulation [51].

Indeed it has been reported that upon stimulation, murine DN CD4⁻CD8⁻ CD3⁺ TCR γ/δ peripheral T cells are able to proliferate and to produce IL2 and IFN- γ but not IL4, resembling conventional CD4⁺ TH1 cells in this regard [52]. Besides upon stimulation the cytokine production profile of human $\alpha\beta$ TCR CD4⁻CD8⁻ T cell clones with anti-CD3 was predominantly Th0-like [53]. Moreover, it has been reported that 40–60% of the CD3⁺ cells infiltrating the lung during the immune response in mice were CD3⁺ CD4⁻ CD8⁻ TcR- $\alpha\beta$ bearing cells, which upon ConA stimulation, synthesized mRNA for IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IFN- γ , TNF- α , GM-CSF, and TGF beta [54]. In addition unconventional DN TCR $\alpha\beta$ + T cells which appear to differentiate extrathymically, seem to participate in early response against *Listeria monocytogenes* and cytomegalovirus infections through IFN- γ production but lacked expression of IL-4 [55, 56].

In summary present study provide further evidence indicating that distinctive phenotypic and functional features exist between NALT and NP in their lymphocyte populations contained. As expected for an effector mucosal site we found that nasal passages contained major proportions of activated lymphocytes along as higher numbers of T cells spontaneously producing cytokines in comparison to NALT.

Acknowledgment

The study was funded by UNAM DGAPA PAPIIT IN213903 and CONACyT 43102 grants. Rodríguez-Monroy was supported by a doctoral fellowship from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT).

References

- 1 Kuper CF, Koornstra PJ, Hameleers DM *et al.* The role of nasopharyngeal lymphoid tissue. *Immunol Today* 1992;13:219–24.
- 2 Bergquist C, Johansson EL, Lagergard T, Holmgren J, Rudin A. Intranasal vaccination of humans with recombinant cholera toxin B subunit induces systemic and local antibody responses in the upper respiratory tract and the vagina. *Infect Immun* 1997;65:2676–84.
- 3 Zuercher AW. Upper respiratory tract immunity. *Viral Immunol* 2003;16:279–89.
- 4 Bienenstock J, McDermott MR. Bronchus- and nasal-associated lymphoid tissues. *Immunol Rev* 2005;206:22–31.
- 5 Koornstra PJ, de Jong FI, Vlek LF, Marres EH, van Breda Vriesman PJ. The Waldeyer ring equivalent in the rat. A model for analysis of oronasopharyngeal immune responses. *Acta Otolaryngol* 1991;111:591–9.
- 6 Spit BJ, Hendriksen EG, Bruijntjes JP, Kuper CF. Nasal lymphoid tissue in the rat. *Cell Tissue Res* 1989;255:193–8.
- 7 van der Ven I, Sminia T. The development and structure of mouse nasal-associated lymphoid tissue: an immuno- and enzyme-histochemical study. *Reg Immunol* 1993;5:69–75.

- 8 Hiroi T, Iwatani K, Iijima H, Kodama S, Yanagita M, Kiyono H. Nasal immune system: distinctive Th0 and Th1/Th2 type environments in murine nasal-associated lymphoid tissues and nasal passage, respectively. *Eur J Immunol* 1998;28:3346–53.
- 9 Tamura S, Iwasaki T, Thompson AH *et al*. Antibody-forming cells in the nasal-associated lymphoid tissue during primary influenza virus infection. *J Gen Virol* 1998;79(Pt 2):291–9.
- 10 Heritage PL, Underdown BJ, Arsenaault AL, Snider DP, McDermott MR. Comparison of murine nasal-associated lymphoid tissue and Peyer's patches. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;156:1256–62.
- 11 Arase H, Saito T, Phillips JH, Lanier LL. Cutting edge: the mouse NK cell-associated antigen recognized by DX5 monoclonal antibody is CD49b (alpha 2 integrin, very late antigen-2). *J Immunol* 2001;167:1141–4.
- 12 Yanagita M, Hiroi T, Kitagaki N *et al*. Nasopharyngeal-associated lymphoreticular tissue (NALT) immunity: fimbriae-specific Th1 and Th2 cell-regulated IgA responses for the inhibition of bacterial attachment to epithelial cells and subsequent inflammatory cytokine production. *J Immunol* 1999;162:3559–65.
- 13 Wu HY, Nikolova EB, Beagley KW, Russell MW. Induction of antibody-secreting cells and T-helper and memory cells in murine nasal lymphoid tissue. *Immunology* 1996;88:493–500.
- 14 Nikolic T, Dingjan GM, Leenen PJ, Hendriks RW. A subfraction of B220(+) cells in murine bone marrow and spleen does not belong to the B cell lineage but has dendritic cell characteristics. *Eur J Immunol* 2002;32:686–92.
- 15 Nutt SL, Heavey B, Rolink AG, Busslinger M. Commitment to the B-lymphoid lineage depends on the transcription factor Pax5. *Nature* 1999;401:556–62.
- 16 Melchers F, ten Boekel E, Seidl T *et al*. Repertoire selection by pre-B-cell receptors and B-cell receptors, and genetic control of B-cell development from immature to mature B cells. *Immunol Rev* 2000;175:33–46.
- 17 Wijdenes J, Vooijs WC, Clement C *et al*. A plasmocyte selective monoclonal antibody (B-B4) recognizes syndecan-1. *Br J Haematol* 1996;94:318–23.
- 18 Zuercher AW, Coffin SE, Thurnheer MC, Fundova P, Cebra JJ. Nasal-associated lymphoid tissue is a mucosal inductive site for virus-specific humoral and cellular immune responses. *J Immunol* 2002;168:1796–1803.
- 19 Rharbauui F, Bruder D, Vidakovic M, Ebensen T, Buer J, Guzman CA. Characterization of a B220+ lymphoid cell subpopulation with immune modulatory functions in nasal-associated lymphoid tissues. *J Immunol* 2005;174:1317–24.
- 20 Ford MS, Zhang ZX, Chen W, Zhang L. Double-negative T regulatory cells can develop outside the thymus and do not mature from CD8+ T cell precursors. *J Immunol* 2006;177:2803–9.
- 21 Zhang ZX, Young K, Zhang L. CD3+CD4-CD8- alphabeta-TCR+ T cell as immune regulatory cell. *J Mol Med* 2001;79:419–27.
- 22 Pellicci DG, Hammond KJ, Coquet J *et al*. DX5/CD49b-positive T cells are not synonymous with CD1d-dependent NKT cells. *J Immunol* 2005;175:4416–25.
- 23 Hammond KJ, Pelikan SB, Crowe NY *et al*. NKT cells are phenotypically and functionally diverse. *Eur J Immunol* 1999;29:3768–81.
- 24 Halder RC, Kawamura T, Bannai M *et al*. Intensive generation of NK1.1- extrathymic T cells in the liver by injection of bone marrow cells isolated from mice with a mutation of polymorphic major histocompatibility complex antigens. *Immunology* 2001;102:450–9.
- 25 Johansson M, Lycke N. A unique population of extrathymically derived alpha beta TCR+CD4-CD8- T cells with regulatory functions dominates the mouse female genital tract. *J Immunol* 2003;170:1659–66.
- 26 Yamagiwa S, Sugahara S, Shimizu T *et al*. The primary site of CD4- 8- B220+ alphabeta T cells in lpr mice: the appendix in normal mice. *J Immunol* 1998;160:2665–74.
- 27 Kiyono H, Fukuyama S. NALT- versus Peyer's-patch-mediated mucosal immunity. *Nat Rev Immunol* 2004;4:699–710.
- 28 Wu HY, Russell MW. Nasal lymphoid tissue, intranasal immunization, and compartmentalization of the common mucosal immune system. *Immunol Res* 1997;16:187–201.
- 29 Fukuyama S, Hiroi T, Yokota Y *et al*. Initiation of NALT organogenesis is independent of the IL-7R, LTbetaR, and NIK signaling pathways but requires the Id2 gene and CD3(-)CD4(+)/CD45(+) cells. *Immunity* 2002;17:31–40.
- 30 Masopust D, Vezyz V, Marzo AL, Lefrancois L. Preferential localization of effector memory cells in nonlymphoid tissue. *Science* 2001;291:2413–7.
- 31 MacDonald HR, Budd RC, Cerottini JC. Pgp-1 (Ly 24) as a marker of murine memory T lymphocytes. *Curr Top Microbiol Immunol* 1990;159:97–109.
- 32 Swain SL, Croft M, Dubey C *et al*. From naive to memory T cells. *Immunol Rev* 1996;150:143–67.
- 33 Birkeland ML, Kraus T, Tardelli L, Pure E. Progressive changes in CD45RB phenotype and lymphokine production by murine CD4+ T cells after alloantigen exposure. *Immunology* 1992;75:632–8.
- 34 Bradley LM, Atkins GG, Swain SL. Long-term CD4+ memory T cells from the spleen lack MEL-14, the lymph node homing receptor. *J Immunol* 1992;148:324–31.
- 35 Budd RC, Cerottini JC, Horvath C *et al*. Distinction of virgin and memory T lymphocytes. Stable acquisition of the Pgp-1 glycoprotein concomitant with antigenic stimulation. *J Immunol* 1987;138:3120–9.
- 36 Ernst DN, Hobbs MV, Torbett BE *et al*. Differences in the expression profiles of CD45RB, Pgp-1, and 3G11 membrane antigens and in the patterns of lymphokine secretion by splenic CD4+ T cells from young and aged mice. *J Immunol* 1990;145:1295–1302.
- 37 Jung TM, Gallatin WM, Weissman IL, Dailey MO. Down-regulation of homing receptors after T cell activation. *J Immunol* 1988;141:4110–7.
- 38 Hogan RJ, Zhong W, Usherwood EJ, Cookenham T, Roberts AD, Woodland DL. Protection from respiratory virus infections can be mediated by antigen-specific CD4(+) T cells that persist in the lungs. *J Exp Med* 2001;193:981–6.
- 39 Reinhardt RL, Khoruts A, Merica R, Zell T, Jenkins MK. Visualizing the generation of memory CD4 T cells in the whole body. *Nature* 2001;410:101–5.
- 40 Hogan RJ, Usherwood EJ, Zhong W *et al*. Activated antigen-specific CD8+ T cells persist in the lungs following recovery from respiratory virus infections. *J Immunol* 2001;166:1813–22.
- 41 Wiley JA, Hogan RJ, Woodland DL, Harmsen AG. Antigen-specific CD8(+) T cells persist in the upper respiratory tract following influenza virus infection. *J Immunol* 2001;167:3293–9.
- 42 Sallusto F, Lenig D, Forster R, Lipp M, Lanzavecchia A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* 1999;401:708–12.
- 43 Woodland DL, Hogan RJ, Zhong W. Cellular immunity and memory to respiratory virus infections. *Immunol Res* 2001;24:53–67.
- 44 Cauley LS, Cookenham T, Miller TB *et al*. Cutting edge: virus-specific CD4+ memory T cells in nonlymphoid tissues express a highly activated phenotype. *J Immunol* 2002;169:6655–8.
- 45 Lavelle EC. Generation of improved mucosal vaccines by induction of innate immunity. *Cell Mol Life Sci* 2005;62:2750–70.
- 46 Hiroi T, Goto H, Someya K *et al*. HIV mucosal vaccine: nasal immunization with rBCG-V3J1 induces a long term V3J1 peptide-specific neutralizing immunity in Th1- and Th2-deficient conditions. *J Immunol* 2001;167:5862–7.
- 47 Park HS, Costalonga M, Reinhardt RL, Dombek PE, Jenkins MK, Cleary PP. Primary induction of CD4 T cell responses in nasal associated lymphoid tissue during group A streptococcal infection. *Eur J Immunol* 2004;34:2843–53.

- 48 Imaoka K, Miller CJ, Kubota M *et al.* Nasal immunization of non-human primates with simian immunodeficiency virus p55gag and cholera toxin adjuvant induces Th1/Th2 help for virus-specific immune responses in reproductive tissues. *J Immunol* 1998;161:5952–8.
- 49 Kurono Y, Yamamoto M, Fujihashi K *et al.* Nasal immunization induces Haemophilus influenzae-specific Th1 and Th2 responses with mucosal IgA and systemic IgG antibodies for protective immunity. *J Infect Dis* 1999;180:122–32.
- 50 Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol* 2003;21:335–76.
- 51 Zlotnik A, Godfrey DI, Fischer M, Suda T. Cytokine production by mature and immature CD4-CD8- T cells. Alpha beta-T cell receptor+ CD4-CD8- T cells produce IL-4. *J Immunol* 1992;149:1211–5.
- 52 Cron RQ, Gajewski TF, Sharrow SO, Fitch FW, Matis LA, Blue-stone JA. Phenotypic and functional analysis of murine CD3+,CD4-,CD8- TCR-gamma delta-expressing peripheral T cells. *J Immunol* 1989;142:3754–62.
- 53 Katsikis PD, Cohen SB, Murison JG *et al.* Human alpha beta T-cell receptor CD4-CD8 T-cell clones are predominantly Th0-like. *Immunology* 1995;84:501–4.
- 54 Chang JC, Zhang L, Distler SG, Ziang G, Kaplan AM. Characterization and function of CD3+ CD4- CD8- TcR-alpha beta bearing cells infiltrating the lung during the immune response. *Reg Immunol* 1992;4:25–33.
- 55 Hossain MS, Takimoto H, Ninomiya T *et al.* Characterization of CD4- CD8- CD3+ T-cell receptor-alphabeta+ T cells in murine cytomegalovirus infection. *Immunology* 2000;101:19–29.
- 56 Kadena T, Matsuzaki G, Fujise S *et al.* TCR alpha beta+ CD4-CD8- T cells differentiate extrathymically in an lck-independent manner and participate in early response against Listeria monocytogenes infection through interferon-gamma production. *Immunology* 1997;91:511–9.

CAPÍTULO III

**EFFECTOS DE LA INMUNIZACIÓN INTRANASAL CON LA PROTOXINA
CRY1AC SOBRE LAS DIFERENCIAS FENOTÍPICAS Y FUNCIONALES
DE LINFOCITOS DEL NALT Y NP DE RATÓN.**

Introducción.

La mucosa nasal es un sitio importante para la defensa del huésped contra patógenos que invaden esta vía, así como el primer sitio de contacto con los antígenos inhalados (5). Además del papel que juega en la defensa de las vías respiratorias altas y bajas, el sistema linfoide nasal coopera con el sistémico y tiene que ver con las reacciones inmunes en sitios distantes, tales como el tracto urogenital y el intestinal (8, 15). Tomando en consideración esta característica, se han diseñado nuevas estrategias de vacunación basadas en la aplicación nasal, y se ha demostrado que son procedimientos efectivos para la inducción de inmunidad específica a antígenos en los tejidos respiratorio y reproductivo. Sin embargo, a pesar de su papel en la inmunidad mucosal, poco es lo que se sabe sobre el sistema inmune nasal.

Existen varias evidencias que sugieren que el NALT puede tener un papel importante en la inducción en la respuesta inmune de la mucosa después de la inmunización intranasal (36), sin embargo, no se han determinado los mecanismos involucrados en la inducción y expresión de la respuesta inmune en la mucosa nasal.

El NALT y los NP son considerados como el sitio inductor y efector, respectivamente, a pesar de esto, son pocos los trabajos que han caracterizado sistemáticamente a las poblaciones de linfocitos de estos dos tejidos nasales. En un trabajo previo (37) caracterizamos las diferencias fenotípicas y funcionales existentes en linfocitos del NALT y NP mientras que el objetivo principal de este estudio es caracterizar el efecto de la inmunización intranasal con la protoxina Cry1Ac en la activación y en la producción de citocinas en linfocitos del NALT y NP.

La inmunización intranasal es una ruta efectiva para estimular la inmunidad de mucosas hacia una variedad de patógenos (12, 38, 39) y proteínas solubles, (8, 40).

La inmunización intranasal es muy eficiente para inducir respuestas inmunes humorales y celulares en la mucosa respiratoria y en sitios mucosos distantes tales como el tracto genital y el intestino (8-15). También se ha demostrado que esta ruta de inmunización es más efectiva que la oral y la vaginal para inducir respuestas generalizadas a nivel de mucosas y sistémicas (16-20), además de requerir una menor cantidad de inmunógenos (8, 13, 41-43).

Existen pocos adyuvantes de la inmunidad de mucosas (21). La toxina de cólera (CT) (22, 23) y la toxina termolábil de *Escherichia coli* (LT) (24) tienen efectos adyuvantes cuando se coadministran o conjugan con proteínas solubles que por sí solas no son inmunogénicas para las mucosas (25). Sin embargo, la aplicación de estas toxinas en humanos no es conveniente por su toxicidad y altos costos de producción. Las formas mutantes no tóxicas de LT y CT que mantienen parcialmente la adyuvancia también son excesivamente costosas (25, 26, 28).

Por lo anterior se infiere que es necesario descubrir y estudiar nuevos adyuvantes de mucosas y proteínas u otras moléculas que pudieran utilizarse como acarreadoras de epítopes vacunales que sean capaces de estimular la respuesta inmune en las superficies mucosas al mismo tiempo que sean inocuas para vertebrados, estables, de bajo costo de producción y que puedan aplicarse por vías mucosas.

Cry1Ac como adyuvante mucosal.

Cry1Ac es una proteína producida por la bacteria *Bacillus thuringiensis* que se ha utilizado desde los años 1930's como bioinsecticida. Esta proteína es producida por las bacterias como protoxina (130 kDa) y se solubiliza y procesa proteolíticamente por proteasas intestinales de insectos para producir la toxina (75 kDa). Se ha demostrado que Cry1Ac, como toxina o protoxina, no es tóxica para vertebrados

(44). Aunque los estudios con Cry1Ac se han enfocado principalmente en cuestiones vinculadas a la agricultura, se ha demostrado que es una proteína muy inmunogénica, capaz de generar respuestas potentes en suero y mucosas, incluso con una sola aplicación (29). Más aún, la coadministración de Cry1Ac por rutas mucosales con antígenos como albúmina sérica bovina, el antígeno de superficie del virus de hepatitis B y polisacáridos de neumococo ha aumentado la respuesta inmune hacia éstos, a niveles similares a los obtenidos cuando se usó la toxina de cólera como adyuvante (31, 34). Cry1Ac incrementa la inmunidad protectora hacia la meningoencefalitis experimental por *Naegleria fowleri* en ratón, una enfermedad infecciosa aguda fatal iniciada en la mucosa nasal (32).

Así pues, dado que la pCry1Ac es altamente inmunogénica y tiene propiedades adyuvantes a nivel sistémico y de mucosas; en este trabajo se determinó si la inmunización intranasal de la pCry1Ac modificaba la activación y producción de citocinas en linfocitos tanto del NALT como de los NP, además de analizar las respuestas de células productoras de anticuerpos en ambos tejidos.

Material y métodos.

Obtención de la protoxina Cry1Ac.

El plásmido pCry1Ac (Cry1Ac clonado en el vector pKK3322), donado por el Dr. Donald Dean (Ohio State University, Columbus, USA), se introdujo en células competentes TOP10 de *Escherichia coli* por medio de un shock térmico. Se seleccionaron las cepas resistentes a la ampicilina y se cultivaron en medio LB suplementado con 100 µg/ml de este antibiótico a 37°C con agitación constante (~300 rpm). A las 48 h de cultivo las bacterias se cosecharon por centrifugación (7000 g por 7 min), se resuspendieron en buffer TE (10 mM TrisCl, 1 mM EDTA, pH 8), se incubaron durante 30 min a 37°C con 1 mg/ml de lisozima (Sigma, MO)

y se lisaron por sonicación (Fisher Sonic Dismembrator Model 300). La fracción insoluble del lisado se lavó dos veces con TE/Tween-20 1%, dos veces con 0.5 M NaCl y una vez con agua bidestilada. La protoxina Cry1Ac se solubilizó disgregando la pastilla en buffer PCB 30 mM Na₂CO₃, 70 mM NaHCO₃, 1 % (v/v) 2-mercaptoetanol, pH 9.6) e incubando durante 30 min a 37°C. Posteriormente se aclaró por centrifugación a 16 000 g durante 10 min, se determinó la concentración de proteína por el método de Bradford y se analizó la pureza por SDS-PAGE en un gel al 7.5%. Una vez obtenida la pCry1Ac se eliminaron los restos de endotoxina que pudiera tener al pasarla por una columna de Polimixina (Affi-Prep® Polymyxin Matriz BIO-RAD 156-0010) para posteriormente verificar la ausencia restos de endotoxina con la prueba de detección semicuantitativa de endotoxina Sigma E-TOXATE® (Limulus ameobocyte lysate). La proteína se almacenó a 4°C hasta ser usada.

Ruta y esquema de Inmunización.

Se emplearon ratones BALB/c machos de 6 - 8 semanas de edad. Se administraron 50 µg del antígeno pCry1Ac por vía intranasal. Los grupos experimentales consistieron de siete animales que recibieron tres dosis de 50 µg de la pCry1Ac (una cada semana) y se sacrificaron 7 días después de la última inmunización.

Prueba de ELISPOT.

Se utilizaron placas de 24 pozos, donde se colocó papel de nitrocelulosa en cada pozo. Los pozos se recubrieron con la protoxina Cry1Ac disuelta en PBS (10 µg/500µl por pozo), posteriormente se incubaron las placas por 24 h a 4°C. Las placas se lavaron 3 veces con PBS-T (0.05%) para posteriormente ser bloqueadas con albúmina 1% en PBS-T durante 2 h a temperatura ambiente. Se realizó nuevamente el proceso de lavado (3 veces con PBS-T y tres veces con PBS). Se

agregaron 5×10^5 linfocitos por pozo en 500 μ l de medio RPMI-1640 y se incubaron a 37°C con CO₂ 5% por 4 horas. Las placas con linfocitos del NALT y NP se lavaron 5 veces con PBS-T, y se agregaron los anticuerpos monoclonales anti-inmunoglobulinas conjugados a peroxidasa (1:1000) anti-IgA, IgG e IgM. Se incubaron por dos horas a temperatura ambiente, a continuación, se lavaron 3 veces con PBS-T y se reveló con 4-cloronaftol. La membrana de nitrocelulosa se observó en un microscopio estereoscópico para contar el número de células productoras de anticuerpo (AFC) anti-Cry1Ac de linfocitos aislados del NALT y NP de ratones BALB/c inmunizados con la protoxina.

La obtención de los tejidos (NALT y NP) y las células de éstos así como los anticuerpos utilizados para determinar los efectos de la inmunización intranasal con la protoxina Cry1Ac, sobre estas poblaciones celulares, son exactamente los mismos que los descritos en el capítulo I.

Análisis estadístico.

El análisis estadístico fue realizado con la técnica no paramétrica Mann–Whitney U-test, con una $P < 0.05$ de significancia.

Resultados.

Cry1Ac modifica las poblaciones de linfocitos del NALT y NP.

Los linfocitos del NALT y NP se obtuvieron como se describió anteriormente (37). El número de linfocitos recuperados del NALT de ratones normales BALB/c, fue de $7.2 (\pm 0.7) \times 10^5$ células y de $1.4 (\pm 0.5) \times 10^6$ células para los NP. En el grupo inmunizado con Cry1Ac, se observa un incremento en el número obtenido de células tanto para el NALT ($1.2 \pm 0.3 \times 10^6$ células) como en los NP ($1.6 \pm 0.1 \times$

10^6 células). El fenotipo de los linfocitos del NALT y NP analizados por citometría de flujo, de ambos grupos (control e inmunizado) se muestra en la Fig. 3.1. Tanto en el grupo control como en el inmunizado, las células B fueron más abundantes que las T, en ambos tejidos nasales (NALT y NP). Al inmunizar con Cry1Ac, los porcentajes de células B son muy similares y no existe diferencia significativa en los valores observados en el NALT del grupo control ($46.8 \% \pm 2.39$ y $47.2 \% \pm 2.9$ respectivamente). Sin embargo, hay un aumento significativo de linfocitos B en los NP del grupo inmunizado ($69.2 \% \pm 5.93$) con respecto al control ($55.2 \% \pm 1.48$) (Fig. 3.1, Tabla 3.1). En contraste, las células T presentan porcentajes muy similares entre ambos grupos, $37.6 \% \pm 2.1$ para el NALT del grupo control y $36.8 \% \pm 3.11$ para el inmunizado; en los NP, se observó un $17.6 \% \pm 4.45$ en el grupo control, mientras que en el inmunizado el porcentaje fue de $16.8 \% \pm 2.28$ (Fig. 3.1, Tabla 3.1). Las células T CD4⁺ disminuyen en el NALT al inmunizar con Cry1Ac, de $48.0 \% \pm 2.0$ a $35.8 \% \pm 5.36$ y los T CD8⁺ de $11.0 \% \pm 3.2$ a $5.2 \% \pm 1.79$, estas disminuciones de células T CD4⁺ y CD8⁺ en el NALT de ambos grupos son significativamente diferentes. Sin embargo, en los NP se puede observar un cambio importante en las proporciones de estas células, hay un aumento significativo en células T CD4⁺ del grupo inmunizado ($67.8 \% \pm 3.03$) con respecto al control ($49.0 \% \pm 3.54$), de igual forma, los linfocitos T CD8⁺ se ven aumentados en el grupo inmunizado ($16.6 \% \pm 2.7$) con respecto al control ($7.6 \% \pm 2.41$) (Fig. 3.1, Tabla 3.1).

Tabla 3.1. Caracterización fenotípica de la superficie de linfocitos del NALT y NP en ratones control e inmunizados intranasalmente con Cry1Ac.

Marcadores celulares	NALT	NALT+Cry1Ac	NP	NP+Cry1Ac
B220⁺	47.2 ± 2.9	46.8 ± 2.39	55.2 ± 1.48	69.2 ± 5.93 *
CD3⁺	37.6 ± 2.1	36.8 ± 3.11	17.6 ± 4.45	16.8 ± 2.28
B/T	1.3	1.3	3.1	4.2
CD4⁺	48.0 ± 2.0	35.8 ± 5.36 §	49.0 ± 3.54	67.8 ± 3.03 *
CD8⁺	11.0 ± 3.2	5.2 ± 1.79 §	7.6 ± 2.41	16.6 ± 2.7 *
CD4⁺/CD8⁺	4.4	6.9	6.4	4.1
CD3⁺CD4⁺CD8⁺	41.0 ± 4.4	59.0 ± 3.0 §	43.4 ± 3.0	15.6 ± 3.2 *

Tabla 3.1. Los linfocitos aislados del NALT y NP de ratones normales e inmunizados se tiñeron con mAbs acoplados con fluorocromos y analizados por citometría de flujo. Los datos representan la media de los porcentajes de expresión ± la desviación estándar de 5 experimentos independientes usando un conjunto de células de 7 ratones. § señala las diferencias significativas (p<0.05) de los porcentajes de las poblaciones celulares entre el NALT del grupo control e inmunizado. * señala las diferencias significativas (p<0.05) de los porcentajes de las poblaciones celulares entre los NP del grupo control e inmunizado.

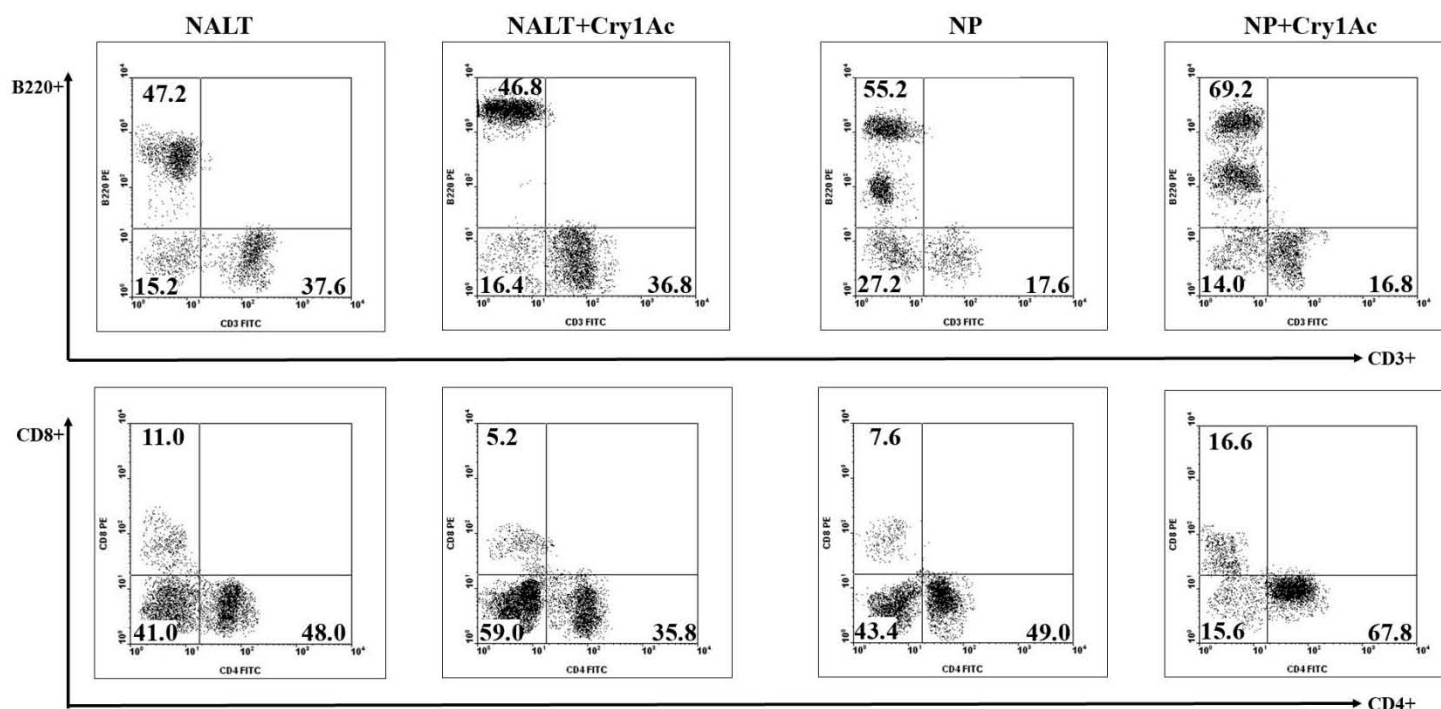


Fig. 3.1. Porcentaje de las poblaciones de linfocitos del NALT y NP. Los linfocitos de ambos tejidos nasales fueron aislados de ratones BALB/c normales e inmunizados con Cry1Ac. 1 X 10⁶ células fueron teñidas con mAbs con fluorocromos y analizados por citometría de flujo. Los dotplots son representativos de 5 experimentos independientes y los valores representan la media de los porcentajes.

Cry1Ac induce respuestas de células secretoras de anticuerpos específicas en NALT y NP.

Se inmunizaron siete ratones BALB/c por la vía intranasal con 50 µg de Cry1Ac, las poblaciones de células del NALT y NP se analizaron para determinar la presencia de células formadoras de anticuerpos (AFCs) específicas a Cry1Ac. La inmunización intranasal con Cry1Ac provocó un aumento considerable de AFCs productoras de IgA e IgG específicos a Cry1Ac en el NALT, IgA fue el isotipo con mayor número de células ($1245 / 10^6 \pm 185$) con respecto a IgG ($801 / 10^6 \pm 97$ células). En NP el número de células fue mucho mayor, sobre todo en lo que respecta al isotipo IgA, en el que el número fue aproximadamente tres veces mayor que en el NALT (NP, $3456 / 10^6 \pm 237$ células) y el número de células específicas a Cry1Ac productoras de IgG también fue mucho mayor ($1233 / 10^6 \pm 85$ células) que en el NALT (Tabla 3.2).

Tabla 3.2. Detección de células secretoras de anticuerpos específicas para Cry1Ac mediante el ensayo de ELISPOT.

No. Células secretoras de anticuerpos/ $10^6 \pm$ DS		
	NALT	NP
<i>IgA</i>	1245 ± 185 *	3456 ± 237
<i>IgG</i>	801 ± 97 *	1233 ± 85
<i>IgM</i>	< 10	< 10

Tabla 3.2. Linfocitos del NALT y NP de grupos de 7 ratones BALB/c inmunizados. Las células fueron incubadas para evaluar la presencia de células formadoras de anticuerpos (AFC) IgA-Cry1Ac específicas, IgG e IgM, a través de la prueba de ELISPOT. Los valores representan la media del número de AFC Cry1Ac-específicas por 1×10^6 células \pm la desviación estándar de 3 experimentos independientes. § señala los grupos con diferencias significativas ($p < 0.05$) del número de AFC Cry1Ac-IgG específicas por millón de células entre el NALT y NP. * señala los grupos con diferencias significativas ($p < 0.05$) del número de AFC Cry1Ac-IgA específicas por millón de células entre el NALT y NP.

La inmunización intranasal con Cry1Ac incrementa la expresión de marcadores de activación CD25 y CD69 en linfocitos del NALT y NP.

Para estudiar el efecto de la inmunización intranasal con Cry1Ac sobre la expresión de marcadores de activación en linfocitos nasales, se analizó por citometría de flujo la proporción de linfocitos B220+, T CD4+ y T CD8+ que expresaron los marcadores de activación CD25 y CD69. Los datos en las Fig. 3.2 y 3.3 muestran las medias de los porcentajes de células B220+, T CD4+ y T CD8+ que expresan CD25 y CD69 en las poblaciones totales de linfocitos del NALT y NP de los grupos control e inmunizados.

CD25

Como era de esperarse para un sitio efector, en los NP se encontró un mayor número de células B220+, T CD4+ y T CD8+ que expresan CD25 con respecto al NALT. Estos valores presentan un aumento significativo ante el estímulo inmunogénico que provoca la inmunización intranasal con Cry1Ac. Las células B que expresan CD25 en el NALT del grupo inmunizado es seis veces mayor que en el grupo control ($52.6 \% \pm 3.92$ y $8.2 \% \pm 2.28$ respectivamente) (Fig. 3.2 y 3.3, Tabla 3.3). De igual forma, se observó un incremento de estas células en los NP de ratones inmunizados ($54.9 \% \pm 4.39$) en relación al grupo control ($25.5 \% \pm 1.17$) (Fig. 3.2 y 3.3, Tabla 3.3). En lo que se refiere a las células T CD4+ que expresan CD25, se observó que tanto en el NALT como NP de ambos grupos, la expresión de este marcador aumentó al doble después de la inmunización con Cry1Ac, teniendo un $46.1 \% \pm 4.44$ en el NALT de ratones inmunizados contra un 20.55 ± 2.51 del grupo control. En NP del grupo experimental se observó un $76.6 \% \pm 3.72$ contra un $38.4 \% \pm 3.4$ de los NP de ratones normales, siendo esta diferencia significativa también. Finalmente, aunque los linfocitos CD8 presentan los porcentajes más bajos de las poblaciones del NALT y NP en ambos grupos, el

porcentaje de expresión de CD25 también se incrementó de forma significativa en los dos grupos y en ambos tejidos (NALT control $11.5 \% \pm 1.53$ contra $21.2 \% \pm 1.28$ del grupo inmunizado y en NP control $58.8 \% \pm 2.17$ contra $73.9 \% \pm 5.38$ en el grupo experimental) (Fig. 3.2 y 3.3, Tabla 3.3).

Tabla 3.3. Porcentaje de expresión de CD25 en las diferentes poblaciones de linfocitos del NALT y NP en ratones control e inmunizados con Cry1Ac.

	NALT		NP	
	<i>control</i>	<i>Cry1Ac i.n.</i>	<i>control</i>	<i>Cry1Ac i.n.</i>
<i>B220</i>⁺	8.2 ± 2.28	52.6 ± 3.92 *	25.5 ± 1.17	54.9 ± 4.39 *
<i>CD4</i>⁺	20.5 ± 2.51	46.1 ± 4.44 *	38.4 ± 3.4	76.6 ± 3.72 *
<i>CD8</i>⁺	11.5 ± 1.53	21.2 ± 1.28 *	58.8 ± 2.17	58.8 ± 2.17 *

Tabla 3.3. Los linfocitos aislados del NALT y NP de ratones normales e inmunizados se tiñeron con mAbs conjugados con fluorocromos y analizados por citometría de flujo. Los datos representan la media de los porcentajes de expresión \pm la desviación estándar de 5 experimentos independientes usando un conjunto de células de 7 ratones. § indica los grupos con diferencias significativas ($p < 0.05$) del porcentaje de expresión de CD25 entre las diferentes poblaciones de linfocitos del NALT del grupo control e inmunizado. * indica los grupos con diferencias significativas ($p < 0.05$) del porcentaje de expresión de CD25 entre las diferentes poblaciones de linfocitos de los NP del grupo control e inmunizado.

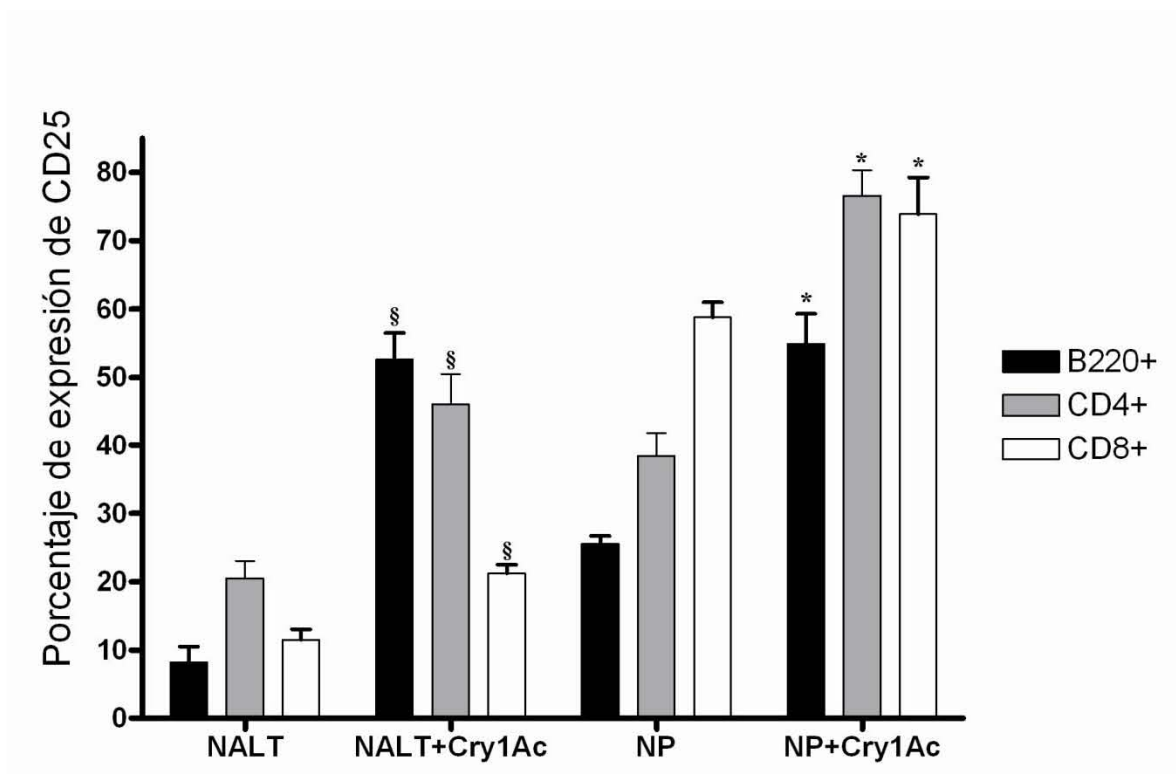


Fig. 3.2. Porcentaje de expresión del marcador de activación CD25 en las poblaciones de linfocitos del NALT y NP. Los linfocitos se aislaron de ratones BALB/c normales e inmunizados con Cry1Ac. 1×10^6 células se tiñeron con mAbs acoplados a fluorocromos y los resultados se adquirieron por citometría de flujo. Los valores representan la media de los porcentajes \pm la desviación estándar de 5 experimentos independientes. § indica los grupos con diferencias significativas ($p < 0.05$) del porcentaje de expresión de CD25 entre las diferentes poblaciones de linfocitos del NALT del grupo control e inmunizado. * indica los grupos con diferencias significativas ($p < 0.05$) del porcentaje de expresión de CD25 entre las diferentes poblaciones de linfocitos de los NP del grupo control e inmunizado.

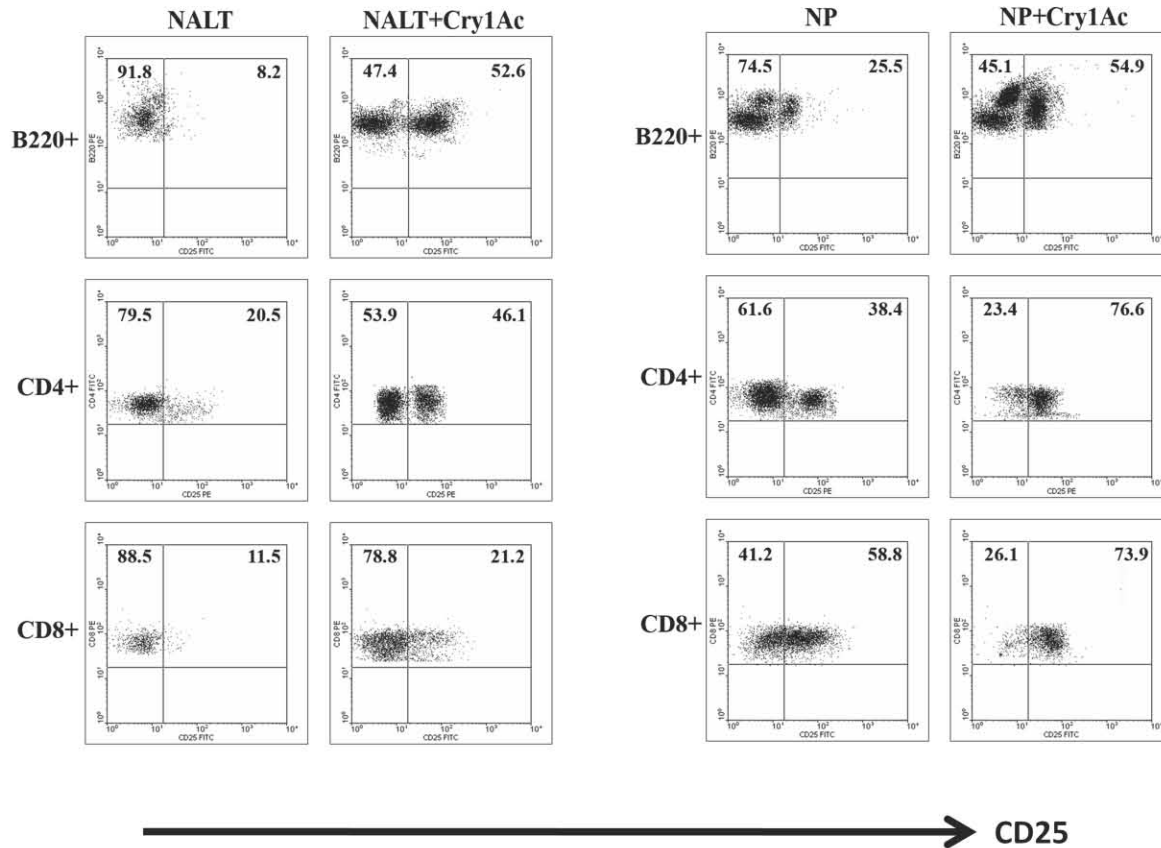


Fig. 3.3. Porcentaje de expresión del marcador de activación CD25 en las poblaciones de linfocitos del NALT y NP. Los linfocitos se aislaron de ratones BALB/c normales e inmunizados con Cry1Ac. 1×10^6 células se tiñeron con mAbs con fluorocromos y se analizaron por citometría de flujo. Las gráficas son representativas de 5 experimentos independientes y los valores representan la media de los porcentajes.

CD69

Es importante mencionar que tanto en el NALT como en los NP del grupo inmunizado con Cry1Ac se presentaron incrementos significativos en la expresión de CD69. En el NALT las células B220+ del grupo control, registraron los porcentajes más bajos de expresión de CD69 ($2.3 \% \pm 0.94$) pero después de la inmunización, la expresión de CD69 aumentó a $29.2 \% \pm 5.27$ (Fig. 3.4 y 3.5, Tabla 3.4). De forma muy similar, se registró el aumento de células B220+ CD69+ en NP de ratones inmunizados ($40.6 \% \pm 2.61$) con respecto al grupo control (12.9

% \pm 3.14) (Fig. 3.4 y 3.5, Tabla 3.4). Las células T CD4⁺ del NALT, en ambos grupos, si bien es cierto que tienen un alto porcentaje de expresión, no se registraron cambios significativos con o sin inmunización (29.8 % \pm 3.11 contra 28.6 % \pm 2.9 respectivamente) (Fig. 3.4 y 3.5, Tabla 3.4). Algo muy parecido ocurrió con los linfocitos T CD8⁺. En lo que respecta a los NP, Cry1Ac aumentó la expresión de CD69 tanto en células B220⁺ como T CD4⁺, para las células B, aumentan de 12.9 % \pm 3.14 (control) a 40.6 5 \pm 2.61 (inmunizado) y en T CD4⁺ el aumento va de 38.3 % \pm 3.31 en ratones normales a 56.2 % \pm 4.23 en el grupo experimental (Fig. 3.4 y 3.5, Tabla 3.4).

Tabla 3.4. Porcentaje de expresión de CD69 en las diferentes poblaciones de linfocitos del NALT y NP en ratones control e inmunizados con Cry1Ac.

	NALT		NP	
	<i>control</i>	<i>Cry1Ac i.n.</i>	<i>control</i>	<i>Cry1Ac i.n.</i>
<i>B220</i>⁺	2.3 \pm 0.94	29.2 \pm 5.27 *	12.9 \pm 3.14	40.6 \pm 2.61 *
<i>CD4</i>⁺	29.8 \pm 3.11	28.6 \pm 2.9	38.3 \pm 3.31	56.2 \pm 4.23 *
<i>CD8</i>⁺	17.1 \pm 2.67	13.5 \pm 3.71	64.4 \pm 0.96	63.2 \pm 5.38

Tabla 3.4. Los linfocitos aislados del NALT y NP de ratones normales e inmunizados se tiñeron con mAbs conjugados con fluorocromos y se analizaron por citometría de flujo. Los datos representan la media de los porcentajes de expresión \pm la desviación estándar de 5 experimentos independientes usando un conjunto de células de 7 ratones. § indica los grupos con diferencias significativas ($p < 0.05$) del porcentaje de expresión de CD69 entre las diferentes poblaciones de linfocitos del NALT del grupo control e inmunizado. * indica los grupos con diferencias significativas ($p < 0.05$) del porcentaje de expresión de CD69 entre las diferentes poblaciones de linfocitos de los NP del grupo control e inmunizado.

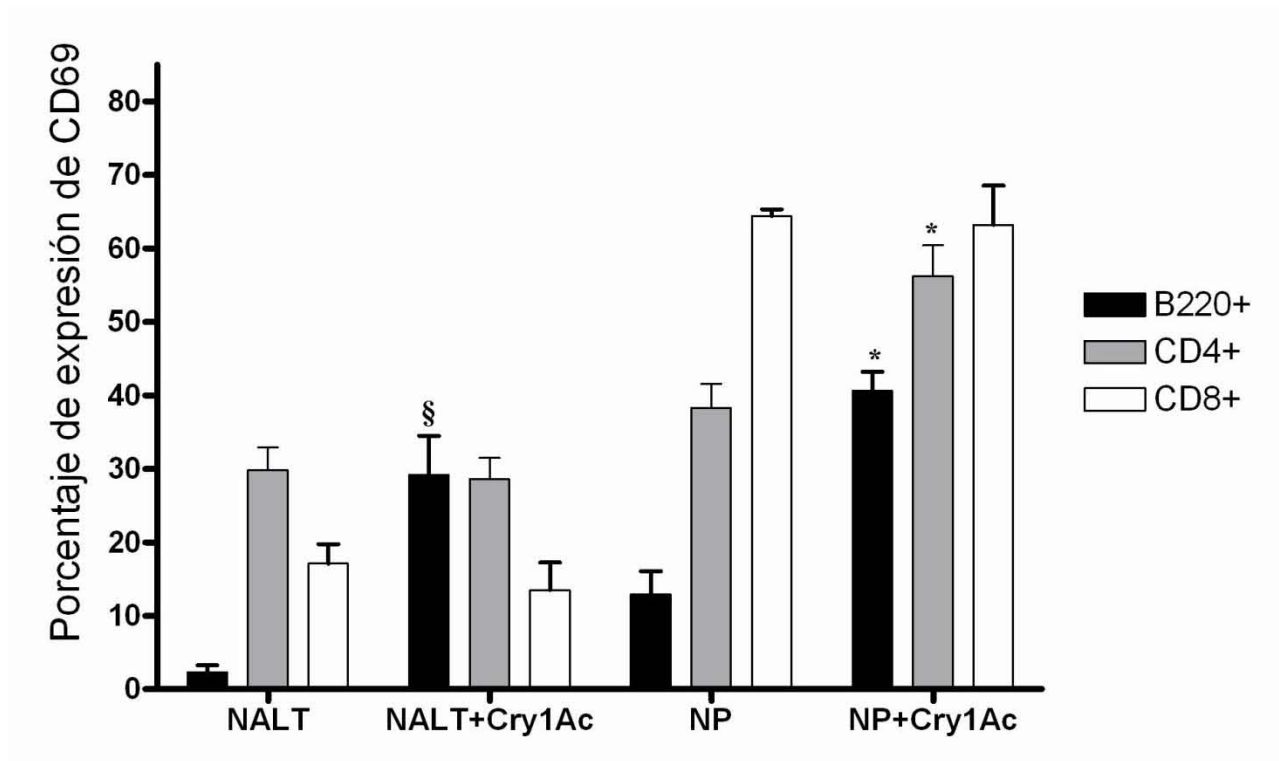


Fig. 3.4. Porcentaje de expresión del marcador de activación CD69 en las poblaciones de linfocitos del NALT y NP. Los linfocitos se aislaron de ratones BALB/c normales e inmunizados con Cry1Ac. 1×10^6 células se tiñeron con mAbs con fluorocromos y analizados por citometría de flujo. Los valores representan la media de los porcentajes \pm la desviación estándar de 5 experimentos independientes. § indica los grupos con diferencias significativas ($p < 0.05$) del porcentaje de expresión de CD69 entre las diferentes poblaciones de linfocitos del NALT del grupo control e inmunizado. * indica los grupos con diferencias significativas ($p < 0.05$) del porcentaje de expresión de CD69 entre las diferentes poblaciones de linfocitos de los NP del grupo control e inmunizado.

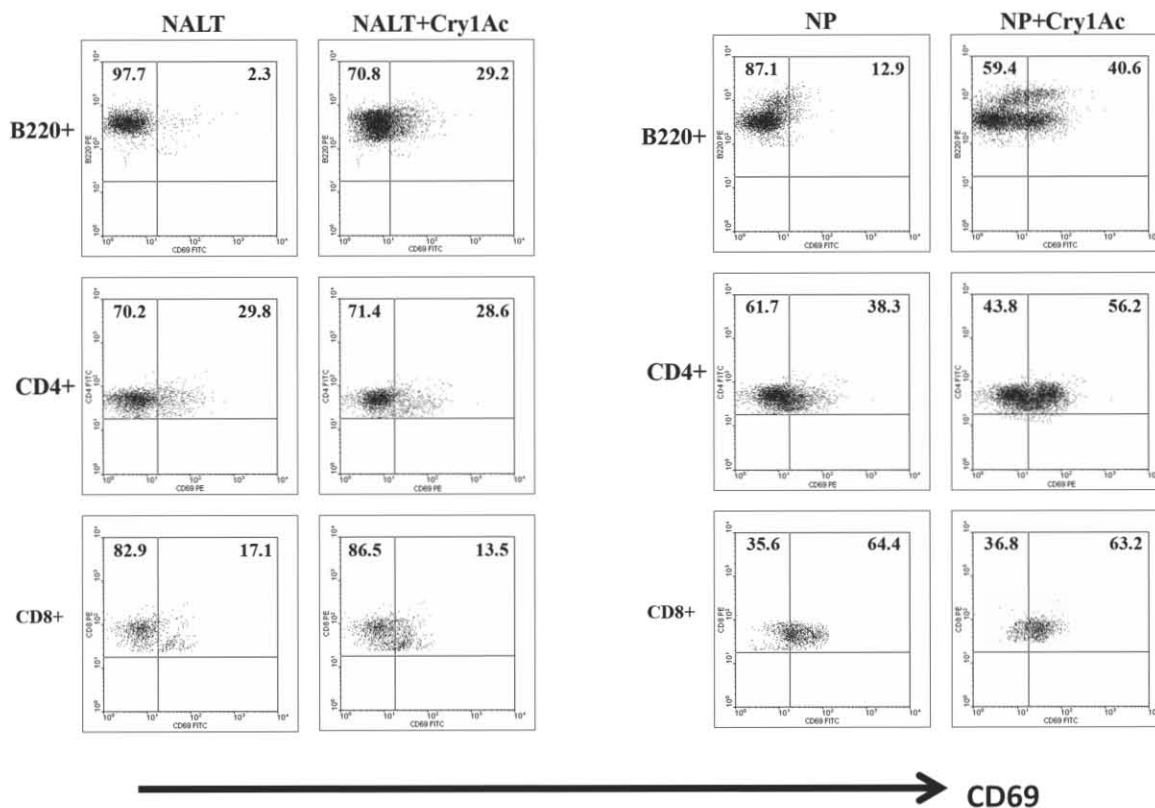


Fig. 3.5. Porcentaje de expresión del marcador de activación CD69 en las poblaciones de linfocitos del NALT y NP. Los linfocitos se aislaron de ratones BALB/c normales e inmunizados con Cry1Ac. 1×10^6 células se tiñeron con mAbs con fluorocromos y analizados por citometría de flujo. Las gráficas son representativas de 5 experimentos independientes y los valores representan la media de los porcentajes.

Cry1Ac aumenta la proporción de linfocitos T productores de citocinas en el NALT y NP.

En un estudio previo (37) se observó que de forma espontánea, se producían principalmente IL-4, IL-5, IL-10 y también aunque en menor proporción IL-2, IFN- γ , y TNF- α en el NALT y NP. Al inmunizar con Cry1Ac se observaron células T productoras de citocinas en ambos tejidos, siendo mayor la proporción de células T que producen IL-4 ($27.4 \% \pm 3.85$), IL-5 ($19.1 \% \pm 4.1$) e IL-10 ($16.3 \% \pm 3.26$) en los NP que en el NALT, donde se registró $18.1 \% \pm 3.13$ para IL-4, $13.6 \% \pm 2.27$

para IL-5 y $10.9 \% \pm 2.61$ para IL-10 (Fig. 3.4), dichos cambios son significativamente diferentes y refuerzan la idea de que los NP actúan predominantemente como un sitio efector. En lo que respecta a las otras citocinas reportadas (37), se observó que en el NALT la IL-2, IFN- γ y TNF- α , a pesar de presentar porcentajes muy bajos, éstos aumentaron al inmunizar con Cry1Ac, aunque estas diferencias no fueron significativas en lo que se refiere al NALT, mientras que en NP los pequeños aumentos que se registraron en los ratones inmunizados fueron significativamente diferentes con respecto al NP control, con excepción de TNF- α .

Como puede observarse, tanto espontáneamente como por efecto de la inmunización, se registra tanto en el NALT como en NP un perfil de citocinas tipo Th2. Las células productoras de IL-4, representó la población con mayor porcentaje en el NALT ($9.8 \% \pm 1.54$) y NP ($14.5 \% \pm 0.93$) del grupo control como del inmunizado ($18.1 \% \pm 3.13$ en el NALT y $27.4 \% \pm 3.85$ en NP) (Fig. 3.6). La segunda población con mayor porcentaje en el grupo control, fueron las células T productoras de IL-10, tanto en el NALT como en NP (4.95 ± 1.8 y $12.9 \% \pm 1.54$ respectivamente), mientras que en el grupo experimental la población de células T productoras de IL-5, fueron la segunda población con mayor porcentaje (NALT, 13.65 ± 2.27 y en NP, $19.1 \% \pm 4.1$). Aunque los porcentajes de células T que producen IL-2 e IFN- γ representan los valores más bajos en los dos grupos y en ambos tejidos, estos datos sugieren que al menos un número pequeño de células T, producen citocinas Th1 tanto espontáneamente como por efecto de Cry1Ac.

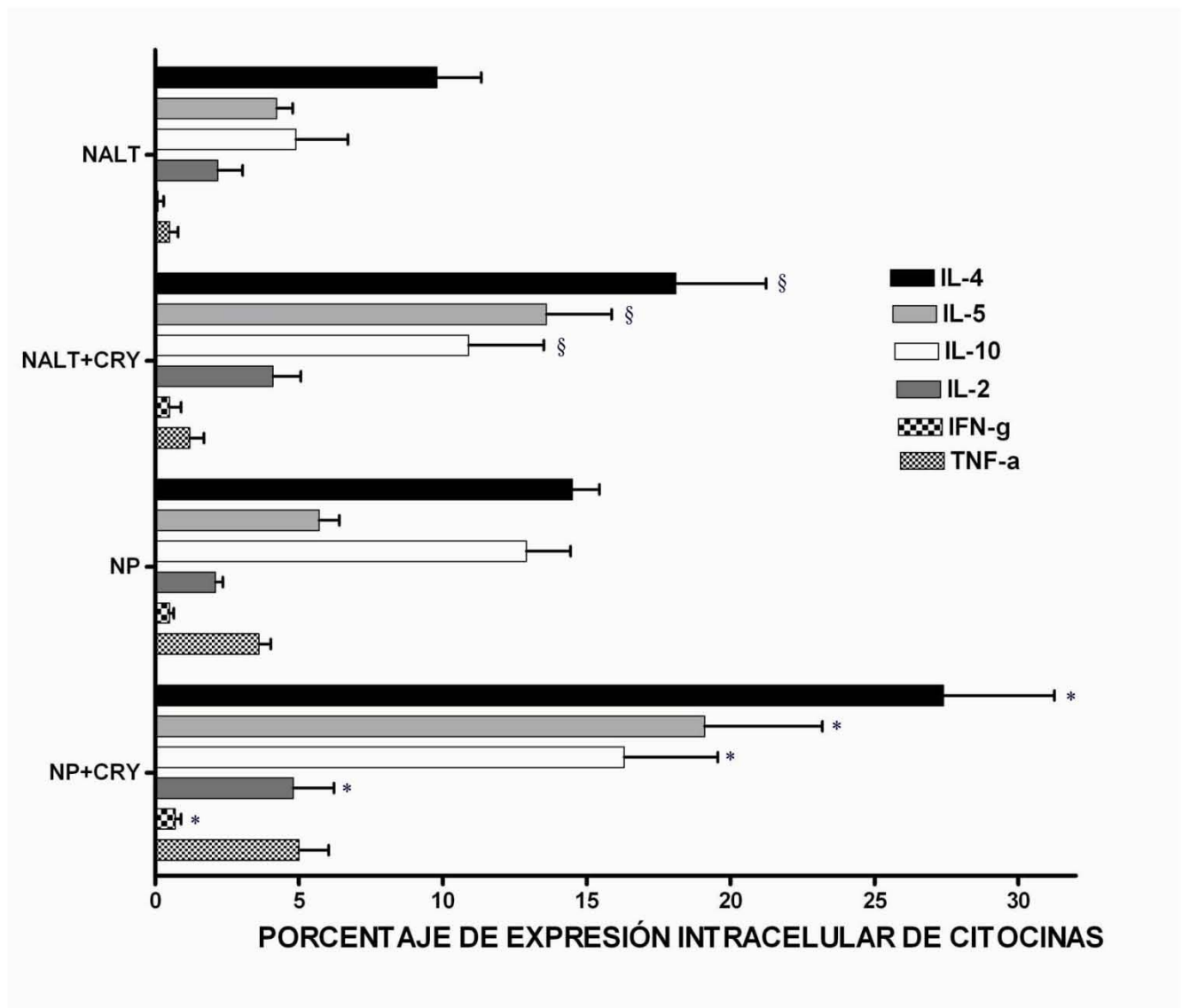


Fig. 3.6. Porcentaje de células T CD3+ productoras de citocinas en el NALT y NP de ratones BALB/c normales e inmunizados intranasalmente con Cry1Ac. Los linfocitos aislados del NALT y NP se cultivaron con brefeldina-A (10 mg/ml) por 3 horas y teñidos con mAb anti-CD3. La expresión intracelular de citocinas se observó al realizar la tinción con mAb conjugados a fluorocromos, a células fijadas y permeabilizadas. Las células se aislaron por citometría de flujo, los datos representan la media de los porcentajes \pm la desviación estándar de 5 experimentos independientes (usando un conjunto de células de 7 ratones por cada tejido). § indica las diferencias significativas ($p < 0.05$) en los porcentajes de células CD3+ productoras de citocinas entre el NALT del grupo control y el inmunizado. * indica las diferencias significativas ($p < 0.05$) en los porcentajes de células CD3+ productoras de citocinas entre los NP del grupo control y el inmunizado.

Discusión.

El sistema inmune de mucosas puede dividirse en compartimentos inductores y efectores. El NALT es una región típicamente inductora y los pasajes nasales son considerados como sitios efectores. Sin embargo, el efecto de la inmunización intranasal sobre el fenotipo y las funciones de las diferentes subpoblaciones celulares que residen en estos compartimentos nasales, aún no están bien caracterizadas sobre todo ante estímulos inmunogénicos como la inmunización intranasal con Cry1Ac (29-31, 34, 35, 45).

En este estudio, la inmunización intranasal con 50µg de Cry1Ac, dió como resultado cambios en los fenotipos y funcionalidad de las poblaciones de linfocitos tanto del NALT como de NP. Cuando se comparan los porcentajes de poblaciones de estos compartimentos nasales, de los grupos control e inmunizado, Cry1Ac induce respuestas específicas de células B IgA⁺ e IgG⁺ en ambos tejidos, aunque los porcentajes son menores en el NALT que en NP ($p < 0.05$). Las respuestas de células formadoras de anticuerpos (AFC) anti Cry1Ac -IgA fueron las más abundantes y no se detectaron AFC-IgM, estos resultados coinciden con los reportados al estudiar la respuesta ante la inmunización con CT (46, 47). Incluso en otros estudios, se ha demostrado que la respuesta IgA específica ante una infección viral, está perfectamente correlacionada con la presencia de anticuerpos IgA, los cuales están directamente relacionados con la respuesta de la mucosa nasal en ratones infectados con el virus de la influenza (39, 48). Un dato relevante es la presencia de las células IgG⁺, que a pesar que se detectaron cantidades menores que las IgA⁺, en otros estudios o no se han reportado o simplemente no se han estudiado. Estos resultados sugieren que el NALT y NP por la inmunización intranasal de Cry1Ac, son estimulados por la protoxina dando una alta respuesta de AFC-IgA y también de AFC-IgG para proporcionar en primer instancia una gran

cantidad de anticuerpos, los cuales podrían estar involucrados en la protección de las vías respiratorias altas. El desarrollo de AFC en el NALT y NP así como la producción de diferentes anticuerpos en ratones inmunizados intranasalmente con diferentes proteínas de origen bacteriano, aún no está bien caracterizado y son importantes para comprender cuál es el papel que juegan estos compartimentos nasales en la diferenciación de las células B.

Por otra parte, en este estudio se demuestra la propiedad de Cry1Ac de aumentar una respuesta inmune cuando es aplicada intranasalmente. El incremento de AFC-IgA e IgG específicas, así como la activación y producción de citocinas en linfocitos del NALT y NP, son cambios significativos entre el grupo control e inmunizado.

La expresión de citocinas por linfocitos del NALT y NP ya ha sido estudiada en ratones inmunizados con CT (14) y por RT-PCR (40) en ratones no inmunizados, por lo que tomando en cuenta las características inmunogénicas de Cry1Ac, se consideró importante analizar el efecto de la inmunización con la protoxina Cry1Ac en la expresión intracelular de citocinas, por medio de la citometría de flujo.

El aumento significativo ($p < 0.05$) de la expresión intracelular de la producción de citocinas como IL-4, IL-5 e IL-10, así como la baja expresión de IL-2 e IFN- γ , indican una respuesta Th2 dominante. Estos datos son consistentes con trabajos previos donde después de la inmunización intranasal con Cry1Ac coadministrada con extracto amibiano de *Naegleria fowleri*, se da una respuesta mucho mayor de IgG1 que de IgG2 (32). Se ha demostrado que Cry1Ac tiene propiedades inmunogénicas y de adyuvante al igual que CT (29-31, 34, 35) y existen evidencias de que este tipo de proteínas de origen bacteriano aumentan predominantemente esta respuesta Th2 (21, 49-52).

En conclusión, se encontró que la aplicación intranasal de Cry1Ac induce activación de linfocitos de NALT y NP, incrementa la proporción de linfocitos T

que producen citocinas (preferentemente Th2), e induce respuestas específicas de células productoras de anticuerpos IgA e IgG. Estos resultados ayudan a explicar los efectos inmunogénicos y adyuvantes inducidos por la aplicación intranasal con Cry1Ac, que es una proteína con potencial para mejorar las vacunas mucosas. Por otra parte los resultados indican que Cry puede utilizarse como una herramienta para caracterizar la compartimentalización del sistema inmune nasal.

CAPÍTULO IV

EFECTO DE LA INMUNIZACIÓN INTRANASAL CON LA PROTOXINA CRY1AC EN LA EXPRESIÓN DE RECEPTORES DE *HOMING* Y MOLÉCULAS DE ADHESIÓN DEL NALT Y NP.

Introducción.

Se sabe que la inmunización intranasal es una ruta efectiva para estimular la inmunidad de mucosas hacia una variedad de patógenos (12, 38, 39) y proteínas solubles incluyendo la toxina de cólera (8, 40). Esta ruta de inmunización induce respuestas inmunológicas favorables no sólo a nivel local sino también en sitios mucosos distantes. En particular la inmunización intranasal proporciona inmunidad en el tracto genito-urinario (8, 41-43).

Las estrategias recientes de vacunación a nivel de mucosas, se han enfocado en el hecho de que la inmunización intranasal, desencadena una respuesta inmune a través del sistema inmune de mucosas (42). Esta ruta de inmunización es atractiva debido a su fácil administración y a la posibilidad de inducir inmunidad tanto en vías respiratorias altas como en sitios distales como el tracto urogenital, sin embargo, a pesar de que se ha probado satisfactoriamente que la inmunización intranasal es un método altamente efectivo, incluso para proporcionar inmunidad en sitios distantes, aún no se sabe como la estimulación del NALT guía una respuesta inmune a sitios mucosos distantes.

Estructuralmente el NALT es muy similar a las PP, contienen células M, zonas de organización para células B y T (47). Aunque posiblemente el NALT no debe ser el único sitio que contribuye significativamente a la estimulación de los sitios mucosos efectores de las vías aéreas, su importancia se debe probablemente a su proximidad a la lámina propia nasal, lo que fortalece la idea de que esta estructura única es un tejido importante para estudiar procesos inmunológicos con antígenos introducidos por vía intranasal (6).

Es posible que la habilidad del NALT de inducir una respuesta inmune a sitios mucosos distantes se deba en parte a los ligandos especializados expresados en sus HEV. Estos ligandos o adresinas interactúan con receptores específicos de *homing*,

expresados por linfocitos B y T y permiten el tránsito de los linfocitos, de la sangre hacia el tejido linfoide. Sin embargo, los perfiles de adresinas mostrados por estas HEV no han sido bien identificados, pero se han podido observar algunas de sus características funcionales del *homing* de linfocitos del NALT.

Se ha observado que los linfocitos aislados del NALT de rata, preferentemente regresan al NALT, a los nódulos linfáticos cervicales y a los nódulos linfáticos mesentéricos, en lugar de hacerlo hacia las PP. Esta evidencia sugiere que el perfil de adresinas del NALT debe ser diferente al perfil de las PP (6). El *homing* de los linfocitos a las PP está bien estudiado y se ha observado que la molécula MAdCAM-1 juega un papel importante en el tránsito de células B y T no activadas, hacia las PP. MAdCAM-1 se expresa en las PP, en el nódulo linfoide mesentérico (MLN) y en la LP del intestino. Las células B y T, interactúan con MAdCAM-1 a través del ligando celular $\alpha 4\beta 7$. En algunos tejidos, MAdCAM-1 puede unirse a células que expresan L-selectina a través de la expresión del carbohidrato PNAd (*peripheral nod adressin*) sobre el esqueleto glicoprotéico de MAdCAM-1. En contraste, el tránsito de linfocitos no activados hacia los nódulos linfáticos periféricos (PLN) está mediado por la unión de L-selectina a PNAd expresada en otras glicoproteínas diferentes a MAdCAM-1. De esta manera, parece haber una separación bien definida entre los patrones de circulación mucosos y periféricos de linfocitos, y hasta la fecha no se ha determinado si las HEV del NALT expresan un fenotipo exclusivo, ya sea del tipo mucoso o periférico, o una combinación de ambos (6). Se ha descrito que las HEV del NALT expresan un perfil único de adresinas que no se parece en forma estricta a un fenotipo mucoso o periférico. Todas las HEV del NALT expresan PNAd, ya sea sola o coexpresada con MAdCAM-1. Este perfil difiere considerablemente con las PP. Los linfocitos del NALT también muestran una expresión única del perfil de L-selectina, además, el NALT mostró tanto MAdCAM-1 como VCAM-1 dentro de las áreas de células B.

Estos resultados sugieren que el NALT es un tejido mucoso de características únicas, donde la unión de linfocitos está principalmente mediada por PNAd; y que la expresión de MAdCAM-1 y VCAM-1 puede jugar un papel importante en el reclutamiento y retención de los linfocitos.

Hasta este momento, los receptores de *homing* y adreínas que permiten el tránsito de linfocitos al NALT, no están bien definidos (6). Lo único que se sabe al respecto es que en este tejido, el *homing* de linfocitos está mediado primeramente por PNAd y su interacción con L-selectina (53).

La respuesta inmune depende de un intrincado sistema de moléculas de adhesión para coordinar el *homing* y retención de linfocitos tanto en tejidos linfoides como en los sitios de infección. Sin embargo, con respecto al estudio del *homing* en el NALT, sólo se han realizado estudios en modelos de inmunización con CT y en condiciones normales (grupos controles), y no se ha estudiado la variación de la expresión de estas moléculas inmunógenos no tóxicos como adyuvantes mucosos, como sería el caso de la protoxina Cry1Ac.

En estudios previos, se ha demostrado que Cry1Ac, como toxina o protoxina, que no es tóxica para vertebrados (44), es una proteína muy inmunogénica, capaz de generar respuestas potentes en suero y mucosas, incluso con una sola aplicación (29). La coadministración de Cry1Ac por rutas mucosales con antígenos como albúmina sérica bovina, el antígeno de superficie del virus de hepatitis B y los polisacáridos de neumococo, aumenta la respuesta inmune hacia éstos, a niveles similares a los obtenidos cuando se usó la toxina de cólera como adyuvante (31, 34). Recientemente, (54) se demostró que la inmunización intranasal con pCry1Ac modifica de forma significativa la expresión de CD25 en linfocitos B220+, T CD4+ y T CD8+ tanto en el NALT como en NP. En cuanto a la expresión de de CD69, en el NALT se incrementa aproximadamente 10 veces más en linfocitos B220+. Cry1Ac también incrementa significativamente la expresión de este marcador tanto

en linfocitos B220+ como T CD4+ en NP. En este mismo estudio se demostró que la inmunización intranasal con Cry1Ac permite observar células T productoras de citocinas tanto en el NALT como en NP, siendo mayor la proporción de células que producen IL-4, IL-5 e IL-10 en NP que en el NALT. En lo que respecta a las otras citocinas reportadas en estos tejidos (37), se observó que en el NALT la IL-2, IFN- γ y TNF- α , a pesar de presentar porcentajes muy bajos, éstos aumentaron al inmunizar con Cry1Ac, aunque estas diferencias no fueron significativas en lo que se refiere al NALT, mientras que en NP los pequeños aumentos que se registraron en los ratones inmunizados fueron significativamente diferentes con respecto al NP control, con excepción de TNF- α . Por último, en otros estudios se ha sugerido que los efectos inmunogénicos de la protoxina Cry1Ac, varían dependiendo de la vía y de la dosis administrada (29-31, 34, 35, 45). Tomando en cuenta estos antecedentes, el objetivo principal de este capítulo fue mostrar que la inmunización intranasal con el inmunógeno Cry1Ac modifica de manera diferencial la expresión de receptores de homing en linfocitos T y B tanto del NALT como de NP además de provocar cambios en el patrón de expresión de las moléculas de adhesión del NALT.

Material y métodos.

La obtención de la protoxina Cry1Ac, de las células del NALT y NP, así como la ruta de inmunización, son exactamente igual a los descritos en el capítulo III.

Inmunotinción de la superficie de linfocitos del NALT y NP para determinar la expresión de $\alpha 4\beta 7$, $\alpha 4\beta 1$, $\alpha E\beta 7$, LFA-1 y L-selectina por citometría de flujo.

La tinción de los linfocitos se llevó a cabo con los siguientes anticuerpos anti-ratón (Becton Dickinson Technologies, Gaithersburg, MD) obtenidos de PharMingen (San Diego, CA). Los anticuerpos utilizados en este estudio fueron: anti-CD45R/B220⁺ (PE) (RA3-6B2), anti-CD3⁺ (FITC) (molecular complex 17A2), anti-CD3⁺ (PerCP) (CD3 ϵ chain) (145-2C11), anti-CD4⁺ FITC (L3T4) (6K1.5), y anti-CD8a⁺ PE (Ly-2) (53-6.7); anti-LPAM-1 (integrina $\alpha 4\beta 7$ complex) PE (DATK32); anti-CD62L FITC (L-selectina, LECAM-1, Ly-22) (MEL-14); anti-CD29 FITC (integrin $\beta 1$ chain) (Ha/2); anti-CD11a PE (integrin α_L chain, LFA-1); anti-CD103 FITC (integrin αIEL chain) (2E7).

Tinción inmunohistoquímica de MAdCAM-1, VCAM-1 y PNAd, para su localización dentro del NALT.

El paladar con el NALT se disecó perfectamente e impregnó con Tissue-Teck y se puso en contacto con pentano (Merck) a -70°C para alcanzar la congelación del tejido, para luego hacer cortes transversales de 6 μ m de espesor mediante criostato (Leica CM 1510) y colocar entre 6 y 8 cortes en laminillas silanisadas, se fijaron con acetona por 10 minutos, el siguiente paso fue hidratar con PBS 1x pH 7.4 por 10 minutos, para después colocar las laminillas en PBS 1x mas 0.1% de azida de sodio y 0.3% de peróxido de hidrógeno por 15 minutos, se lavaron tres veces con PBS 1x, se bloqueó con suero bovino de adulto al 10% por 30 minutos, y se incubó posteriormente con los anticuerpos monoclonales biotinilados de rata anti-ratón CD106 (VCAM-1), (PharMingen, San Diego, CA), a una concentración de 1:500,

PNAd (PharMingen, San Diego, CA) 1:500, MAdCAM-1 (PharMingen, San Diego, CA) 1:500 y CD 54 (ICAM-1) (PharMingen, San Diego, CA) 1:500 por una hora y se lavaron con PBS-tween. Se incubaron con estreptoavidina peroxidasa (Zymed Labs Inc., San Francisco, CA), por una hora y se lavó con PBS-tween, para realizar la exposición a la diaminobencidina como sustrato (Pierce –cc48182) por 5 minutos, se lavó nuevamente y se tiñeron los núcleos con hematoxilina para después deshidratar los tejidos con varios pases de alcohol y xilol, finalmente las muestras se protegieron con un cubre-objetos sellando con resina para conservar los cortes.

Resultados.

Modificación del patrón de expresión de moléculas de adhesión en el NALT, mediado por la inmunización intranasal con Cry1Ac.

El tránsito de linfocitos en los tejidos linfoides asociados a mucosas así como en otros órganos linfoides, depende en parte por ligandos especializados que se expresan en las paredes de sus HEV. Estos ligandos o adreínas, interactúan con receptores específicos expresados en la superficie de linfocitos B y T, y permiten el tránsito de estas células del torrente sanguíneo hacia el tejido linfoide. En el presente trabajo, se estudió por inmunohistoquímica, si la expresión de MAdCAM-1, VCAM-1, ICAM-1 y PNAd en cortes del NALT se modificaba por efecto de la inmunización intranasal con Cry1Ac mediante una tinción inmunohistoquímica para revelar la expresión de estas moléculas.

En el NALT del grupo control, se observó que las moléculas de adhesión que presentaron una mayor marca fueron ICAM-1 y PNAd. Aunque la tinción no es uniforme, se pudo apreciar que ICAM-1 se expresa prácticamente en todo el NALT

a través de la red reticular y que la marca es más intensa en las HEV (Fig. 4.1-A, B). Después de la inmunización, se observó que hay un aumento considerable de la expresión de dicha molécula en todo el tejido y predominando de igual forma en las HEV (Fig. 4.1-C, D). MAdCAM-1 en el grupo control tiene una expresión difusa, mientras que en el inmunizado la expresión se da preferentemente hacia la periferia del NALT y no hay expresión en las HEV (Fig. 4.1-E, F), sin embargo, en el grupo inmunizado se hace más localizada la reacción en zonas cercanas a las HEV pero no en éstas (Fig. 4.1-G, H). En lo que se refiere a PNAd, es la molécula que manifiesta cambios más drásticos después de la inmunización intranasal con Cry1Ac, en el grupo control se observó (Fig. 4.1-I, J) que hay una intensa marca en toda la red reticular y preferentemente en las HEV, sin embargo, en el grupo inmunizado hay una reducción casi total de la expresión sobre la red reticular y sólo permanece en las HEV (Fig. 4.1-K, L). Por lo que respecta a VCAM-1, el cambio más interesante que se observó es que en el grupo control no hay expresión en las HEV (Fig. 1-M, N) mientras que en el NALT del grupo inmunizado es evidente la marca en las HEV (Fig. 4.1-O, P)

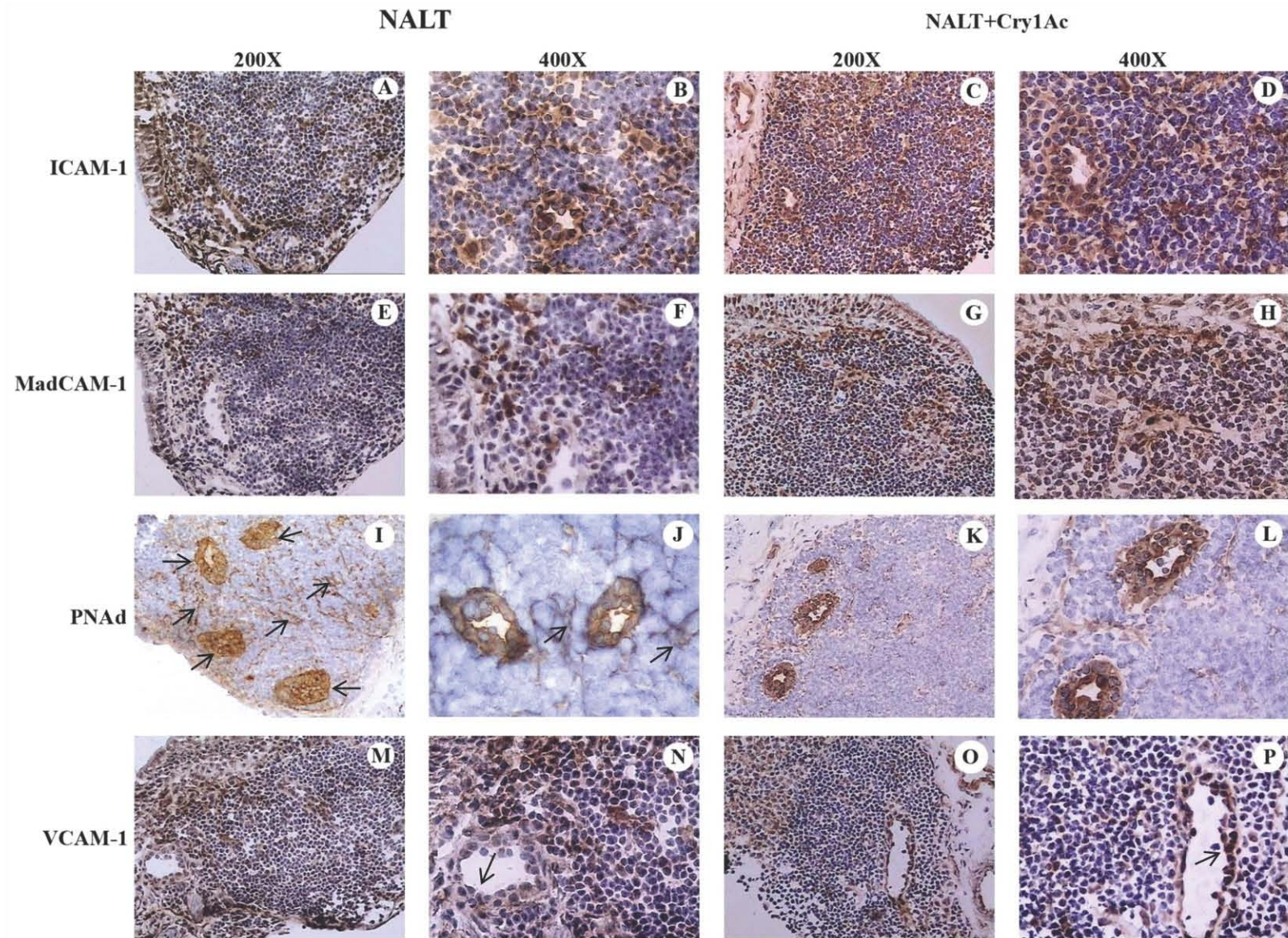


Fig. 4.1. Detección inmunohistoquímica de la expresión de las moléculas de adhesión en cortes congelados de 6µm de espesor del NALT de ratones BALB/c de los grupos control e inmunizado con Cry1Ac. La detección se realizó usando mAb anti-ICAM-1, MAdCAM-1, PNAd y VCAM-1 biotinilados. Las imágenes son cortes representativos de 5 experimentos independientes.

Efecto de la inmunización intranasal con Cry1Ac en la expresión de receptores de homing en linfocitos T y B del NALT y NP.

Considerando los resultados anteriores, donde se apreció la expresión de las moléculas de adhesión como ICAM-1, PNA_d, MAdCAM-1 y VCAM-1, se decidió estudiar la expresión de las integrinas $\alpha 4\beta 7$, $\alpha 4\beta 1$, $\alpha 4\beta 7$ and LFA-1 además de L-selectina, para caracterizar el perfil de receptores específicos de *homing* en la superficie de las células B y T del NALT y NP en ratones control e inmunizados con Cry1Ac.

L-selectina. En el NALT del grupo control, tanto en linfocitos T como B, existe un porcentaje alto de expresión de esta lectina ($41.2 \% \pm 2.3$ y $42.1 \% \pm 1.5$ respectivamente). Sin embargo, al inmunizar con Cry1Ac, se observó una reducción de la expresión de L-selectina muy drástica en las células T ($3.4 \% \pm 1.2$) y aunque más moderada, también hay reducción de la expresión en las células B ($30.4 \% \pm 3.2$) (Tabla 4.1 Fig. 4.2). En contraste, en los NP la inmunización intranasal con Cry1Ac provocó un incremento en la proporción de linfocitos T y B L-selectina +. La proporción de linfocitos T que expresan L-selectina en NP se incrementó de 39.7% a 58.8% mientras que la proporción de linfocitos B L-selectina + se incrementó de 26.6% a 38.2% (Tabla 4.1 Fig. 4.2).

Tabla 4.1. Perfil de los receptores de *homing* en linfocitos T y B del NALT y NP de ratones BALB/c control e inmunizados con Cry1Ac.

CD3+ (%)				
	<i>NALT</i>	<i>NALT+Cry1Ac</i>	<i>NP</i>	<i>NP+Cry1Ac</i>
<i>L-selectina</i>	41.2 ± 2.3	3.4 ± 1.2 §	39.7 ± 3.4	58.8 ± 3.9 *
<i>α4β1</i>	24.9 ± 2.8	8.1 ± 2.5 §	51.5 ± 4.2	62.9 ± 4.6 *
<i>LFA-1</i>	42.0 ± 3.9	33.0 ± 2.9 §	31.4 ± 2.3	40.4 ± 3.5 *
<i>α4β7</i>	0.6 ± 0.4	1.3 ± 0.7	2.5 ± 1.2	2.8 ± 0.9

B220+ (%)				
	<i>NALT</i>	<i>NALT+Cry1Ac</i>	<i>NP</i>	<i>NP+Cry1Ac</i>
<i>L-selectina</i>	42.1 ± 1.5	30.4 ± 3.2 §	26.6 ± 3.1	38.2 ± 2.5 *
<i>α4β1</i>	32.2 ± 2.3	7.2 ± 2.7 §	55.4 ± 2.9	66.6 ± 4.4 *
<i>LFA-1</i>	51.9 ± 3.4	34.6 ± 2.9 §	38.6 ± 2.5	53.2 ± 3.7 *
<i>α4β7</i>	1.4 ± 0.6	1.6 ± 0.7	3.5 ± 1.1	3.1 ± 0.9

Tabla 4.1. Los linfocitos aislados del NALT y NP de ratones normales e inmunizados se tiñeron con mAbs conjugados con fluorocromos y analizados por citometría de flujo. Los datos representan la media de los porcentajes de expresión ± la desviación estándar de 5 experimentos independientes usando un conjunto de células de 7 ratones. § indica los grupos con diferencias significativas ($p < 0.05$) del porcentaje de expresión de las diferentes integrinas y L-selectina entre las diferentes poblaciones de linfocitos del NALT del grupo control e inmunizado. * indica los grupos con diferencias significativas ($p < 0.05$) del porcentaje de expresión de las diferentes integrinas y L-selectina entre las diferentes poblaciones de linfocitos de los NP del grupo control e inmunizado.

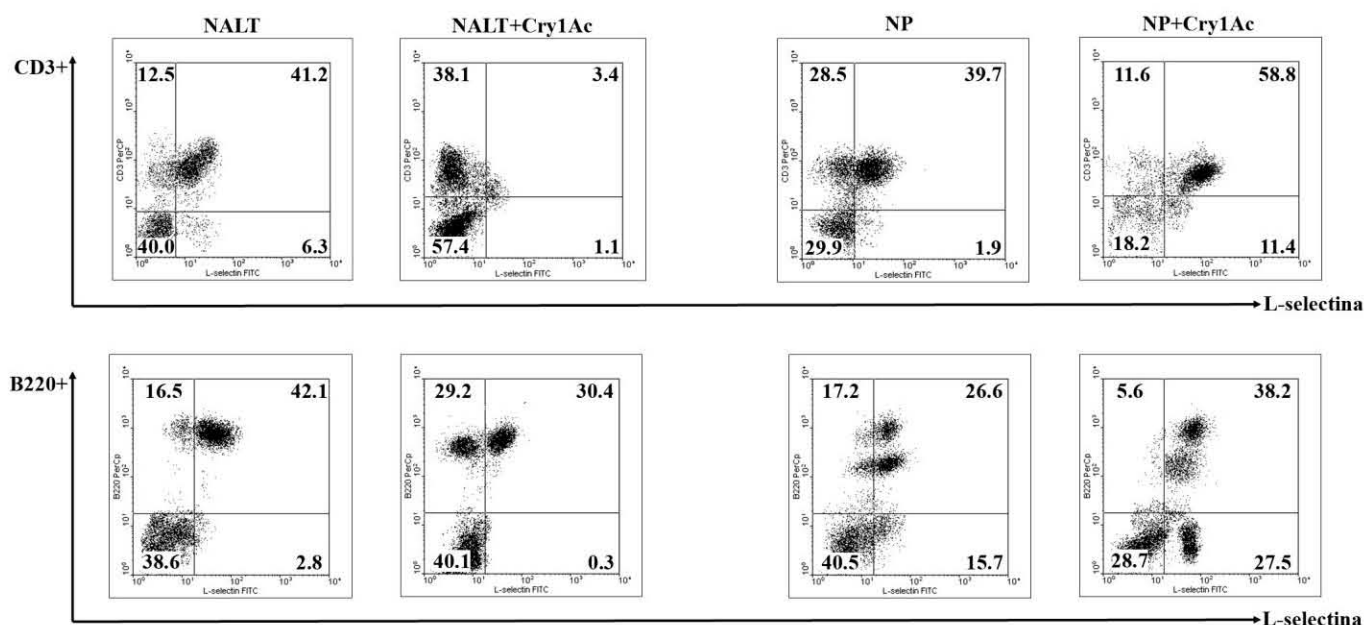


Fig. 4.2. Porcentaje de expresión de L-selectina en las poblaciones de linfocitos del NALT y NP. Los linfocitos de ambos tejidos nasales fueron aislados de ratones BALB/c normales e inmunizados con Cry1Ac. 1×10^6 células fueron teñidas con mAbs con fluorocromos y analizados por citometría de flujo. Los dotplots son representativos de 5 experimentos independientes y los valores representan la media de los porcentajes.

$\alpha 4\beta 1$. La inmunización intranasal con Cry1Ac modificó de manera diferencial las proporciones de linfocitos T y B que expresan $\alpha 4\beta 1$ en el NALT y NP. Ya que en el NALT disminuyeron y en NP se incrementaron. El porcentaje de expresión de $\alpha 4\beta 1$ en células T, disminuyó de $24.9 \% \pm 2.8$ (control) a $8.1 \% \pm 2.5$ (inmunizado). En los linfocitos B de este tejido nasal, la expresión también disminuye de forma significativa después de la inmunización (de $32.2 \% \pm 2.3$ en el grupo control a $7.2 \% \pm 2.7$ en el inmunizado) (Tabla 4.1 Fig. 4.2). En contraste, en linfocitos de NP, se observó que en los grupos control, existe un alto porcentaje de expresión de esta integrina tanto en células T como B (más de 50%) y que dicho porcentaje aumenta significativamente en ambas subpoblaciones de manera similar a más de 62% (Tabla 4.1 Fig. 4.3).

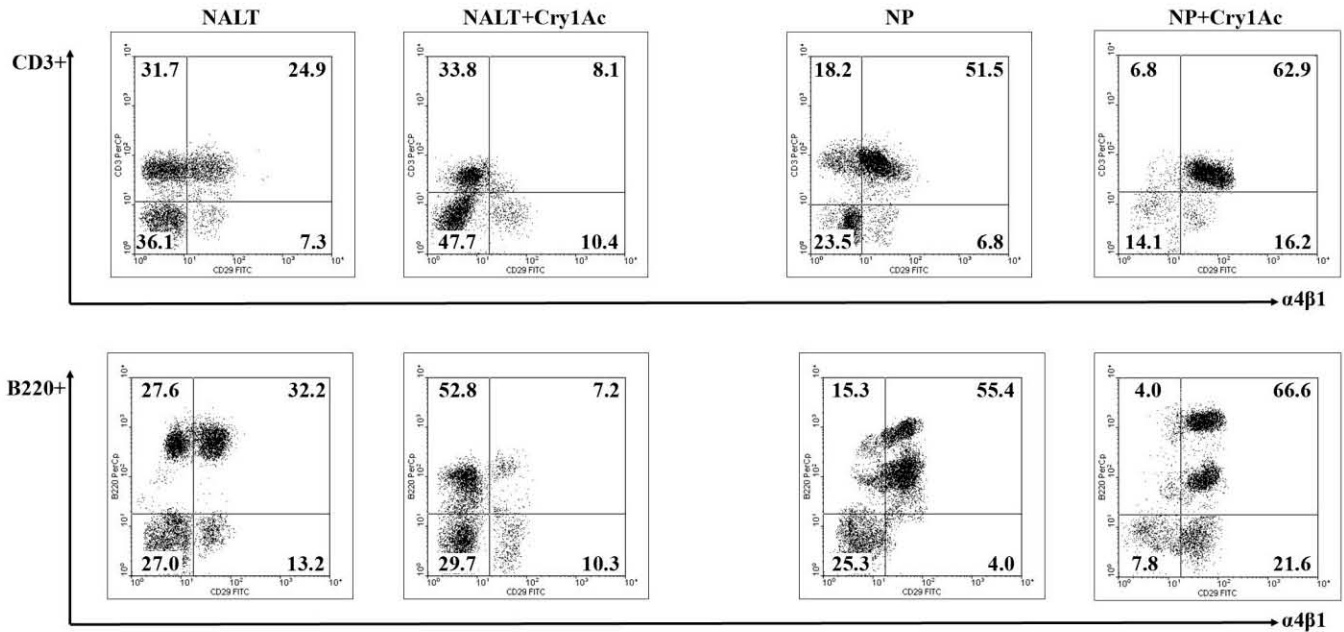


Fig. 4.3. $\alpha 4\beta 1$ expresada en la superficie de linfocitos B y T del NALT y NP. Los linfocitos de ambos tejidos nasales fueron aislados de ratones BALB/c normales e inmunizados con Cry1Ac. 1×10^6 células fueron teñidas con mAbs con fluorocromos y analizados por citometría de flujo. Los dotplots son representativos de 5 experimentos independientes y los valores representan la media de los porcentajes.

LFA-1. En el NALT la expresión de LFA-1 también se modificó en linfocitos T y B del NALT y NP por efecto de la inmunización con Cry1Ac. La expresión de esta molécula en linfocitos T del grupo control, disminuye al inmunizar con Cry1Ac (de $42.0 \% \pm 3.9$ a $33.0 \% \pm 2.9$ respectivamente), mientras que en las células B también se observó una disminución significativa en ambos grupos ($51.9 \% \pm 3.4$ del grupo control contra $34.6 \% \pm 2.9$ del inmunizado) (Tabla 4.1, Fig. 4.4). En los NP se incrementó la expresión de LFA-1 tanto en linfocitos B como T por efecto de la inmunización. El porcentaje de linfocitos T LFA-1+ se incrementó del 31 al 40 % mientras que en linfocitos B se incrementó de 38 a 52 % (Tabla 4.1 Fig. 4.4).

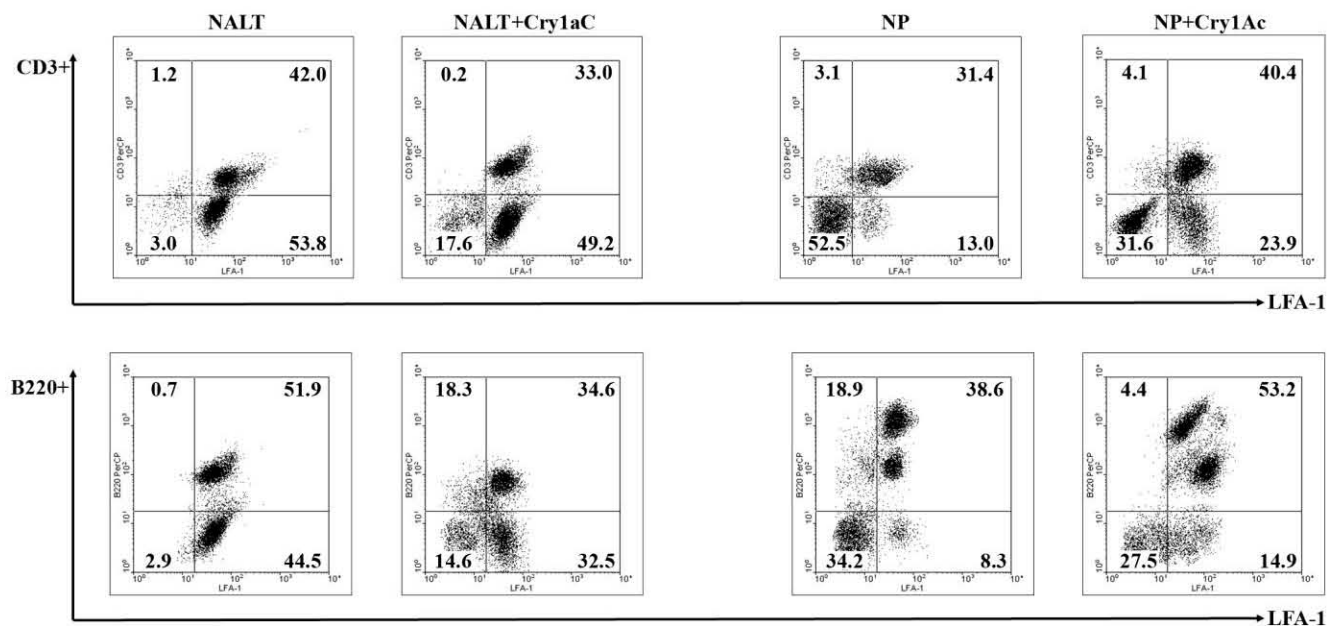


Fig. 4.4. Porcentaje de expresión de LFA-1 en las poblaciones de linfocitos del NALT y NP. Los linfocitos de ambos tejidos nasales fueron aislados de ratones BALB/c normales e inmunizados con Cry1Ac. 1×10^6 células fueron teñidas con mAbs con fluorocromos y analizados por citometría de flujo. Los dotplots son representativos de 5 experimentos independientes y los valores representan la media de los porcentajes.

$\alpha 4\beta 7$. Los porcentajes de linfocitos T y B que expresan $\alpha 4\beta 7$ fueron bajos en el NALT y NP y no se observaron cambios significativos al inmunizar con Cry1Ac (Tabla 4.1)

Discusión.

El principal hallazgo de este trabajo fue el mostrar que la inmunización intranasal con el inmunógeno Cry1Ac, modifica de manera diferencial la expresión de receptores de *homing* en linfocitos T y B en el NALT y NP, además de provocar cambios en el patrón de expresión de moléculas de adhesión en el NALT.

Este hallazgo es relevante debido a que aunque se sabe que el NALT es un importante sitio inductor de la mucosa del tracto respiratorio alto y es importante en el desarrollo de la inmunidad mucosal tanto local como distante, contra antígenos introducidos intranasalmente y que la inmunización intranasal es tal vez la más efectiva para lograr la estimulación de las respuestas en mucosas. Se conoce muy poco sobre los cambios que ocurren por efecto de la inmunización intranasal en los ligandos especializados expresados en las HEV del NALT y sobre los cambios en la expresión de los receptores de *homing*.

Los datos aquí mostrados, demuestran que el perfil de adhesinas expresado en el NALT es considerablemente diferente de lo reportado en otros sitios inductores como PP. Además de corroborar que existe una reacción más intensa de VCAM-1 que de MAdCAM-1 (6), se observó la expresión importante de ICAM-1 y la reducción considerable de la expresión de PNAd al inmunizar con Cry1Ac.

Con respecto a L-selectina, se sabe que regula el *homing* de linfocitos no activados (naive) y de memoria hacia tejidos linfoides secundarios a través de la unión a PNAd (55, 56) y que PNAd se expresa en las HEV de los órganos linfoides secundarios (57). Al observar que con la inmunización con Cry1Ac hay cambios significativos en la expresión de PNAd en el NALT y si se toma en cuenta que la mayoría de los linfocitos no activados expresan L-selectina en su superficie y esto los capacita para transitar a través de muchos sitios linfoides diferentes mediante las interacciones con PNAd, se puede sugerir que estos cambios facilitan el tránsito de linfocitos del NALT a los NP para que rápidamente puedan circular y encontrar el antígeno introducido por la vía intranasal.

Por otra parte, se sabe que la recirculación y *homing* de linfocitos no activados hacia los nódulos linfoides periféricos requiere de L-selectina (58) y LFA-1 (59). Sin embargo, el o los mecanismos del tránsito de linfocitos hacia los pulmones aún no están bien establecidos. En modelos de inflamación pulmonar en ratones, se ha

demostrado que ICAM-1 está implicada en el reclutamiento hacia los pulmones (60), que la integrina $\alpha 4\beta 1$ y su receptor VCAM-1 juegan un papel importante en la migración de linfocitos hacia los pulmones después de un reto intratraqueal con eritrocitos de oveja, los cuales causan una rápida inducción de VCAM-1 endotelial (61, 62). L-selectina y en mayor grado ICAM-1 han mostrado ser importantes en la migración de linfocitos hacia los pulmones durante una respuesta alérgica inflamatoria en modelos de asma (63).

Otra aportación importante, es que los resultados muestran que linfocitos de ratones no inmunizados expresan en su superficie un conjunto de receptores de *homing* (L-selectina, LFA-1, $\alpha 4\beta 1$, $\alpha 4\beta 7$) y que no dependen de un solo par de moléculas como la interacción $\alpha 4\beta 7$ -MAdCAM-1 que regula el *homing* a las PP y sitios mucosos extralinfoideos como la lámina propia (64, 65).

A pesar de no observar porcentajes altos de la expresión de $\alpha 4\beta 7$ -MAdCAM-1, estas moléculas pueden ser importantes en el tránsito de linfocitos de memoria al NALT, ya que algunos de estos linfocitos expresan preferentemente $\alpha 4\beta 7$ y hacen *homing* a sitios donde la expresión de MAdCAM-1 es importante, como ocurre en las PP (66, 67). Algo similar podría explicarse con los resultados de la expresión de VCAM-1 y $\alpha 4\beta 1$, en donde esta interacción es importante para la unión de los linfocitos de memoria en PLN (68, 69).

El hecho de que en el NALT se presenten estas interacciones: L-selectina-PNAd, $\alpha 4\beta 1$ -VCAM-1, LFA-1-ICAM-1 y $\alpha 4\beta 7$ -MAdCAM-1, nos sugiere que juegan un papel funcional muy importante en el reclutamiento de linfocitos en los tejidos nasales y poder entonces proporcionar un modelo de diseminación de células productoras de anticuerpos y linfocitos T a sitios mucosos efectores distantes.

La inmunización de los tejidos mucosos proporciona inmunidad a nivel regional así como en mucosas distantes. Tomando en cuenta esta característica y las propiedades inmunogénicas de Cry1Ac, es importante que se tome en cuenta a esta

protoxina en las estrategias recientes de vacunación enfocadas en la inmunización intranasal como una forma efectiva de estimular sitios tan distantes como el tracto reproductivo.

Estos resultados, sugieren que la inmunización intranasal con Cry1Ac, modifica de manera diferencial la expresión de los receptores de homing en el NALT y NP, principalmente en L-selectina, $\alpha 4\beta 1$ y LFA-1, ya que su expresión disminuyó tanto en linfocitos T como en B después de la inmunización y aumentó en los NP. Cry1Ac modifica la expresión de las moléculas de adhesión en el NALT, disminuyendo considerablemente la red de PNAd e incrementando la expresión de ICAM-1 y también de VCAM-1 en las HEV.

Los datos aquí presentados, apoyan la evidencia de que el NALT presenta un patrón de *homing* de linfocitos único, donde las células T y B activadas en el NALT son capaces de circular a sitios mucosos alternos.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES.

Las conclusiones de este trabajo se pueden dividir en dos apartados, en lo referente al NALT y los NP y por otra parte a los efectos de la inmunización intranasal con Cry1Ac.

1. Se aportaron evidencias novedosas que indican la existencia de diferencias fenotípicas y funcionales respecto a las poblaciones de linfocitos en NALT y NP.
 - Encontramos dos diferencias importantes entre los fenotipos de las superficies celulares de linfocitos del NALT y NP. Una diferencia es que aunque el porcentaje de células B220⁺ fue similar entre los dos compartimentos, existe una característica distintiva en la expresión de B220⁺. Se observaron claramente en NP, dos poblaciones de células B (B220^{hi} y B220^{low}), mientras que el NALT solo contiene células B220^{hi}.
 - La otra diferencia importante es que aunque en ambos tejidos hay mayor cantidad de células B que de células T, el NALT contiene un porcentaje mayor de células T CD3⁺ con respecto a los NP.
 - Tanto el NALT como los NP, contienen una proporción significativa de células doble negativas (DN) que son CD4⁻ CD8⁻ T CD3⁺. Esta población representa aproximadamente el 40% de las células CD3⁺ en ambos tejidos y es más abundante que la proporción de células CD4⁺ y CD8⁺. Consideramos que una parte de estas células DN pueden estar relacionadas con células T regulatorias y por lo tanto jugar un papel importante en la regulación de la respuesta inmune contra antígenos nasales, por otra parte, estas células pueden ser células naive con el potencial para diferenciarse en células Th1 o Th2, dependiendo de la estimulación antigénica.

- Los NP contienen una proporción mayor de células B220+, células T CD4+ y T CD8+ que expresan los marcadores de activación CD25 y CD69 en comparación con el NALT.
 - Existen células T productoras de citocinas en el NALT y NP. La proporción de estas células es mayor en NP que en el NALT.
 - En ambos compartimentos, las células T productoras de citocinas expresan un perfil Th2 y en una proporción menor un perfil Th1.
 - El NALT, además de ser un sitio inductor, también tiene funciones efectoras.
2. La inmunización intranasal con Cry1Ac induce respuestas inmunes en linfocitos de NALT y NP. Induce la activación de linfocitos, induce respuestas de células productoras de anticuerpos e incrementa la proporción de linfocitos T que producen citocinas Th2.
- La aplicación intranasal de Cry1Ac, produce cambios fenotípicos en la superficie de linfocitos tanto del NALT como de NP. El porcentaje de células B220+, T CD4+ y T CD8+ aumentan en NP.
 - Cry1Ac induce una respuesta específica de células productoras de anticuerpos IgA+ e IgG+ en ambos compartimentos. La cantidad de células es menor en el NALT que NP.
 - El efecto de la inmunización intranasal con Cry1Ac con respecto al número de células productoras de anticuerpos es mayor al compararlo con otras moléculas usadas como adyuvantes, como CT y vacunas con partículas del virus de la influenza.
 - Cry1Ac induce *in vivo*, activación de linfocitos del NALT y NP.

- Cry1Ac incrementa la proporción de linfocitos T que producen citocinas, con un perfil predominantemente Th2.
- Cry1Ac administrada intranasalmente, tiene propiedades inmunogénicas y de adyuvante parecidas a CT, con la ventaja de no ser tóxica para vertebrados y sus bajos costos de producción.

REFERENCIAS

1. Czerkinsky C, Russell MW, Lycke N, Lindblad M and Holmgren J. Oral administration of a streptococcal antigen coupled to cholera toxin B subunit evokes strong antibody responses in salivary glands and extramucosal tissues. *Infect Immun* 1989; **57**: 1072-1077.
2. Spit BJ, Hendriksen EG, Bruijntjes JP and Kuper CF. Nasal lymphoid tissue in the rat. *Cell Tissue Res* 1989; **255**: 193-198.
3. Koornstra PJ, de Jong FI, Vlek LF, Marres EH and van Breda Vriesman PJ. The Waldeyer ring equivalent in the rat. A model for analysis of oronasopharyngeal immune responses. *Acta Otolaryngol* 1991; **111**: 591-599.
4. van der Ven I and Sminia T. The development and structure of mouse nasal-associated lymphoid tissue: an immuno- and enzyme-histochemical study. *Reg Immunol* 1993; **5**: 69-75.
5. Kuper CF, Koornstra PJ, Hameleers DM *et al.* The role of nasopharyngeal lymphoid tissue. *Immunol Today* 1992; **13**: 219-224.
6. Csencsits KL, Jutila MA and Pascual DW. Nasal-associated lymphoid tissue: phenotypic and functional evidence for the primary role of peripheral node addressin in naive lymphocyte adhesion to high endothelial venules in a mucosal site. *J Immunol* 1999; **163**: 1382-1389.
7. Asanuma H, Thompson AH, Iwasaki T *et al.* Isolation and characterization of mouse nasal-associated lymphoid tissue. *J Immunol Methods* 1997; **202**: 123-131.
8. Bergquist C, Johansson EL, Lagergard T, Holmgren J and Rudin A. Intranasal vaccination of humans with recombinant cholera toxin B subunit induces systemic and local antibody responses in the upper respiratory tract and the vagina. *Infect Immun* 1997; **65**: 2676-2684.
9. Imaoka K, Miller CJ, Kubota M *et al.* Nasal immunization of nonhuman primates with simian immunodeficiency virus p55gag and cholera toxin adjuvant induces Th1/Th2 help for virus-specific immune responses in reproductive tissues. *J Immunol* 1998; **161**: 5952-5958.
10. Kiyono H and Fukuyama S. NALT- versus Peyer's-patch-mediated mucosal immunity. *Nat Rev Immunol* 2004; **4**: 699-710.
11. Kurono Y, Yamamoto M, Fujihashi K *et al.* Nasal immunization induces *Haemophilus influenzae*-specific Th1 and Th2 responses with mucosal IgA and systemic IgG antibodies for protective immunity. *J Infect Dis* 1999; **180**: 122-132.
12. Langermann S, Palaszynski S, Sadziene A, Stover CK and Koenig S. Systemic and mucosal immunity induced by BCG vector expressing outer-surface protein A of *Borrelia burgdorferi*. *Nature* 1994; **372**: 552-555.

13. Wu HY and Russell MW. Induction of mucosal immunity by intranasal application of a streptococcal surface protein antigen with the cholera toxin B subunit. *Infect Immun* 1993; **61**: 314-322.
14. Yanagita M, Hiroi T, Kitagaki N *et al.* Nasopharyngeal-associated lymphoreticular tissue (NALT) immunity: fimbriae-specific Th1 and Th2 cell-regulated IgA responses for the inhibition of bacterial attachment to epithelial cells and subsequent inflammatory cytokine production. *J Immunol* 1999; **162**: 3559-3565.
15. Zuercher AW. Upper respiratory tract immunity. *Viral Immunol* 2003; **16**: 279-289.
16. Di Tommaso A, Saletti G, Pizza M *et al.* Induction of antigen-specific antibodies in vaginal secretions by using a nontoxic mutant of heat-labile enterotoxin as a mucosal adjuvant. *Infect Immun* 1996; **64**: 974-979.
17. Hirabayashi Y, Kurata H, Funato H *et al.* Comparison of intranasal inoculation of influenza HA vaccine combined with cholera toxin B subunit with oral or parenteral vaccination. *Vaccine* 1990; **8**: 243-248.
18. Muller CP, Beauverger P, Schneider F, Jung G and Brons NH. Cholera toxin B stimulates systemic neutralizing antibodies after intranasal co-immunization with measles virus. *J Gen Virol* 1995; **76 (Pt 6)**: 1371-1380.
19. Wu HY, Nguyen HH and Russell MW. Nasal lymphoid tissue (NALT) as a mucosal immune inductive site. *Scand J Immunol* 1997; **46**: 506-513.
20. Wu HY and Russell MW. Nasal lymphoid tissue, intranasal immunization, and compartmentalization of the common mucosal immune system. *Immunol Res* 1997; **16**: 187-201.
21. Elson CO, Dertzbaugh M.T. In *Mucosal Immunology*, ed. Lamm M, McGhee JR., Mestecky J., Strober W., Bienestock J., San Diego, CA: Academic Press; 1994: 817-838.
22. Elson CO and Ealding W. Cholera toxin feeding did not induce oral tolerance in mice and abrogated oral tolerance to an unrelated protein antigen. *J Immunol* 1984; **133**: 2892-2897.
23. Lycke N, Karlsson U, Sjolander A and Magnusson KE. The adjuvant action of cholera toxin is associated with an increased intestinal permeability for luminal antigens. *Scand J Immunol* 1991; **33**: 691-698.
24. Clements JD, Hartzog NM and Lyon FL. Adjuvant activity of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin and effect on the induction of oral tolerance in mice to unrelated protein antigens. *Vaccine* 1988; **6**: 269-277.
25. Spangler BD. Structure and function of cholera toxin and the related *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. *Microbiol Rev* 1992; **56**: 622-647.

26. Dickinson BL and Clements JD. Dissociation of Escherichia coli heat-labile enterotoxin adjuvanticity from ADP-ribosyltransferase activity. *Infect Immun* 1995; **63**: 1617-1623.
27. Partidos CD, Pizza M, Rappuoli R and Steward MW. The adjuvant effect of a non-toxic mutant of heat-labile enterotoxin of Escherichia coli for the induction of measles virus-specific CTL responses after intranasal co-immunization with a synthetic peptide. *Immunology* 1996; **89**: 483-487.
28. Yamamoto S, Kiyono H, Yamamoto M *et al.* A nontoxic mutant of cholera toxin elicits Th2-type responses for enhanced mucosal immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; **94**: 5267-5272.
29. Moreno-Fierros L, Garcia N, Gutierrez R, Lopez-Revilla R and Vazquez-Padron RI. Intranasal, rectal and intraperitoneal immunization with protoxin Cry1Ac from Bacillus thuringiensis induces compartmentalized serum, intestinal, vaginal and pulmonary immune responses in BALB/c mice. *Microbes Infect* 2000; **2**: 885-890.
30. Moreno-Fierros L, Perez-Ordóñez I and Palomar-Morales M. Slight influence of the estrous cycle stage on the mucosal and systemic specific antibody response induced after vaginal and intraperitoneal immunization with protoxin Cry1Ac from Bacillus thuringiensis in mice. *Life Sci* 2002; **71**: 2667-2680.
31. Moreno-Fierros L, Ruiz-Medina EJ, Esquivel R, Lopez-Revilla R and Pina-Cruz S. Intranasal Cry1Ac protoxin is an effective mucosal and systemic carrier and adjuvant of Streptococcus pneumoniae polysaccharides in mice. *Scand J Immunol* 2003; **57**: 45-55.
32. Rojas-Hernandez S, Rodríguez-Monroy MA, Lopez-Revilla R, Resendiz-Albor AA and Moreno-Fierros L. Intranasal coadministration of the Cry1Ac protoxin with amoebal lysates increases protection against Naegleria fowleri meningoencephalitis. *Infect Immun* 2004; **72**: 4368-4375.
33. Vazquez RI, Moreno-Fierros L, Neri-Bazan L, De La Riva GA and Lopez-Revilla R. Bacillus thuringiensis Cry1Ac protoxin is a potent systemic and mucosal adjuvant. *Scand J Immunol* 1999; **49**: 578-584.
34. Vazquez-Padron RI, Moreno-Fierros L, Neri-Bazan L, de la Riva GA and Lopez-Revilla R. Intra-gastric and intraperitoneal administration of Cry1Ac protoxin from Bacillus thuringiensis induces systemic and mucosal antibody responses in mice. *Life Sci* 1999; **64**: 1897-1912.
35. Vazquez-Padron RI, Moreno-Fierros L, Neri-Bazan L, Martínez-Gil AF, de-la-Riva GA and Lopez-Revilla R. Characterization of the mucosal and systemic immune response induced by Cry1Ac protein from Bacillus thuringiensis HD 73 in mice. *Braz J Med Biol Res* 2000; **33**: 147-155.

36. Hiroi T, Iwatani K, Iijima H, Kodama S, Yanagita M and Kiyono H. Nasal immune system: distinctive Th0 and Th1/Th2 type environments in murine nasal-associated lymphoid tissues and nasal passage, respectively. *Eur J Immunol* 1998; **28**: 3346-3353.
37. Rodriguez-Monroy MA, Rojas-Hernandez S and Moreno-Fierros L. Phenotypic and functional differences between lymphocytes from NALT and nasal passages of mice. *Scand J Immunol* 2007; **65**: 276-288.
38. Gallichan WS and Rosenthal KL. Specific secretory immune responses in the female genital tract following intranasal immunization with a recombinant adenovirus expressing glycoprotein B of herpes simplex virus. *Vaccine* 1995; **13**: 1589-1595.
39. Tamura S, Iwasaki T, Thompson AH *et al.* Antibody-forming cells in the nasal-associated lymphoid tissue during primary influenza virus infection. *J Gen Virol* 1998; **79** (Pt 2): 291-299.
40. Wu HY, Nikolova EB, Beagley KW and Russell MW. Induction of antibody-secreting cells and T-helper and memory cells in murine nasal lymphoid tissue. *Immunology* 1996; **88**: 493-500.
41. Hordnes K, Tynning T, Brown TA, Haneberg B and Jonsson R. Nasal immunization with group B streptococci can induce high levels of specific IgA antibodies in cervicovaginal secretions of mice. *Vaccine* 1997; **15**: 1244-1251.
42. Staats HF, Nichols WG and Palker TJ. Mucosal immunity to HIV-1: systemic and vaginal antibody responses after intranasal immunization with the HIV-1 C4/V3 peptide T1SP10 MN(A). *J Immunol* 1996; **157**: 462-472.
43. VanCott TC, Kaminski RW, Mascola JR *et al.* HIV-1 neutralizing antibodies in the genital and respiratory tracts of mice intranasally immunized with oligomeric gp160. *J Immunol* 1998; **160**: 2000-2012.
44. Travis J and Potempa J. Bacterial proteinases as targets for the development of second-generation antibiotics. *Biochim Biophys Acta* 2000; **1477**: 35-50.
45. Esquivel-Perez R and Moreno-Fierros L. Mucosal and systemic adjuvant effects of cholera toxin and Cry1Ac protoxin on the specific antibody response to HIV-1 C4/V3 peptides are different and depend on the antigen co-administered. *Viral Immunol* 2005; **18**: 695-708.
46. Asanuma H, Aizawa C, Kurata T and Tamura S. IgA antibody-forming cell responses in the nasal-associated lymphoid tissue of mice vaccinated by intranasal, intravenous and/or subcutaneous administration. *Vaccine* 1998; **16**: 1257-1262.
47. Heritage PL, Underdown BJ, Arsenault AL, Snider DP and McDermott MR. Comparison of murine nasal-associated lymphoid tissue and Peyer's patches. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; **156**: 1256-1262.

48. Asanuma H, Koide F, Suzuki Y *et al.* Cross-protection against influenza virus Infection in mice vaccinated by combined nasal/subcutaneous administration. *Vaccine* 1995; **13**: 3-5.
49. Holmgren J, Czerkinsky C, Eriksson K and Mharandi A. Mucosal immunisation and adjuvants: a brief overview of recent advances and challenges. *Vaccine* 2003; **21 Suppl 2**: S89-95.
50. Ryan EJ, Daly LM and Mills KH. Immunomodulators and delivery systems for vaccination by mucosal routes. *Trends Biotechnol* 2001; **19**: 293-304.
51. Xu-Amano J, Jackson RJ, Fujihashi K, Kiyono H, Staats HF and McGhee JR. Helper Th1 and Th2 cell responses following mucosal or systemic immunization with cholera toxin. *Vaccine* 1994; **12**: 903-911.
52. Xu-Amano J, Kiyono H, Jackson RJ *et al.* Helper T cell subsets for immunoglobulin A responses: oral immunization with tetanus toxoid and cholera toxin as adjuvant selectively induces Th2 cells in mucosa associated tissues. *J Exp Med* 1993; **178**: 1309-1320.
53. Csencsits KL, Walters N and Pascual DW. Cutting edge: dichotomy of homing receptor dependence by mucosal effector B cells: alpha(E) versus L-selectin. *J Immunol* 2001; **167**: 2441-2445.
54. Rodriguez-Monroy MA and Moreno-Fierros L. Efecto de la inmunización intranasal con la protoxina Cry1Ac en la expresión de receptores de homing y moléculas de adhesión del NALT y NP. *Artículo en proceso*.
55. Ley K, Bullard DC, Arbones ML *et al.* Sequential contribution of L- and P-selectin to leukocyte rolling in vivo. *J Exp Med* 1995; **181**: 669-675.
56. Sallusto F, Mackay CR and Lanzavecchia A. The role of chemokine receptors in primary, effector, and memory immune responses. *Annu Rev Immunol* 2000; **18**: 593-620.
57. Michie SA, Streeter PR, Bolt PA, Butcher EC and Picker LJ. The human peripheral lymph node vascular addressin. An inducible endothelial antigen involved in lymphocyte homing. *Am J Pathol* 1993; **143**: 1688-1698.
58. Warnock RA, Askari S, Butcher EC and von Andrian UH. Molecular mechanisms of lymphocyte homing to peripheral lymph nodes. *J Exp Med* 1998; **187**: 205-216.
59. Berlin-Rufenach C, Otto F, Mathies M *et al.* Lymphocyte migration in lymphocyte function-associated antigen (LFA)-1-deficient mice. *J Exp Med* 1999; **189**: 1467-1478.
60. Chin JE, Winterrowd GE, Hatfield CA *et al.* Involvement of intercellular adhesion molecule-1 in the antigen-induced infiltration of eosinophils and lymphocytes into the airways in a murine model of pulmonary inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1998; **18**: 158-167.

61. Wolber FM, Curtis JL, Maly P *et al.* Endothelial selectins and alpha4 integrins regulate independent pathways of T lymphocyte recruitment in the pulmonary immune response. *J Immunol* 1998; **161**: 4396-4403.
62. Wolber FM, Curtis JL, Milik AM *et al.* Lymphocyte recruitment and the kinetics of adhesion receptor expression during the pulmonary immune response to particulate antigen. *Am J Pathol* 1997; **151**: 1715-1727.
63. Keramidaris E, Merson TD, Steeber DA, Tedder TF and Tang ML. L-selectin and intercellular adhesion molecule 1 mediate lymphocyte migration to the inflamed airway/lung during an allergic inflammatory response in an animal model of asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2001; **107**: 734-738.
64. Hamann A, Andrew DP, Jablonski-Westrich D, Holzmann B and Butcher EC. Role of alpha 4-integrins in lymphocyte homing to mucosal tissues in vivo. *J Immunol* 1994; **152**: 3282-3293.
65. Rott LS, Briskin MJ, Andrew DP, Berg EL and Butcher EC. A fundamental subdivision of circulating lymphocytes defined by adhesion to mucosal addressin cell adhesion molecule-1. Comparison with vascular cell adhesion molecule-1 and correlation with beta 7 integrins and memory differentiation. *J Immunol* 1996; **156**: 3727-3736.
66. Rott LS, Rose JR, Bass D, Williams MB, Greenberg HB and Butcher EC. Expression of mucosal homing receptor alpha4beta7 by circulating CD4+ cells with memory for intestinal rotavirus. *J Clin Invest* 1997; **100**: 1204-1208.
67. Williams MB and Butcher EC. Homing of naive and memory T lymphocyte subsets to Peyer's patches, lymph nodes, and spleen. *J Immunol* 1997; **159**: 1746-1752.
68. Gorczynski RM, Fu XM, Issekutz T and Cohen Z. Differential regulation of rejection of small intestinal and skin allografts in rats by injection of antibodies to ICAM-1 or the integrins alpha 4, alpha L, or beta 2. *Cell Immunol* 1998; **184**: 74-82.
69. Suraud V, Olivier M, Bodier CC and Guilloteau LA. Differential expression of homing receptors and vascular addressins in tonsils and draining lymph nodes: Effect of Brucella Infection in sheep. *Vet Immunol Immunopathol* 2007; **115**: 239-250.