



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLOGICAS

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA

**“ANALISIS DE LA RESPUESTA IgG INTESTINAL
UTILIZANDO EL MODELO DE INMUNIZACIÓN
INTRAPERITONEAL CON LA PROTOXINA CRY1AC
EN RATÓN”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA

M. en C. Silvia Leticia Verdín Terán

Tutor Principal: Dra. Leticia Moreno Fierros

Comité tutorial:

Dr. Javier Espinosa Aguirre

Dr. Edelmiro Santiago Osorio

México, D.F.

Noviembre, 2010



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

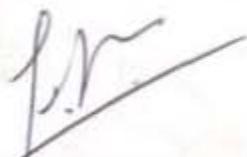
Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 9 de agosto del 2010, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS del (la) alumno (a) **VERDIN TERÁN SILVIA LETICIA** con número de cuenta 073466068 con la tesis titulada "**ANÁLISIS DE LA RESPUESTA IgG INTESTINAL, UTILIZANDO EL MODELO DE INMUNIZACIÓN INTRAPERITONEAL CON LA PROTOXINA CRY 1AC EN RATÓN**", realizada bajo la dirección del (la) **DRA. LETICIA MORENO FIERROS**:

Presidente: DR. JESÚS JAVIER ESPINOSA AGUIRRE
Vocal: DRA. MARÍA ISABEL SOTO CRUZ
Vocal: DR. DIEGO JULIO ARENAS ARANDA
Vocal: DRA. PATRICIA MARGARITA TATO ZALDIVAR
Secretario: DRA. LETICIA MORENO FIERROS
Suplente: DR. LUIS ARTURO BAIZA GUTMAN
Suplente: DR. EDELMIRO SANTIAGO OSORIO

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

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 10 de noviembre de 2010.


Dr. Juan Núñez Farfán
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente del (la) interesado (a)

Agradecimientos

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM

Este trabajo fue realizado en el laboratorio 9 Inmunología en Mucosas de la Unidad de Biomedicina de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM con los siguientes apoyos financieros:

UNAM DGAPA

Beca PASPA (2002-2005)

PAPIIT IN226610 e IN221807,

PAPIME PE203607

CONACyT 43102-M, y 080920

Agradecimientos a Título Personal

Con eterno agradecimiento a la Dra. Leticia Moreno Fierros, por su ejemplo de mujer tenaz, fuerte y triunfadora, por su estímulo y apoyo para cumplir con una gran meta. Misión cumplida.

A los Doctores Jesús Espinosa (con s) Aguirre y Edelmiro Santiago Osorio, porque con sus sugerencias enriquecieron el proyecto de investigación y mi vida académica. También por el tiempo invertido a lo largo de todo mi largo proceso de doctorado.

A los sinodales; Dra. Isabel Soto, Dra. Patricia Tato, Dr. Diego Arenas A., Dr. Arturo Baiza por todas las sugerencias y comentarios que hicieron que el trabajo tomara mejor cariz.

Al Dr. Alonso Vilches, por su importante y eficiente colaboración con el ensayo RT-PCR. A la Q.B.P Blanca Estela Reyes Márquez por su experto apoyo en el citómetro de flujo y a la Dra. Norma Delgado Buenrostro por la captura de las imágenes de microscopía confocal.

A mis compañeros de Laboratorio, quienes de alguna manera influyeron en mi labor académica. Principalmente a Rita Esquivel quien me inició en la difícil tarea del aislamiento de linfocitos intestinales, a Javiero Varona ejemplo de constancia y a Marco Rodríguez siempre apoyándome cuando lo necesité.

Por supuesto: a DIOS

Y finalmente:

Gracias a la vida que me ha dado tanto...again, again, again

Dedicatorias

A mis Padres: con el profundo respeto, admiración y amor que se merecen. Aunque ya no estén físicamente, se que siempre estarán en las buenas, en las malas... siempre.

A los motores de mi vida: Joar y Axel porque desde que están en mi vida han sido el principal estímulo conductor.

A mis Hermanos: Noya, Carlos, Rita y Rafa lo mas cercano a mi...

A Felipe: mi compañero leal, mi gordito divain

A Chivis Fenanda Peyez Mendoza, otro regalote de Dios

A Marco: por contribuir a la mitad del regalote tan bien hecho

Jon: porque desde que estás, si estás

A Luis: por los montones de risas que compartimos

Al buche de amigotes que tengo: por ayudarme a digerir el menú de mi vida

Índice

Índice tablas y figuras.....	6
Resumen Español	7
Resumen Ingles.....	8
Introducción.....	9
Receptores Fc.....	11
pIgR	11
FcRn	12
Receptores mediadores de respuestas efectoras.....	13
Fc gamma RI (CD64)	14
Fc gama RII (CD32)	15
Fc gama RIII (CD16)	16
Fc gama RI.....	17
Antecedentes.....	19
Modelo de inducción de IgG Intestinal	19
Justificación	20
Planteamiento del problema.....	22
Objetivos	22
Material y Métodos.....	24
Producción de pCry1Ac.....	24
Purificación de pCry1Ac	24
Esquema de Inmunización	24
Aislamiento de linfocitos intestinales.....	24
ELISPOT.....	25
Análisis de citometría de flujo.....	25
Inmunohistoquímica.....	25
Microscopia confocal.....	26
ELISA.....	26
Inmunoprecipitación	27
Análisis de RNA mensajero por RT-PCR.....	27
Análisis de transporte de IgG por Transwell.....	28
Análisis estadístico.....	28
Resultados.....	29
Discusión.....	45
Conclusiones.....	51
Bibliografía.....	52

Índice de tablas y figuras

Figura 1. Receptor polimérico para las inmunoglobulinas IgA/IgM.....	11
Figura 2. Tabla de características generales de los Receptores Fc para IgG	18
Figura 3. Niveles de anticuerpos analizados por ELISA.....	29
Figura 4. Cuantificación de IgG.....	30
Figura 5. ELISPOT de linfocitos aislados intestinales.....	31
Tabla 1. Análisis por citometría de linfocitos intestinales.....	32
Figura 6. Análisis de FACS para los linfocitos intestinales.....	32
Figura 7. Detección de IgG por Inmunohistoquímica	33
Figura 8. Análisis por FACS de células epiteliales IgG+.....	34
Figura 9. Detección de la expresión de FcRn por RT-PCR.....	35
Figura 10. Análisis de citometría de células epiteliales FcRn+.....	36
Figura 11. Microscopia confocal del FcRn intestinal.....	37
Figura 12. Inmunodetección de IgG y CD16/32 en lisados intestinales.....	38
Figura 13. Inmunoprecipitación de CD16/32 e IgG epitelial.....	39
Figura 14. Inmunodetección de CD 16 y CD32 en lisado epitelial.....	39
Figura 15. Detección por FACS en células epiteliales de CD16 y CD32.....	40
Figura 16. Microscopia confocal de CD32 en intestinos.....	41
Figura 17. Microscopia confocal de CD16 en intestinos.....	42
Figura 18. Análisis por citometría de la captación de IgG en células epiteliales.....	43
Figura 19. Análisis por Transwell del transporte de IgG en epitelio.....	44

Resumen

Se ha demostrado que la protoxina Cry1Ac de *Bacillus thuringiensis* es un potente inmunógeno sistémico y mucoso con propiedades adyuvantes. La pCry1Ac induce alta producción de IgG en fluidos intestinales cuando es administrada intraperitonealmente en ratón. Por lo que se usó este protocolo como un modelo para determinar si los altos niveles de IgG detectados en la secreción intestinal son producidos localmente, si al inducir IgG intestinal se induce la expresión del receptor FcRn en epitelio intestinal de ratón adulto y si otros receptores para la IgG como el FcRgamma II y el FcRgamma III están presentes en el epitelio intestinal y por lo tanto participar en la captación o en el transporte epitelial de esta inmunoglobulina.

Mediante ELISA, ELISPOT, citometría de flujo, inmunohistoquímica y Microscopia confocal se caracterizó la población de linfocitos B y epiteliales positivas a IgG y los receptores FcRn y FcR gama II y III. Se realizó inmunodetección epitelial de los receptores gama y se realizaron ensayos de captación de la IgG y por análisis transwell en células epiteliales se comprobó el transporte de la IgG por los receptores gama en ratón adulto.

Los resultados del presente trabajo indican que la inmunización intraperitoneal con pCry1Ac produce aumento en la producción local de IgG, de células que la producen, de células epiteliales intestinales que contienen IgG e inducción de la molécula encargada de su transporte, el FcRn, en epitelio intestinal de ratón adulto.

Como también se detectó producción basal de IgG, pero no la presencia del FcRn, se probaron los receptores Fcgamma II y el Fcgamma III como probables moléculas transportadoras, cuya expresión también fue incrementada por la inmunización i.p. con Cry1Ac. Los resultados obtenidos sugieren que los FcRgammaII y Fcgamma RIII también participan en el transporte de IgG en el roedor adulto.

Summary

It has been shown that *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac protoxin is a potent systemic and mucosal immunogen with adjuvant properties. The pCry1Ac induces high production of IgG in intestinal fluids when administered intraperitoneally in mice. As this protocol was used as a model to determine whether high levels of IgG detected in intestinal secretions are produced locally, whether by inducing IgG induces intestinal FcRn receptor expression in adult mouse intestinal epithelium and whether other receptors for IgG as FcRgamma II and FcRgamma III are present in the intestinal epithelium and therefore could participate in the recruitment or the epithelial transport of this immunoglobulin. By ELISA, ELISPOT, flow cytometry, immunohistochemistry and confocal microscopy, we characterized the population of B cells and epithelial cells positive for IgG and FcRn receptors and FcRgammaII and FcRgammaIII. Immunodetection was performed range epithelial receptors and uptake assays were performed for IgG and transwell analysis was found in epithelial cells of the IgG transport receptor-range in adult mice. The results of this study indicate that intraperitoneal immunization with pCry1Ac produces increased local production of IgG, cells that produce intestinal epithelial cells containing IgG and induction of the molecule responsible for transport, the FcRn in intestinal epithelium adult mouse. However, as also detected basal production of IgG, but not the presence of FcRn, were tested Fcgamma receptors II and III as probable transporter molecules, whose expression was also increased by i.p. immunization with Cry1Ac. The results suggest that FcRII and FcRIII and also participate in the transport of IgG in the adult rodent.

Introducción

El sistema inmune de mucosas comprende aquellos elementos linfoides asociados a las superficies internas del cuerpo, principalmente el tracto gastrointestinal, el tracto respiratorio alto y bajo y el tracto urogenital. Además, puede incluir las glándulas exocrinas que están cercanas a estos órganos como las glándulas salivares, lagrimales, mamarias y el páncreas[1].

Este sistema inmune, desarrollado en los mamíferos superiores, constituye la primera línea de defensa del organismo. La superficie más vulnerable y extensa son los 400 m² de mucosa gastrointestinal (200 veces mayor que la superficie cutánea), pero también está la mucosa de las vías aéreas, la urogenital, y la conjuntiva que recubre los ojos. Debido a la extensa área que ocupan, las mucosas están expuestas a una gran diversidad de patógenos, por lo que son la principal vía de entrada de microorganismos, alérgenos, y carcinógenos [2].

El epitelio mucoso constituye la interfase entre los ambientes internos y externos del tracto gastrointestinal. Esta área es el sitio para la digestión y absorción de los nutrientes esenciales, además de que funciona como la primera barrera de defensa contra los agentes infecciosos. Por su importancia, el mecanismo protector en las mucosas es muy eficiente, existen además una serie de agentes y mecanismos no inmunes que participan en la protección, como es la acidez gástrica, el jugo pancreático, la bilis, el mucus y la motilidad intestinal [3].

Los tejidos linfoides asociados con las superficies de mucosas comprenden los compartimientos más grandes del sistema inmune. El intestino es el órgano linfóide de mayor tamaño en el cuerpo por el número de linfocitos y la cantidad de inmunoglobulina que produce.

Durante muchos años se ha considerado que en el organismo, la IgA secretoria (IgAs) constituye más del 80 % de todos los anticuerpos producidos por el Tejido Linfóide Asociado a Mucosas (TLAM). La IgAs no solo está presente en las secreciones externas, sino también ejerce propiedades antimicrobianas en las células epiteliales, brinda una protección inmunológica específica para todas las superficies mucosas, pues bloquea la penetración de agentes patógenos al organismo. La IgA secretoria se produce como resultado de una síntesis local. Entre sus funciones están la de inhibir la adherencia bacteriana y la neutralización de enzimas, virus y toxinas [3].

La IgM en secreciones está asociada al componente secretor, aunque su concentración es menor que la de IgA. También pueden aparecer pequeñas concentraciones de IgE, fundamentalmente en casos en que la permeabilidad del tejido mucoso se vea afectado por reacciones alérgicas. [2]

Por su parte, la concentración de IgG en secreciones puede ser igual, o incluso mayor que para la IgM, además en la orina, fluido seminal y las secreciones del tracto genital, el isotipo dominante es la IgG. Se considera que esta inmunoglobulina entra a las secreciones externas por difusión paracelular independiente de receptores, y transporte transepitelial mediado por un receptor FcRn y endocitosis de fase fluida dependiendo del tejido involucrado [4].

Se considera que la presencia de IgG en las secreciones intestinales es debida a una gran liberación del suero al lumen intestinal vía bilis como la forma normal del catabolismo de la IgG sérica [5]. En pulmones, mucosa nasal, saco gingival y endometrio, es derivada del suero por translocación a través del epitelio debido a una probable irritación local o proceso inflamatorio que produce la liberación de proteínas hacia las superficies mucosas [6].

Sin embargo, estas consideraciones no excluyen la posibilidad de una respuesta inmune adicional, con producción local de IgG independiente del sistema inmune sistémico. En humano se ha detectado la presencia de células productoras de IgG desde un 3% en duodeno-yeyuno hasta un 17% en las glándulas nasales en tejidos con ausencia de inflamación [1].

También se ha detectado la presencia de anticuerpos IgG en secreciones de humanos sanos, y se encontró que existen diferencias en el patrón de especificidad de estos anticuerpos con respecto al de la IgG sérica, lo que sugiere el origen local de la IgG y la existencia de células productoras de este isotipo en mucosas [5].

Existen antecedentes del aumento de IgG intestinal o niveles similares a la IgA como resultado de una respuesta inmune “no convencional” a diferentes antígenos. La inmunización parenteral con rotavirus y con sus partículas virales en ratones, induce la formación de células productoras de IgA e IgG en el intestino delgado y niveles elevados de IgG en heces [7]. La administración parenteral de toxoide tetánico a ratonas Balb/c, produjo un gran aumento en los niveles de IgG en las secreciones, además de la presencia de células productoras de anticuerpos IgG e IgA antitetánico en intestinos delgado y grueso, glándulas salivales y vagina [8].

Está bien descrito el transporte unidireccional de la IgA a través del epitelio intestinal hacia el lumen mediante un receptor polimérico y su relación con la defensa del huésped contra diversos patógenos en las mucosas. La contribución de la IgG del lumen intestinal para la defensa del huésped, así como el mecanismo por el cual la IgG llega a las secreciones lumbales y su función, no son completamente conocidos. Durante el desarrollo fetal, el receptor neonatal Fc (FcRn) es el responsable del transporte de la IgG a través de las barreras epiteliales en placenta e intestino de roedores y humanos para la transferencia pasiva de la inmunidad de la madre al feto o dentro del mismo neonato [9, 10]. En el roedor, el FcRn se expresa en concentraciones elevadas en el epitelio del intestino delgado proximal al estomago durante el periodo neonatal y sus niveles declinan después del destete y no se expresa en el intestino de roedores adultos [11]. Aunque este fenómeno se consideraba como “neonatal” para este receptor en particular, recientemente se ha comprobado que su expresión se continúa a través de la vida adulta en humanos, cerdos, vacas, monos y algunos roedores. [12-15]. De hecho, en humano se expresa en numerosos tipos celulares como el epitelio intestinal, renal y bronquial [10, 13, 15]. Pero el hecho de que el FcRn no se exprese en epitelio intestinal de ratones adultos, sugiere que el transporte de IgG intestinal es mediado por otro receptor Fc gamma.

Receptores Fc

Los receptores del dominio Fc de las inmunoglobulinas tienen un importante papel en la defensa inmune. Existen dos tipos funcionales bien definidos de receptores en mamíferos. Una clase de receptores transporta inmunoglobulinas para cruzar el tejido epitelial como su principal sitio de acción. Esta clase incluye al receptor neonatal Fc (FcRn) el cual transporta la IgG y al receptor polimérico (pIgR) que transporta la inmunoglobulina A (IgA) y a la inmunoglobulina M (IgM). Otra clase de receptores están presentes en la superficie de las células efectoras y disparan varias respuestas biológicas por la unión con complejos de antígeno-anticuerpo. De estos, los mejor caracterizados son los receptores para la IgG (FcγR) y los receptores (FcεR) de unión a la inmunoglobulina E (IgE) [16, 17].

Receptores Fc Transportadores de Inmunoglobulinas

pIgR

Esta molécula es llamada así por su capacidad de transportar moléculas poliméricas de las inmunoglobulinas IgA e IgM. La IgA del suero es producida en forma monomérica, pero aquella que se encuentra en las secreciones es producida localmente en las zonas mucosas y está asociada con la proteína llamada cadena J en forma inicial como dímero. La IgM se encuentra en forma pentamérica o hexamérica, pero únicamente la forma pentamérica está unida a la cadena J. El pIgR transporta las formas dimerica de la IgA y la pentamérica de la IgM. El transporte de la IgA está bien estudiado. La IgA se encuentra en las secreciones epiteliales de la luz intestinal, glándulas salivales y lagrimales, secreciones del tracto respiratorio y en la leche materna, donde su capacidad neutralizante forma la primera línea de defensa contra patógenos. La IgA es sintetizada por las células plasmáticas que se encuentran bajo las membranas basales del epitelio, subsecuente a la síntesis, cruza la barrera epitelial por transcitosis donde se involucra su unión con el receptor pIgR por la zona baso lateral, este complejo es internalizado formando endosomas para ser llevado hacia la zona apical de la célula, (pero también hay transcitosis constitutiva de pIgR libre) donde el receptor es roto y su porción extracelular es liberada a las secreciones como un complejo con la IgA; este complejo llamado IgA secretora es la que protege contra patógenos a los tractos digestivo, respiratorio y genital (Fig.1) [16].

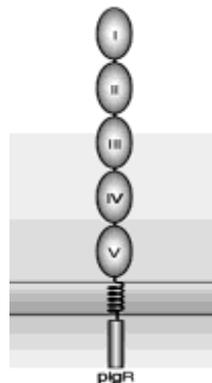


Figura 1. El receptor polimérico para las inmunoglobulinas IgA/IgM es una proteína de membrana tipo I, con una larga región extracelular, compuesta de cinco dominios, una región transmembranal y una región citoplasmática de 103 aminoácidos.

FcRn

El receptor encargado del transporte de la IgG fue descubierto hace ya algún tiempo y se considera que este es el mecanismo por el cual la madre transfiere moléculas de IgG maternas al feto y por el cual los neonatos de mamífero adquieren la inmunidad humoral que depende de los antígenos que la madre tiene. La adquisición pasiva de anticuerpos es importante para el neonato en el tiempo inmediato al nacimiento, cuando su sistema inmune no está totalmente funcional. Inicialmente este receptor fue llamado FcR neonatal (FcRn) porque fue descubierto en la superficie apical del epitelio intestinal de ratas lactantes. La IgG materna se encuentra en la leche materna, se une al receptor Fc y atraviesa el epitelio intestinal, proceso llamado transcitosis, para después ser liberado al torrente sanguíneo por la superficie basolateral del epitelio [18]. También se ha demostrado que el FcRn es expresado en el saco vitelino de ratas y ratones y en la placenta humana y su función es la transferencia de la IgG materna. En ratones y ratas, el FcRn es producido en altas concentraciones por las células epiteliales intestinales de crías lactantes, y es la responsable del transporte de la IgG en la leche materna para atravesar el epitelio y llegar a la circulación en los animales recién nacidos; pero es auto-regulado en el intestino del roedor, se produce en altas concentraciones al nacimiento y sus niveles van disminuyendo dramáticamente dentro del epitelio (aproximadamente 1000 veces) conforme avanza el tiempo de amamantamiento hasta ya no expresarse a los 14 días de edad [11].

El patrón de expresión del FcRn en humano difiere del observado en roedores, pues es expresado en las células epiteliales intestinales desde el neonato hasta el adulto [19]; [20]. Asimismo, se expresa en hepatocitos de humano y rata adulta y se postula que su función puede ser el transporte de complejos antígeno-anticuerpo de la bilis al parénquima hepático. Las células presentadoras del parénquima pueden procesar los antígenos y presentarlos a los linfocitos T que estimulan a los linfocitos B locales para secretar anticuerpos específicos que son transportados de regreso a la bilis- [16]. El FcRn interviene en el transporte bidireccional de la IgG de las superficies basolateral hacia la apical así como a la inversa *in vitro* e *in vivo* [18].

Además, el FcRn es el receptor catabólico que controla el tiempo de vida de la IgG en el suero mediante su “secuestro” en vesículas ácidas intracelulares. Tiene un alto grado de afinidad que asegura el transporte de la IgG no unida, la cual es la forma más usual de IgG en el recién nacido, aunque también se ha reportado el transporte de complejos antígeno-anticuerpo [21].

El FcRn es una glicoproteína de membrana tipo I y es específica para el isotipo IgG, es un heterodímero con una cadena ligera $\beta 2$ microglobulina, la misma cadena que esta asociada con la molécula del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MCH en inglés) tipo I. [19]. La clonación de la cadena pesada del FcRn revela una similitud adicional a las moléculas MHC-I. Las cadenas pesadas de ambas moléculas consisten de 3 dominios extracelulares $\alpha 1$, $\alpha 2$, y $\alpha 3$ seguidas por una región transmembranal y una secuencia citoplasmática corta [22]. Aunque la región extracelular del FcRn y del MHC-I exhiben baja pero significativa similitud en su secuencia (entre 22-30% de identidad para los dominios 1 y 2, y del 35-37% para el dominio 3), las regiones citoplasmáticas y transmembranales de los dos tipos de proteínas no muestran secuencias similares. Las moléculas MHC-I no tienen función como receptores a inmunoglobulinas aunque se unen a pequeños péptidos de los linfocitos T. La similitud

en la estructura primaria, terciaria y cuaternaria entre ambas moléculas sugiere que tienen un antecesor común [22, 23].

En resumen, el FcRn es expresado en una gran variedad de tipos celulares y tejidos, incluyendo las células epiteliales intestinales (IECs) de roedores neonatos, del sincitiotrofoblasto en la placenta de humanos, hepatocitos y células endoteliales de humano, rata y ratón adultos, en células epiteliales de glándula mamaria de bovino, intestino y riñón humano, en micro-vasculatura y epitelio del plexo coroideo en cerebro de rata. El FcRn también es expresado en monocitos, macrófagos y en algunos tipos de células dendríticas. Los macrófagos de la lámina propia intestinal también expresan el FcRn [18, 24-26].

Receptores Fc mediadores de respuestas efectoras

Los receptores FcRs para la IgG e IgE están presentes en la superficie de varias células involucradas en el sistema inmune. Las respuestas biológicas producidas incluyen las que son dependientes del anticuerpo, citotoxicidad mediada por células, fagocitosis, liberación de mediadores inflamatorios y regulación de la proliferación y diferenciación de linfocitos.

El proceso de fagocitosis involucra la ingestión de las partículas microbianas, internalización y formación de vesículas ácidas citoplasmáticas llamadas fagosomas que se unen a los lisosomas para que las enzimas de estos últimos destruyan dichas partículas. Este proceso se distingue de la endocitosis ya que el tamaño de las partículas en la fagocitosis es de 1 μm de diámetro o mayor. Los receptores FcRs se clasifican en dos grupos: Fc γ que unen IgG y Fc ϵ RI que unen IgE.

Los Fc γ median la internalización de complejos antígeno-anticuerpo más pequeños vía endocitosis, la cual permite una mayor eficiencia en la presentación por las moléculas MHC II. Además, estos receptores presentan las células cubiertas de anticuerpos para que sean destruidas por el mecanismo de citotoxicidad mediada por células. En la superficie celular de los mastocitos se expresa el receptor para IgE, el Fc ϵ RI, que se une monoméricamente a la IgE con alta afinidad. El entrecruzamiento de la IgE con antígenos multivalentes produce activación de diversas respuestas inflamatorias que incluyen la liberación de Histamina, Serotonina y Leucotrienos resultando en la acumulación de líquido y en reflujo de células y proteínas para contener la infección [17].

Existen tres clases principales de receptores Fc γ Rs: Fc γ RI, Fc γ RII y Fc γ RIII, el Fc γ RIV muy recientemente descrito y dos Fc ϵ RI: Fc ϵ RI y Fc ϵ RII. Las porciones de unión a los anticuerpos (las cadenas α) para todos estos receptores (excepto para Fc ϵ RII) son miembros de la superfamilia de genes de las Inmunoglobulinas, todas son proteínas transmembranales tipo I que contienen una región extracelular que guardan gran similitud entre ellas: desde un 70-98% entre los Fc γ Rs y alrededor del 40% entre los Fc γ Rs y el Fc ϵ I. Las subunidades α de varios miembros de la superfamilia se encuentran en múltiples formas. En el ratón, genes únicos codifican para cada uno de las tres clases de Fc γ R, en humano se han identificado tres genes para el Fc γ RI, tres para el Fc γ RII y dos para el Fc γ RIII. Existen diferencias de los dominios citoplasmáticos de las dos isoformas del Fc γ RIII que dan por resultado diferencias funcionales notables. Las

dos isoformas difieren en su anclaje en la membrana, una isoforma es anclada a la membrana por una cadena polipeptídica y la otra es anclada por un Glico-Fosfatidil inositol (GPI). Además de las formas unidas a las membranas, se encuentran en circulación las versiones solubles generadas por enlazamiento de los exones transmembranales o por proteólisis de las formas unidas a las membranas. Las formas solubles de los FcRs juegan un papel inmuno-regulador por la interferencia con las funciones de sus contrapartes unidos a las membranas. Los dominios de unión de algunos FcRs están asociados en las membranas con otras proteínas que son requeridas por el receptor en el ensamblaje y señalización. Las cadenas α del Fc γ I y del Fc ϵ RI están asociados con la proteína de membrana llamada la cadena ζ . La cadena γ es homóloga de la cadena ζ , una proteína identificada como esencial para el ensamblaje y señalización del complejo receptor-CD3 de la célula T. Ambas cadenas se asocian con el Fc γ RIII. Los dominios citoplasmáticos de las cadenas γ y ζ tienen una secuencia común que contiene serinas llamadas “motifs” que actúan como activadores del receptor al antígeno (ARAM en inglés) ITAM, TAM o ARH1 [16, 27, 28].

Los receptores Fc γ Rs una vez unidos al complejo inmune, inician una cascada de señalización vía el ITAM, que normalmente comienza con una activación secuencial de las proteínas tirosina- cinasas de la familia Src, continuando por la activación de las proteínas tirosina-cinasas SyK. Esto resulta en la fosforilación del mismo ITAM con el reclutamiento de varias proteínas intermedias que incluyen otras cinasas y otras señalizaciones intermedias. En muchos tipos celulares, la activación de proteínas adaptadoras de la cinasa I PI3K resulta en el reclutamiento de la fosfolipasa C γ que produce un flujo de calcio y la activación de diferentes funciones efectoras. En macrófagos y células dendríticas la activación de los Fc γ Rs produce funciones celulares como fagocitosis, estallido respiratorio y la producción de las citocinas TNF- α e IL-6. En neutrófilos y NK disparan la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos y degranulación; y en los mastocitos, inducen degranulación.

En general, tanto los receptores Fc γ activadores como los inhibitorios son co-expresados en una misma célula, por lo que el ligando de la IgG puede ser capaz de entrecruzarse con ambos, lo cual es de suma importancia pues es lo que produce un umbral para la expresión de estímulos. La expresión relativa de ambas vías de señalización determina la respuesta celular[28] (Fig.2)

Cada uno de los receptores tiene diferentes características, las más importantes se mencionan a continuación:

Fc γ RI (CD64)

Localizado en el cromosoma 1q21m el receptor Fc γ RI es el único receptor que se une fuertemente a la IgG de forma monomérica y puede disparar respuestas efectoras con bajas concentraciones de la inmunoglobulina [16]. Este receptor también es el único Fc γ que tiene tres dominios extracelulares. La familia Fc γ E tiene tres genes (FCGRIA, FCGRIIB y FCGRIC) pero únicamente el FcRIa, producto del gen FcGRIA, se ha identificado como un receptor a lo largo de toda la superficie celular. El Fc γ RI se ha encontrado en la superficie de los monocitos, células dendríticas, macrófagos y neutrófilos activados. La expresión estable del Fc γ RI requiere de la presencia de un homodímero de la cadena γ , que resulta en la expresión de un complejo de Fc γ RIa (la cadena γ)/ γ - γ sobre la superficie celular. Este receptor puede ser expresado en ausencia de este homodímero de la cadena γ pero su expresión es transitoria.[29]

Se expresa en la superficie de los neutrófilos, monocitos, granulocitos y macrófagos. Este receptor se une a la IgG monomérica con alta afinidad lo cual es una característica típica de la respuesta inmune temprana *in vivo*. La unión monomérica del receptor requiere de entrecruzamiento con la IgG y el complejo resulta en una internalización que es rápidamente reciclado hacia la superficie, aunque la internalización del complejo receptor-ligando involucra su degradación. La internalización y degradación del complejo FcγRI-IgG-antígeno aumenta la unión de los péptidos antigénicos a las moléculas de MHC II. Este receptor interviene en la respuesta celular citotóxica dependiente de antígenos [16].

En recientes trabajos se ha demostrado que el FcγRIa es el único receptor Fc que tiene la habilidad para facilitar la presentación de antígenos, y tiene la habilidad para regular la expresión de TNSFF13b (también llamado BLyS o BAFF) en el entrecruzamiento con el ligando de la IgG o con la opsonina CRP [29].

FcγRII (CD32)

Se expresa ampliamente en una gran variedad de células del sistema inmune. Tiene un peso molecular aproximadamente de 40-45 KDa. Se une monoméricamente a la IgG con muy baja afinidad. Bajo condiciones fisiológicas, la baja afinidad del FcγRII para la IgG monomérica asegura que este receptor (igual que el FcγRIII) interactúe únicamente con la IgG que se ha agregado al unirse a antígenos multivalentes. Se han detectado tres genes en humano y uno en roedor que codifican transcritos múltiples que difieren primariamente en sus colas citoplasmáticas. El gene FcγRII murino tiene dos transcritos: el β1 y β2. Ambas isoformas inhiben la activación de los linfocitos B. También se ha demostrado que el FcγRII puede inhibir la activación de los mastocitos activados por el receptor FcεRI. Además, se ha confirmado que los ratones deficientes del FcγRII muestran cantidades elevadas de IgG y disminución de la activación en los mastocitos dependientes de este receptor [16, 23].

El cromosoma de la subclase de receptores FcγRII en humano 1q23 está compuesto de tres genes FCGR2A, FCGR2B y FCGR2C, que codifican las proteínas FcγRIIa, FcγRIIb y FcγRIIc que son expresadas en monocitos, ciertos tipos de células dendríticas, neutrófilos, linfocitos B, plaquetas y células NK. El FcγRII (CD32) para la IgG es el receptor de baja afinidad más ampliamente distribuido. Con dos dominios extracelulares tipo IgG, este receptor tiene baja afinidad por la IgG monomérica, pero se une a agregados de IgG y complejos inmunes fácilmente [30].

Diferente a los otros receptores Fc, el FcγRIIb tiene motifs de señalización que se unen directamente a sus dominios citoplasmáticos y no requiere de la cadena γ para una expresión estable o función. Los receptores FcγRIIa y el FcγRIIc contienen un motif de activación (ITAM), la proteína FcγRIIb es el único receptor Fcγ inhibidor que contiene un motif inhibidor dependiente de una tirosina (ITIM) en su dominio citoplasmático. En un nivel adicional de complejidad en el locus FCGR2B hay tres transcritos empalmados alternativamente que pueden ser expresados: b1 y b2 difieren por un inserto de 19 aminoácidos en el dominio citoplasmático del FcγRIIb, mientras que la forma b3 carece de una parte de la secuencia de señalización. El FcγRIIb es el único receptor Fcγ expresado en las células B, mientras que el FcγRII2b se encuentra en las células mieloides junto con el FcγRIIa. [29]

El gen FCGR2C del receptor FcγRIIa tiene un polimorfismo en la posición 13 (una glutamina) del codón de paro en el primer dominio extracelular y se ha descrito en una proteína expresada en las células NK únicamente cuando el alelo 13Q está presente.

Este gen codifica un dominio extracelular que es altamente homólogo al Fc γ RIIB y un dominio intracelular citoplasmático muy parecido al dominio citoplasmático del FCGR2A. La caracterización del locus FCGR2 sugiere que el gen FCGR2 es el resultado de un entrecruzamiento entre el FCGR2A y el FCGR2B.[29]

El Fc γ RIIa puede activar directamente plaquetas dando como resultado agregación plaquetaria. Mientras que todas estas funciones son dependientes del ITAM, es probable que las secuencias en las cadenas γ asociadas también contribuyan a la función neta del receptor [29].

El papel del Fc γ RIIb es el de modular las funciones efectoras producidas por los receptores Fc activadores. Como el único receptor con un ITIM, el Fc γ RIIb actúa como un supresor de la activación por complejos inmunes cuando está unido a la IgG en los linfocitos B. Cuando el Fc γ RIIb está unido con otros receptores activadores, el ITIM es fosforilado por una cinasa de la familia Src como Lyn que produce el reclutamiento de otras cinasas Src, así como las fosfatasas SHIP. En los linfocitos B, las SHIP pueden inhibir la activación de la vía de proteínas como PLC γ y la BTK (tirosina cinasa de Bruton) y por lo tanto la supresión de los eventos posteriores como el flujo de calcio y la disminución de múltiples funciones celulares [29, 31].

El papel clave del Fc γ RIIb para regular la autoinmunidad se ha demostrado en modelos murinos y en pacientes humanos. Ciertas cepas de ratón que son deficientes del Fc γ RIIb desarrollan espontáneamente una enfermedad parecida al lupus resultando en glomerulonefritis y muerte prematura. De manera contraria, el aumento en la expresión de este receptor puede restaurar la tolerancia y aminorar la autoinmunidad espontánea [30]. Un aspecto que se encuentra en intensa investigación es el papel de las variaciones del número de copias de un gen como una de las causas en las enfermedades autoinmunes. Las variaciones genéticas de los receptores Fc γ , especialmente del receptor de baja afinidad, el FcRIIb, produce susceptibilidad y severidad en varias enfermedades autoinmunes como lupus eritematoso múltiple, artritis reumatoide, púrpura trombocitopénica, vasculitis sistémica asociada a anticuerpos citoplasmáticos asociados a neutrófilos, miastenia gravis, síndrome de Guillain Barré y esclerosis múltiple [30].

El balance entre los receptores Fc γ activadores e inhibidores, determina el inicio de inflamación mediada por complejos inmunes. Recientemente se ha demostrado que este balance puede regular la respuesta de maduración producida por la vía del Interferón tipo I que involucra la presencia de STAT-1 en células dendríticas y monocitos de humano y se sugiere que la manipulación de este balance podría ser utilizado en el manejo de la autoinmunidad y cáncer en humano [32].

Fc γ RIII (CD16)

Se caracteriza por poseer un peso molecular de 50-80 kDa y su naturaleza bioquímica lo incluye dentro de la familia de las inmunoglobulinas. Se expresa específicamente en neutrófilos, macrófagos, mastocitos y es el único FcR encontrado en células NK. Como el Fc γ RII, el Fc γ RIII se clasifica como un receptor de baja afinidad para la IgG. Existen dos genes que codifican en humano (*Fc γ RIIIA* y el *Fc γ RIIIB*) y solo uno en ratón. En humano los dos genes, el FCGR3A y el FCGR3B codifican a los dos receptores el RIIIA y Fc γ RIIIB. Este último también es considerado de baja afinidad; además el Fc γ RIIIA puede unirse a la IgG monoméricamente con

afinidad intermedia y ambos (RIIIA y RIIIB) unirse a la IgG de manera multimérica y complejos inmunes de manera eficiente. La unión del ligando del Fc γ RIIIa es fuertemente influenciado por glicosilación del receptor. Diversas formas glicosiladas del Fc γ RIIIA son expresadas en células NK y monocitos/macrófagos de humano con diferentes habilidades de unirse a la IgG.[17, 29].

Las proteínas Fc γ RIIIa son expresadas como proteínas transmembranales de los monocitos, macrófagos, células dendríticas, células T δ/γ y células NK. Sobre estas células la cadena γ (o la cadena ζ de las células NK) es necesaria para una expresión estable de la proteína sobre la superficie de las células y la transducción de señales del complejo Fc γ RIIIa. De manera particular, en los mastocitos el receptor Fc γ RIIIa también puede incorporar la cadena β del receptor de IgE resultando en un complejo $\alpha/\beta/\gamma-\gamma$ sobre la superficie celular [29].

El gen del Fc γ RIIIB es el único de los genes de los receptores Fc γ en el que el receptor es anclado a una GPI. Este receptor es expresado sobre la superficie de los neutrófilos y basófilos. En los neutrófilos es altamente expresado, de 150,000 a 200,000 receptores por célula. Por estudios bioquímicos se ha sugerido que cuando el Fc γ RIIIB es expresado en la superficie de los neutrófilos interactúa con la β 2 integrina CD11b/CD18. Esto es interesante dada la reciente demostración de la fuerte asociación genética entre una variación del locus CD11B/ITGAM y el lupus eritematoso.[17, 29]

Estos receptores tienen diferentes distribuciones celulares, en humano el *Fc γ RIIIA* se localiza en macrófagos, NK y mastocitos y el *Fc γ RIIIB* principalmente en neutrófilos. La isoforma murina se expresa en macrófagos y NKs. Participan en la respuesta celular de citotoxicidad dependiente de antígenos, así como en la endocitosis y fagocitosis. Este receptor interviene en la internalización rápida de los complejos antígeno-anticuerpo y aumenta la eficiencia en la presentación antigénica. Se ha demostrado que este receptor trabaja sinérgicamente con el receptor Fc γ RII para aumentar respuestas como la fagocitosis [16].

Una función clave de los receptores activadores es la eliminación o remoción de los complejos inmunes, de todos ellos el Fc γ RIIIa es el que juega un papel importante en la remoción de dichos complejos inmunes. La afinidad intermedia de este receptor en los macrófagos en tejido fijado, da la idea que es el que los captura para facilitar su eliminación[29].

Fc γ RIV

Este receptor recientemente descrito, solo se ha encontrado en ratón, tiene un peso molecular aproximado de 40 kD, su gen de 75kb está en el intervalo entre el Fc γ RII y el Fc γ RIII, y únicamente se une a IgG2a e IgG2b con afinidad intermedia[31, 33]. Esta proteína es muy similar al Fc γ RIIIA de humano con un 60-65% de identidad y de un 44% de similitud con el Fc γ RIII de ratón. Este receptor requiere de la cadena γ para su expresión en superficie. La unión de este receptor con los complejos inmunes produce liberación de calcio. Como los otros receptores Fc activadores, estímulos inflamatorios como los LPS o citocinas TH1 como el IFN lo pueden inducir, y citocinas TH2 como IL-4, IL10 o TNF- β disminuyen su expresión [34]. Este receptor se expresa en los leucocitos de sangre periférica, así como en el bazo, el timo, el colon y el intestino[31, 35].

Receptor								
	CD64	CD 32		CD 16			B2	FcγR4
Fc								
72								6kDa
Estructura								
	FcRγ	Motif ITAM	Motif ITIM	Motif ITAM	ancla GPI			FcRγ
Gene	Humano	FCGR1A ¹	FCGR2A	FCGR2B	FCGR2C	FCGR3A	FCGR3B	FcRn
	Ratón	fcgr1	fcgr2b	fcgr3			fcgr4	FcRn
Orden de		$10^8 M^{-1}$	$2 \times 10^6 M^{-1}$	$2 \times 10^6 M^{-1}$		$2 \times 10^6 M^{-1}$		$5 \times 10^7 M^{-1}$
Afinidad		1) IgG1 IgG3 2) IgG4 3) IgG2	IgG1 IgG3=IgG2 IgG4	IgG1 IgG1 IgG3 IgG2	IgG1		IgG2a IgG2b IgG1,IgG3	Alta en todas las subclases
Expresión		Macrófagos Monocitos Dendríticas Eosinófilos Neutrófilos	Macrófagos Monocitos Eosinófilos Dendríticas Mastocitos Mastocitos Plaquetas	Macrófagos Monocitos Eosinófilos Dendríticas Mastocitos Neutrófilos Linfocitos B	NK	Macrófagos Monocitos Dendríticas NK Mastocitos Linfocitos Tγδ	Neutrófilos Eosinófilos Macrófagos	Monocitos Macrófagos Dendríticas Epitelios Endotelio Hepatocitos

Figura 2. Tabla de las características generales de los Receptores Fc para la IgG. Todos los FcγRs son glicoproteínas con una subunidad alfa (α). El FcγRI tiene tres dominios extracelulares tipo C2 y los FcγRII, RIII y RIV tienen dos dominios extracelulares. Todos los FcγRs tienen similitudes entre el 50-95% en su porción extracelular pero difieren en sus dominios citoplasmáticos. El receptor FcγRI es el único de alta afinidad a la IgG, mientras que el FcγRIIb es el único inhibidor. Los receptores Fcγ de baja afinidad en humano son cuatro; FcγRIIA, FcγRIIC, cuya señalización es por medio de un inmunoreceptor activador basado en una tirosina (ITAM) y el FcγRIIIA y el FcRγRIIIB que está unido a la membrana por un grupo glicolsilfosfatidilinositol. En ratón hay dos receptores de baja afinidad: el FcγRIII y el FcγRIV. La señalización de estos últimos cuatro receptores activadores en ambas especies es a través de la cadena común γ de los receptores Fc.

Antecedentes

Modelo de Inducción de IgG Intestinal: inmunización i.p. con protoxina Cry1Ac

Las proteínas Cry son cristales producidos como protoxinas por *Bacillus thuringiensis* (Bt) durante la esporulación y son utilizadas como insecticidas. Después de la ingestión, las proteínas cristalinas son solubilizadas y activadas proteolíticamente por las proteasas del intestino del insecto susceptible. La toxina activada, que no es tóxica para los vertebrados, se une a receptores específicos de la superficie de la membrana en el epitelio del intestino induciendo la formación de poros y produciendo la muerte [36]. Cry1Ac en particular, es una proteína formadora de poros que es específicamente tóxica para larvas de lepidópteros.

Los productos de Bt representan alrededor del 1% del total de los agroquímicos (fungicidas, herbicidas e insecticidas) vendidos en el mundo y son polvos que contienen mezclas de esporas secas y cristales de toxinas. Los cristales son agregados de proteínas (alrededor de 130-140 kDa) y son protoxinas que deben ser activadas antes para tener sus efectos tóxicos. Los cristales de las proteínas son altamente insolubles en condiciones normales, por lo que se consideran enteramente seguras para humanos, otros vertebrados y la mayoría de insectos. Solo son solubilizadas en condiciones reductoras de pH elevados (alrededor de pH 9.5), condiciones comúnmente encontradas en el intestino de las larvas de lepidópteros por lo que son insecticidas altamente específicos. Una vez que han sido solubilizadas en el intestino del insecto, las protoxinas son rotas por una proteasa intestinal para producir la toxina activa que es de alrededor de 60 kD. Estas toxinas son denominadas delta endotoxinas y se unen a las células epiteliales del intestino medio, creando poros en las membranas celulares y permitiendo salida de iones. Como resultado, el intestino es rápidamente inmovilizado, las células epiteliales se lisan, la larva cesa de comer y el pH del intestino disminuye para equilibrarse con el pH sanguíneo, esta disminución permite que las esporas bacterianas germinen y las bacterias invadan al huésped causando una septicemia local. Estudios recientes de la estructura de las delta endotoxinas demuestran que tienen tres dominios: el Dominio I está constituido por un paquete de 7 alfa hélices, algunas de las cuales pueden insertarse en la membrana de la célula intestinal, creando un poro por donde pasan los iones libremente. El Dominio II consiste de tres Beta hélices anti paralelas, similares a las regiones de unión a los antígenos de las inmunoglobulinas, sugiriendo que este dominio se une a los receptores del intestino. El Dominio III es un paquete compacto de Beta hélices que protege la exposición del carboxilo terminal de la toxina activa, previniendo su ruptura por las proteasas intestinales [37].

Bt produce dos tipos principales de toxinas: las toxinas Cry (crystal), codificadas por diferentes genes *cry* (esta característica se usa para clasificar los diferentes tipos de las toxinas de Bt). El segundo tipo son las toxinas Cyt (citolíticas), que junto a las toxinas Cry, aumentan la efectividad del control de insectos. Alrededor de 50 de los genes que codifican las toxinas Cry se han secuenciado y esto ha permitido asignar más de 15 grupos sobre las bases de sus similitudes en las secuencias. Bt variedad *Kurstaki* produce principalmente Cry 1Ab y Cry 1Ac [36, 38].

Desde hace mucho tiempo se ha estudiado la proteína Cry1Ac con el objeto de evaluar su actividad bioinsecticida y los estudios de seguridad se han enfocado principalmente a la patogenicidad del bacilo y su toxicidad. Los estudios toxicológicos usando altas

concentraciones de esporas y cristales de varias cepas de Bt han mostrado que estas proteínas son casi inocuas para vertebrados [39]. Es por ello que se considera que las proteínas Cry que se producen masivamente a través de fermentación en Bt o microorganismos transgénicos son seguras para el ambiente [36, 40]. Debido a esto, existe una nueva generación de plantas transgénicas que contienen cantidades considerables de proteínas Cry comercializadas y utilizadas para producción de alimentos [41]. Sin embargo, existen reportes epidemiológicos donde los agricultores expuestos a pesticidas que contenían Bt *var. Kurstaki* presentaron un aumento en los niveles séricos de inmunoglobulinas durante tiempos prolongados (2 años), aunque en el seguimiento de estos pacientes se observó la disminución en los títulos de inmunoglobulinas después de un año de suspender el uso de estos bioinsecticidas [42]. En otro trabajo se evaluó la respuesta inmune en agricultores antes y después de usar pesticidas comerciales que contienen productos de Bt *var. Kurstaki* y se detectaron niveles elevados de IgE e IgG séricos además de una respuesta alérgica en piel, siendo más altas dichas respuestas a mayor cantidad y frecuencia de uso de los bioinsecticidas. Adicionalmente se observó una baja frecuencia de enfermedades gastrointestinales en todos los sujetos que estuvieron en contacto con dichos productos [38].

Muy recientemente se han reportado las propiedades inmunológicas de estas proteínas en vertebrados, inicialmente solo se había sugerido que sus cristales pudieran tener actividad antitumoral contra el sarcoma Yoshida debido posiblemente a su capacidad de provocar un incremento general de la inmunidad en ratas [43]. Trabajos experimentales en el laboratorio muestran que la protoxina Cry1Ac de Bt es un potente inmunógeno sistémico y mucosal con propiedades adyuvantes. Se ha determinado que la inmunización intranasal (IN), rectal (R) e intraperitoneal (IP) con Cry1Ac es capaz de inducir respuestas de anticuerpos en mucosas vaginales, intestinales y de tracto respiratorio [44]. También se ha descubierto que posee efectos adyuvantes tanto a nivel intestinal como sistémico, tan potentes como los de la toxina del cólera, cuando se coadministra con albúmina de suero de bovino (BSA) y antígeno de membrana del virus de Hepatitis B (HbsAG) en ratones Balb/c por las vías oral (O) e intraperitoneal (IP) [45, 46] y por las vías IN y R [47]. Asimismo, la co-administración intranasal e intraperitoneal de Cry1Ac con extractos de proteínas totales de *Naegleria fowleri* incrementa la protección en el modelo de meningoencefalitis amibiana en ratón [48].

Justificación

La inmunoglobulina predominante en las superficie de mucosas es la IgA, pero además de la IgA secretoria, también se puede inducir una cantidad significativa de IgG que a su vez puede ser secretada hacia el lumen intestinal de humanos adultos y roedores [4]. Aunque el papel inmunoprotector de la IgA está bien establecido, otros isotipos de inmunoglobulinas tales como la IgG e IgM pueden participar en la protección de mucosas [49]. Recientemente, basándose en evidencias que indican que los anticuerpos IgG mucosales pueden actuar neutralizando toxinas, adhesinas o virus, inhibiendo la penetración de éstos últimos a través de la capa epitelial, se ha sugerido que la IgG asociada a mucosas puede contribuir a la defensa del organismo [50]. De hecho, la IgG mucosal inducida por una inmunización sistémica (ej. con polisacáridos de *Hemophilus influenzae*) o por sistémica pasiva de anticuerpos IgG específicos (contra el virus de inmunodeficiencia en simios) produce una excelente protección contra patógenos presentes en las rutas mucosas (respiratoria o vaginal respectivamente) [4]. Asimismo, dentro del lumen, los anticuerpos IgG pueden ejercer funciones contra el HIV [51].

También se ha reportado inmunidad mucosal de IgG e IgM contra la influenza en un modelo de ratón knockout a IgA [52]. En contraste con todo lo que se conoce sobre el proceso activo del transporte unidireccional de IgA hacia el lumen, cruzando por las células epiteliales mediante un receptor polimérico (pIgR) [53] y su relación en la defensa mucosal del huésped contra diversos patógenos, la contribución de la IgG del lumen intestinal para la defensa del huésped, así como los mecanismos por los cuales la IgG llega a las secreciones lumbales y su función en estos lugares, no son completamente conocidos. El receptor Fc neonatal para la IgG (FcRn) es el receptor responsable del transporte de IgG a través de las barreras epiteliales. Además, la unión del receptor FcRn a la IgG y a la albúmina es dependiente de pH y en ambos casos los protege del catabolismo pues los desvía de la degradación de los lisosomas a través de su expresión en el endotelio y otros tipos celulares [3, 54]. Asimismo, el FcRn también puede aumentar el ingreso de antígenos mediado por IgG a través del epitelio mucosal [55]. En ratas y ratones, el FcRn se expresa abundantemente en las células epiteliales intestinales de las crías lactantes ya que es el responsable del transporte de la IgG presente en la leche materna para cruzar las células epiteliales hacia la circulación, pero en el intestino de ratón su expresión es autorregulada ontogénicamente, ya que es elevada en el nacimiento y disminuye dramáticamente dentro del epitelio (aproximadamente mil veces) durante el destete, aproximadamente a los 14 días de edad, coincidiendo con el tiempo del cierre epitelial y simultáneamente con el cese del transporte de IgG [3, 11, 54, 56]. Las diferencias filogenéticas en los mecanismos de transporte de la IgG entre el roedor y el humano son claras, el entender más sobre los mecanismos de transporte alternos de la IgG, complementaría la información sobre los procesos básicos que se desarrollan en las mucosas. Los recientes avances en el conocimiento en esta área, hacen mas evidente que el sistema inmune de mucosas es el mas importante y complejo del sistema inmune. Además, muchos de los procesos patológicos de auto inmunidad están mediados por elevadas producciones de IgG autoreactivas, el conocer vías alternas de su transporte, que también pudiesen participar en el humano, es de suma importancia para futuras aplicaciones en la clínica. Este trabajo presenta algunos aspectos no descritos de la respuesta inmune en mucosas que se dirige hacia la producción de IgG. Se utilizó como inductor de la respuesta a la protoxina CryIac que se ha demostrado induce respuestas preferenciales hacia ese isotipo tanto a nivel mucosal como sistémico. Se analizó si la producción fue local y que ocurre con el transporte de la IgG cuando es producida en altos niveles en un tejido que se considera que normalmente no la produce.

Planteamiento del problema

Hasta muy recientemente, la alta producción de IgG a nivel de mucosas es considerada como una respuesta inmune normal, y es por ello que no se han caracterizado varios aspectos de este tipo de respuesta. Tomando en cuenta que la inmunización intraperitoneal de roedores con Cry1Ac induce aumento en la producción de anticuerpos IgG en lavados intestinales, consideramos que este hecho podría funcionar como un buen modelo para caracterizar algunos aspectos que no han sido estudiados durante el proceso de inducción de IgG intestinal.

Existen pocos trabajos donde se evalúe si el aumento de la IgG intestinal es específico para el antígeno utilizado y no se ha determinado si hay un mecanismo de transporte a nivel intestinal en ratón adulto, pues debido a que el epitelio intestinal de los roedores presenta autorregulación en la expresión del FcRn a través del desarrollo y que no se produce en estado adulto, sugiere que el transporte intestinal de la IgG en los roedores adultos puede estar mediado por dos diferentes mecanismos: a) la reactivación de la expresión del receptor FcRn ó b) por un receptor Fc distinto. Es importante destacar que no se ha explorado si el FcRn es expresado en el epitelio intestinal bajo inducción en la producción de IgG.

Por lo tanto en este trabajo se eligió a la protoxina Cry1Ac recombinante de *Bacillus thuringiensis ssp kurstaki HD-73* como un inmunógeno para evaluar las respuestas IgG intestinales en el ratón adulto. Por lo que se plantearon los siguientes:

Objetivos

General:

Caracterizar la respuesta de IgG intestinal utilizando el modelo de inmunización intraperitoneal con la pCry1Ac en ratón.

Particulares

1. Validar el modelo de Inducción de IgG intestinal en ratones por la inmunización intraperitoneal con Cry1Ac.
 - 1.1. Evaluar si existe inducción de respuesta específica IgG en lámina propia intestinal utilizando la técnica de ELISPOT.
 - 1.2. Corroborar el aumento de la IgG específica y cuantificarla a nivel intestinal.
 - 1.3. Determinar mediante citometría de flujo si se modifican las proporciones de células B IgG+ IgA+, IgM+, IgE+ en intestinos delgado y grueso.
 - 1.4. Determinar por inmunohistoquímica la presencia de linfocitos B IgG positivos
2. Determinar si el receptor FcRn se expresa en epitelio de ratón adulto cuando se induce un aumento en la producción de IgG intestinal.
 - 2.1. Determinar la expresión de FcRn por RT-PCR, microscopía confocal y citometría

3. Determinar si se expresan los receptores Fc γ RII/III en el tejido intestinal de ratones controles e inmunizados mediante Microscopia confocal, citometría de flujo, western blot.
4. Determinar si existe co-localización con la IgG con los receptores Fc γ RII y III en el tejido intestinal mediante microscopia confocal, citometría de flujo.
5. Determinar por inmunoprecipitación si la IgG se encuentra asociada a los receptores Fc γ II y III en epitelio intestinal.
6. Determinar si los receptores Fc γ RII/III pueden participar en la captación o el transporte de la IgG en el epitelio intestinal del ratón.

Material y métodos

Producción de pCry1Ac

Se trabajó con la cepa recombinante de *Escherichia coli* JM103 (pOS9300) donada por el Dr. Donald Dean de la Ohio State University (Columbus, USA). Las bacterias se cultivaron durante 48 hr en medio LB adicionando ampicilina (50 µg/ml) y kanamicina (30 µg/mL). La síntesis de Cry1Ac se induce con isopropil β-D-tiogalactopiranosido (IPTG, Promega) 1 mM en el cultivo hasta llegar a 0.5-1.0 de absorbancia a 540 nm.

Purificación de pCry1Ac

Las células se cosecharon a 10 000 rpm por 15 min. a 4°C y se lavaron dos veces con buffer TE (Tris-HCl 50 mM, EDTA 10 mM, pH 8.0). Posteriormente se incubaron a 37°C durante 1 hr. con 4 mg/mL de lisozima y se sonicaron durante 5 min. por 5 veces en hielo (Fisher Sonic Dismembrator modelo 300 Laboratory Equipment Company, Hayward, CA, USA). Los cuerpos de inclusión se recuperaron por centrifugación a 12 000 rpm por 20 min. a 4°C, se lavaron una vez con agua estéril adicionada con fenilmetilsulfonil fluoruro (PMSF) 1 mM y fueron solubilizados con buffer CBP (Na₂CO₃ 100 mM, PMSF 1mM y β-mercaptoetanol 1%, pH 9.6). La Cry1Ac soluble se separó por centrifugación a 12 000 rpm por 15 min. a 4°C. Fue esterilizada por filtración y almacenada a 4°C. La concentración de la proteína se determinó por el método de Bradford y su pureza se evaluó por SDS-PAGE.

Esquema de inmunización

Se utilizaron ratones Balb/c de 3 meses de edad. Se trabajó con grupos de 5 organismos. Los animales recibieron 3 dosis por vía intraperitoneal de 50 µg de pCry1Ac (una cada semana) y se sacrificaron 7 días después de la última inmunización. Se utilizaron organismos sin inmunizar como control.

Aislamiento de linfocitos intestinales

Los ratones fueron sacrificados por sobre anestesia con éter y se obtuvieron los intestinos, los cuales se lavaron con medio RPMI 1640 frío; con ayuda de una sonda, en el intestino delgado se removieron las placas de Peyer, y ambos intestinos (delgado y grueso) se separaron y se voltearon con ayuda de un ganchillo de acero inoxidable (#4). Cada intestino volteado fue incubado en 10 mL de medio RPMI conteniendo EDTA 1.5 mM por 30 min. a 37° C. Después de la incubación, el intestino fue comprimido ligeramente con un embolo de jeringa hipodérmica en una malla plástica. La suspensión celular obtenida (células epiteliales e intra epiteliales) se centrifugaron 10 min. a 1500 rpm, las pastillas obtenidas fueron resuspendidas en 8 mL de medio RPMI adicionadas con 200 µL de suero fetal bovino y se mantuvieron en hielo. La mucosa intestinal restante se volvió a incubar con 20 mL de medio RPMI y 60 U/mL de colagenasa (por intestino) por 30 min. a 37° C, después de este tiempo se adicionaron 200 µL de suero bovino y esta solución que contiene los linfocitos de la lámina propia se centrifugaron a 1500 rpm por 10 min. A la pastilla obtenida se le adicionaron 200 µL de suero bovino y se resuspendió en 8ml de RPMI. Nuevamente se centrifugó y después los linfocitos aislados del epitelio y de lámina propia (las células obtenidas después del tratamiento con EDTA y colagenasa respectivamente) se aislaron utilizando un gradiente de Percoll (75%-40%), colocándose 4 mL de las muestras disueltas en el Percoll al 40% para ser

colocados sobre el Percoll al 75% y después ser centrifugados por 25 min. a 2000 rpm a temperatura ambiente. En tubos cónicos de 15 mL se recuperó el anillo que contiene a los linfocitos (en la interfase de 75-40%) y se agregaron 200 μ L de suero y se aforó a 10 mL de medio RPMI 1640, se centrifugó a 1500 rpm durante 5 min. a 4° C, desechándose el sobrenadante y se agregaron 200 μ L de suero y 500 μ L de medio por cada intestino. Finalmente se ajustó a 1×10^6 células por mililitro para el análisis de citometría y ELISPOT.

ELISPOT

Se utilizaron placas de 26 pozos cubiertas con membranas de nitrocelulosa recubiertas con 10 μ g de proteína Cry1Ac en PBS por pozo toda una noche. Se bloquearon con BSA al 1% en PBS durante 1 hr. las placas se lavaron tres veces con PBS-Tween 20 0.5% (PBS-T) y entonces se adicionaron 100 μ L/ pozo de la suspensión de células (1×10^6 /mL) en 2 mL de medio RPMI con gentamicina (50 μ g/mL) y 7% de BSA durante 3 hr. a 37° C en CO₂ al 5% y 100 % de humedad. Pasado este tiempo se lavaron 5 veces los pozos con PBS-T. Posteriormente se adicionaron 300 μ L de los conjugados anti-IgA, anti-IgG, anti-IgM y anti-IgE (BD-Pharmigen St Jose CA) marcados con peroxidasa diluidos 1:1000 en PBS-T. Las placas se incubaron por 2 hr. a temperatura ambiente y se lavaron tres veces con PBS-T y cinco veces con PBS 1:3. Se revelaron con 4-alfa-cloro-naftol. Las placas se lavaron con agua destilada durante 15 min. y los spots se contaron en un microscopio estereoscópico.

Análisis de citometría de flujo

Para determinar la población de linfocitos T se usó el CD3e-PerCP o FITC (Pharmigen, Beckton-Dickinson, CA). Para analizar las células positivas a los diferentes isotipos de inmunoglobulinas, se utilizaron los anticuerpos: anti-IgA-FITC (BD-Pharmigen, anti-IgE-FITC (BioSource, Nivelles), anti-IgM-PE (BD-Pharmigen CA), y anti-IgG-biotinilada (Pierce, Rockford, IL). La segunda incubación se hizo con Streptavidina-PE o con Avidina-FITC (BD-Pharmigen). Para el análisis de citometría de la población de células epiteliales se utilizó anti E-cadherina- FITC de ratón (B. D. Pharmigen CA), IgG Alexa Fluor 594 (Molecular Probes, Oregon) y anti-CD16/32 biotinilado (Chemicon, Temecula CA) y Streptavidina-PerCp (Beckton Dickinson CA). Como control de isotipos se utilizaron IgG_{2b}, κ -FITC (B.D.-Pharmigen CA) y IgG_{2a}, κ - PE (B.D.-Pharmigen ,CA). Se utilizó un citometro de flujo laminar Facs calibur Beckton Dickinson,USA. Para realizar el análisis se contaron 50,000 eventos y se utilizo en software BD Cell Quest Pro software v.5.1.1.

Inmunohistoquímica

Se obtuvieron muestras de 0.5 cm de largo de colon, ciego y recto del intestino grueso y del duodeno, ileon y yeyuno del intestino delgado de los animales inmunizados 3 veces y de organismos control. Las muestras fueron fijadas 24 hr. en fijador de sales de zinc (FSZ) (González et-al, 1991). Se procesaron con la técnica histológica de rutina, con líquido intermedio de alcohol butílico, inclusión en Paraplast y se cortaron a 5 micras. Se inactivó la peroxidasa endógena con metanol y peróxido de hidrógeno (H₂O₂) al 0.5% por 3 min. Se utilizó PBS-Tritón X-100 0.07% v/v (Bio-Rad Lab, CA) para permeabilizar (5min.) y todas las diluciones se realizaron en la misma solución. Se utilizaron anticuerpos contra IgA-HRP (goat Anti mouse α -chain specific, Sigma) 1:500, IgG-HRP 1:1000 (goat anti-mouse Fc, Pierce, Rockford, IL) IgM-HRP 1:1000 (goat anti mouse μ chain specific, Pierce, Rockford, IL) e IgE-HRP (goat anti mouse Pierce, Rockford, IL) 1:1000 y se reveló con 0.9 mM de 3-3 Diaminobencidina (DAB)

(Sigma-Aldrich MO) y H₂O₂ (Fermont) al 0.05%. Para la inmunohistoquímica de CD 16/32 se bloqueó con suero de bovino al 3% y albúmina de huevo al 5% en PBS-Tritón 0.07% por 30 min. a temperatura ambiente. Para inactivar la biotina endógena se utilizó el Kit de bloqueo avidina/biotina (Zymed Labs. St Fco CA) según las instrucciones del fabricante. Se incubó con el anti CD16/32 biotinilado (Chemicon) por 24 h a 4°C y después de 5 lavados con PBS-tritón, se incubó por 2 hr. con Streptavidina-HRP (Zymed Laboratories Inc, CA) 1:1000 en ambos casos y se reveló con DAB y H₂O₂ como se describió anteriormente.

Microscopia confocal

Las muestras fueron procesadas de la misma manera que para inmunohistoquímica, sin inactivar peroxidasa endógena, se bloqueó con suero al 6% en PBS-tritón y se utilizó anti-ratón IgG-FITC (Sigma-Aldrich), anti-FcRn de chivo (Santa Cruz), anti-CD16 de chivo (Santa Cruz), CD32 de conejo (Santa Cruz) dilución 1:1000 en todos los casos por 24 hr a 4°C, los anticuerpos secundarios anti-chivo Cy5 (Invitrogen) y anti-conejo Cy5 (Beckton Dickinson CA) en dilución 1: 1000 por 1 hr. a temperatura ambiente. Las laminillas fueron almacenadas a -20°C en oscuridad hasta ser capturadas. Las imágenes fueron obtenidas en un microscopio confocal Modelo TCS SP2 Marca Leica (Mannheim, Germany).

ELISA

Para determinar los niveles de anticuerpos anti-pCry1Ac en los lavados intestinales se desarrolló la prueba de ELISA. Los intestinos fueron disecados y los lavados intestinales se obtuvieron con una sonda, se usaron 5 mL de RPMI 1640 (Sigma Chem. MO) para el intestino delgado y 3 mL para el intestino grueso, se adicionó sal sódica del ácido 4-hidroximercuribenzoico (Sigma Chem) al 0.1 M en trizma base al 150 mM, se almacenaron a -70°C hasta realizar las pruebas. Se utilizaron cajas de 96 pozos (Metrix) que fueron recubiertas con 1 µg de pCry1Ac disuelta en amortiguador de carbonatos pH 9.6 (Na₂CO₃ 1 mM, NaHCO₃ 3 mM) por toda la noche a 4 °C, se lavaron con PBS-Tween 3 veces, se bloqueó con leche descremada (Sveltes, Nestlé Co.) al 3% por 2 hr. a temperatura ambiente y se adicionaron los líquidos intestinales diluidos en leche 1:2 se incubaron toda la noche a 4 °C, se adicionaron los conjugados peroxidados anti IgA (goat Anti-mouse α-chain specific, Sigma(Sigma Chem. MO), IgG (goat anti-mouse Fc, Pierce Rockford, IL), IgM (goat anti-mouse µ chain specific, Pierce Rockford, IL) e IgE (goat anti-mouse Pierce Rockford, IL) en dilución de 1:1000 e incubaron por 2 hr. a temperatura ambiente, y se revelaron con 100 µL de sustrato: 40 mg. ortofenildiamina (Sigma Chem. MO) en amortiguador de citratos pH 5.0 y 40 µL. de H₂O₂ al 0.05% y se leyeron las placas a 492 nm. en un espectrofotómetro (Ascent, Thermo Labsystems). También se realizó la prueba de ELISA directa para inmunoglobulinas donde las placas de 96 pozos fueron recubiertas con 200 µL de los lavados intestinales a 4 °C durante toda la noche, fueron lavados con PBS-T y bloqueados con leche descremada al 3% por 1 hr.; después se adicionaron los conjugados peroxidados diluidos 1:1000 por 2 hr. a temperatura ambiente, y revelados con ortofenildiamina y con una lectura de 492 nm. (Ascent, Thermo Labsystems). Previamente se realizó una prueba de Titulación donde los títulos se definen como el valor recíproco de la dilución mas alta de la muestra que da un valor de densidad óptica de 0.1. Para determinar cualitativamente la concentración de la IgG en los líquidos intestinales se utilizó un dilución 1:2 y se cuantificó por interpolación de los valores de D.O. de una curva de calibración de IgG (Sigma Chem. St. Louis MO)

Inmunoprecipitación

Los intestinos delgado y grueso fueron aislados y evertidos, se incubaron por 30 min. en RPMI con EDTA 1.5 mM y Ditioneitol 1mM (DTT Sigma Chem. MO) a 150 rpm a 37°C, la suspensión celular obtenida se compactó por centrifugación a 1500 rpm a 4°C por 7 min. Se realizaron varios lavados con RPMI suplementado con BSA al 5% para eliminar residuos de EDTA. Las células epiteliales intestinales fueron obtenidas por gradiente de Percoll triple (20%, 40% 75%), en centrifugación a 1500 rpm por 30 min. a temperatura ambiente. Para lisar se utilizó amortiguador de lisis Tris HCl 50 mM, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, Tritón 100X 1% y como inhibidor de proteasas Complete, Mini Cocktail (Roche Co. Mannheim), las muestras se almacenaron a -70 ° C hasta su uso. Para inmunoprecipitar los receptores FcγII/III se utilizaron 150 µg de proteína (determinados por Lowry) de los lisados intestinales de ambos grupos experimentales, a los que se les agregaron 20 µL (10µg) de anti CD 16/32 biotinilado y se incubaron por 24 hr. a 4° C, este volumen se incorporo a 300 uL de perlas de agarosa-estreptavidina según especificaciones del fabricante (Immunopure Immobilized Streptavidin, Pierce Co. Rockford, IL). Se incubaron por 2 hr. a temperatura ambiente en agitación ligera y se realizaron 4 lavados con PBS a 1500 rpm por 5 min. Para la inmunodetección de los receptores y la IgG, las perlas de agarosa con el anticuerpo se corrieron en geles de acrilamida al 10% a 120 volts y se transfirieron a membranas de PVDF (100 volts, 60 min.), se bloquearon con leche descremada al 6% por 2 hr. a temperatura ambiente, se incubaron con anti IgG-HRP 1:500 (goat anti-mouse Fc, Pierce Rockford, IL), en PBS-T toda la noche a 4° C en agitación ligera y se reveló con Western blotting luminol Reagent (sc-2048 Santa Cruz Biotech. USA) en película radiográfica.

Análisis de RNA mensajero por RT-PCR

Para determinar el nivel de expresión del mRNA del FcRn del ratón se desarrolló la prueba de RT-PCR en células epiteliales aisladas donde el DNA fue extraído con TRIzol (Invitrogen; Carlsbad, CA, USA) y se precipitaron con alcohol isopropílico y etanol. La concentración de RNA se determinó por absorbancia a 260 nm, una cadena simple de cDNA fue sintetizada de 1 µg de RNA por la reacción de transcripción - reversa con 500 unidades de MVL TR (Promega, Madison, WI, USA). Para generar una sonda de DNA para la cadena alfa del FcRn, las sondas de PCR fueron sintetizados por Invitrogen Life Technologies (Carlsbad, CA USA) basados sobre la secuencia en ratón reportada para mRNA (GenBank NM_010189). La expresión relativa del FcRn fue evaluada por amplificación de PCR usando las sondas de sentido y antisentido: 5'CAGCCTCTCACTGTGGACCTAGA3' y 5'AAAGCCATGGGGCTGGCAGACC 3'. La amplificación fue completada por incubación de 1 µL del cDNA resultante en un volumen de reacción de 30 µL (50 mmol/L KCl, 150 mmol/L MgCl₂, 10 mmol/L Tris-HCl, pH 9.0) que contenía 100 pmol de las sondas específicas sentido/antisentido y 0.25 µL de Taq polimerasa (Promega, Madison, WI, USA). El procedimiento comprende un ciclo de calentamiento de 95° C por 5 min. Seguidos de 25 ciclos de desnaturalización a 90° C por 30 seg. alineando a 64° C por 30 seg., extensión a 72 ° C por 30 seg. y un ciclo de 72 ° C por 1 min. para obtener un producto de 150 bp de largo. Las muestras fueron analizadas por duplicado sobre geles de agarosa y cuantificadas por densitometría utilizando un Analizador de fluorescencia para imágenes Fuji-Film fluorescent Image Analyzer FLA-5000 (Tokio, Japón). La cantidad de mRNA que codifica el FcRn fue normalizado por la comparación de la cantidad del mRNA que codifica a la glicerilaldehido 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) como control interno.

Análisis del transporte de IgG en células epiteliales en cultivos transwell

Se purificó IgG de suero de ratón utilizando proteína A acoplada a una columna de Sepharosa (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, California, USA), verificando su pureza por electroforesis y cuantificando la concentración de la proteína por el método de mini Bradford. Esta IgG se marcó con FITC según especificaciones del proveedor de FITC- Antibody Labeling KIT (Pierce, Chemical Co. Rockford, Illinois, USA) se verificó la conjugación de la proteína con FITC con electroforesis en geles de poliacrilamida y detección con UV. La concentración de la proteína conjugada fue 1 mg/mL y con esta se hizo una curva patrón de IgG. Para el análisis del transporte epitelial se colocaron 3×10^5 células epiteliales intestinales aisladas en las insertos de transwell recubiertos con Colágena (Transwell-COL 6.5 mm diámetro 0.4 μm , Corning-Costar Corp., Cambridge, Massachusetts, USA) y se incubaron a 37° C, CO₂ al 5% por 72 hr para formar la monocapa verificándose por observación con microscopio, se cambió el medio RPMI diariamente, y el día del ensayo se adicionaron 200 μL de medio arriba y 500 μL abajo. Para ver el transporte apical o basolateral se colocó en la parte superior o inferior según el caso 6 μg por pozo de anti CD 16, anti CD32, anti CD32/16 o medio solo respectivamente por duplicado y se dejaron incubando por 1 hr. Pasado el tiempo se agregaron 3 μg de IgG-FITC, al final del periodo de incubación se colectaron los sobrenadantes, se centrifugaron y se detectó la IgG-FITC transportada utilizando el Lector de placas para fluorescencia (FLx800 Microplate fluorescente Reader, Biotek Int. Inc. USA) a las 4 hr., y otra serie de experimentos a las 24 hrs., los valores de IgG transportada se interpolaron de la curva patrón de IgG-FITC realizada al momento.

Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron analizados por ANOVA de dos variables para ELISPOT, ELISA y Citometrías de linfocitos B intestinales; seguidos de una prueba de Bonferroni para la comparación múltiple de medias entre los grupos, con un nivel de significancia de 0.05. Para el análisis de citometría de la región de E-cadherina⁺ en el epitelio de ambos intestinos se utilizó un análisis de t- pareada no paramétrica. Todos los análisis fueron realizados con el software GraphPad Prism 4.

RESULTADOS

Cry1Ac induce aumento en los niveles de respuestas específicas y totales de IgG en los lavados intestinales.

Lo primero que se realizó fue examinar los niveles de los anticuerpos específicos en las secreciones intestinales de los ratones inmunizados por la ruta intraperitoneal (i.p.) con la protoxina Cry1Ac. Como se esperaba, se detectaron casi exclusivamente anticuerpos IgG anti Cry1Ac en los lavados de ambos intestinos, aunque hubo mayor proporción en el intestino grueso. El nivel de anticuerpos totales IgG fue significativamente mayor en los lavados intestinales de los ratones inmunizados que en los ratones control ($p < 0.05\%$) (Fig. 3).

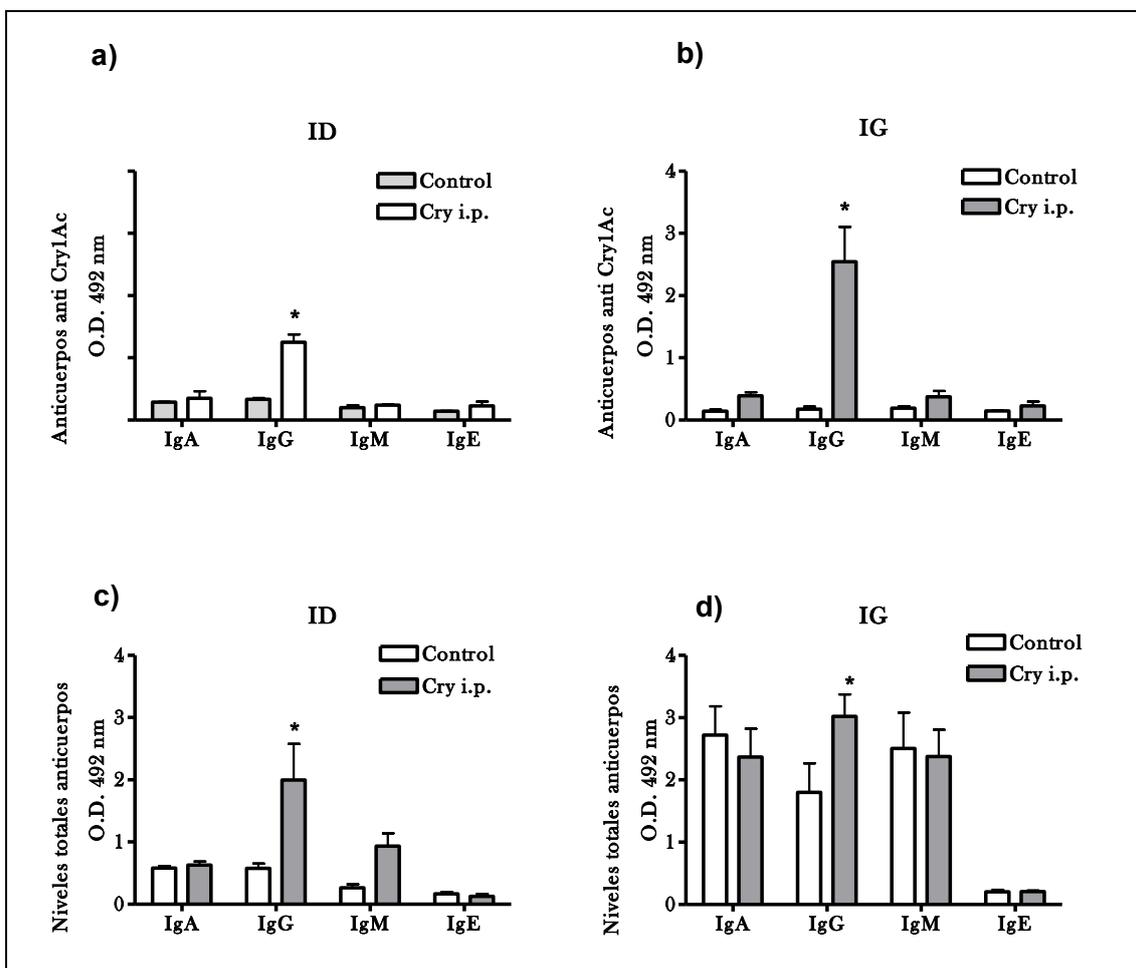


Figura.3. Niveles de anticuerpos analizados mediante ELISA en lavados intestinales de ratones control y ratones inmunizados con pCry1Ac i.p. a) Niveles de anticuerpos anti-Cry en intestino delgado (ID), b) Niveles de anticuerpos anti-cry en Intestino grueso (IG). C) Niveles totales de inmunoglobulinas en ID y d) en intestino grueso. La administración i.p.de la protoxina produce principalmente respuestas IgG específicas y aumento en los niveles totales en ambos intestinos (n= 5, $P < 0.001$).

La concentración de IgG aumenta en las secreciones intestinales de ratón inmunizado con pCry1Ac.

La cuantificación de IgG en los lavados intestinales indica que existe una producción basal de IgG en los organismos control como se observa en los ensayos de ELISAS totales. Nuevamente se corrobora el aumento en la producción de IgG en los ratones inmunizados intraperitonealmente con pCry1Ac, principalmente en el intestino grueso ($P < 0.05$) (Fig. 4).

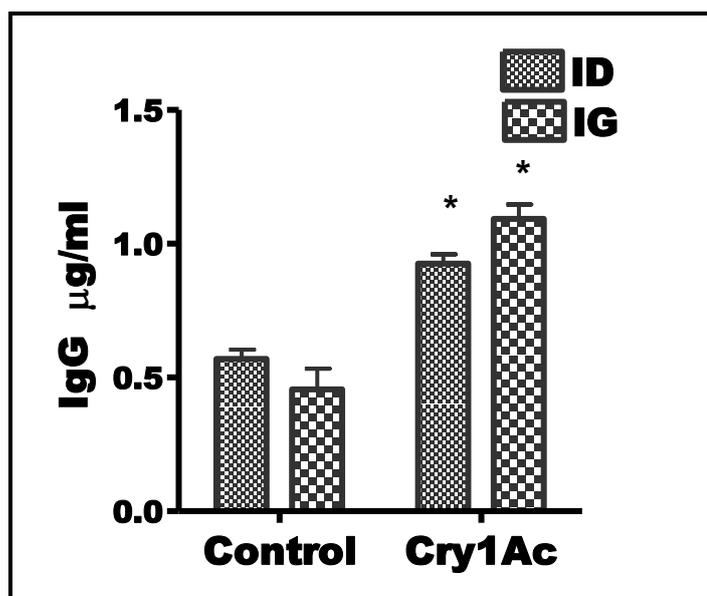


Figura. 4. Cuantificación de la producción de IgG total en los líquidos de Intestino Delgado (ID) y de Intestino Grueso (IG). La inmunización con pCry1Ac indujo aumento en la producción de IgG en ambos intestinos ($n=5$ $P < 0.05$).

La inmunización con Cry1Ac induce la formación de células formadoras de anticuerpos con respuestas específicas en la lámina propia.

Para determinar si los anticuerpos IgG anti-Cry1Ac detectados en los lavados intestinales de los ratones inmunizados se sintetizaron localmente, se aislaron linfocitos de lámina propia tanto del intestino delgado como del intestino grueso, y se evaluó la respuesta de las células productoras de anticuerpos anti-Cry por la técnica de ELISPOT. Se detectó que en la lámina propia de ambos intestinos se produjeron respuestas específicas en las células formadoras de anticuerpos, siendo en el intestino delgado donde se detectó mayor cantidad de células productoras de IgM e IgA anti Cry1Ac que en el intestino grueso, donde se encontraron cantidades similares de células productoras de anticuerpos IgA, IgG e IgM (Fig. 5). Aunque encontramos que en la lámina propia de ambos intestinos el número de células productoras de IgG anti Cry no fueron mayores que las células de los otros isotipos, si fue muy evidente que los spots de las células productoras de IgG fueron mayores y más intensos que los spots de los otros isotipos, sugiriendo que la producción de este isotipo fue mayor.

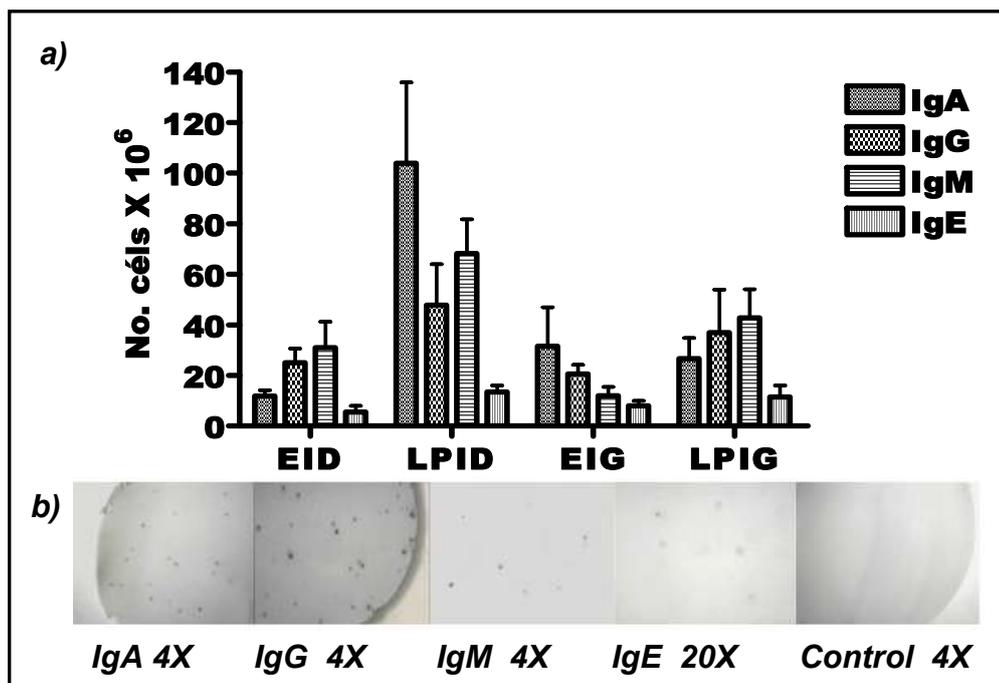


Figura.5. ELISPOT de linfocitos B aislados de epitelio (E), y Lámina propia (LP) de Intestino Delgado (ID) e Intestino Grueso (IG). a) Se detectó la presencia de células productoras de anticuerpos anti-Cry1Ac en ambos intestinos, principalmente en el Intestino Delgado. b) Spots de los linfocitos intestinales aislados de los ratones inmunizados con pCry1Ac, se observa que los de IgG son de mayor intensidad y tamaño. El control comprueba la especificidad de la prueba hacia pCry1Ac (n=5).

La inmunización i.p. con pCry1Ac incrementó la proporción de Linfocitos IgG⁺ en la lámina propia intestinal

Los linfocitos B intraepiteliales de intestino delgado se encuentran en un 7% - 10%, en el intestino grueso se encuentran entre un 15 a 20% , en lámina propia de intestino delgado entre un 37% - 40%, y en lámina propia del intestino grueso entre un 37% - 45% de la población total de linfocitos. Estos datos fueron obtenidos de 5 experimentos con 5 ratones por experimento En el caso del intestino grueso no hay reportes previos de la cuantificación de la población de linfocitos B y los isotipos presentes en ese tejido.

En los ratones control se observó que los linfocitos B del epitelio del intestino delgado presentaron la misma proporción de células IgA⁺, IgG⁺, IgM⁺ e IgE⁺, y en la lamina propia se observó una predominancia de células IgA⁺ (p<0.05). Para el intestino grueso existe una población de células positivas para todos los isotipos de manera homogénea, pero en la lámina propia predominaron células IgM⁺ seguidas de IgA⁺, siendo que la población de IgG⁺ esta en proporciones bajas al igual que las células IgE⁺ (p<0.001).

La administración intraperitoneal con 50 µg de pCry1Ac provocó que en el epitelio de intestino delgado, se modifiquen las proporciones de los linfocitos B, ya que se observó un aumento en la cantidad de células IgE⁺ e IgA⁺, disminuyendo la proporción de IgM⁺, la población de células IgG⁺ no presentó modificaciones (p <0.001). En la

lámina propia del intestino delgado se mantuvo como principal isotipo las células IgA⁺ sin que se modificaran significativamente las otras poblaciones.

La inmunización en la población de linfocitos B del epitelio del intestino grueso produjo aumento en los linfocitos IgM⁺ e IgG⁺, disminuyendo los IgE⁺ (p <0.001). En la lámina propia del intestino grueso el isotipo predominante de los linfocitos B fue la IgM⁺ (21.02±1.17) seguido de la IgG (14.42±0.91) produciéndose ligera disminución de las células IgA⁺ (p <0.001) (Fig. 6).

Tabla 1. Análisis por FACS de la población de linfocitos B en epitelio (E) y lamina propia (LP) del Intestino Delgado (ID) e Intestino Grueso (IG) de ratones testigo (T) e inmunizados (C) i.p. con pCry1Ac. (n= 5 ratones/ experimento, 3 experimentos en total).

Iso/tej	EIDT	EIDC	EIGT	EIGC	LPIDT	LPIDC	LPIGT	LPIGC
IgA	1.9±0.3	1.8±0.3	3.8±0.9	4.2±0.5	17.7±1	15.2±0.1	15.7±2	13.1±1.4
IgG	2.6±0.4	2.6±0.5	4.7±0.4	5.8±0.2	7.4 ±0.9	11.0±1.5	10.4±0.9	14.4±0.9
IgM	2.1±0.3	2.7±0.3	4.9±0.9	5.4±0.4	18.6±1.7	16.6±1.1	18.9±1.4	21.0±1.5
IgE	1.8±0.4	3.2±0.5	1.9±0.4	2.5±0.3	1.9±0.5	2.8±0.4	2.7±0.6	2.1±0.4

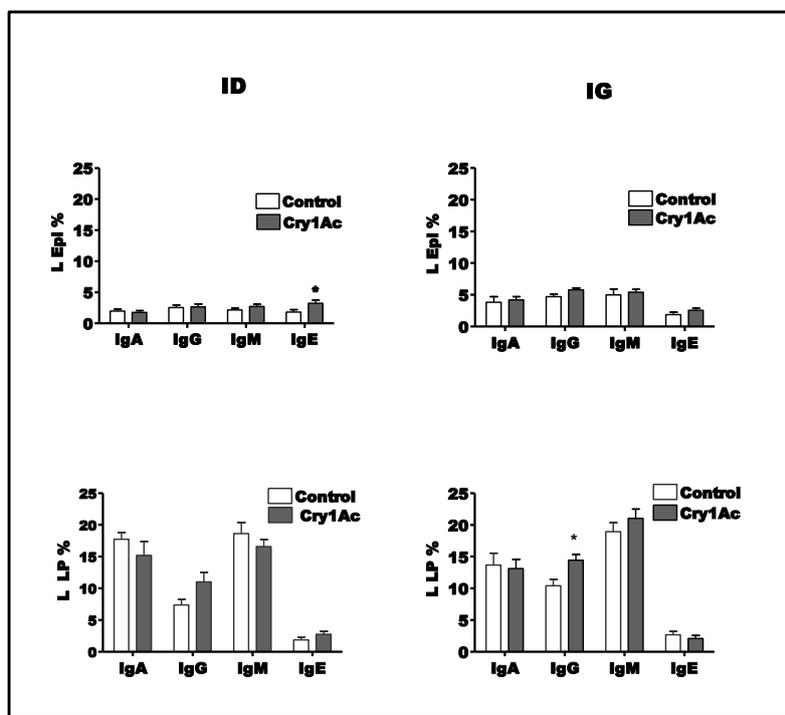


Figura 6. Análisis de FACS para los linfocitos B (L) de epitelio (Epi) y Lámina propia (LP) de intestino delgado e intestino grueso de ratones control e inmunizados. La pCry1Ac produce aumento en los linfocitos B IgG⁺ en la lamina propia del intestino delgado y grueso y de los linfocitos B IgE⁺ en el epitelio del Intestino delgado p<0.001 (n=5).

Presencia de Células epiteliales IgG⁺ y linfocitos IgG⁺ en cortes histológicos de intestino delgado y grueso en organismos control y en inmunizados con pCry1Ac intraperitoneal.

La inmunohistoquímica en cortes transversales de intestino delgado e intestino grueso nos mostró cambios que resultaron de la administración i.p. con pCry pues se indujo un aumento en la cantidad y reactividad para la IgG en los linfocitos B y en las células epiteliales de ambos intestinos. En el intestino delgado se observó mayor cantidad de células en la lámina propia y reactividad en el epitelio. En las tres zonas del intestino grueso se observaron diferencias en la distribución y reactividad para la IgG, siendo mayor en la lámina propia del colon, siguiendo en orden descendente el ciego y finalmente menor cantidad en el recto. En general, el recto presentó menor cantidad de células positivas, la zona que presentó mayor cantidad de linfocitos B IgG⁺ fue el ciego. Inesperadamente se detectó que algunas células epiteliales también demuestran reacción positiva a IgG, sugiriendo que esta inmunoglobulina puede ser transportada a través del epitelio en ratones control e inmunizados (Fig. 7).

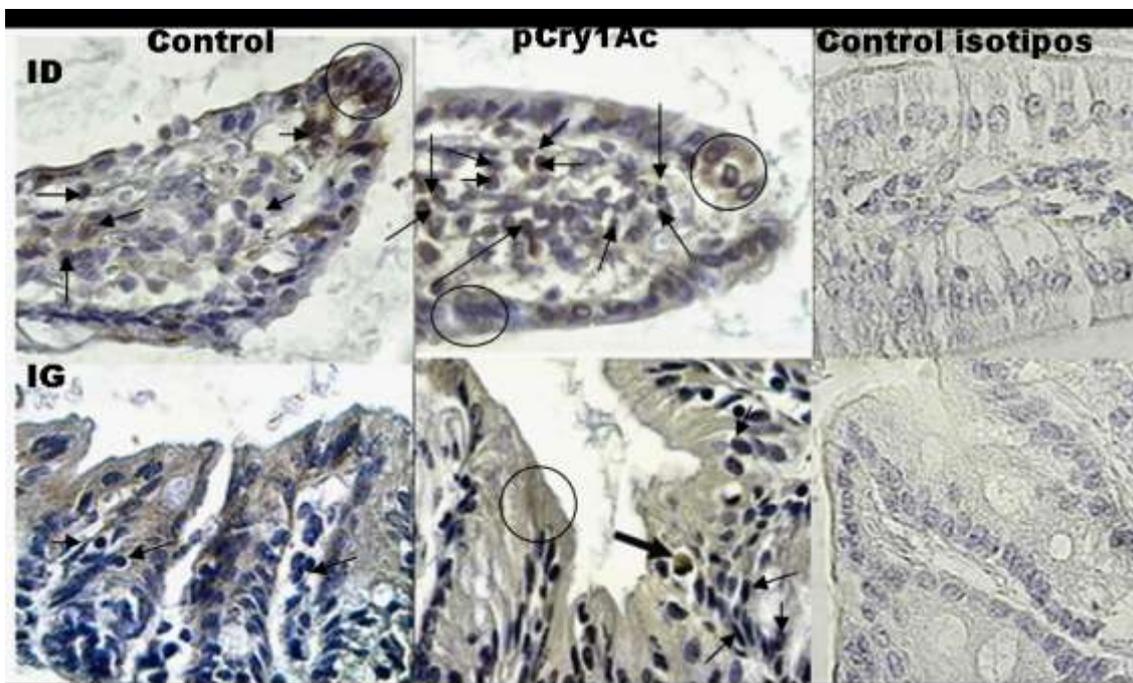


Figura 7. Detección de IgG por Inmunohistoquímica con peroxidasa de cortes de intestino delgado (ID) e Intestino grueso (IG) fijados con sales de zinc. Se observa mayor cantidad de CSA IgG⁺ en la lámina propia de ambos intestinos (flechas delgadas) y ocasionalmente intraepitelialmente (flecha gruesa) con la inmunización con Cry. También es notoria la reacción IgG⁺ en las células epiteliales (circulo). (Contratinción Hematoxilina de Harris, 5 μ m, 500X)

Cry1Ac produce aumento en la expresión de IgG en las células epiteliales

Para estimar la frecuencia de las células epiteliales que presentan IgG en el intestino, estas se aislaron en un gradiente de Percoll en la interfase de 20-40%, tanto de intestino delgado como de intestino grueso de ratones control e inmunizados. La población obtenida fue analizada por citometría de flujo usando E-cadherina como un marcador de células epiteliales. Aunque se detectaron dos poblaciones E-cadherina, una de alta

expresión (Hi) y otra de baja expresión (Lo) se utilizó toda la región E cadherina positiva. El análisis muestra que inclusive en los organismos control hay células epiteliales IgG⁺ y la inmunización con pCry1Ac aumenta su frecuencia. El intestino grueso muestra la mayor cantidad de células IgG⁺ en los organismos inmunizados (Fig. 8).

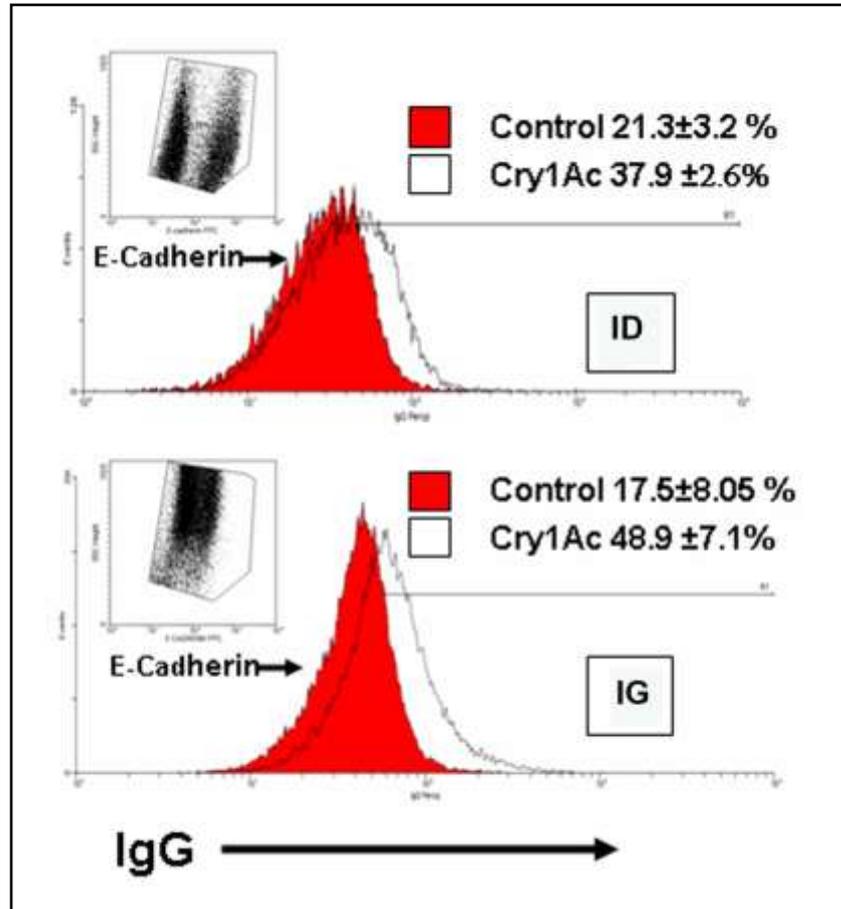


Figura 8. Análisis por citometría de flujo de las células epiteliales IgG⁺ de intestino delgado (ID) y grueso (IG) utilizando E-cadherina como marcador epitelial. La frecuencia de células epiteliales IgG⁺ fue mayor en ambos intestinos después de la inmunización con pCry1Ac, y es mayor en el intestino grueso. Los valores mostrados son calculados de la región epitelial p<0.05 (n=2 organismos por grupo analizados de manera individual con un total de 8 experimentos).

La inmunización i.p. con pCry1Ac aumenta la expresión del receptor FcRn

El receptor transepitelial descrito para la IgG es el FcRn, aunque no se ha reportado previamente su expresión en ratón adulto. Al realizar la prueba de RT-PCR en células epiteliales de los intestinos de ratón neonato de 2 días, ratón control y en ratón inmunizado se encontraron resultados positivos. Como era de esperar se detectó la inducción del receptor FcRn en el ratón neonato en el epitelio de ambos intestinos, además, un aumento en la expresión del FcRn en los ratones inmunizados con pCry1Ac. Este aumento se observó principalmente en el intestino grueso y una ligera expresión en el intestino delgado. Sin embargo, la expresión en los organismos adultos no inmunizados fue muy baja (Fig. 9).

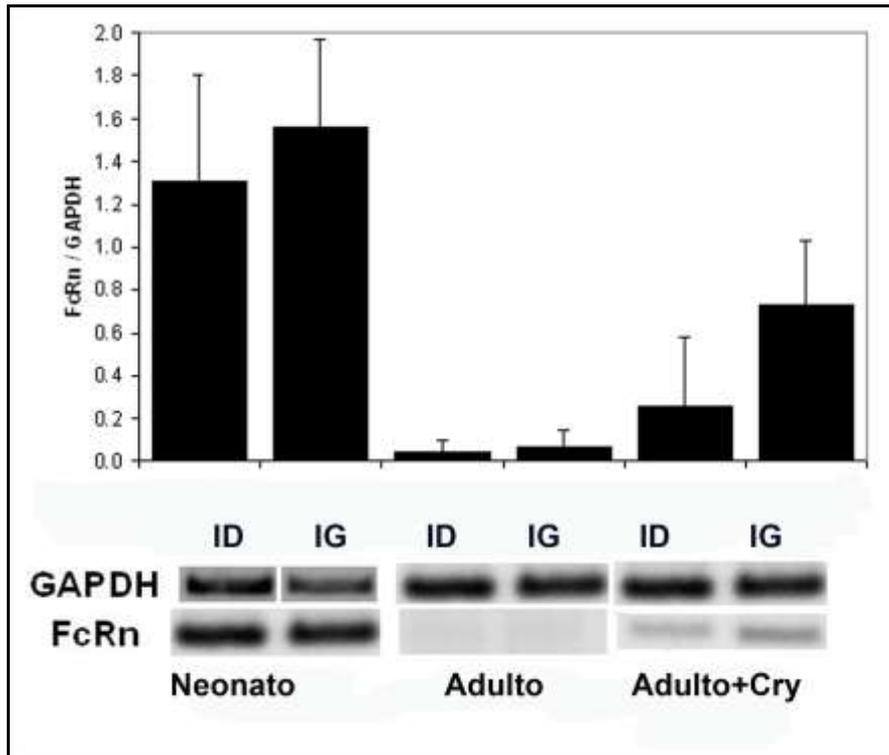


Figura 9. El aumento en la producción de IgG inducida por la inmunización i.p. con pCry1Ac también induce aumento en la expresión del receptor FcRn en el epitelio intestinal, principalmente en el intestino grueso. (n= 3).

La proteína FcRn sí se expresa en el epitelio intestinal de ratón.

Para verificar si la proteína FcRn se expresaba en mayor concentración en el epitelio intestinal de animales adultos inmunizados que en adultos no inmunizados, se realizó citometría de flujo con células aisladas y también microscopia confocal. Los resultados de citometría indican que el porcentaje de células epiteliales que expresan FcRn es mayor en animales inmunizados, además la expresión de esta proteína fue mayor en el intestino grueso.

Aunque sí hay expresión de FcRn en las células epiteliales de los organismos control principalmente en el intestino grueso (19.5 ± 4.2) y muy baja expresión en el delgado (4.9 ± 2.5), se aprecia que ésta aumenta en los ratones inmunizados siendo mayor el porcentaje en el intestino grueso (36.8 ± 8) aunque proporcionalmente es mayor la inducción en el delgado (de un 4.9% a un 27.1%) (Fig. 10).

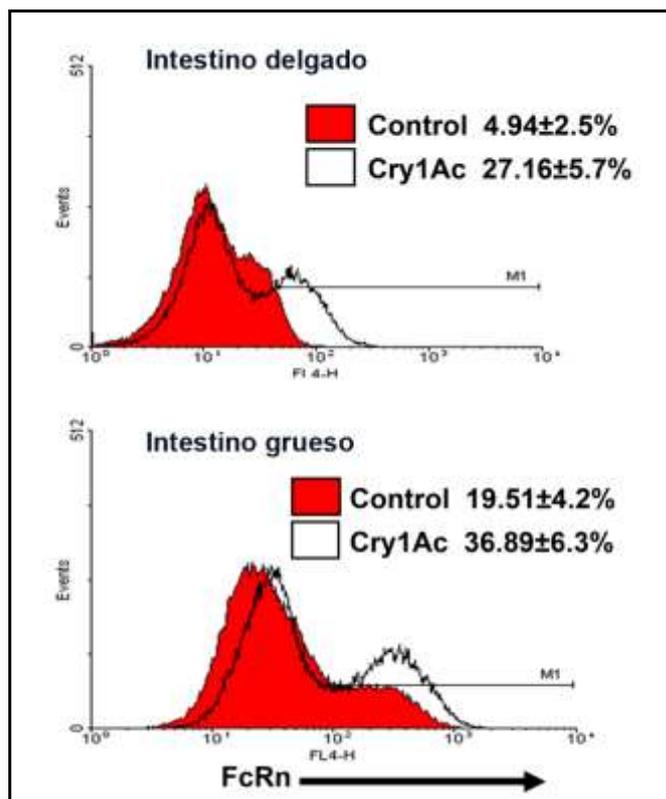


Figura 10. Análisis de citometría de las células epiteliales que expresan la proteína FcRn en el epitelio de los ratón adulto control e inmunizado, no solo aumenta la cantidad de células que expresan la proteína sino que también su fluorescencia, principalmente en el intestino grueso $p < 0.05$ ($n=5$).

Co-localización en el epitelio de IgG y FcRn por microscopia confocal

La microscopia confocal nos permitió concluir que la inducción de la respuesta inmune hacia IgG se relaciona con la expresión del receptor FcRn en el ratón adulto. Para ello utilizamos intestinos de ratones de neonato de 2 días de edad como controles positivos, y se observó claramente la presencia del receptor durante el periodo de lactancia en el intestino delgado y su co-localización con la IgG proveniente de la leche materna, ya que al momento de la disección, es muy clara la presencia de leche en el tracto digestivo. No encontramos en la bibliografía, evidencias de la presencia del receptor FcRn en el intestino grueso de neonato ni adulto en roedor. Utilizando microscopia confocal no encontramos una fluorescencia marcada hacia FcRn en el intestino grueso del roedor neonato. Sin embargo, nuestros resultados muestran que en el ratón adulto cuando hay inducción de IgG, hay expresión de su receptor o molécula transportadora en el intestino grueso (Fig. 11).

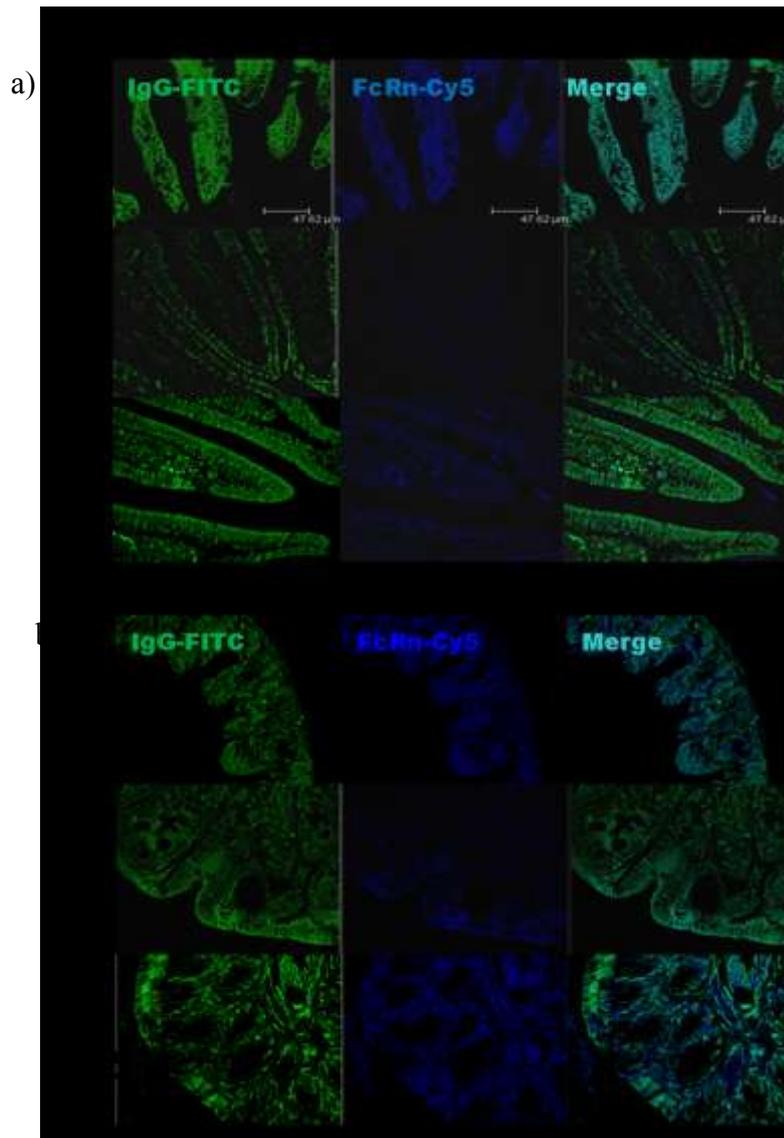


Figura 11. Microscopia confocal de cortes histológicos de ratón neonato de 2 días de nacido como control positivo a IgG de origen materno y de su transportador FcRn. a) Se demuestra ligera expresión en el intestino delgado de IgG en el ratón adulto control, aumento de IgG con la inmunización con pCry1Ac y un ligero aumento de FcRn. b) La IgG en el intestino grueso de ratón neonato no es tan alta como en el Intestino delgado y pCry1Ac induce aumento en la expresión de IgG y de su receptor FcRn el intestino grueso.

Los receptores FcγRII y el FcγRIII están presentes en el epitelio intestinal.

Aunque hay expresión de FcRn en los organismos inmunizados, esto no explica el transporte de la IgG en los intestinos (principalmente en el intestino delgado) de los organismos control donde también se detectó la presencia de IgG y nula presencia de la proteína FcRn. Esto sugiere que podría expresarse un receptor Fcγ distinto en las células epiteliales, que pudiera participar en el transporte de IgG. Para determinar si los receptores FcγRII y FcγRIII se expresan en el epitelio intestinal de los ratones control e inmunizados con Cry1Ac, se realizó la inmunodetección usando inicialmente el anticuerpo anti CD16/32 que reconoce un epítipo que comparten los receptores FcγRII

y FcγRIII, receptores que normalmente son coexpresados y se encuentran en el epitelio intestinal. Para tal efecto, se desarrollaron análisis de Citometría y Western blot en los extractos de las células epiteliales para comprobar la presencia de IgG y los FcγRII/III (utilizando el anticuerpo anti CD16/32.), así como Microscopia confocal para determinar su distribución a nivel tisular. Una vez confirmada la expresión de ambos receptores, en ensayos posteriores se utilizaron también los anticuerpos anti CD16 y anti CD32 individuales.

Las células epiteliales contienen IgG y expresan FcγRII y FcγRIII

Al realizar la inmunodetección por Western Blot en extractos de células epiteliales de animales control e inmunizados, encontramos que contienen IgG. Además, usando el anticuerpo anti CD16/32, detectamos dos bandas que corresponden a moléculas con pesos moleculares correspondientes a los descritos para los receptores CD32 y CD16 (FcγRII y FcγRIII de ≈37-40 y ≈68-75 kDa respectivamente) (Fig 12).

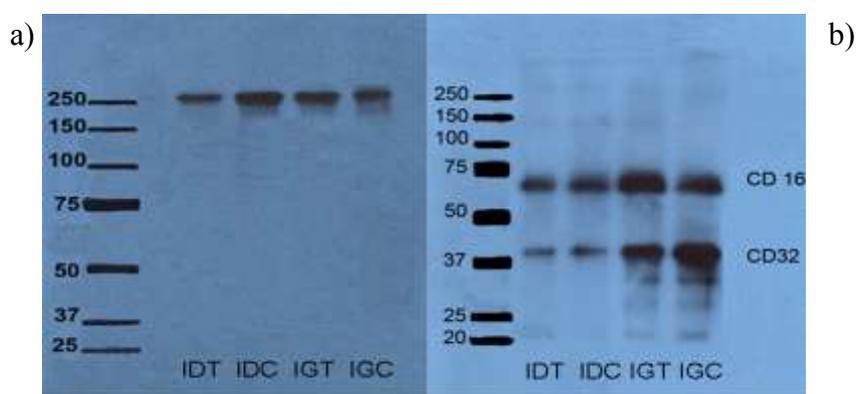


Figura12. Inmuno detección de IgG y FcγRII /III (CD16/32) en lisados epiteliales de Intestino delgado (ID) e Intestino Grueso (IG) testigo (T) e inmunizado (C).
a) Detección de IgG b) Detección de CD 16 (50-80 kD) y CD32 (38-42 kD).

IgG se encuentra unida a los receptores FcγRII/III en el epitelio intestinal

Como se detectó la presencia de los receptores FcγRII y RIII en el epitelio intestinal, se determinó si dichos receptores se encontraban unidos a la IgG. Para ello se realizó inmunoprecipitación en los lisados de las células epiteliales, incubándose con anti-CD16/32 biotinilado para después ser pasados por una columna de agarosa conjugada a estreptavidina y así capturar a las moléculas de CD16/32 presentes y después realizar la inmunodetección con IgG. Como al inmunoprecipitar con anti-CD16/32 y revelar con anti-IgG encontramos que en todos los casos se obtuvieron bandas de IgG, estos resultados indican claramente que tanto en los intestino delgado como en el grueso de los ratones control e inmunizados, la IgG se encuentra asociada a CD 16/32 (Fig. 13).

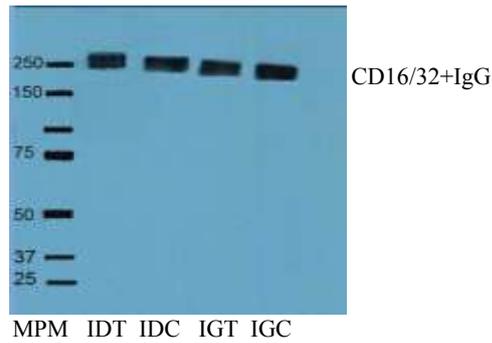


Figura. 13. Ensayo de Inmuno precipitación de Fc γ RII/III γ -IgG en lisados epiteliales de intestino delgado (ID), grueso (IG) de los organismos control (T) e inmunizados (C). El anti CD 16/32 biotinilado fue mezclado con los lisados epiteliales para después incubarse en perlas de agarosa-estreptavidina toda la noche a 4° C. Las perlas fueron lavadas y se transfirieron a papel de PVDF para detectar la presencia de IgG utilizando anti-IgG-peroxidado y se revelaron en película radiográfica.

La detección por separado de los receptores Fc γ RII y /III en epitelio intestinal confirma la presencia de ambos tanto en intestino delgado como en el intestino grueso.

El ensayo de Western blot en extractos de células epiteliales intestinales revelado con anti CD16/32 indicaba la presencia de los receptores Fc γ RII y RIII. Sin embargo, para confirmar este hallazgo, consideramos necesario repetir el ensayo revelando con anticuerpos específicos para estos receptores.

Los ensayos de inmunodetección usando anticuerpos anti-CD32 y anti-CD16 por separado, indican la presencia de los dos receptores en epitelio intestinal de ambos intestinos, tanto en los animales control como inmunizados. Aunque este análisis no es cuantitativo, al parecer existen diferencias en cuanto la cantidad expresada en el epitelio intestinal después de la inmunización (Fig. 14).

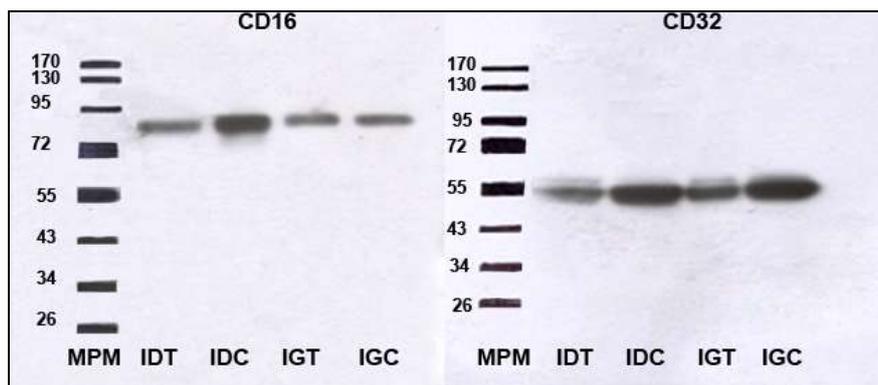


Figura14. Inmunodetección de CD16 y CD 32 por separado en lisados de células epiteliales de I. delgado (ID) e I. grueso (I.G.) de organismos testigo (T) e inmunizados con pCry1Ac (C). Se encuentran ambos receptores en las células epiteliales intestinales tanto en los organismos inmunizados como no inmunizados.

La inmunización con Cry1Ac aumenta la frecuencia de células epiteliales FcγRII⁺ y FcγRIII⁺

Para cuantificar la frecuencia de células epiteliales que expresan FcγRII⁺ y FcγRIII⁺, y si se modifica por la inmunización, se realizó un análisis por citometría de flujo en células epiteliales aisladas de animales control e inmunizados teñidas con anticuerpos anti-CD32 y anti-CD16. Las poblaciones de células epiteliales que se utilizaron para la detección de los receptores Fcγ por citometría de flujo se purificaron usando un gradiente triple de Percoll y se recuperaron en la interfase de 20-40%. Para definir la población de células epiteliales intestinales, se utilizó la región positiva E-cadherina⁺ basándose en los parámetros de granularidad y tamaño. En el análisis se detectó que los dos receptores se encuentran en las células epiteliales de ambos intestinos. Aunque se observan diferencias en la expresión de cada uno de ellos, pues en el intestino delgado de los ratones sin inmunización ambos receptores se encuentran en la misma proporción entre un 20-29%. En el intestino grueso, hay mayor proporción de células positivas para el receptor FcγRII (CD32) con un porcentaje del 41%. La inmunización con la pCry1Ac aumentó la frecuencia de células positivas al receptor FcγRIII (CD 16) tanto en el intestino delgado como en el grueso, y solo se observó aumento de FcγRII (CD32) en el intestino delgado; en el intestino grueso se mantuvo igual que en el organismo control (Fig. 15).

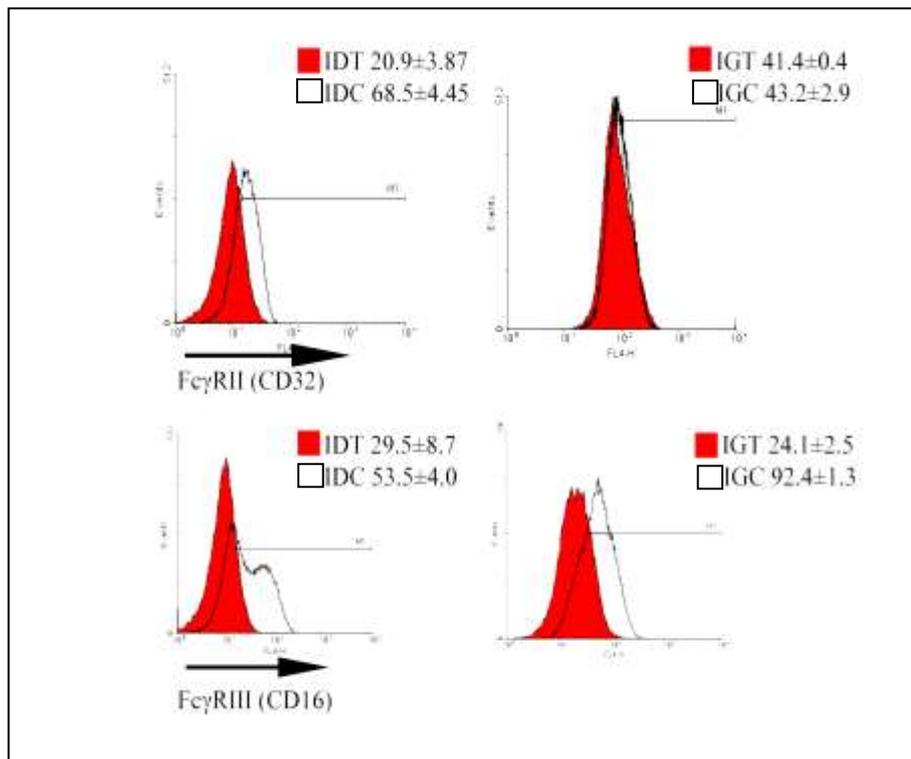


Figura 15. Detección por FACS de células epiteliales positivas a los receptores FcγRII y RIII. Se demuestra la presencia de los dos receptores en la población de células epiteliales caracterizadas por la expresión de E-cadherina⁺ de los intestinos delgados control (IDT), y con pCry1Ac (IDC), intestinos grueso control (IGC) y con pCry1Ac (IGC). La inmunización produjo un aumento en la cantidad de células que los expresan, a excepción del FcγRII (CD32) en el intestino grueso donde no aumenta la expresión, pero se observa una expresión constitutiva en los dos grupos experimentales (p<0.05 n=3)

Por microscopia confocal se detectó una reacción positiva a CD 16 y CD32 en el epitelio de ambos intestinos y que aumentó con la inmunización con pCry1Ac.

Los resultados obtenidos por microscopia confocal confirmaron que hay células epiteliales positivas a Fc γ RII y Fc γ RIII en ambos intestinos. Los dos receptores están co-localizados con la IgG y se observó que hay un aumento de ambas moléculas en los intestinos de los ratones inmunizados, y como se ha observado anteriormente, también la IgG se ve aumentada con la inmunización.

La inmunización en el intestino delgado produjo aumento en la expresión de Fc γ RII (CD32) y co-localización con IgG a nivel epitelial, y se observó aumento en la expresión de ambas moléculas después de la inmunización. En el intestino grueso la expresión de Fc γ RII (CD32) en los organismos control es constitutiva, y se observó ligero aumento después de la inmunización (Fig. 16).

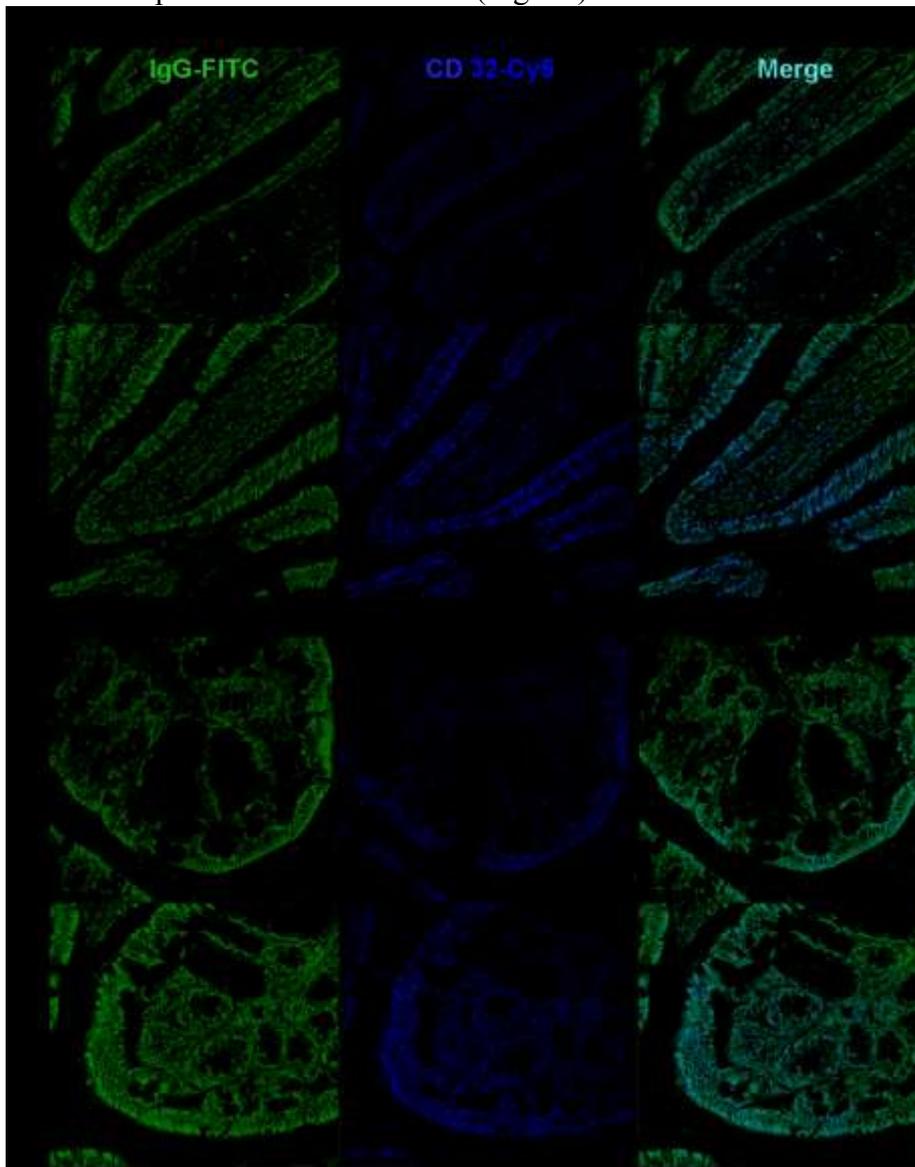


Figura 16. Microscopia confocal de Intestino delgado y grueso de ratón control e inmunizado con pCry1Ac, donde se observa expresión de Fc γ RII (CD32) en el intestino delgado y aumento de su expresión con la inmunización.

Los resultados obtenidos para el receptor Fc γ RIII (CD32) demuestran expresión constitutiva epitelial de este receptor y aumento con la inmunización de IgG y del receptor y co-localización en la zona apical epitelial en ambos intestinos. En intestino delgado se observa mayor expresión en la zona basal con la inmunización (Fig.17).

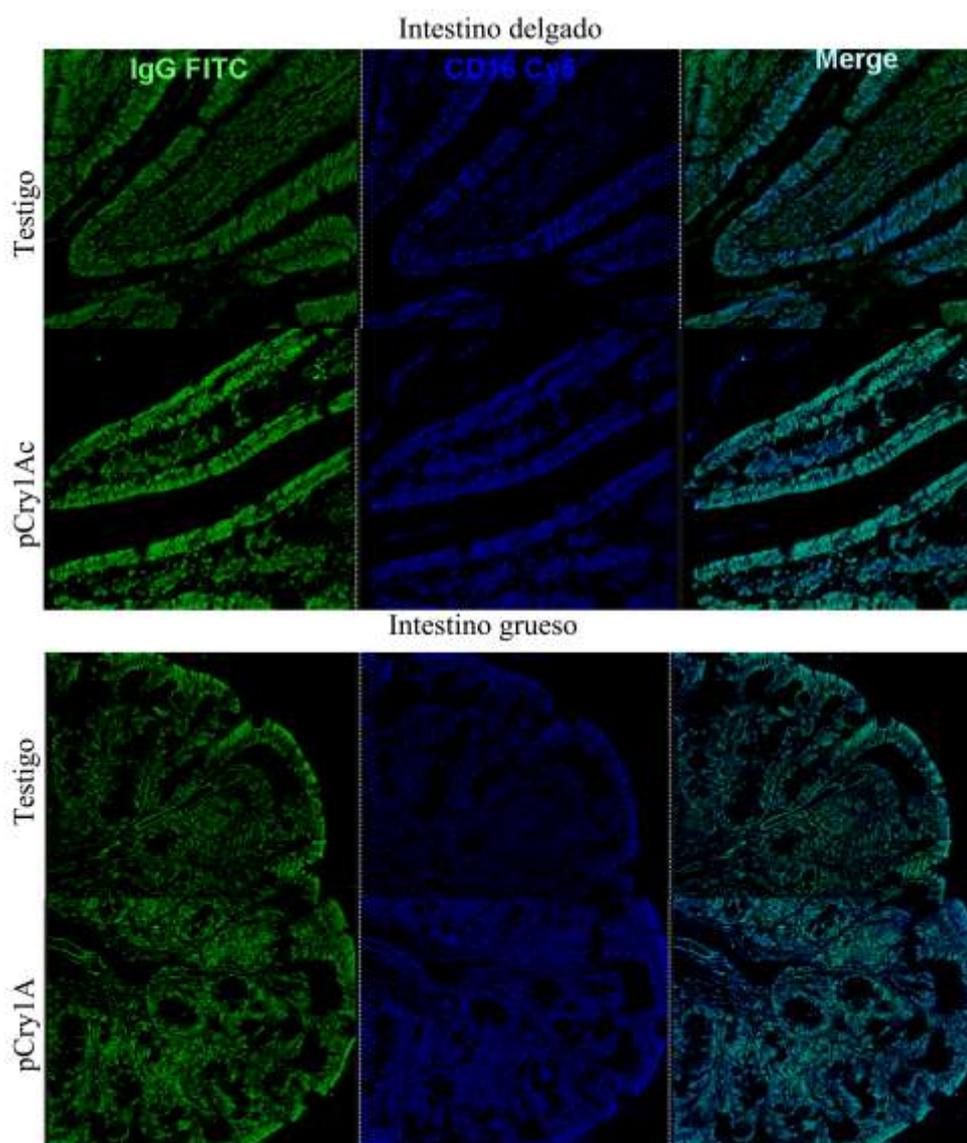


Figura 17. Microscopia confocal de intestino delgado y grueso de ratones control e inmunizados con pCry1Ac. IgG aumenta con la inmunización y Fc γ RIII (CD16) se expresa de manera constitutiva en el epitelio y aumenta en el Intestino delgado.(Fijación con sales de Zinc, 5 μ m. Diluciones 1:1000 de c/anticuerpo)

El bloqueo de Fc γ RII/III produce disminución en la captación de IgG in Vitro

Para determinar si el Fc γ RII y el Fc γ RIII podrían participar en un mecanismo de transporte alterno de la IgG en el ratón adulto a nivel epitelial intestinal se realizaron las pruebas de captación de la IgG marcada con FITC en células epiteliales en suspensión y el paso de IgG-FITC en monocapa epitelial en cámaras transwell.

Inhibición de la captura de IgG cuando se bloquean los receptores Fc

A células epiteliales en suspensión se les adicionó el anti CD16 (FcγRIII) y el anti CD32 (FcγRII) o la mezcla de ambos y se incubaron para después adicionar IgG conjugado con FITC y detectar si hubo su captación. Se observó que la “neutralización” de ambos receptores sí involucra una pérdida en la captura de la IgG. Hay mayor inhibición de la captación de IgG cuando se bloqueó con CD32 (disminuyó un 19% de células positivas) contra un (9%) para el FcγRIII (CD16), esto coincide con el aumento de la expresión de FcγRII (CD32) con la inmunización y la mezcla de ambos se observa un efecto mayor de hasta un 42% menos de células IgG-FITC⁺, todos con respecto a las células que no se les adiciono ningún anticuerpo (control positivo) (Fig. 18).

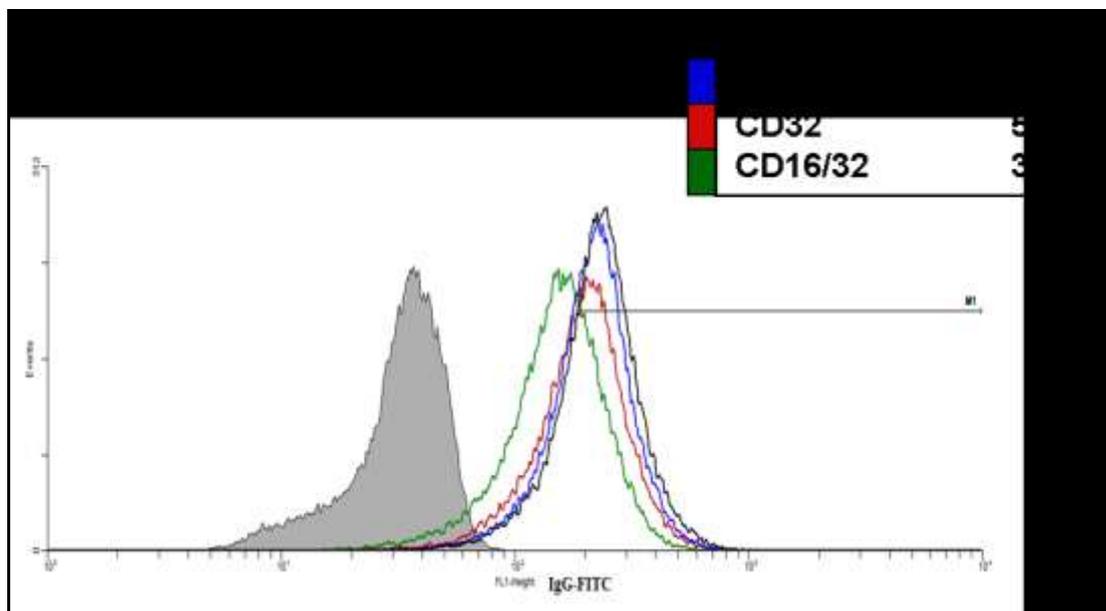


Figura 18. Por citometría se detecta que el bloqueo de CD 16 y CD 32 solo o combinados indujo disminución de células positivas a IgG-FITC en las células epiteliales, bloqueando los dos receptores se obtiene menor frecuencia de células epiteliales IgG⁺.

Por análisis transwell el bloqueo de los receptores también disminuye el transporte de IgG-FITC principalmente en dirección basal-apical.

Los ensayos donde se trató de determinar la dirección de transporte, muestran mayor inhibición del paso de IgG-FITC en la dirección basal/apical, principalmente con el bloqueo de CD32 y la mezcla de los dos receptores. No se observaron efectos del bloqueo de ninguno de los receptores cuando se aplicaron en dirección apical/basal. Lo anterior sugiere que el transporte de la IgG por estos receptores puede estar dado de la lámina propia hacia la luz del intestino (Fig. 19).

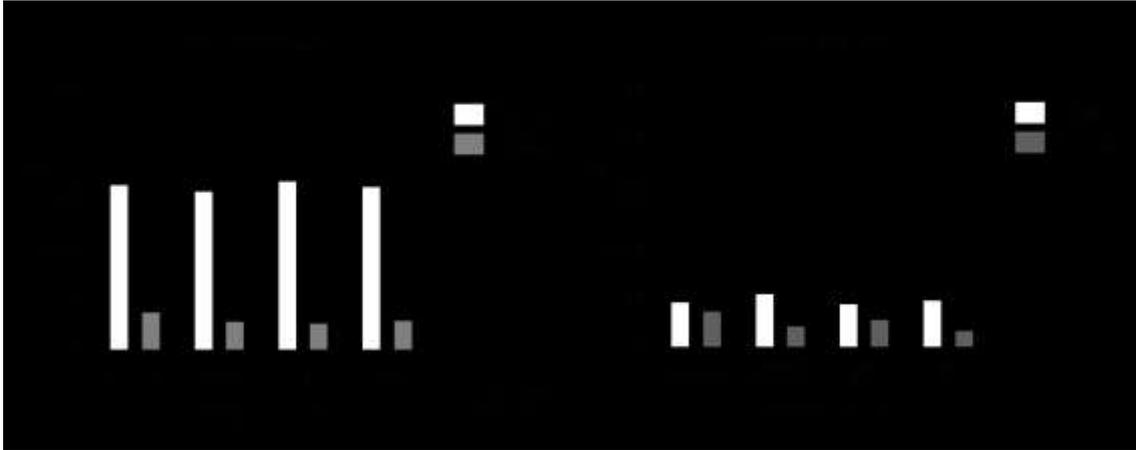


Figura 19. Análisis del bloqueo del transporte de IgG conjugada con FITC. Para ver el transporte apical o basolateral, se detectó la IgG-FITC según la dirección donde fue aplicada en la cámara de Transwell, considerando apical cuando se puso en la parte baja del inserto y basal en la parte superior de la monocapa. Se logró inhibición del paso de IgG en la dirección basal /apical con CD32 y en la mezcla de ambos anticuerpos contra CD16 y CD32.

Discusión

Considerando que previamente hemos descrito que la protoxina Cry1Ac induce preferencialmente respuestas intestinales IgG específicas cuando es administrada intraperitonealmente en ratones, en el presente trabajo usamos este mismo protocolo como un modelo para dirigir la influencia de la inmunización sistémica sobre la inducción de una alta producción de IgG intestinal y determinar su origen y la expresión de moléculas encargadas de su transporte en ratones control e inmunizados.

Los resultados del presente trabajo corroboran que la inmunización intraperitoneal con Cry1Ac es un buen modelo para caracterizar la respuesta IgG intestinal pues se demostró que induce aumento en la generación de linfocitos B productores de IgG específica (anti-Cry1Ac) en la lámina propia, aumento en la producción de dicha inmunoglobulina y aumento en la cantidad de células epiteliales IgG⁺. Asimismo, se demostró que se inducen moléculas encargadas de su transporte como los receptores FcRn y FcRγII/III.

Además de la IgA, que es la inmunoglobulina predominante en las secreciones, pueden ser inducidas y secretadas cantidades significativas de IgG hacia el lumen intestinal en humanos y roedores adultos que puede participar en la protección de mucosas. Se había considerado que la presencia de IgG en secreciones mucosas se origina exclusivamente o predominantemente de la circulación a través de la transudación o inflamación [13, 14]. En el caso de las secreciones del tracto genital, las células productoras de IgG sintetizan cantidades significativas de esta inmunoglobulina [57]. Ya recientemente y coincidiendo con el presente trabajo, diversos grupos han encontrado que la inmunización intraperitoneal puede inducir respuestas inmunes celulares y/o humorales a nivel sistémico y mucoso de IgG, tanto en humano, ratón, cerdo y mono por diversos agentes patógenos o moléculas inductoras de respuesta inmune [6, 58-60].

También se ha reportado la inducción de las respuestas celulares IgG específicas en la lámina propia intestinal después de la infección o inmunización. Por ejemplo, después de la inoculación con rotavirus, el número de células secretoras de anticuerpos (CSA) IgG inducidas fue comparable a las CSA IgA en la lámina propia intestinal. [7]. Después de un reto con el corona virus, un virus entérico, se detectaron grandes cantidades de CSA IgG y pocas CSA IgA en el intestino de cerdo [61]. Ahora bien, también se ha encontrado especificidad en la respuesta pues la IgG en mucosas puede ser inducida de varios sitios efectores como el yeyuno, íleo, colon, glándulas salivares, útero y vagina por la inmunización parenteral con antígenos solubles [8]. Coincidiendo con nuestros resultados, estos reportes también han encontrado que la inmunización intraperitoneal puede inducir respuestas humorales y/o celulares tanto a nivel sistémico o de mucosa intestinal [8, 62-64].

Usando citometría, se determinó que la lámina propia intestinal contiene linfocitos IgG⁺ y que su frecuencia fue aumentada después de la inmunización. Adicionalmente, los datos obtenidos indican que hay producción local de células IgG específicas anti Cry1Ac así como un aumento en la frecuencia de células B IgG⁺ en la lámina propia de los ratones inmunizados. Los resultados indican que las respuestas celulares anticuerpo-específicas fueron inducidas en la lámina propia de ambos intestinos en los ratones inmunizados, pero el número de células con respuesta anti Cry1Ac no fue mayor que la de los otros isotipos. Además, se ha demostrado que la

especificidad de los anticuerpos IgG de las secreciones puede diferir de las del suero y varía de acuerdo al compartimiento mucoso [5].

Sin embargo, estos resultados no excluyen la posibilidad de que parte de la elevada cantidad de IgG encontrada en las secreciones intestinales, puedan venir desde el suero como un resultado de una reacción inflamatoria intestinal provocada por la inmunización. Por lo que consideramos importante evaluar la presencia de linfocitos IgG⁺ intestinales por inmunohistoquímica como un indicativo de producción local y además detectar si la inmunización provocó inflamación intestinal. Después de la revisión histológica, no se encontró evidencia alguna de reacción o daño tisular. Se detectaron linfocitos B IgG⁺ en la lámina propia de ambos intestinos tanto en los organismos control como en los inmunizados y la IgG no solo fue detectada en los linfocitos B de la lámina propia, sino dentro de los vasos sanguíneos, dentro de las células epiteliales, no entre las células epiteliales, y fue muy evidente la presencia de IgG tanto en la región basal como en la apical de las células epiteliales, sugiriendo esto que la IgG está dentro de las células epiteliales intestinales y que por lo tanto, existe un mecanismo de internalización. En un estudio previo, se encontró que la protoxina se une al epitelio intestinal *in situ* en ratón y se induce hiperpolarización de la mucosa aunque sin daño aparente [37, 60].

Ahora bien, si la inmunización no provoca daño tisular pero sí un aumento en la cantidad de células productoras de IgG en la lámina propia intestinal, así como la presencia de IgG en el epitelio y en las secreciones intestinales, todo indica que debe de existir un mecanismo de transporte aún no descrito donde la IgG producida en la lamina propia pase a través del epitelio para llegar al lumen en el ratón adulto. La reciente identificación de niveles significativos de expresión constitutiva del FcRn en numerosos tipos celulares epiteliales a lo largo de la vida, aunado al reconocimiento de que el FcRn participa en un transporte bidireccional de la IgG (desde la superficie basolateral a la apical así como a la inversa) en las barreras epiteliales principalmente en humano [15, 18, 24-26], ha dirigido la atención a otras funciones potenciales del FcRn en la inmunidad, sin que se busquen respuestas sobre los mecanismos alternos del transporte de la IgG en las otras especies.

Los resultados obtenidos en este trabajo indican que hay reactivación de la expresión del FcRn en el ratón adulto. Aunque la expresión que se induce es sustancialmente menor a la encontrada en los intestinos del ratón neonato, el FcRn probablemente pueda ayudar el transporte epitelial de la IgG en el intestino de adulto después de presentar aumento en la producción de IgG y aumento de células epiteliales IgG⁺. Además, apoyando las notables diferencias fenotípicas y funcionales entre ambos intestinos [65], se encontró que hay mayor expresión del FcRn en las células epiteliales del intestino grueso que en el delgado en los ratones inmunizados y que también coincide con aumento de la molécula que transporta.

Al parecer el aumento del FcRn en el epitelio intestinal del ratón adulto puede ser consecuencia de la inducción de altas respuestas celulares hacia la producción de IgG (aumento de Linfocitos IgG⁺ y aumento en la producción de la inmunoglobulina), mas que un posible efecto directo sobre las células epiteliales, ya que el antígeno puede actuar sobre distintos tipos celulares como macrófagos o células dendríticas, antes de alcanzar el epitelio, además de que fue administrado intraperitonealmente. Aunque la naturaleza de las moléculas que interactúan con las proteínas Cry en los enterocitos de

mamífero parecen ser diferentes a los receptores de naturaleza glicoproteica descrita en los insectos, como la N-aminopeptidasa de 120 kD y la glicoproteína like-cadherina de 210 kD (Bt-R1)[66] pues los receptores no son inhibidos por GalNAc, manosa o biotina. Se requieren estudios mas detallados para determinar los mecanismos que permiten observar los efectos *in vitro* e *in vivo* de pCry1Ac sobre las células epiteliales. También puede ser interesante determinar si con otros antígenos diferentes de pCry también se provoca un aumento de la expresión de IgG y del FcRn sobre el epitelio.

Hasta el momento, no se ha detectado la presencia de receptor FcRn en células epiteliales intestinales de ratón adulto que puede explicar el mecanismo de transporte de la IgG. Nuestros resultados muestran que bajo inducción de la secreción de IgG a nivel intestinal, sí se produce expresión del receptor FcRn en el epitelio de ambos intestinos. Sin embargo, esto no explica como se transporta la IgG trans-epitelialmente en los organismos control donde también se detecta la presencia de IgG tanto en las secreciones como en las células epiteliales intestinales. Por lo que muy probablemente debe existir un mecanismo alternativo de transporte, donde puedan participar otras moléculas como los receptores FcγRII y III para la IgG que son expresados por casi todas las células del sistema inmune (macrófagos, linfocitos, plaquetas, células dendríticas, células NK y granulocitos) así como en ciertos epitelios como el de placenta, hígado e intestino de neonato; tienen varias funciones que van desde la endocitosis, mediadores en la respuesta citotóxica o inflamatoria, regulación del desarrollo de las células B y transcitosis de inmunoglobulinas a nivel placentario y en células transfectadas MDCK [67-71].

El receptor FcγRIII (CD16) interviene en la internalización rápida de los complejos antígeno-anticuerpo y aumenta la eficiencia en la presentación antigénica. Se ha demostrado que este receptor trabaja sinérgicamente con el receptor FcγRII para aumentar las respuestas tales como la fagocitosis [16]. El mecanismo más importante del receptor FcγRII (CD32) es de regular los efectos de los receptores activadores, en este caso, el receptor FcγRIII [29]. Además, se ha confirmado que en ratones deficientes del FcγRII (CD32) se encuentran niveles elevados de IgG que indica que no hay movimiento de la inmunoglobulina en el organismo [16]. Esto último nos sugiere un probable mecanismo de transporte o movilización de la IgG por estos receptores. La presencia de los receptores FcγRII y FcγRIII, (CD32 y CD16 respectivamente) en el epitelio intestinal y su papel como moléculas transportadoras no se ha sugerido, sin embargo, no se puede despreciar la idea de que estos receptores de baja afinidad a la IgG monomérica y que principalmente transportan complejos inmunes, pudiesen participar como transportadores de la IgG o complejos inmunes de IgG presentes en intestino del ratón adulto. En el roedor neonato se ha demostrado que se transportan complejos inmunes en el lumen intestinal de la madre al feto hacia torrente sanguíneo [16],[72]. En el ratón adulto estos receptores, debido a que se co expresan y actúan sinérgicamente [28], pueden ser los encargados del transporte epitelial de la IgG a nivel intestinal, por lo que en este trabajo se analizó su probable función transportadora.

Para detectar los receptores FcγRs se realizó inmuno-histoquímica con peroxidasa en intestinos de neonato (como control positivo) y en adulto, encontrándose reactividad en epitelio intestinal en neonatos y en adultos no inmunizados e inmunizados. Lo anterior confirma su presencia no solo en las células de la estirpe inmune sino también en otros tipos celulares, lo que también sugiere una función a ese nivel. Cuando se realizaron las pruebas de inmunofluorescencia y citometría de estos receptores y de la

IgG, los resultados eran consistentes con la presencia de estas moléculas y su co-localización. Además, por citometría de flujo se observó un aumento en la frecuencia de células positivas a IgG y FcγRII o con FcγRIII con la inmunización con Cry1Ac i.p.

No hay reportes previos de la detección de dichos receptores en epitelio intestinal de ratón adulto, si bien se ha reportado previamente que el receptor FcγRII (CD32) interviene en el movimiento de la IgG [16]. En este trabajo no solo se detecta la co-expresión de los receptores FcγRII y FcγRIII en ratones no estimulados para producir IgG. También se encontraron diferencias en la expresión de estos receptores, el FcγRII (CD32) es más abundante en el intestino grueso, pero en el intestino delgado no, y el FcγRIII (CD16) tiene una abundancia en un rango de un 20-30% en ambos intestinos. Su presencia explicaría el mecanismo de transporte de la IgG presente en las secreciones intestinales detectadas en los ratones control o no inmunizados y la menor proporción de IgG detectada en el intestino grueso quizá sea debida por la mayor cantidad de células que la captan y transportan por el FcγRII (CD32). La inmunización con pCry1Ac produce un incremento en la expresión de ambos receptores en el epitelio intestinal, que además coincide con las grandes cantidades de IgG inducidas por la inmunización, este hecho sugiere que la inducción de la inmunoglobulina va a la par con la de sus receptores y que estos participan como sus moléculas transportadoras. El considerable aumento del receptor FcγRIII (CD16), en ambos intestinos, y su reconocida eficiencia en el transporte de complejos inmunes, aunado con la mayor expresión epitelial del FcγRII (CD32) son evidencias de este probable mecanismo de transporte de la IgG.

El ensayo de inhibición de la captación de la IgG en el que se bloqueo con el anti-CD16 y anti-CD32, indica que la IgG se une a dichos receptores. Estas evidencias en conjunto con las pruebas de transporte en cámaras transwell, sugieren que efectivamente participan en el transporte de la IgG en la mucosa intestinal de ratón adulto. La inhibición del transporte de la IgG, cuando se utilizó la mezcla de ambos receptores, afectó principalmente el paso desde la zona basal a la apical, caso contrario en el neonato donde el transporte de los complejos inmunes de IgG se da de la zona apical a la basal, y de manera individual el bloqueo de FcγRII (anti-CD32) produce mayor inhibición del paso de IgG de la zona basal a la zona apical. Sin embargo, el transporte se ve aún más inhibido cuando se bloquean los dos receptores, lo que indica un sinergismo en el transporte. Las diferencias de expresión de ambas moléculas a nivel intestinal, donde se observa un aumento de ambos en el intestino grueso y solo de FcγRIII en el intestino grueso, es una evidencia más de las diferencias fenotípicas entre ambos intestinos, y quizá el aumento del transporte de la IgG desde la zona basal a la apical indique el transporte de la IgG producida en los linfocitos IgG⁺ de la lamina propia por la acción del antígeno y que posteriormente sea llevada hacia el lumen.

Otro resultado no reportado con anterioridad es la presencia de estos dos receptores en las células epiteliales. Se sabe de su expresión en las células de la estirpe inmune y solo hay un reporte previo de la presencia del FcγRIII (CD16) en el epitelio intestinal y que participa en el transporte de complejos inmunes [16] o que el FcRn expresado en el epitelio intestinal humano transporta complejos inmunes captados por las células dendríticas mucosales [73]. Otros autores describen el reciclamiento de complejos inmunes intactos en las células dendríticas [74]. Se postula que en la superficie celular, el FcγRIIb (CD32) podría unirse a los complejos inmunes, ya una vez internalizados, estos complejos pueden ser transferidos al FcRn en los endosomas y entonces ser

retornados a la superficie celular, donde podrían ser liberados a un pH fisiológico [32]. Este probable mecanismo de transporte de complejos inmunes IgG-antígeno por las células dendríticas a nivel intestinal es considerado en humano, pero se comienza relacionar a los otros receptores Fc para la IgG con respecto a su posible papel en su transporte a nivel intestinal.

La presencia de los receptores Fc γ RII (CD32) y Fc γ RIII (CD16) en ratón, en todas las pruebas de detección utilizadas en este trabajo es muy clara, se observa su presencia en los organismos control y su aumento después de la inmunización. También se muestran evidencias de su posible papel como transportadores a nivel intestinal. Muy probablemente ambos receptores participan en el transporte de la IgG, como una manera complementaria en el ratón neonato y quizá como una única forma de transporte de la IgG a través del epitelio en el ratón adulto que no tiene una inducción de IgG. Su presencia en organismos adultos podría parecer lógica, pues se sabe que en ratón existe una pérdida de expresión o autoregulación del FcRn en el destete [75]. En ratones el FcRn tampoco es detectable en las vías aéreas altas y solo niveles bajos en las células epiteliales alveolares [76]. Estos datos indican las diferencias entre especies y como es el caso a nivel intestinal muy probablemente el Fc γ RII (CD32) y el Fc γ RIII (CD16) también podrían participar en el transporte de IgG a nivel pulmonar en el ratón.

Este trabajo no aclara la presencia de estos receptores en el endotelio, si bien no fue el objetivo principal, su detección a nivel endotelial también sugeriría una vía de transporte más de zonas mucosas a nivel sistémico. La inmuno detección en los lisados epiteliales y la inmunoprecipitación, comprueba que si están unidos a nivel celular, son evidencias que se suman a la muy probable función de transportadores de la IgG a nivel epitelial. Lo anterior indica que los mecanismos de expresión de la IgG y sus moléculas transportadoras no solo involucran cambios en los linfocitos y las células epiteliales, sino que el ambiente necesario para una respuesta mucosa diferente a IgA, que involucra otros tipos celulares y que la respuesta para este isotipo es mas compleja que la considerada respuesta típica de IgA mucosal.

El papel de la IgG en la protección de las mucosas aún esta por determinarse, sin embargo se ha observado la prevención de la infección vaginal o rectal del virus de VIH por la administración intravenosa de la IgG en Macaco rhesus [51];[77] y protección en mucosas por la IgG e IgM contra el virus de influenza en ratones knockout de IgA [52]; [78]. En nuestro laboratorio se observó que el reto en ratones inmunizados intranasalmente con la coadministración de pCry1Ac y lisados de *Naegleria fowleri* se obtiene un 100% de la protección y elevados niveles de IgA e IgG en suero, lavados traqueo-pulmonares y nasales [48]. Además se ha demostrado que la administración oral de inmunoglobulinas produce protección contra la enteritis causada por rotavirus [79] y otras infecciones [80];[81]. En estos reportes se considera que el aumento de la IgG en el organismo, sin importar el origen (endógeno o exógeno), es una alternativa terapéutica importante para enfermedades donde aún la medicina moderna no tiene herramientas adecuadas de manejo. Si consideramos que la pCry 1Ac induce aumento en la producción de IgG en las mucosas y que es un buen adyuvante en los modelos utilizados, se puede considerar un buen candidato para inducir respuestas a patógenos cuya respuesta inmune principal sea IgG y mejorar la calidad en la respuesta inmune protectora, aunque no sea la forma clásica ya establecida. También la protoxina Cry1Ac

puede ser utilizada como una herramienta para caracterizar la inducción de respuestas intestinales IgG.

Finalmente, este reporte presenta aspectos no descritos del sistema inmune de mucosas, como la caracterización de la población de linfocitos B intraepiteliales y de lamina propia del intestino grueso y las modificaciones que presenta cuando se induce una respuesta dirigida hacia la alta producción de IgG. Asimismo, se presentan evidencias de la inducción del receptor FcRn en ratón adulto y la presencia de los receptores Fc γ RII/RIII en epitelio intestinal y su papel como transportadores de la IgG en la mucosa intestinal.

CONCLUSIONES

La administración intraperitoneal de la pCry1Ac en ratones es un buen modelo de inducción de respuesta mucosal de IgG, ya que induce una concentración elevada de IgG intestinal que además es específica y local.

La inducción mucosal de IgG produce a su vez expresión del receptor FcRn en el intestino del ratón adulto.

Se demuestra que hay producción basal de IgG a nivel intestinal.

La presencia basal de IgG indica que existe otro mecanismo de transporte de la IgG en ratones adultos.

Se determinó la presencia de los receptores FcγRII/RIII en epitelio intestinal de ratón adulto.

Se presentan evidencias de que los receptores FcγRII/RIII participan en el transporte de la IgG en el epitelio intestinal.

BIBLIOGRAFIA

1. Brandtzaeg, P., *Molecular and cellular aspects of the secretory immunoglobulin system*. Apmis, 1995. **103**(1): p. 1-19.
2. Wershil, B.K. and G.T. Furuta, *4. Gastrointestinal mucosal immunity*, in *J Allergy Clin Immunol*. 2008. p. S380-3; quiz S415.
3. Rojas, R. and G. Apodaca, *Immunoglobulin transport across polarized epithelial cells*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2002. **3**(12): p. 944-55.
4. Woof, J.M. and J. Mestecky, *Mucosal immunoglobulins*. Immunol Rev, 2005. **206**: p. 64-82.
5. Berneman, A., et al., *The specificity patterns of human immunoglobulin G antibodies in serum differ from those in autologous secretions*. Infect Immun, 1998. **66**(9): p. 4163-8.
6. Bouvet, J.P., N. Decroix, and P. Pamoninlapatham, *Stimulation of local antibody production: parenteral or mucosal vaccination?*, in *Trends Immunol*. 2002. p. 209-13.
7. Yuan, L., et al., *Systematic and intestinal antibody-secreting cell responses and correlates of protective immunity to human rotavirus in a gnotobiotic pig model of disease*. J Virol, 1996. **70**(5): p. 3075-83.
8. Decroix, N., et al., *Induction in mucosa of IgG and IgA antibodies against parenterally administered soluble immunogens*. Scand J Immunol, 2001. **53**(4): p. 401-9.
9. Blumberg, R.S., et al., *A major histocompatibility complex class I-related Fc receptor for IgG on rat hepatocytes*. J Clin Invest, 1995. **95**(5): p. 2397-402.
10. Israel, E.J., et al., *Expression of the neonatal Fc receptor, FcRn, on human intestinal epithelial cells*. Immunology, 1997. **92**(1): p. 69-74.
11. Martin, M.G., S.V. Wu, and J.H. Walsh, *Ontogenetic development and distribution of antibody transport and Fc receptor mRNA expression in rat intestine*. Dig Dis Sci, 1997. **42**(5): p. 1062-9.
12. Kacs Kovics, I., et al., *Cloning and characterization of the bovine MHC class I-like Fc receptor*. J Immunol, 2000. **164**(4): p. 1889-97.
13. Kobayashi, N., et al., *FcRn-mediated transcytosis of immunoglobulin G in human renal proximal tubular epithelial cells*. Am J Physiol Renal Physiol, 2002. **282**(2): p. F358-65.
14. Schnulle, P.M. and W.L. Hurley, *Sequence and expression of the FcRn in the porcine mammary gland*. Vet Immunol Immunopathol, 2003. **91**(3-4): p. 227-31.
15. Spiekermann, G.M., et al., *Receptor-mediated immunoglobulin G transport across mucosal barriers in adult life: functional expression of FcRn in the mammalian lung*. J Exp Med, 2002. **196**(3): p. 303-10.
16. Raghavan, M. and P.J. Bjorkman, *Fc receptors and their interactions with immunoglobulins*. Annu Rev Cell Dev Biol, 1996. **12**: p. 181-220.
17. Daeron, M., *Fc receptor biology*. Annu Rev Immunol, 1997. **15**: p. 203-34.
18. Dickinson, B.L., et al., *Bidirectional FcRn-dependent IgG transport in a polarized human intestinal epithelial cell line*. J Clin Invest, 1999. **104**(7): p. 903-11.
19. Simister, N.E. and K.E. Mostov, *An Fc receptor structurally related to MHC class I antigens*. Nature, 1989. **337**(6203): p. 184-7.

20. Townsend, A. and H. Bodmer, *Antigen recognition by class I-restricted T lymphocytes*. Annu Rev Immunol, 1989. **7**: p. 601-24.
21. Abrahamson, D.R., A. Powers, and R. Rodewald, *Intestinal absorption of immune complexes by neonatal rats: a route of antigen transfer from mother to young*. Science, 1979. **206**(4418): p. 567-9.
22. Simister, N.E. and K.E. Mostov, *Cloning and expression of the neonatal rat intestinal Fc receptor, a major histocompatibility complex class I antigen homolog*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 1989. **54 Pt 1**: p. 571-80.
23. Roopenian, D.C. and S. Akilesh, *FcRn: the neonatal Fc receptor comes of age*. Nat Rev Immunol, 2007. **7**(9): p. 715-25.
24. Ellinger, I., et al., *Apical to basolateral transcytosis and apical recycling of immunoglobulin G in trophoblast-derived BeWo cells: effects of low temperature, nocodazole, and cytochalasin D*. Exp Cell Res, 2001. **269**(2): p. 322-31.
25. Mayer, B., et al., *Redistribution of the sheep neonatal Fc receptor in the mammary gland around the time of parturition in ewes and its localization in the small intestine of neonatal lambs*. Immunology, 2002. **107**(3): p. 288-96.
26. Zhu, X., et al., *MHC class I-related neonatal Fc receptor for IgG is functionally expressed in monocytes, intestinal macrophages, and dendritic cells*. J Immunol, 2001. **166**(5): p. 3266-76.
27. van Royen-Kerkhof, A., et al., *Flow cytometric determination of FcgammaRIIa (CD32) polymorphism*. J Immunol Methods, 2004. **294**(1-2): p. 135-44.
28. Ravetch, J.V. and S. Bolland, *IgG Fc receptors*. Annu Rev Immunol, 2001. **19**: p. 275-90.
29. Li, X., et al., *Fcgamma receptors: structure, function and role as genetic risk factors in SLE*. Genes Immun, 2009. **10**(5): p. 380-9.
30. Willcocks, L.C., K.G. Smith, and M.R. Clatworthy, *Low-affinity Fcgamma receptors, autoimmunity and infection*. Expert Rev Mol Med, 2009. **11**: p. e24.
31. Mechetina, L.V., et al., *Identification of CD16-2, a novel mouse receptor homologous to CD16/Fc gamma RIII*. Immunogenetics, 2002. **54**(7): p. 463-8.
32. Dhodapkar, K.M., et al., *Selective blockade of the inhibitory Fcgamma receptor (FcgammaRIIB) in human dendritic cells and monocytes induces a type I interferon response program*. J Exp Med, 2007. **204**(6): p. 1359-69.
33. Nimmerjahn, F., et al., *FcgammaRIV: a novel FcR with distinct IgG subclass specificity*. Immunity, 2005. **23**(1): p. 41-51.
34. Nimmerjahn, F. and J.V. Ravetch, *Fcgamma receptors: old friends and new family members*. Immunity, 2006. **24**(1): p. 19-28.
35. Jakus, Z., et al., *Critical but overlapping role of FcgammaRIII and FcgammaRIV in activation of murine neutrophils by immobilized immune complexes*. J Immunol, 2008. **180**(1): p. 618-29.
36. Hofte, H. and H.R. Whiteley, *Insecticidal crystal proteins of Bacillus thuringiensis*. Microbiol Rev, 1989. **53**(2): p. 242-55.
37. Knight, P.J., N. Crickmore, and D.J. Ellar, *The receptor for Bacillus thuringiensis CryIA(c) delta-endotoxin in the brush border membrane of the lepidopteran Manduca sexta is aminopeptidase N*. Mol Microbiol, 1994. **11**(3): p. 429-36.
38. Bernstein, I.L., et al., *Immune responses in farm workers after exposure to Bacillus thuringiensis pesticides*. Environ Health Perspect, 1999. **107**(7): p. 575-82.

39. Betz, F.S., B.G. Hammond, and R.L. Fuchs, *Safety and advantages of Bacillus thuringiensis-protected plants to control insect pests*. Regul Toxicol Pharmacol, 2000. **32**(2): p. 156-73.
40. Ge, A.Z., R.M. Pfister, and D.H. Dean, *Hyperexpression of a Bacillus thuringiensis delta-endotoxin-encoding gene in Escherichia coli: properties of the product*. Gene, 1990. **93**(1): p. 49-54.
41. Schroder, M., et al., *A 90-day safety study of genetically modified rice expressing CryIAb protein (Bacillus thuringiensis toxin) in Wistar rats*. Food Chem Toxicol, 2007. **45**(3): p. 339-49.
42. Siegel, J.P., *The mammalian safety of Bacillus thuringiensis-based insecticides*. J Invertebr Pathol, 2001. **77**(1): p. 13-21.
43. Prasad, S.S. and Y.I. Shethna, *Enhancement of immune response by the proteinaceous crystal of Bacillus thuringiensis var thuringiensis*. Biochem Biophys Res Commun, 1975. **62**(3): p. 517-23.
44. Moreno-Fierros, L., et al., *Intranasal, rectal and intraperitoneal immunization with protoxin CryIAc from Bacillus thuringiensis induces compartmentalized serum, intestinal, vaginal and pulmonary immune responses in Balb/c mice*. Microbes Infect, 2000. **2**(8): p. 885-90.
45. Vazquez, R.I., et al., *Bacillus thuringiensis CryIAc protoxin is a potent systemic and mucosal adjuvant*. Scand J Immunol, 1999. **49**(6): p. 578-84.
46. Vazquez-Padron, R.I., et al., *Intragastric and intraperitoneal administration of CryIAc protoxin from Bacillus thuringiensis induces systemic and mucosal antibody responses in mice*. Life Sci, 1999. **64**(21): p. 1897-912.
47. Esquivel-Perez, R. and L. Moreno-Fierros, *Mucosal and systemic adjuvant effects of cholera toxin and CryIAc 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**(4): p. 695-708.
48. Rojas-Hernandez, S., et al., *Intranasal coadministration of the CryIAc protoxin with amoebal lysates increases protection against Naegleria fowleri meningoencephalitis*. Infect Immun, 2004. **72**(8): p. 4368-75.
49. Woof, J.M. and M.A. Kerr, *The function of immunoglobulin A in immunity*. J Pathol, 2006. **208**(2): p. 270-82.
50. Robert-Guroff, M., *IgG surfaces as an important component in mucosal protection*. Nat Med, 2000. **6**(2): p. 129-30.
51. Baba, T.W., et al., *Human neutralizing monoclonal antibodies of the IgG1 subtype protect against mucosal simian-human immunodeficiency virus infection*. Nat Med, 2000. **6**(2): p. 200-6.
52. Mbawuike, I.N., et al., *Mucosal immunity to influenza without IgA: an IgA knockout mouse model*. J Immunol, 1999. **162**(5): p. 2530-7.
53. Johansen, F.E., et al., *Absence of epithelial immunoglobulin A transport, with increased mucosal leakiness, in polymeric immunoglobulin receptor/secretory component-deficient mice*. J Exp Med, 1999. **190**(7): p. 915-22.
54. Ghetie, V., et al., *Abnormally short serum half-lives of IgG in beta 2-microglobulin-deficient mice*. Eur J Immunol, 1996. **26**(3): p. 690-6.
55. Yoshida, M., et al., *Neonatal Fc receptor for IgG regulates mucosal immune responses to luminal bacteria*. J Clin Invest, 2006. **116**(8): p. 2142-2151.
56. Yoshida, M., et al., *IgG transport across mucosal barriers by neonatal Fc receptor for IgG and mucosal immunity*. Springer Semin Immunopathol, 2006. **28**(4): p. 397-403.

57. Parr, E.L. and M.B. Parr, *Immunoglobulin G is the main protective antibody in mouse vaginal secretions after vaginal immunization with attenuated herpes simplex virus type 2*. J Virol, 1997. **71**(11): p. 8109-15.
58. Gallichan, W.S. and K.L. Rosenthal, *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**(16): p. 1589-95.
59. Russell, M.W., et al., *Salivary, nasal, genital, and systemic antibody responses in monkeys immunized intranasally with a bacterial protein antigen and the Cholera toxin B subunit*. Infect Immun, 1996. **64**(4): p. 1272-83.
60. VanCott, J.L., et al., *Contribution of antibody-secreting cells induced in mucosal lymphoid tissues of pigs inoculated with respiratory or enteric strains of coronavirus to immunity against enteric coronavirus challenge*. J Immunol, 1994. **152**(8): p. 3980-90.
61. de Arriba, M.L., et al., *Mucosal and systemic isotype-specific antibody responses and protection in conventional pigs exposed to virulent or attenuated porcine epidemic diarrhoea virus*. Vet Immunol Immunopathol, 2002. **85**(1-2): p. 85-97.
62. Moreno-Fierros, L., M.C. Dominguez-Robles, and F. Enriquez-Rincon, *Entamoeba histolytica: induction and isotype analysis of antibody producing cell responses in Peyer's patches and spleen after local and systemic immunization in male and female mice*. Exp Parasitol, 1995. **80**(3): p. 541-9.
63. Buonaguro, L., et al., *Induction of systemic and mucosal cross-clade neutralizing antibodies in BALB/c mice immunized with human immunodeficiency virus type 1 clade A virus-like particles administered by different routes of inoculation*. J Virol, 2005. **79**(11): p. 7059-67.
64. Singh, M., et al., *Induction of systemic and mucosal immune response in mice immunised with porins of Salmonella typhi*. J Med Microbiol, 1999. **48**(1): p. 79-88.
65. Resendiz-Albor, A.A., et al., *Striking phenotypic and functional differences in lamina propria lymphocytes from the large and small intestine of mice*. Life Sci, 2005. **76**(24): p. 2783-803.
66. Nagamatsu, Y., et al., *The cadherin-like protein is essential to specificity determination and cytotoxic action of the Bacillus thuringiensis insecticidal CryIAa toxin*. FEBS Lett, 1999. **460**(2): p. 385-90.
67. Gafencu, A., et al., *Investigation of IgG receptors expressed on the surface of human placental endothelial cells*. Placenta, 2003. **24**(6): p. 664-76.
68. Hunziker, W. and I. Mellman, *Expression of macrophage-lymphocyte Fc receptors in Madin-Darby canine kidney cells: polarity and transcytosis differ for isoforms with or without coated pit localization domains*. J Cell Biol, 1989. **109**(6 Pt 2): p. 3291-302.
69. Koyama, M., et al., *Differential mRNA expression of three distinct classes of Fc gamma receptor at the feto-maternal interface*. J Reprod Immunol, 1991. **20**(2): p. 103-13.
70. Lyden, T.W., et al., *The Fc receptor for IgG expressed in the villus endothelium of human placenta is Fc gamma RIIb2*. J Immunol, 2001. **166**(6): p. 3882-9.
71. Unkeless, J.C., E. Scigliano, and V.H. Freedman, *Structure and function of human and murine receptors for IgG*. Annu Rev Immunol, 1988. **6**: p. 251-81.

72. Peppard, J.V., et al., *The transfer of immune complexes from the lumen of the small intestine to the bloodstream in sucking rats*. Immunology, 1984. **53**(2): p. 385-93.
73. Yoshida, M., et al., *Human neonatal Fc receptor mediates transport of IgG into luminal secretions for delivery of antigens to mucosal dendritic cells*. Immunity, 2004. **20**(6): p. 769-83.
74. Bergtold, A., et al., *Cell surface recycling of internalized antigen permits dendritic cell priming of B cells*. Immunity, 2005. **23**(5): p. 503-14.
75. Israel, E.J., et al., *Requirement for a beta 2-microglobulin-associated Fc receptor for acquisition of maternal IgG by fetal and neonatal mice*. J Immunol, 1995. **154**(12): p. 6246-51.
76. Akilesh, S., et al., *Neonatal FcR expression in bone marrow-derived cells functions to protect serum IgG from catabolism*. J Immunol, 2007. **179**(7): p. 4580-8.
77. Mascola, J.R., et al., *Protection of macaques against vaginal transmission of a pathogenic HIV-1/SIV chimeric virus by passive infusion of neutralizing antibodies*. Nat Med, 2000. **6**(2): p. 207-10.
78. O'Neal, C.M., G.R. Harriman, and M.E. Conner, *Protection of the villus epithelial cells of the small intestine from rotavirus infection does not require immunoglobulin A*. J Virol, 2000. **74**(9): p. 4102-9.
79. Guarino, A., et al., *Passive immunotherapy for rotavirus-induced diarrhoea in children with HIV infection*. Aids, 1996. **10**(10): p. 1176-8.
80. Eibl, M.M., *History of immunoglobulin replacement*. Immunol Allergy Clin North Am, 2008. **28**(4): p. 737-64, viii.
81. Israel, Z.R., et al., *Incomplete protection, but suppression of virus burden, elicited by subunit simian immunodeficiency virus vaccines*. J Virol, 1994. **68**(3): p. 1843-53.