

Tesis de Posgrado

Inducción, producción y mantenimiento de la respuesta inmune sistémica por inmunización oral

Benedetti, Rubén Mariano

2003

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Benedetti, Rubén Mariano. (2003). Inducción, producción y mantenimiento de la respuesta inmune sistémica por inmunización oral. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3631_Benedetti.pdf

Cita tipo Chicago:

Benedetti, Rubén Mariano. "Inducción, producción y mantenimiento de la respuesta inmune sistémica por inmunización oral". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2003.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3631_Benedetti.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

**INDUCCIÓN, PRODUCCIÓN Y MANTENIMIENTO
DE LA RESPUESTA INMUNE SISTÉMICA POR
INMUNIZACIÓN ORAL**

Autor: Rubén Mariano Benedetti

Tesis para optar al título de
Doctor de la Universidad de Buenos Aires

Director: Juan Fló

Laboratorio de Inmunoquímica
Departamento de Química Biológica
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

3631

Año 2003

*"y temía así quedar completamente ciego del alma,
al mirar las cosas con los ojos..."*
Platón, *Fedón*.

Eggers Lan, Conrado.
El "Fedón" de Platón, estudio y notas. 5ª ed.
Buenos Aires, EUDEBA, 1993.

Agradecimientos

A Juan Fló, que confió en mí, me dió tantas oportunidades y me dirigió con enorme buena voluntad y disposición.

A Ernesto J Massouh que me aceptó en el Laboratorio de Inmunoquímica y actuó como Director Asistente de esta tesis.

A lo integrantes de Inmunoquímica, a los que están y a los que ya no están en el laboratorio, quienes siempre crearon un ambiente de sincero compañerismo y de estímulo al trabajo: Cati, quien me ayudó tanto con sus saberes; Hebe, que transmite tanta paz; Guillermo, con su excelente asistencia técnica; Fernanda, con su dinamismo y deseos de saber; Fabián, con quien estoy en deuda; Liliana, a quien le envidio su actitud hacia la vida; Nilda, con su invaluable ayuda; Jimena, con su bondad y Paola y Santiago, que ya no están pero los recuerdo.

A la Dra. M. Estela Roux quien acercó inicialmente el tema de la inmunología de las mucosas al laboratorio.

Al personal docente y no docente de Cs. Exactas, especialmente del Dpto. de Química Biológica cuyo trabajo (generalmente poco recompensado) mantiene en pie a la Institución.

Estas menciones por breves son injustas y quedaron muchas personas sin nombrar pero la lista completa sería muy larga.

Índice

	Pag.
Publicaciones a las que dio lugar este trabajo	8
Abreviaturas	9
Resúmen / Summary	11
INTRODUCCIÓN	14
A. El sistema inmune de las mucosas	15
A.1. Breve reseña con especial énfasis en el intestino	15
A.2. Anatomía y fisiología del GALT	17
A.2.1. Generalidades	17
A.2.2. Sitios inductores y efectores	18
A.2.3. Transporte y presentación del antígeno en los sitios inductores	18
A.2.4. Respuesta de células B, centros germinales	21
A.2.5. Respuesta de células T	22
A.2.6. Sitios efectores	23
A.2.7. Conmutación al isotipo IgA	24
A.3. Inmunobiología de la IgA	24
A.4. Células B de tipo 1 (B1) y anticuerpos SIgA "naturales"	27
A.5. Tolerancia oral	28
A.5.1. Células T regulatorias	30
A.5.2. Células T CD8 ⁺ supresoras/regulatorias	31
A.5.3. Anergia y delección	31
B. La toxina colérica, potente antígeno y adyuvante oral	32
C. Evidencias de que el sistema inmune de mucosas no es una unidad uniforme ni aislada	34
C.1. Compartimentación del MALT	34
C.2. El sistema inmune de las mucosas como parte del sistema inmune de todo el organismo	37
C.3. La producción sistémica de anticuerpos por inmunización oral	38
C.4. La producción de anticuerpos en la médula ósea	39
C.4.1. La médula ósea como órgano productor de anticuerpos	39
C.4.2. Las CSA de médula ósea provienen de células B migrantes de los centros germinales	42
C.4.3. El tráfico (<i>homing</i>) linfocitario hacia la médula ósea	43
C.4.4. La producción de anticuerpos en la médula ósea por inmunización oral	44
OBJETIVOS	46

MATERIALES Y METODOS	48
D.1. <u>Animales</u>	49
D.2. <u>Esquemas experimentales de inmunización</u>	49
D.2.1. <u>Inmunización intra-placas de Peyer (ipP)</u>	49
D.2.2. <u>Una, dos o tres dosis por vía intragástrica (ig)</u>	49
D.2.3. <u>Cinética de los primeros días de la respuesta hacia una dosis ig</u>	50
D.2.4. <u>Respuesta anamnésica en una inmunización oral</u>	50
D.2.5. <u>Cinética de la respuesta a largo plazo luego de tres dosis ig</u>	50
D.2.6. <u>Respuesta anamnésica luego de tres dosis ig</u>	51
D.2.7. <u>Inmunizaciones ig en ratas a las que se les extirpó el bazo</u>	51
D.2.8. <u>Estudios de transferencia adoptiva de memoria</u>	51
D.3. <u>Administración de antígeno</u>	52
D.3.1. <u>Inoculación ipP</u>	52
D.3.2. <u>Inoculación ig</u>	53
D.4. <u>Extracción de fluido intestinal</u>	53
D.5. <u>Preparación de suspensiones celulares de órganos linfáticos</u>	54
D.5.1. <u>Células de placas de Peyer</u>	54
D.5.2. <u>Células de la lámina propia del intestino delgado</u>	55
D.5.3. <u>Células del ganglio mesentérico</u>	57
D.5.4. <u>Células del bazo</u>	57
D.5.5. <u>Células de la médula ósea del fémur</u>	58
D.6. <u>Ensayo de ELISA spot (ELISPOT) para cuantificar CSA anti-toxina colérica</u>	59
D.6.1. <u>Cálculo del número total de CSA antitoxina por órgano</u>	62
D.7. <u>Ensayo de ELISA para determinar los niveles de anticuerpos anti-toxina colérica</u>	62
D.8. <u>Cultivos primarios de células de órganos linfáticos</u>	65
D.8.1. <u>Cultivos con bloqueo de la presentación antigénica vía el MHC Clase II</u>	65
D.8.2. <u>Cultivos en ausencia de células adherentes</u>	65
D.9. <u>Eliminación de las células B y T por inmunocitoaderencia (<i>panning</i>)</u>	66
D.10. <u>Esplenectomías</u>	67
D.11. <u>Cuantificación de poblaciones celulares por citometría de flujo</u>	68
D.11.1. <u>Análisis de linfocitos T y B en médula ósea de rata adulta</u>	68
D.11.2. <u>Análisis de la contaminación con linfocitos T o B en las poblaciones depletadas por inmunocitoaderencia</u>	69
D.12. <u>Determinación de la permanencia de complejos antígeno-anticuerpo en órganos linfáticos secundarios</u>	69
D.13. <u>Análisis estadístico</u>	70
D.14. <u>Medios, buffers y otras soluciones</u>	71

RESULTADOS	75
E.1. <u>CSA antitoxina en médula ósea por inmunización en la mucosa intestinal</u>	76
E.1.1. <u>Rápida aparición y acumulación de CSA antitoxina en médula ósea luego de inmunizaciones intragástricas</u>	76
E.1.2. <u>Una única inmunización directa en las placas de Peyer genera CSA antitoxina en médula ósea</u>	77
E.1.3. <u>La aparición de células plasmáticas en médula ósea no decae con la edad</u>	82
E.1.4. <u>La médula ósea tiende a acumular CSA del isotipo IgA luego de una acumulación ipP</u>	85
E.2. <u>En la etapa más temprana de la inmunización oral con toxina colérica se produce una presentación directa en el bazo</u>	86
E.2.1. <u>En el bazo se produce la más rápida aparición de CSA con una inmunización oral y esta rápida respuesta es rica en IgM</u>	86
E.2.2. <u>La cinética de anticuerpos antitoxina en suero y fluido intestinal sigue en forma coherente a la aparición de CSA</u>	91
E.2.3. <u>Los precursores de CSA antitoxina aparecen en bazo antes que en ganglio mesentérico luego de la inmunización ig</u>	91
E.2.4. <u>Presentación <i>in situ</i> en el bazo luego de una inmunización oral con toxina colérica</u>	93
E.2.5. <u>El bazo no es un eslabón en la cadena de eventos que llevan a la aparición de CSA en médula ósea pero sí es sitio de paso al ganglio mesentérico</u>	95
E.3. <u>Respuesta de memoria en el GALT y en el bazo</u>	98
E.3.1. <u>La respuesta secundaria en el GALT posee las características de la memoria clásica: mayor rapidez y expansión</u>	98
E.3.2. <u>Presentación <i>in situ</i> de la toxina colérica en el bazo durante un desafío oral</u>	99
E.3.3. <u>La cinética de los anticuerpos antitoxina en suero e intestino va en paralelo con la de CSA</u>	102
E.4. <u>Importancia fundamental de la médula ósea para mantener la inmunidad a nivel sistémico con una inmunización oral</u>	105
E.4.1. <u>La médula ósea es el único órgano sistémico que sintetiza anticuerpos a largo plazo luego de una inmunización oral</u>	105
E.4.2. <u>La médula ósea es el principal órgano que produce anticuerpos circulantes luego de una inmunización oral</u>	108
E.4.3. <u>La médula ósea mantiene a largo plazo la acumulación preferencial de CSA de clase IgA</u>	112
E.4.4. <u>Los anticuerpos antitoxina en suero y lavado intestinal permanecieron por largo plazo con una inmunización ig</u>	114
E.5. <u>La médula ósea es órgano clave para el mantenimiento de la producción de anticuerpos pero no para la inducción de la respuesta de memoria</u>	116
E.5.1. <u>La memoria cuando el único órgano sistémico con CSA es la médula ósea: rápida activación del ganglio mesentérico</u>	116
E.5.2. <u>La médula ósea es el principal contribuyente de anticuerpos circulantes durante la respuesta de memoria ante un desafío oral</u>	118
E.5.3. <u>Los títulos de anticuerpos antitoxina de la respuesta de memoria</u>	

	<u>están lnea con la aparición de las CSA</u>	120
E.5.4.	<u>Ensayos de transferencia adoptiva: ganglio mesentérico y bazo poseen los mayores números de células de memoria</u>	122
E.5.5.	<u>El conjunto de células de memoria contiene células B y T</u>	125
	<u>DISCUSION</u>	130
F.	<u>La médula ósea y la respuesta inmune de mucosas</u>	131
F.1.	<u>La médula ósea, principal productor parenteral de anticuerpos por inmunización en el intestino</u>	132
F.2.	<u>La médula ósea como órgano del sistema inmune asociado a mucosas</u>	134
F.3.	<u>Migración de células B a médula ósea</u>	135
G.	<u>Presentación directa de la toxina colérica en bazo por administración oral</u>	137
G.1.	<u>Poblamiento del ganglio mesentérico pero no de la médula ósea por las CSA originadas en el bazo</u>	139
H.	<u>IgA antitoxina en la mucosa intestinal</u>	140
I.	<u>La cuestión de las células plasmáticas detectadas a largo plazo</u>	141
I.1.	<u>"Memoria de anticuerpos" dependiente de antígeno</u>	142
I.2.	<u>Crítica a la hipótesis de la persistencia del antígeno</u>	145
I.3.	<u>"Memoria de anticuerpos" independiente de antígeno</u>	146
I.4.	<u>Críticas a la hipótesis de la independencia del antígeno</u>	147
I.5.	<u>Las células plasmáticas de larga vida</u>	148
I.6.	<u>El sentido evolutivo de las células plasmáticas de larga vida</u>	150
J.	<u>La memoria B en la inmunización oral</u>	151
J.1.	<u>Los órganos de la memoria B en la inmunización oral con toxina colérica</u>	155
J.2.	<u>Rol de la médula ósea en la respuesta de memoria por desafío oral</u>	157
J.3.	<u>Memoria de células B y T en el modelo de mucosas</u>	158
J.4.	<u>El aporte fisiológico de dos mecanismos</u>	160
	<u>CONCLUSIONES</u>	162
	<u>BIBLIOGRAFIA</u>	164

Publicaciones a las que dio lugar este trabajo

Parte de los resultados que se incluyen en esta tesis fueron previamente publicados en:

- 1 The bone marrow as a site of antibody production after a mucosal immunization. Benedetti R, Massouh E, Fló J. Immunology Letters, 48: 109-115. 1995.
- 2 Oral administration of one dose of cholera toxin induces a systemic immune response prior to a mucosal immune response by a direct presentation in the spleen. Benedetti R, Lev P, Massouh E and Fló J. Immunology Letters, 60: 149-156. 1998.
- 3 Long term antibodies after an oral immunization with cholera toxin are synthesized in the bone marrow and may play a role in the regulation of memory B cell maintenance at systemic and mucosal sites. Benedetti R, Lev P, Massouh E y Fló J. Research in Immunology, 149: 107-118. 1998.

Abreviaturas

Nota aclaratoria: En muchos casos se ha optado por utilizar a la abreviatura del idioma inglés debido que su uso está muy extendido y se facilita la lectura. Algunas abreviaturas muy comunes como las de las distintas clases de inmunoglobulinas, citoquinas y quimiocinas, han sido omitidas de esta lista.

Abr. ingl.	Abreviatura en el idioma inglés
BI (células)	Linfocitos B (Bursa-equivalente) de tipo I
BALT	Abr. ingl. de Tejido linfoide asociado a los bronquios
Bcl-2	Proteína codificada por el proto-oncogen bcl-2 (leucemia/linfoma de célula B tipo 2)
BCR	Receptor (de antígeno) de linfocitos B
BSA	Abr. ingl. de Albúmina de suero bovina
BFS	Abr. ingl. de Bacterias filamentosas segmentadas
Bz	Bazo
cadena H o L	Cadenas pesadas o livianas de inmunoglobulinas
CFTR	Abr. ingl. de Regulador de conductancia en transmembrana de fibrosis cística
CH (genes)	Abr. ingl. de los Genes de cadena pesada de las inmunoglobulinas
CSA	Células secretoras de anticuerpos (plasmáticas)
CT-A	Abr. ingl. de Subunidad A de la toxina colérica
CT-B	Abr. ingl. de Subunidad B de la toxina colérica
CTL	Abr. ingl. de Linfocitos T citotóxicos
CTLA-4	Abr. ingl. de Proteína asociada a CTL 4 (CD152)
dpd	días post-desafío
dpi	días post-inmunización
DS	Desvío estándar
DSE	Abr. ingl. de Domo subepitelial
DTH	Abr. ingl. de Hipersensibilidad de tipo retrasada
DTT	Ditiotreitol
EAF	Epitelio asociado al folículo
ELISA	Abr. ingl. de Ensayo inmuno-enzimático adsorbido a una superficie
ELISPOT	Abr. ingl. de ELISA en puntos (o focos)
ES	Error estándar
f. i.	Fluido intestinal
Fc	Fracción cristalizante de la inmunoglobulina
FcRn	Abr. ingl. de Receptor del Fc de IgA del intestino de rata neonata
FcαRI	Abr. ingl. de Receptor de Fc de cadena alfa de tipo I
FcαRIIB	Receptor de la porción Fc de cadena gama de inmunoglobulina de tipo 2B
FDC	Abr. ingl. de Células dendríticas foliculares
FITC	Abr. ingl. de Isotiocianato de Fluoresceína
GALT	Abr. ingl. de Tejido linfoide asociado al intestino
genes V	genes de la región variable de las cadenas (pesadas y livianas) de las inmunoglobulinas
GM	Ganglio mesentérico
HLA-DR	Abr. ingl. de Genes de linfocitos humanos 2 (MHC humano) relacionados al locus D
IEL	Abr. ingl. de Linfocitos intra-epiteliales
ig	Intragástrica
IgAm	Inmunoglobulina A monomérica
IgAp	Inmunoglobulina A polimérica

IgH (genes)	Abr. ingl. de Genes de cadenas pesadas de las inmunoglobulinas
IL-7R	Abr. ingl. de Receptor de interleuquina 7
int.	Intermedio
ipP	Intra-placas de Peyer
J (cadena)	Cadena de unión en las inmunoglobulinas poliméricas
LCMV	Abr. ingl. de Virus de la coriomeningitis linfocitaria
LPS	Lipopolisacárido
M (células)	Células con microvelocidades
MALT	Abr. ingl. de Tejido linfoide asociado a las mucosas
MHC I/II	Abr. ingl. de Complejo mayor de histocompatibilidad de tipo 1 o 2
n. d.	no determinado
NALT	Abr. ingl. de Tejido linfoide asociado a la mucosa nasal
OPD	orto-fenilendiamina
OVA	Abr. ingl. de Albúmina de huevo de gallina
PGE2	Prostaglandina tipo E2
pIgR	Abr. ingl. de Receptor de inmunoglobulinas poliméricas
PBS	Abr. ingl. de Buffer fosfato salino (según Dulbecco)
PMSF	Abr. ingl. de Fluoruro de fenil metil sulfónico
PNA	Abr. ingl. de Aglutinina de maní
PP	Placas de Peyer
PPD	para-fenilendiamina
PWM	Abr. ingl. de Mitógeno de la Fitolaca
Ref./Refs.	Referencia o Referencias
RIF	Región interfolicular
SIgA	Abr. ingl. de Inmunoglobulina A secretoria
SIgD	Abr. ingl. de Inmunoglobulina D secretoria
SIgM	Abr. ingl. de Inmunoglobulina M secretoria
TCR	Abr. ingl. de Receptor de linfocito T (madurado en el timo)
TGF- β	Abr. ingl. de Factor de crecimiento transformante tipo beta
Th1/Th2	Abr. ingl. de Linfocitos T colaboradores de tipo 1 o 2
Th3	Abr. ingl. de Linfocitos T colaboradores tipo 3
TNF- α	Abr. ingl. de Factor de necrosis tumoral tipo alfa
Tr1	Abr. ingl. de Linfocitos T regulatorios tipo 1
VIP	Abr. ingl. de Péptido intestinal vasoactivo
VPG	Abr. ingl. de Proteína viral de Rotavirus (cápside)
vs	Abr. ingl. de <i>Versus</i> (contra)

RESUMEN / SUMMARY

Resumen

Tradicionalmente se pensaba que las mucosas poseían un sistema inmune propio y común con pocos puntos de contacto con el resto del sistema inmune. Esto se fundamentaba en que las mucosas se caracterizan por (1) el predominio de la IgA, (2) la dificultad de obtener respuesta inmune en las mucosas con una inmunización sistémica y (3) que con una inmunización por una mucosa es posible dar protección en otras mucosas distantes.

Con posterioridad, se encontraron varias interacciones entre los tejidos linfoides de las mucosas y los sistémicos que llevan a pensar que en realidad no hay una clara separación en dos sistemas inmunes, sino que constituyen una unidad. El fenómeno de la tolerancia oral, la posibilidad (en algunos casos) de inducir la respuesta inmune sistémica por inmunización por la vía de las mucosas y el transporte hepatobiliar de IgA polimérica desde el suero al intestino son ejemplos de esa comunicación.

Otra conexión posible es que la médula ósea reciba células productoras de anticuerpos luego de una inmunización sistémica. Es bien conocido que en la médula ósea aparecen células plasmáticas luego de una inmunización sistémica. La médula ósea es el principal productor de anticuerpos en la respuesta secundaria. Pese a esto, no era claro si una inmunización por las mucosas podía llevar a que la médula ósea se convierta en productora de anticuerpos específicos.

En este trabajo efectuamos inmunizaciones orales (intragástricas e intra-placas de Peyer) utilizando toxina colérica, uno de los más potentes antígenos y adyuvante por las mucosas, para observar la cinética de aparición de las células plasmáticas antitoxina en el intestino, el bazo y la médula ósea. También observamos la respuesta de memoria.

En estas condiciones encontramos que:

- Tanto durante el primado como en la memoria, en la médula ósea aparecen células plasmáticas y este es el principal órgano productor de anticuerpos destinados a la circulación sanguínea.
- La médula ósea es, además, el único órgano que mantiene células secretoras de anticuerpos muchos meses después de la inmunización oral, cuando consideramos que ya no queda antígeno en el organismo.
- Existe una muy temprana presentación antigénica en el bazo, paralela a la que ocurre en el intestino.
- La médula ósea posee linfocitos T y B de memoria, aunque el ganglio mesentérico y el bazo tienen mayor concentración de células de memoria.

Todas estas observaciones contribuyen al mejor conocimiento de la amplia comunicación entre el llamado sistema inmune de las mucosas y el central y sostienen la idea de la unidad del sistema inmune.

Summary

Traditionally it was thought that the mucosae had a common immune system with few meeting points with the rest of the immune system. This was based on that the mucosae are characterized by (1) the predominance of the IgA, (2) the difficulty to obtain immune response in the mucosae with a systemic immunization and (3) that with a mucosal immunization is possible to give protection in other distant mucosae.

Later, several interactions between the mucosal and systemic lymphoid tissues were found which led to think that in fact there is no clear separation between the two immune systems, but that they constitute a unit. The phenomenon of oral tolerance, the possibility (in some cases) of inducing a systemic immune response by immunization by the route of the mucosae and hepatobiliary transport of polymeric IgA from serum to intestine are examples of that communication.

Another possible connection is that the bone marrow receives antibody producing cells after a systemic immunization. It is well known that in the bone marrow plasma cells appear after a systemic immunization. The bone marrow is the main antibody producing site in the secondary response. In spite of this, it was not clear whether an immunization by the mucosae could make the bone marrow become a producer of specific antibodies.

In this work we carried out oral immunizations (intra-gastric and intra-Peyer patches) using cholera toxin, one of the most powerful antigens and adjuvant by the mucosae, to observe the kinetics of appearance of the antitoxin plasma cells in the intestine, spleen and bone marrow. We also observed the memory response.

In these conditions we found that:

- During the priming as well as during the memory, plasma cells appear in the bone marrow and this is the main organ producing antibodies destined to blood circulation.
- The bone marrow is, in addition, the only organ that maintains antibody secreting cells many months after oral immunization, when we consider there is no more antigen left in the organism.
- A very early antigenic presentation in spleen exists, parallel but independent from what happens in the intestine.
- The bone marrow does have memory T and B cells, although the mesenteric lymph node and spleen have greater concentrations of memory cells.

All these observations contribute to the best knowledge of the extensive communication between the so called mucosal immune system and the central immune system and support the idea of the unit of the immune system.

INTRODUCCIÓN

A. EL SISTEMA INMUNE DE LAS MUCOSAS

A.1. Breve reseña con especial énfasis en el intestino

En los vertebrados un gran intercambio de materia y la mayor interacción con moléculas del ambiente externo se realiza a través de las membranas mucosas. Es un requerimiento fisiológico que en las mucosas las células expuestas directamente al medio externo estén vivas y posean barreras más permeables al paso de las moléculas que el epitelio de la piel, en muchos casos esto no sólo es cierto para moléculas pequeñas como la absorción de nutrientes sino también para macromoléculas de importancia fisiológica. Ejemplos son la incorporación de proteínas de la dieta durante la lactancia (1) y de IgG materna al intestino de ratones neonatos debida a un receptor de Fc (FcRn), heterodímero de la familia del MHC I (2). Esta barrera menos rígida hace que las mucosas puedan ser atravesadas por antígenos de naturaleza muy variada como los derivados de los alimentos, la microbiota residente y los microorganismos patógenos (3).

Para mantener bajo control a los antígenos extraños y los microorganismos (patógenos o comensales) que pueden ingresar por las superficies de las mucosas como la cavidad oral, las vías aéreas, el tracto gastrointestinal y el conducto urogenital, las mucosas cuentan con varios mecanismos de inmunidad innata (4) y con el sistema inmune adaptativo (5 y 6).

Si tenemos en cuenta el cálculo de que en un humano adulto la superficie de las mucosas cubren un área de al menos 400 m², es decir unas 20 veces más que el área que cubre la piel (5 y 7) no es sorprendente que el **tejido linfoide asociado a las mucosas (MALT)** comprenda el más grande compartimento del sistema inmune, con más presencia de linfocitos que en todas las otras partes del cuerpo juntas (7). Se estima que un 70-80 % de todas las células productoras de inmunoglobulinas están asociadas a mucosas y que, aunque en proporciones variables en las distintas especies de mamíferos (8), en humanos y animales de laboratorio el principal anticuerpo de las mucosas es la **IgA secretoria (SIgA)** a diferencia de lo que ocurre en suero donde la IgA es minoritaria (9). Solamente el intestino produce más masa de SIgA que la producción total de las otras inmunoglobulinas en el resto del organismo (10). En otras palabras, los anticuerpos

que actúan en las mucosas son de producción local (11). También se estima que casi un 60 % de todas las células T del cuerpo están en el intestino delgado (12).

El sistema inmune de las mucosas tiene algunas características propias, entre las más destacadas señalamos:

- (a) El ya mencionado predominio de SIgA (y en menor medida de IgM secretoria, SIgM).
- (b) La ausencia o muy pobre activación de una respuesta inmune específica en las mucosas cuando se da una inmunización sistémica (10 y 11).
- (c) Cuando la mayoría de los antígenos no replicantes son inicialmente presentados por las mucosas, se generan mecanismos que impiden la estimulación de la respuesta inmune sistémica que se debería observar luego de inocular un posterior desafío antigénico sistémico, esta no-respuesta específica de antígeno se ha llamado **tolerancia oral**.
- (d) Además, incluso la inmunización intestinal local no se provoca con antígenos proteicos solubles convencionales introducidos por vía oral (13) y en humanos sanos normalmente hay poca o ninguna IgA intestinal dirigida contra antígenos de la dieta (14). La razón general de todo esto es que el sistema inmune en el intestino debe autolimitarse de modo de no responder a los antígenos de la dieta. Es digno de destacar que en la condición normal el sistema inmune de las mucosas se comporta frente a los antígenos de la dieta como si fueran antígenos propios. Además debe mantener a la microbiota normal en el *lumen*, sin eliminarla aunque impidiendo su ingreso en el organismo. Sin embargo en las mucosas debe permanecer la capacidad de dar una vigorosa respuesta inmune que sea protectora de potenciales patógenos, toxinas u otros antígenos peligrosos que puedan ingresar.

A estas peculiaridades se le suma un circuito de migración restringido a las mucosas por parte de los linfocitos que son inducidos por antígeno en las mucosas y que fue primero estudiado con los linfoblastos IgA⁺ que abandonan el **tejido linfoide asociado a intestino (GALT)** para dirigirse (a modo de retorno) al intestino (15, 16 y 17); observación que luego fue ampliada con la demostración de que las células B IgA⁺, las células B de otros isotipos y las células T inducidas en el GALT también participan de un tránsito linfocitario a mucosas y glándulas exócrinas lejanas (18 y 19). Considerando todo esto se construyó el concepto de un **Sistema Inmune Común a las Mucosas** que funciona como una red de tejidos y células asociadas a las mucosas

comunicadas por células con características y afinidades migratorias distintas a las que se encuentran en los órganos linfáticos sistémicos (20 y 21) y que actúan como efectoras de la protección inmunológica en mucosas distantes al sitio del MALT donde se indujo la respuesta.

A.2. Anatomía y fisiología del GALT

A.2.1. Generalidades

La mucosa intestinal es un epitelio simple de células cilíndricas de absorción (**enterocitos** o células **absortivas**) cuya cara apical (que limita con el *lumen*) posee un conjunto compacto de microvellosidades cubiertas por una capa de glicocalix y *mucus*. En forma aislada aparecen otras como las células caliciformes, secretoras de mucina. Este epitelio forma una sucesión de vellos estrechamente dispuestos que le confieren una enorme superficie de absorción. Entre las vellosidades, el epitelio se hunde en criptas en donde hay células epiteliales proliferantes que dan origen a los enterocitos que van madurando y desplazándose hacia la punta del vello que es zona de descamación. Por la membrana lateral y casi en el extremo apical, los enterocitos están unidos entre sí por un cinturón de unión estrecha que los rodea por completo y que separa los ambientes externos e internos como una barrera selectiva.

En las vellosidades, por debajo del epitelio hay un tejido conectivo llamado **lámina propia** que mantiene su continuidad por la base de las vellosidades. La lámina propia intestinal es rica en células inmunocompetentes: linfocitos, macrófagos, células dendríticas, y está atravesada por vasos sanguíneos y linfáticos eferentes.

Si bien no es una separación absoluta, en el GALT se pueden reconocer regiones en donde se inicia la respuesta inmune adaptativa (**sitios inductores**) y regiones en las cuales las células efectoras generadas ejercen su acción (**sitios efectores**; Refs. 6 y 11).

A.2.2. Sitios inductores y efectores

En el intestino, los sitios inductores más relevantes son las placas de Peyer, órganos con forma de domo constituidos por cúmulos de folículos linfoides de modo similar a los ganglios linfáticos, aunque a diferencia de estos últimos, las placas de Peyer carecen de linfáticos aferentes y el tejido linfoide está en contacto directo con un epitelio asociado a los folículos (EAF) del espesor de una sola célula que los separa de (y los comunica con) los antígenos del medio externo.

Además en el intestino delgado y grueso hay numerosos agregados linfoides solitarios y dispersos por la lámina propia. El apéndice es particularmente rico en estos folículos linfoides y se asume que tiene funciones similares a las placas de Peyer, sin embargo esta afirmación no ha sido formalmente probada. Por otra parte los vasos linfáticos que se inician en el intestino se dirigen al ganglio mesentérico de modo que este recibe las moléculas y células inmunocompetentes que vienen por la linfa desde el intestino y es un órgano donde también se puede inducir la respuesta inmune local. Al conjunto de éstos órganos y folículos linfoides asociados al intestino se los conoce como GALT organizado (3).

Los principales sitios efectores son la lámina propia intestinal, que recibe los linfocitos T y B que fueron activados en los sitios inductores (o alternativamente fueron activados *in situ*), y una rica población de células T del epitelio intestinal que se desarrolla independientemente de las placas de Peyer: los linfocitos intraepiteliales (IEL). La lámina propia posee, además de linfocitos, macrófagos y una amplia variedad de células mieloides y dendríticas, lo que sugiere un rol adicional de tejido inductor. Los IEL son células T principalmente CD8⁺ asociadas a un fenotipo citotóxico/supresor o nulas (CD4⁻, CD8⁻) y se distinguen en que muchas poseen receptores de células T (TCR) de cadenas γ/δ , muy infrecuente en otras partes del organismo (22).

A.2.3. Transporte y presentación del antígeno en los sitios inductores

En las placas de Peyer, el EAF posee además de enterocitos unas células que poseen cortos y espaciados micropliegues (células M) en vez de microvellosidades y la

capa de glicocálix es más delgada que en el resto del epitelio. Las células M están especializadas en tomar muestras de antígenos presentes en el contenido intestinal y entregárselo al tejido linfoide de las placas de Peyer. Estas células son pobres en lisosomas (a diferencia de los enterocitos) y los antígenos las atraviesan sin sufrir mayores alteraciones.

Una gran variedad de macromoléculas solubles y partículas (incluyendo microorganismos) pueden ser transportados por las células M. Sin embargo, para una incorporación eficiente del antígeno, las células M exhiben cierta selectividad y existen características específicas de los antígenos que determinan una fácil interacción con las células M y su transporte al interior de las placas de Peyer. Para las partículas inertes su tamaño es muy importante (23). En el caso de los microbios, el tipo y estado de los mismos es determinante, por ejemplo *Mycobacterium paratuberculosis* es tomado por las células M sea que las bacterias se encuentren viables o muertas pero en el caso de *Vibrio cholerae* sólo son incorporados y transportados los organismos vivos de cepas que poseen movilidad (24).

La membrana basolateral de las células M tiene grandes invaginaciones que forman amplios bolsillos que constituyen sitios putativos de encuentro inicial con el antígeno y están ocupados por células B, células T CD3⁺, CD4⁺ (25) y macrófagos que se abren paso por la membrana basal (26 y 27).

Se ha propuesto que las células M tienen alguna capacidad de presentar antígenos sobre la base de que son capaces de expresar MHC Clase II, producir IL-1 y que tienen endosomas ácidos, potencialmente capaces de clivar polipéptidos (28, 29). Sin embargo la expresión de MHC Clase II en células M es desvaída (30) y además por su limitado contacto con la mayoría de las células T y como en conejo no se ha podido probar la existencia de células T en estos bolsillos basolaterales (31), no parece que las células M sean importantes en la presentación de antígenos a los linfocitos T CD4⁺ (32).

Tampoco los macrófagos son buenos candidatos a actuar como células presentadoras en las placas de Peyer, se ha postulado que los macrófagos son pobres presentadores de antígeno e incluso secretan PGE₂ que inhibe la respuesta inmune (33) en parte al regular negativamente la actividad de las células dendríticas (34).

Las células B son mejores candidatas como presentadoras de los antígenos que entregan las células M. Las células B de los bolsillos basolaterales que aparecen como mejores presentadoras de antígeno son del fenotipo de memoria sIgD⁻, MHC II^{alto} (HLA DR en humanos) ya que expresan o pueden sobreexpresar rápidamente a las moléculas coestimuladoras CD80, 86 (B7) mejorando la interacción con las células T CD4⁺ (35), es decir que actuarían en una etapa de realimentación de la respuesta y menos en el primer encuentro con el antígeno (primado). Sin embargo, en el caso en que son células B *naive* las que presentan antígeno en los bolsillos de las células M, dicha actividad aparece asociada al fenómeno de tolerancia probablemente debido a que las células B *naive* no dan una señal adecuada por las moléculas coestimuladoras CD80, 86, induciendo la anergia de las células T. Otra posibilidad es que las células B *naive* que allí se encuentran actúan como presentadoras cuando se reciben grandes cantidades orales de antígeno, en dicho caso las células T que reciben la presentación antigénica en determinado momento expresan CD152 (CTLA-4) y la señal por esta vía induce su apoptosis (tolerancia por delección clonal) o anergia (36).

En la actualidad se acepta que las células dendríticas son las principales células presentadoras durante el primado de la respuesta en el intestino (37). En las placas de Peyer, la región que está inmediatamente por debajo del EAF es el domo subepitelial (DSE), un sector rico en células dendríticas principalmente inmaduras y fagocíticas, pero que estimuladas con TNF- α o vía CD40 maduran y son capaces de presentar antígeno *in vitro* (38). Aunque no es posible descartar que las células dendríticas presenten antígeno a las células T directamente en el DSE; luego de incorporar antígeno, las células dendríticas migran a la región interfolicular (RIF) de las placas de Peyer rica en células T (o al ganglio mesentérico) en donde inducen la proliferación de las células T *naive* específicas (32).

A su vez las células T específicas activadas son capaces de proveer una señal coestimuladora vía CD40 a las células B *naive* sIgD⁺, sIgM⁺ que están detectando al antígeno por sus inmunoglobulinas de superficie, posibilitando la proliferación y la producción de anticuerpos (39). Poco después las células CD4⁺ y B específicas activadas migran a los folículos para desarrollar la reacción de centro germinal que resulta en la formación de células B de memoria y células destinadas a plasmáticas que conmutaron al

isotipo IgA y se dirigen al ganglio mesentérico o a la lámina propia para su diferenciación final (40).

Por otro lado, las células T CD8⁺ *naive* también son activadas por las células dendríticas en la RIF, por lo que proliferan y migran a mucosas distantes y otros órganos.

A.2.4. Respuesta de células B, centros germinales

Los centros germinales se inician con el arribo de unos pocos clones de células B sIgD⁺, IgM⁺, CD38⁺ (41) y células T CD4⁺ específicas previamente estimuladas en las áreas de células T (42). Los folículos linfoides producen una quimiocina CXC (BLC) que actúa sobre los linfocitos B que expresan el receptor CXCR5 (BLR-1) y los atrae (43). Recientemente el mismo receptor de quimiocina fue reportado para las células T (44).

En paralelo los complejos antígeno-anticuerpo se depositan sobre las células dendríticas foliculares (FDC). A partir de aquí, la interacción entre las células B específicas, las FDC con antígeno y las células T colaboradoras originan una enorme expansión y diversificación de los linfocitos B en ese sitio que se visualiza como el centro germinal (45 y 46).

En esta etapa las células B modifican la afinidad hacia el antígeno por mecanismos de hipermutación somática sobre los genes V_H y V_L de inmunoglobulinas y de edición de receptor de células B (BCR; Refs. 47 y 48). Si las células B exhiben un BCR que une con alta afinidad al antígeno que se encuentra en las FDC, sobreviven y sus clones son seleccionados positivamente. Las que pierden afinidad por el antígeno mueren por apoptosis inducida por Fas (CD95) con rápida activación de caspasa-8 (49). Las señales coestimuladoras de las FDC incluyen la señal vía receptor de complemento tipo 2 (CR2; CD19/21/81) que dan los fragmentos de C3 asociados a los complejos inmunes, de otro modo los complejos inmunes por sí solos son pobres inmunógenos debido a la señal inhibitoria que se desencadena por el FcγRIIB (50).

Además la descarga de señales de supervivencia requiere de un estrecho contacto entre las células B y las proyecciones de las FDC, lo que involucra reconocimiento entre

moléculas de adhesión. El resultado final es que en las células B se mantienen elevados niveles de una proteína inhibitoria del dominio de muerte asociado a Fas, cFLIP_L (39, 49 y 51).

Las células B que unen eficientemente al antígeno en las FDC del centro germinal, son capaces de presentarlo en el MHC II a las células T colaboradoras CD4⁺ con TCR específicos con participación de señales bidireccionales CD40-CD40L (CD154) y citoquinas que evitan la apoptosis con expresión de cFLIP_L. En contrario, si el linfocito B no presenta el péptido adecuado a las células T CD4⁺, tampoco escapa a la apoptosis. Esta selección elimina la posibilidad de que del centro germinal surjan células B que produzcan anticuerpos contra antígenos propios (39 y 49).

A.2.5. Respuesta de células T

Las placas de Peyer (al igual que el bazo) poseen similares cantidades de células T que corresponden al perfil de citoquinas de tipo Th2 (secretoras de IL-5 e IL-4) que de la población Th1 (IL-2 e INF- γ) durante una inmunización oral (52). Si bien se acepta que para la activación de las células B se requieren células Th2, en varias ocasiones se detecta un marcado perfil Th1, inducido por células dendríticas que secretan IL-12 en respuesta a señales coestimuladoras por CD40 (53, 54), necesario para la activación de macrófagos y de células T CD8⁺ citotóxicas.

Ejemplos de inducción de respuesta Th1 en intestino han sido frecuentemente observados en infecciones bacterianas como en el caso de *Salmonella typhimurium* (55) y en la mayoría de las inflamaciones intestinales experimentales o en la enfermedad de Crohn (56-58). Sin embargo en algunos modelos animales y en la colitis ulcerativa predomina el camino Th2 (59 y 60). De todos modos en ambos caminos de inducción, el resultado final es la liberación de las citoquinas proinflamatorias de polimorfonucleares y macrófagos, IL-1, IL-6, IL-8 y TNF α en la mucosa intestinal (60 y 61).

El inicio de las Th2 por células dendríticas es más oscuro. Las IL-4 e IL-10 inhiben la producción de IL-12, favoreciendo la inducción de Th2 y al menos una población de células dendríticas de placas de Peyer puede ser estimulada a producir IL-

10 *in vitro* (62), aunque otros autores señalan la importancia de IL-6 en ganglios linfáticos periféricos (63). Recientemente se determinó que las células T *natural killer* dependientes de CD1 (NK1.1⁺) productoras de IL-4 evitan la respuesta celular periférica cuando se da antígeno por vía oral, lo que podría involucrar un desvío a la respuesta Th2 (64).

A.2.6. Sitios efectores

Las células B y T primadas y activadas en los sitios efectores arriban a la lámina propia intestinal para ejercer su rol efector y de vigilancia inmunológica. Las células B se establecen como células plasmáticas secretoras principalmente de SIgA, aunque también se encuentran células B IgM⁺, IgD⁺ indiferenciadas. Muchas células T permanecen como células de memoria y responden al reencuentro con el antígeno. Como es de esperar esto depende de una entrada del antígeno a través del epitelio (65) que puede ser presentado por las células dendríticas maduras MHC II^{alto} en la lámina propia (66). Además las células T CD4⁺ de lámina propia tienen baja proliferación y requieren la señal alternativa vía CD2 (67), siendo entonces capaces de producir altos niveles de citoquinas (68). El sentido de esto puede ser aumentar el umbral de respuesta para evitar la activación debida a antígenos irrelevantes.

Las células T CD8⁺ de lámina propia son efectoras de la respuesta citotóxica en infecciones virales locales, como las de rotavirus (69). Por otro lado los linfocitos CD8⁺ TCRγδ⁺ intraepiteliales podrían ser primadas localmente por células epiteliales (70) o por células dendríticas parcialmente intraepiteliales (71). Durante una infección intestinal el epitelio secreta citoquinas y quimiocinas de la familia CXC como CXCL8 (IL-8), CXCL1 (GROα), CXCL2 (GROβ) y de la familia CC como CCL2 (MCP-1) y CCL5 (RANTES) que dirigen la extravasación de neutrófilos y monocitos al sitio de la inflamación (72, 73).

A.2.7. Conmutación al isotipo IgA

Las células T del tipo Th2 activadas residentes en placas de Peyer son capaces de conducir a las células B específicas, inducidas por antígeno en el mismo órgano, a conmutar el isotipo de inmunoglobulina hacia la producción de IgA (74, 75). Las células T que causan la conmutación a IgA son productoras de TGF- β (76, 77); esta citoquina actúa en las etapas más tempranas de la conmutación de isotipo que involucra el acceso al gen CH α y la aparición de sus transcritos de línea germinal (78). Además la inducción de la conmutación a IgA en las células B requiere de la interacción con células T vía el CD40 y la señal por unión del antígeno a la IgD del BCR (79, 80).

Las células B sufren la conmutación al isotipo IgA en los centros germinales de las placas de Peyer, en donde el antígeno relacionado a las FDC brinda una de las señales necesarias, y emergen de los centros germinales como células B IgA⁺ en superficie que proliferan pobremente y no diferencian localmente a células plasmáticas (81). Para la diferenciación terminal de las células IgA⁺ se requiere IL-5 (80, 82) e IL-6 (83). Al menos en humanos, una citoquina necesaria para la secreción de IgA es IL-10, que evita la apoptosis al inducir Bcl-2 (79, 84). Es común encontrar IL-10 en el particular microambiente de las placas de Peyer y facilita la aparición de las células T regulatorias.

Para el desarrollo de los IEL TCR $\gamma\delta$ ⁺ es necesaria la señal vía IL-7R (85); en su ausencia hay deficiencia de IgA (86). Esto parece estar relacionado con la influencia que tiene el epitelio intestinal en favorecer la formación de las células productoras de TGF- β , mecanismo efector de la tolerancia oral, lo que habla de una notable economía de los recursos disponibles en la mucosa.

A.3. Inmunobiología de la SIgA

La SIgA que se encuentra en las secreciones es polimérica (principalmente dimérica pero también tetramérica) y está asociada a un polipéptido llamado componente secretorio, porción remanente del receptor de inmunoglobulina polimérica (pIgR) con el que las células epiteliales (y los hepatocitos en algunas especies) la transportan desde el tejido a la secreción (9, 87). La SIgA además está unida por puentes disulfuro a un

polipéptido de unión (cadena J) aunque su función estaría más relacionada a una firme interacción con el pIgR que a la formación del polímero de IgA (88).

Muchas de las propiedades biológicas de la SIgA se deben a su naturaleza polimérica y a la porción Fc que tiene abundantes aminoácidos hidrofílicos, una unión estable (covalente) con el componente secretorio (89) y sitios de *N*-glicosilación con residuos terminales de ácido siálico que le confieren carga negativa (90), ocultamiento de potenciales sitios de clivaje proteolítico e inactivación de tripsina y quimiotripsina (91).

Entre las funciones más conocidas de la SIgA se encuentran:

(a) El combinarse en el *lumen* y la superficie de las mucosas con antígenos de los alimentos para impedir su adsorción y con microorganismos para reducir su movilidad e impedir la adhesión y entrada a las células epiteliales o para neutralizar virus. La inhibición viral puede deberse al bloqueo de los epitopes que se unen al receptor o a mecanismos no del todo comprendidos en los que por ejemplo bajas concentraciones de SIgA o SIgM a la hemaglutinina del virus de la influenza A no evitan la unión pero inhiben la internalización o replicación intracelular (92).

(b) Puede combinarse intracelularmente durante su transporte al *lumen* con antígenos y virus que ingresaron a la célula epitelial logrando neutralizarlos (93 y 94), anticuerpos anti-cápside VP6 de rotavirus (proteína interna del virión) son capaces de neutralizar la infección durante el ensamblado pero no sobre la partícula viral entera (95).

(c) La unión con el antígeno ya ingresado en la lámina propia de la mucosa permite excretarlos a través del epitelio por unión al pIgR, evitando la entrada de complejos inmunes peligrosos. Por ejemplo complejos IgAp-virus de Epstein-Bar fueron transportados de sangre a bilis sin infección de los hepatocitos (96), probablemente este sea un mecanismo antiflogístico de eliminar complejos. Sin embargo si el camino de transcitosis por pIgR no está polarizado desde el extremo basolateral (recepción del complejo inmune) al apical (descarga del antígeno) de la célula epitelial, puede convertirse en un mecanismo de infección (97).

En los roedores y la mayoría de los mamíferos estudiados hay una sola clase de IgA pero en humanos hay 2 isotipos. En el intestino delgado, la cavidad buconasal, las

glándulas mamarias y las lacrimales el 60 % o más de las células productoras de IgA son del isotipo IgA1, mientras que en intestino grueso las proporciones se invierten, por otro lado en los bronquios las cantidades son más parejas con mayoría de IgA1 (19). La cadena α de la IgA1 posee una extensa zona de bisagra con 13 aminoácidos (con varias serinas y treoninas) y 5 sitios de *O*-glicosilación más que la IgA2 (90). La rara secuencia y el alto grado de glicosilación impide que la zona de la bisagra de la IgA1 sea susceptible a las enzimas proteolíticas tradicionales, sin embargo algunos microbios comensales o patogénicos poseen proteasas capaces de clivar la región bisagra y evadir la acción de la SIgA1 (los monómeros no suelen dar protección). Estas proteasas son raros casos de endopeptidasas post-prolina, en muchos casos el péptido diana es un adyacente inmediato a una cadena lateral de carbohidratos y son excelente ejemplo de evolución convergente y exquisita especificidad de substrato (98).

La IgA2 (al igual que la IgA murina) carece de esta larga bisagra y es resistente a la mayoría de estas enzimas. La diferencia de actividad biológica que hay entre ambos isotipos de IgA permanecen oscuras, se postula que la IgA1 tiene mayor flexibilidad y habilidad para unir antígeno aunque esta hipótesis no ha sido demostrada experimentalmente (99), por otro lado la IgA2 tiene 2 cadenas más de carbohidratos *N*-ligados que determinan que la IgA2 sea eliminada más rápidamente por el receptor de asialoglicoproteína en hepatocitos (100).

En el intestino la inflamación atenta contra el normal funcionamiento del sistema digestivo y la SIgA está considerada un anticuerpo no inflamatorio. Sin embargo la IgA monomérica puede conducir varias funciones inflamatorias por intermedio del receptor mieloides del Fc de la IgA (Fc α RI, CD89; Ref. 101). Por otro lado la SIgA estimula la desgranulación de eosinófilos y basófilos (por un receptor distinto al Fc α RI) lo que estaría relacionado a la inmunidad contra parásitos y a reacciones alérgicas (102). Una hipótesis postula que en condiciones patológicas, los mediadores de inflamación permiten la expresión del Fc α RI en células de Kupffer de modo que las bacterias que invaden la circulación sean opsonizadas por IgA del suero y fagocitadas en hígado como una segunda línea de defensa (inflamatoria) luego de ser superada la barrera de SIgA (101).

A.4. Células B de tipo 1 (B1) y anticuerpos SIgA "naturales"

Los linfocitos B1 CD5⁺ son una población de células B peritoneales autorenovables capaces de liberar al suero anticuerpos (en su mayoría del tipo IgM) espontáneamente sin intervención de antígenos propios o externos incluso en ratones libres de gérmenes, son los llamados anticuerpos naturales. Estos anticuerpos son polireactivos y poco específicos. Es frecuente que en el suero haya bajos niveles de anticuerpos naturales que unan una amplia variedad de virus y bacterias aunque raramente actúan como neutralizantes por lo que se consideraba que no debían hacer diferencia contra la letalidad de las enfermedades causadas por virus citopáticos, frecuentemente asociada a la replicación en tejido neuronal. Sin embargo recientemente se demostró que la IgM natural sérica es capaz de reclutar virus en los órganos linfoides secundarios disminuyendo los títulos virales en otros órganos como sangre, hígado, riñón y cerebro (103).

En la lámina propia intestinal, las células B1 generan la aparición de IgM naturales con elevado entrecruzamiento de especificidades y muchos clones expresan genes V de inmunoglobulina de línea germinal, aunque sus niveles de secreción pueden ser aumentados por LPS (104). Las células B1 también son capaces de poblar el intestino con células plasmáticas que producen una población de SIgA polireactiva con secuencias predominantes de línea germinal por lo que se los ha considerado parte de los anticuerpos naturales, sin embargo a diferencia de lo que ocurre en el suero, los ratones libres de gérmenes carecen de SIgA reactiva contra bacterias comensales y su inducción depende de la existencia de microbiota residente (105).

Una de las mejores inductoras de estas IgA "naturales" es uno de los principales (aunque poco conocidos) comensales del intestino: las bacterias filamentosas segmentadas (BFS, anaerobios obligados, Gram +, segmentados, formadores de esporas y hasta hace poco no cultivables), que al colonizar con ellas el intestino de ratones libres de gérmenes indujeron la producción de SIgA "natural" en el GALT a niveles entre el 24 y 63 % de la encontrada en ratones convencionales, sin embargo (y de acuerdo a la característica de los anticuerpos naturales) menos del 1,4 % de la SIgA total resultó específica a BSF (106). La explicación de tal actividad podría estar en la interacción física que establecen los filamentos de la BFS y el gangliósido asialo GM1 (que provoca

una reorganización de los filamentos de actina e induce una sobreexpresión del MHC Clase II) en la membrana de las células epiteliales (106) o a la captura y presentación de las bacterias comensales por células dendríticas intestinales (107).

Ha habido datos contradictorios acerca de si la aparición de SIgA intestinal contra bacterias comensales es independiente o no de linfocitos T. Por un lado la colonización de BFS en ratones libres de gérmenes eleva el número de células T activadas CD4⁺, CD45RB^{bajo} en las placas de Peyer y se ha sugerido que las células T TCRγδ⁺ pueden facilitar la conmutación de isotipo a IgA en centros germinales en el ámbito intestinal (106 y 108). Sin embargo se ha probado que cepas de ratones deficientes en células T tienen IgA intestinal y que no se necesitan folículos linfoides organizados con interacción entre células T y B para encontrar células plasmáticas IgA⁺ en la lámina propia intestinal y SIgA que se une a bacterias comensales (105). Además se ha detectado la conmutación de isotipo a IgA en células B previamente establecidas en la lámina propia, lejos de las placas de Peyer y estimuladas por el contacto con las células del estroma y un ambiente de citoquinas adecuado como TGF-β (109).

Tomado todo junto se avizora la existencia de 2 linajes distintos en la respuesta de SIgA intestinal. Uno el clásico Timo-dependiente con hipermutación somática y maduración de la afinidad de los anticuerpos que requiere de centros germinales en folículos linfoides organizados que se observa en infecciones intestinales o en la respuesta a proteínas solubles administradas junto a toxina colérica que (ver más adelante) actúa como adyuvante intestinal (105). El otro Timo-independiente derivado de células B1 que no requiere de folículos organizados, que se expresa como respuesta normal a la microbiota comensal y que probablemente sea evolutivamente más antiguo que el sistema inmune adaptativo (105 y 109).

A.5. Tolerancia oral

Son varios los mecanismos que llevan al estado de tolerancia oral y los distintos modelos experimentales describen situaciones en los que predomina uno de ellos aunque puede ocurrir que algunos se superpongan en su accionar, de modo que naturalmente haya caminos alternativos o redundantes que permitan alcanzar el estado de tolerancia

con mayor eficacia. Además son comunes los resultados contradictorios entre distintos autores ya que algunos abordajes experimentales podrían derivar en comportamientos no fisiológicos (110).

Se postula que todas las formas de tolerancia parten de un defecto en la actividad coestimuladora en el primado, durante la presentación del antígeno. Como las células epiteliales del intestino (enterocitos) carecen de coestimuladoras CD80/86 (B7.1/2) o tal vez presentan incorrectamente los péptidos en el MHC II o lo hagan por moléculas no convencionales del MHC, los enterocitos han sido considerados responsables de la presentación para la tolerancia oral (7).

Más recientemente la atención ha sido puesta en las células dendríticas intestinales (32), muchas de las cuales son inmaduras e incapaces de presentar antígeno eficazmente (7) quizás porque sus bajos niveles de expresión de las moléculas CD80/86 privilegian la interacción con células T CD152⁺ (CTLA4) de alta afinidad en detrimento de CD28 (111). En apoyo de esta hipótesis, la expansión *in vivo* de las células dendríticas funcionales (CD11c⁺, MHC II⁺) acentuó y facilitó la inducción del estado tolerante (112). Algunas subpoblaciones de células dendríticas estarían especializadas en inducir tolerancia, tanto residentes en placas de Peyer (113) como en el bazo (110). Un pivote entre la inducción de tolerancia y la respuesta activa parece estar dada en este punto por la presencia de LPS, capaz de hacer madurar y activar a las células dendríticas intestinales (112). Por otro lado, células dendríticas tratadas con IL-10 pueden inducir tolerancia (114).

Otra cuestión es si la presentación del antígeno que conduce a la tolerancia se localiza en el intestino o fuera del GALT. Tradicionalmente se acepta que con cantidades suficientes, un antígeno soluble es tomado por el intestino y entra a circulación sanguínea para inducir la tolerancia en otro sitio; aunque no quedaba claro si para ello se requería una modificación estructural del antígeno (115-118). Más recientemente se ha reportado que bajas dosis de antígeno, también pueden ser presentadas en el bazo dando tolerancia (119) y que la misma se puede inducir en ratones carentes de placas de Peyer (120). Sin embargo no se ha determinado si el antígeno entra en circulación como molécula soluble libre o unida a una célula presentadora (119 y 121).

A.5.1. Células T regulatorias

Uno de los mecanismos responsables de la tolerancia oral hacia antígenos T-dependientes solubles consiste en la aparición de células T regulatorias o supresoras que secretan TGF- β y/o IL-10 (122) y son principalmente del fenotipo CD4⁺ (123-125), y capaces de transferir la tolerancia a ratones receptores no tratados (126).

En los primeros momentos de la presentación del antígeno en las placas de Peyer se detecta una respuesta de perfil Th1 estimulada por IL-12 pero pronto la producción de IFN- γ es inhibida con aumento de Th2 (127), lo que permite el desarrollo de las células T productoras de TGF- β e IL-10 (128), que a su vez desconectan la producción de IL-12 (129). Para que se produzca este desbalance no es necesaria una vigorosa respuesta Th2 (128, 130 y 131) pero sí el particular microambiente del GALT con células epiteliales y macrófagos que producen TGF- β (132). Simultáneamente a lo que ocurre en las placas de Peyer, en la lámina propia intestinal también se observa la aparición temprana de las células regulatorias, (133).

Las células T CD4⁺ regulatorias no se ajustan al perfil de Th1 ni de Th2 sino que son colocadas en una categoría distinta dentro de la cual fueron identificadas una población productora de TGF- β y de cantidades variables de IL-10 llamada **Th3** (122, 134) y otra productora de altos niveles de IL-10 llamada **células T regulatorias de tipo 1 (Tr1)**; Refs. 110 y 135). La tolerancia oral debida a la acción de células T regulatorias es común en esquemas de ingestión repetitiva de bajas dosis de antígeno (122 y 136).

La hipótesis indica que luego de ser inducidas en el intestino, las células T regulatorias migran a los tejidos periféricos en donde sus citoquinas impiden la activación de las células T que encuentren un estímulo antigénico. Como el efecto inhibitorio de TGF- β o IL-10 no es específico de antígeno, también se puede inhibir la activación de células T específicas para otro antígeno (distinto) que sea coadministrado durante el desafío junto al antígeno inductor de los clones regulatorios, este mecanismo ha sido llamado **supresión por proximidad (bystander)**; Refs. 58, 127 y 137).

Sin embargo se ha criticado que ni la migración de las células T regulatorias desde el intestino ni la regulación por citoquinas han sido formalmente probadas *in vivo* y

una hipótesis alternativa postula que la tolerancia oral se debe a una efectiva reducción del número de células T específicas en la periferia (119).

A.5.2. Células T CD8⁺ supresoras/regulatorias

No hay acuerdo si las células T CD8⁺ con restricción MHC Clase I son efectoras de la tolerancia oral para la respuesta de CTL (124 y 138) aunque sí están descritas como células supresoras productoras de TGF-β en el intestino (139). Entre las células T CD8⁺, las mejores identificadas por su acción directa en la tolerancia oral son las que expresan TCRγδ (140 y 141). Como entre los linfocitos intraepiteliales del intestino hay gran cantidad con este fenotipo, se asumió que esta población tiene un rol importante en la tolerancia oral (141-145).

Alternativamente, otros autores señalan que el hígado puede participar en la inducción de la tolerancia oral por acción de las células T TCRγδ⁺ de origen extratímico o de las T CD4⁺ K.K 1.1⁺ (146) y por las células dendríticas hepáticas (147).

A.5.3. Anergia y delección

Bajo ciertas condiciones experimentales, que comúnmente incluyen la ingestión de bajas dosis de antígeno, la tolerancia oral fue atribuida a un estado de **anergia** (136, 148 y 149) o a la delección clonal periférica de las células T CD4⁺ específicas en placas de Peyer (35).

Aunque no se descarta algún rol supresor de las células T anérgicas (150) ni que las células T inducidas en las placas de Peyer tengan impedida la migración a los sitios periféricos, causando así la tolerancia (151).

B. LA TOXINA COLÉRICA, POTENTE ANTÍGENO Y ADYUVANTE ORAL

La regla general es que los antígenos no replicantes T-dependientes fallan en generar una respuesta inmune cuando son inoculados por las mucosas. Excepciones a la regla pueden encontrarse en moléculas de origen bacteriano.

Posiblemente el inmunógeno T-dependiente más potente por la vía de las mucosas sea la **toxina colérica** de *Vibrio cholerae* (152-154). Esta enterotoxina es una proteína de 84 kD compuesta por una subunidad A (CT-A), monómero de 27 kD portador del dominio responsable de la toxicidad que encaja en el centro de la subunidad B (CT-B), un homopentámero que forma un anillo con cadenas de 10,5 kD cada una. La toxina colérica es la causante de las severas diarreas líquidas de los enfermos de cólera (155). La CT-B se une a la membrana celular por el ubicuo gangliósido GM-1 en las células epiteliales del intestino, en consecuencia la toxina colérica se internaliza y es transportada en vesículas (156). La CT-A sufre un corte proteolítico y la reducción de un puente disulfuro, liberándose un fragmento A1 al citosol.

El fragmento A1 tiene una actividad enzimática consistente en utilizar NAD^+ para ADP-ribosilar la subunidad G_{sa} de la proteína G. La proteína G_{sa} -GTP-ADP-ribosa que se produce tiene impedida la hidrólisis a GDP y queda bloqueada en esta forma que activa permanentemente a la adenilato ciclasa con el consiguiente aumento de los niveles de AMPc y la activación de protein quinasa A que a su vez hiperfosforila un canal iónico: el regulador de conductancia en transmembrana de fibrosis cística (CFTR), que al unir ATP se abre permitiendo una masiva salida de Cl^- por la membrana apical y concomitante pérdida de agua característica de la enfermedad (157 y 158).

Otros mecanismos que intervienen en la respuesta secretoria por toxina colérica, involucran mediadores como:

1. Prostaglandina E, molécula inflamatoria que es sintetizada al producirse un aumento de la traducción del RNAm de ciclooxigenasa 2 (COX-2; Ref. 159) con colaboración de Factor activador de plaquetas (160);
2. Serotonina, péptido intestinal vasoactivo (VIP) y sustancia P; moléculas con varias actividades biológicas y que intervienen en la comunicación neuro-inmune (161-163).

Como inmunógeno por las mucosas, pequeñas cantidades de toxina colérica inducen una fuerte respuesta local con SIgA intestinal y también respuesta en el compartimento sistémico con IgG antitoxina en suero (13 y 164) evitando inducir tolerancia (165).

Como adyuvante aumenta en forma drástica la inmunogenicidad de otros antígenos no relacionados cuando son coadministrados por la vía oral (165-167), aunque no es eficaz en todos los casos, por ejemplo no induce anticuerpos contra antígenos de la dieta (168), y no estimula una respuesta policlonal de células B (169).

La toxina colérica activa células T CD4⁺ con perfil Th2 que facilita la conmutación a IgA (170), sin embargo su capacidad adyuvante e inductora de IgA no desmejora con la administración de IL-12, que cambia la respuesta hacia el perfil Th1 (171) y la toxina puede primar tanto una respuesta Th1 como Th2 (172 y 173) y respuesta celular con DTH (174 y 175).

El poder adyuvante de la toxina colérica en el intestino aparece asociado a su capacidad como inmunógeno (176) y ambas cualidades requieren que se mantenga algo de la actividad tóxica con inducción de AMPc (177 y 178). Sin embargo la CT-B parece tener cierta actividad adyuvante *per se*: la CT-B recombinante más LPS inducen producción de IL-1 en macrófagos (179) y en experimentos con proteínas quimeras recombinantes en las que se reemplazó el dominio A1 por un antígeno no relacionado, se logró generar respuesta SIgA local e IgG en suero (180).

Recientemente fue reportado un punto de divergencia entre el efecto adyuvante en mucosas y el sistémico: la respuesta de IgA en mucosas requiere señal vía CTLA-4 (CD152) en las células T, sin embargo (a diferencia de la respuesta humoral en suero) no dependería de la señal coestimuladora por CD28 en las células T (181).

A nivel celular la toxina colérica puede actuar en el crucial paso de la presentación, sobre las células dendríticas (182) y sobre las células epiteliales intestinales (183 y 184).

Otras células diana de la toxina colérica en su función de adyuvante pueden ser los linfocitos T, en los que estimula activación y proliferación de las células específicas de antígeno (con restricción MHC Clase II; Refs. 185 y 186), y los linfocitos B, en los que incrementa los transcritos de RNA de los genes IgH de línea germinal (187). La actividad directa de la toxina colérica sobre las células linfoides puede producirse *in vivo* por un ingreso directo al subepitelio debido al aumento de la permeabilidad intestinal para macromoléculas que provoca la misma toxina (188) o por una transcitosis a través del epitelio (156).

C. EVIDENCIAS DE QUE EL SISTEMA INMUNE DE MUCOSAS NO ES UNA UNIDAD UNIFORME NI AISLADA

C.1. Compartimentación del MALT

La idea de que hay un Sistema Común de las Mucosas integrado, de modo que los linfocitos activados en una mucosa migran hasta otras mucosas para darles inmunidad, es la base de varias vacunas que se han intentado desarrollar (189-192). Sin embargo hay evidencias de que el patrón migratorio de los linfocitos del MALT no es homogéneo, lo que determina compartimentos dentro del MALT, de forma tal que un efectivo estado de inmunidad en las mucosas depende de que la respuesta también sea inducida en otras regiones como el **tejido linfoide asociado a los bronquios (BALT)** en las vías aéreas inferiores y al **asociado a la región nasal (NALT)** de las vías aéreas y tracto digestivo superiores y que incluye amígdalas y adenoides (193).

La diferencia más importante en el tráfico linfocitario es la que existe entre las células inducidas en el GALT y las inducidas en el BALT-NALT. Esta dicotomía se marca al observar que las células inducidas en las vías aéreas suelen generar pobre respuesta de anticuerpos SIgA en el intestino, y que los precursores se ubican preferentemente en los sitios efectores del BALT y del NALT (35). La mejor evidencia en humanos es la abundancia de células B de memoria IgD⁺, IgM⁻ en superficie que sufrieron la delección del gen CHμ en las vías aéreas, mucosa nasal, amígdalas y glándulas salivares y lacrimales, mientras que en el intestino este fenotipo está casi

ausente (194). Además el porcentaje de células B IgA1⁺ es mayor al de las B IgA2⁺ en la lámina propia del intestino delgado, en la mucosa bronquial y nasal y en las glándulas lacrimales y mamarias; sin embargo en el intestino grueso las células B IgA2⁺ son mayoría. Esto indica cierto grado de compartimentación entre el intestino delgado y el grueso (195) al menos en casos patológicos (196).

Otro ejemplo es que aunque en las mucosas la IgG es minoritaria, se observa que en humanos la proporción de células B IgG2⁺ sobre las células IgG3⁺ es mucho más elevada en el intestino que la que se mide en las vías aéreas superiores (35).

Por otro lado, en ratón una inmunización intranasal provoca la aparición de IgA específica y **células secretoras de anticuerpos (CSA)** de isotipo IgA en el NALT pero no en intestino y a la inversa, una inmunización intragástrica da IgA específica en el intestino pero no en los lavados nasales (197).

La expresión de varias combinaciones de moléculas de adhesión y receptores de quimiocinas en diferentes poblaciones de linfocitos, en combinación con los adecuados ligandos en los tejidos receptores (compartimentos), es la causa de que existan los distintos comportamientos migratorios. Algunas subpoblaciones de linfocitos T y B primados (los de memoria y los linfoblastos) en las placas de Peyer expresan altos niveles de las integrinas $\alpha_4\beta_7$ (CD49d/n.d.) y LFA-1 ($\alpha_L\beta_2$; CD11a/CD18) que permite su interacción con MAdCAM-1 e ICAM-2 (CD102) respectivamente en el endotelio de la lámina propia intestinal. Por el contrario el endotelio de las vías aéreas y otras mucosas no poseen MAdCAM-1, en cambio expresan VCAM-1 (CD106), de modo que las subpoblaciones de linfocitos B y T $\alpha_4\beta_1^{\text{alto}}$ (β_7^{bajo}) de memoria tienen un tráfico preferencial hacia las mucosas no intestinales aunque hayan sido primados en el GALT (195 y 198). Además en humanos, luego de una inmunización intranasal aparecen en circulación una mayoría de células B productoras de anticuerpos $\alpha_4\beta_1^{\text{alto}}$ (VLA-4; CD49d/CD29), L-selectina^{alto} (CD62L) potencialmente capaces de poblar tanto intestino como otras mucosas y ganglios linfáticos (199). Entre las células B de memoria IgA⁺ en superficie existe una subpoblación CLA⁺ que por unión a E-selectina (CD62e) se dirigen a los bronquios y tracto aéreo y digestivo superior (200).

En cuanto a las quimiocinas que intervienen en el tráfico linfocitario a los sitios efectores de las mucosas, se sabe que en ratón el ingreso de los linfocitos $\alpha_4\beta_7^{\text{allo}}$ a la lámina propia del intestino es en parte dirigido por la CCL21 (SLC), cuyo receptor celular es CCR7 (195). Al menos en pacientes alérgicos a alimentos, las células T CD4⁺, CD45RO⁺, $\alpha_4\beta_7^+$ de memoria inducidas en las placas de Peyer expresan los receptores CCR7 y CCR9 cuyas quimiocinas específicas son expresadas por el intestino (CCR9 liga a la CCL25 o TECK). Estas quimiocinas probablemente también intervengan en el tráfico linfocitario al pulmón y los bronquios en las alergias (201).

Además la mayoría de los linfocitos de lámina propia e intraepiteliales del intestino expresan los receptores CXCR3 (que une a la quimiocina CXCL10 o I-TAC entre otras) y CCR5, cuyos ligandos son CCL5 (RANTES) y CCL3/4 (MIP α/β), que facilitan su permanencia en el intestino (202).

En suma, con los datos obtenidos de animales y humanos se ha propuesto un modelo de tráfico linfocitario que indica que los linfocitos primados en las placas de Peyer se dirigen preferencialmente a la lámina propia del intestino delgado y los estimulados en el apéndice e intestino grueso se establecen en mayor proporción en la misma mucosa. Los linfocitos primados en el BALT/NALT en su mayoría van a los bronquios, faringe, oído medio y a las glándulas lacrimales, nasales y salivales. Además los sitios efectores de la glándula mamaria y mucosa urogenital reciben aportes tanto del GALT como del BALT/NALT (195). Sin embargo se debe tener en cuenta que además del tráfico preferencial, la presencia del antígeno en los sitios efectores vecinos al lugar de inducción (primado) de los linfocitos puede

- 1) causar una inducción *in situ* de linfocitos *naive* en mucosas consideradas sólo efectoras o
- 2) provocar una mayor retención, proliferación o diferenciación terminal con rescate de la apoptosis por señales coestimuladoras;

El resultado general sería la mayor acumulación de linfocitos específicos en la mucosa donde se produjo la inmunización que la observada en las mucosas lejanas, aunque no necesariamente debida (sólo) al tráfico privilegiado (203).

Estos hechos plantean la necesidad elegir nuevas vías de vacunación por las mucosas. Una protección más completa en todas las mucosas podría necesitar dos

inoculaciones, una nasal y otra oral (197). Patógenos que infectan determinadas mucosas podrían requerir formas de inmunización que den una protección acentuada en esos sitios. Prototipos de vacunas virales por vía nasal dieron buena protección en cuello uterino y vagina (204 y 205). Una dosis de refuerzo aplicada en una mucosa lejana al sitio de vacunación primario puede aumentar la respuesta inmune de la mucosa que recibe la dosis de refuerzo (206).

Junto a la determinación del mejor sitio para inocular el antígeno, la búsqueda de nuevas vacunas de mucosas, más efectivas, prácticas y accesibles incluyen una miríada de diversas metodologías cuya descripción completa excede en mucho el espacio de esta introducción.

C.2. El sistema inmune de las mucosas como parte del sistema inmune de todo el organismo

A pesar del modo en que fue concebido, el sistema común de las mucosas presenta numerosas conexiones con el sistema inmune general y forma parte de él desde que las bases celulares y moleculares de la respuesta inmune son similares en todos los tejidos linfoides.

Hace una década predominaba la idea de que los tejidos de las mucosas contenían su propio sistema inmune local sobre la base de que una inmunización sistémica es generalmente inefectiva para inducir la respuesta inmune en las mucosas (207, 10 y 11). Con posterioridad se fue acumulando creciente evidencia de que con una inmunización parenteral (con varios antígenos vacunales replicantes o no y bajo ciertas condiciones) es posible generar la aparición de CSA de isotipo IgA e IgG en varias mucosas. Aunque los mecanismos causantes de estos efectos no están bien aclarados, esto obliga a tener en cuenta también a las rutas de administración sistémicas cuando se quiere determinar cuál es la que da mejor protección en las mucosas (208).

La comunicación más evidente y mejor estudiada entre el MALT y el resto del sistema inmune es el ya tratado fenómeno de la tolerancia oral. La mayoría de las hipótesis explican la tolerancia oral por la activación en el MALT de algunas de las

células que participan de la respuesta inmune (células dendríticas, células T CD4⁺, células Tr, células T CD8⁺ TCR $\gamma\delta$ ⁺), tras lo cual se dirigen a los órganos sistémicos para dar tolerancia o son eliminadas evitándose la migración a tejidos que no son mucosas (migración que ocurriría en situaciones no tolerogénicas).

Como ya se comentó, otros autores postulan que lo que genera tolerancia es el pasaje de antígeno desde la mucosa al torrente sanguíneo. Como en paralelo se indica que la supervivencia de las células T depende de una periódica estimulación vía sus TCR; en este caso la conexión entre el MALT y los otros tejidos linfoides estaría en que los antígenos de la dieta (y quizás de los microorganismos comensales) juegan un rol más activo en perfilar el repertorio (de especificidad) de las células T periféricas de lo que comúnmente se supone (119).

C.3. La producción sistémica de anticuerpos por inmunización oral

Otra conexión entre ambos sistemas incluye a los casos en los que por inmunización oral o nasal aparece respuesta inmune sistémica (principalmente en el bazo) con anticuerpos circulantes. Aunque inicialmente los resultados fueron confusos (209), superado el problema de la baja inmunogenicidad de la mayoría de los antígenos por la vía de las mucosas (por medio de una adecuada elección del antígeno, o de acompañar a las vacunas con un adyuvante competente o de dotarlas de un sistema de descarga eficaz) apareció una buena variedad de experimentos en los que la inmunización por mucosas produce respuesta inmune protectora humoral y celular en los compartimentos sistémico y de mucosas (191, 206, 209-212).

Como se dijo antes, en el caso de los linfocitos B activados en el NALT, la aparición en sangre de una población con fenotipo $\alpha_4\beta_7^{\text{alto}}$, L-selectina^{alto} justifica el tráfico linfocitario a los ganglios linfáticos sistémicos (199). Por el lado de los linfoblastos activados en el GALT, algunos expresan $\alpha_4\beta_1^{\text{alto}}$, LFA-1^{alto}, L-selectina^{int.} y son capaces de transvasar en tejido linfoide sistémico y eventualmente en órganos inflamados que no son mucosas al detenerse en los endotelios que expresan sus correspondientes ligandos VCAM-1, ICAM-1/2 y PNA_d. En particular una subpoblación CLA⁺, CCR4⁺ puede estar predeterminada a dirigirse a la piel con endotelio E-

selectina^{alto} y que exhibe la quimiocina CCL17 (TARC; Ref. 195) al menos en pacientes alérgicos (201).

C.4. La producción de anticuerpos en la médula ósea

C.4.1. La médula ósea como órgano productor de anticuerpos

Al pensar en la médula ósea inmediatamente la asociamos con su función hematopoyética. Es evidente que la médula ósea roja tiene como principal actividad la generación de los distintos linajes de las células que una vez maduras constituyen los elementos de la sangre y parte del tejido linfoide. Es además el único órgano que conserva esta función después del nacimiento. La médula ósea también posee en mamíferos una menos conocida pero bien establecida actividad como productor de anticuerpos luego de una inmunización sistémica. Los indicios de que en la médula ósea hay anticuerpos se pueden rastrear hasta los albores de la inmunología (213) aunque esos trabajos pioneros no probaron formalmente que los anticuerpos eran realmente producidos en la médula ósea misma. Los artículos en los que verdaderamente se prueba la síntesis de anticuerpos en la médula ósea aparecieron hace varias décadas y en ellos se midió el aumento de los anticuerpos en los sobrenadantes de cultivos de explantos de órganos provenientes de conejos inmunizados con la vacuna de la paratifoidea (214) o la incorporación de glicina-C¹⁴ en la fracción gamaglobulina y de anticuerpos anti-albúmina de huevo de gallina (OVA) en cultivos preparados con órganos de cobayos inmunizados con adyuvante de Freund completo (215). En este último caso se observó que la médula ósea aporta al organismo mayores cantidades de anticuerpos que el bazo y los ganglios linfáticos.

Posteriormente surgieron un cúmulo de trabajos que probaron la formación de grandes cantidades de inmunoglobulinas y de anticuerpos específicos en la médula ósea en varias especies de vertebrados y que revisados por otros autores concluyeron que la médula ósea es la principal fuente de inmunoglobulinas del suero en inmunizaciones sistémicas (216 y 217). De esos trabajos destacamos los que demostraron que también en humanos la médula ósea es (sin tener en cuenta a las mucosas) el principal sitio de producción de inmunoglobulinas (218 y 219) y el que observó la formación de placas de hemólisis debidas a CSA anti-glóbulos rojos de oveja que aparecen en la médula ósea de

ratones que recibieron 2 inmunizaciones (216) al punto de superar al bazo después de los 14 días post-inmunización (dpi).

Algunos estudios previos que investigaron a la médula ósea como órgano de formación de anticuerpos habían dado resultados negativos, en especial para antígenos T-dependientes (217 y 220). Esto se debió a que la médula ósea tiene un período de inducción más largo y en una inmunización sistémica primaria sin adyuvante solamente pueden llegar a encontrarse unas pocas CSA en la médula, y esto ocurre recién unas semanas después de la inmunización (216). En cambio la aparición de CSA en médula ósea resulta característica de una respuesta secundaria en la cual los blastos activados por antígeno abandonan el bazo o los ganglios linfáticos correspondientes en las fases tempranas de la respuesta y migran a la médula ósea en donde se convierten en células plasmáticas, de modo que una esplenectomía hecha hasta 2 días después de la 2ª inyección evita la aparición de CSA en la médula (221), el mismo momento a partir del cual se registra un pico de entrada en la médula ósea de blastos que habían incorporado timidina- H^3 (222). En línea con que la respuesta secundaria depende de la existencia de células de memoria formadas durante el primado, experimentos que combinan la construcción de parabiontes con parejas de ratones primados que difieren en el alotipo de cadena pesada γ_{2a} (locus Igh-1) de inmunoglobulina con esplenectomía de uno de ellos demostraron que luego del desafío antigénico ambos miembros del parabionte expresaron CSA del alotipo del ratón que tiene bazo, indicando que las células B de memoria deben ser estimuladas en los órganos linfoides periféricos antes de la migración a la médula ósea (222).

Una eficiente expresión de CSA en médula ósea también depende de la actividad de células T, como se desprende de la baja cantidad de CSA que hay en médula ósea de ratones *nude* atímicos jóvenes (223 y 224) que es acompañada por una mayor proporción de CSA que expresan el isotipo IgM a expensas del IgA (225). Esta caída en la cantidad total de CSA de la médula ósea (números absolutos) no se verifica en el bazo ni en los ganglios (226). Un trasplante de timo de neonato bajo la cápsula del riñón de los ratones *nude* puede corregir estos defectos aunque la recuperación de las células que contienen IgG o IgA en médula comienza más tarde que en el bazo (226).

Otra característica de la aparición de CSA en la médula ósea es que su contribución al total de CSA (de cualquier especificidad) aumenta con la edad. En ratones de pocas semanas de vida la contribución de la médula ósea al total de CSA es un bajo porcentaje, pero alrededor de los 3 meses de edad se convierte en el contribuyente mayoritario y con el avance de la edad su participación se hace cada vez más importante (217 y 227).

El incremento de las CSA en la médula ósea concomitante con la edad ocurre incluso en ratones *nude* (225) aunque se ve seriamente retrasado (228). Que con el avance de la edad la médula ósea acumule más CSA y que éste sea un suceso que ocurre en la respuesta de tipo secundaria ha llevado a postular que los anticuerpos producidos en médula ósea son un reflejo de los antígenos que el individuo ha encontrado repetidas veces en el ambiente a lo largo de su vida y a mayor tiempo de vida mayores probabilidades de que distintos antígenos hagan contacto con él más de una vez (217, 223 y 225). Esta hipótesis se relaciona con que la médula ósea es un órgano con un microambiente privilegiado para mantener a las CSA ya que la médula de un animal (sea *naive* o recientemente inmunizado) libera uno o más factores solubles (no bien identificados) que sostienen la síntesis de anticuerpos *in vitro* (229), en cambio en los ganglios linfáticos los centros germinales son de corta duración y se disocian para dar lugar a la formación de nuevos al estímulo de otros antígenos distintos (230).

Si se utiliza un antígeno replicante como en el caso de una infección aguda con el virus de la coriomeningitis linfocitaria (LCMV), es suficiente con la infección primaria para obtener CSA antiviral en la médula ósea. La cinética de la respuesta indica que la aparición de estas células plasmáticas está bastante retrasada con respecto al bazo, sin embargo las CSA del bazo declinan con la eliminación del virus y a las pocas semanas la médula ósea se convierte en el principal productor de anticuerpos (231). La presencia de células plasmáticas antiviral en médula se mantiene por más de 1 año y explican la permanencia de los altos títulos de anticuerpos en suero que protegen contra una segunda infección (231). Similares resultados fueron encontrados en otras infecciones virales agudas (232 y 233).

Tras una infección viral aguda, la médula ósea también se puebla de linfocitos T citotóxicos (CTL) que muestran actividad efectora específica y el fenotipo activado

CD8⁺, CD18⁺ (LFA-1) y que pueden permanecer allí hasta 1 año, de modo similar a lo que ocurre en el bazo (234) aún sin antígeno (235). Es llamativo que en ratones no inmunizados la proporción de células CD8⁺ que expresan el fenotipo activado en la médula es bastante mayor que la del bazo (234). Además una transferencia de células de médula ósea de un individuo inmunizado con distintos microorganismos o toxinas puede transmitir inmunidad protectora (humoral o mediada por células) en receptores *naive* (234) o en pacientes inmunosuprimidos (236). Esto último tiene potencial en clínica ya que los pacientes sometidos a trasplante de médula ósea son severamente inmunosuprimidos y muchos pueden quedar comprometidos por 1 o más años (237). A pesar de ello es común eliminar las células T de las médulas óseas donantes para reducir la severidad de la reacción injerto contra huésped (238), sin embargo estrategias alternativas están en estudio (239).

Las células T que llegan a médula ósea también incrementan en número a medida que el individuo envejece pero no por ello pierden actividad de CTL (240). Luego de una inmunización en ratón las células T específicas CD4⁺ activadas en los órganos periféricos migran a la médula ósea y, al igual que en el caso de las células B, se ha postulado que el mayor porcentaje que hay en la médula respecto al bazo y ganglios linfáticos de células CD4⁺ que tienen el fenotipo activado/memoria CD44⁺, CD62L⁻ (L-selectina), se debe a que en la médula hay una acumulación de células T que son la suma de los distintos estímulos antigénicos durante la vida del individuo (241).

C.4.2. Las CSA de médula ósea provienen de células B migrantes de los centros germinales

Ya mencionamos que en una inmunización con un antígeno no replicante las CSA que aparecen en médula ósea son producto de las células B activadas por antígeno en los ganglios linfáticos o el bazo durante una respuesta secundaria. Si el antígeno es un virus, la infección primaria aguda es suficiente para que la médula reciba CSA específicas pero su cinética de poblamiento está retrasada respecto al bazo. La razón de estos desfases es que los blastos B activados que migran a la médula ósea son desprendimientos de los

centros germinales que se desarrollan en los órganos linfoides secundarios que drenan el lugar de inoculación del antígeno (229 y 242).

Las células B de los centros germinales tienen alta avidéz por la aglutinina de maní (PNA) mientras que las células plasmáticas maduras de los ganglios linfáticos y la mayoría de los linfocitos del conducto torácico y sangre periférica no poseen avidéz por la PNA (243). Tres días después de un desafío secundario, un pico de blastos B específicos al antígeno y con fenotipo de centro germinal (PNA^{alto}) atraviesan el conducto torácico y pasan a sangre (229). La transferencia adoptiva de células de centro germinal a los 3 días post-desafío (dpd) a receptores *naive* produce la aparición de grupos de células PNA^{alto} que expresan anticuerpos específicos en citoplasma en médula ósea. Si en vez de transferirlas, las células de centro germinal de 3 o 4 dpd son cultivadas, sintetizan anticuerpos *in vitro*. Con células de centro germinal de 7 o 10 dpd no se constatan estos efectos (229, 244).

Por otra parte las células B de centro germinal son CD62L⁻ (L-selectina) por lo que no es de esperar que retornen a los ganglios, y además las células troncales (*stem*) de médula ósea que durante un transplante vuelven a médula también son PNA^{alto}, es decir que ambos tipos de células podrían ligar el mismo receptor de unión de la médula ósea (229).

C.4.3. El tráfico (*homing*) linfocitario hacia la médula ósea

Las moléculas responsables del tráfico predeterminado hacia la médula ósea no han sido claramente identificadas. Como los blastos B que dejan los centros germinales y las células productoras de anticuerpos que se establecen en la médula ósea unen la PNA, hace varios años fue propuesto que las células que migran a la médula ósea exponen un ligando glicosilado con grupos terminales galactosil-N-acetil-galactosil (el hidrato de carbono que une la PNA) que sería el responsable de dirigir el tránsito a la médula ósea (242). Esta propuesta resulta un poco simplista ya que son varias las proteínas de membrana capaces de unir PNA, una de las más importantes es una forma de CD44 incompletamente sialilada y las células plasmáticas residentes en médula ósea de distintos pacientes con mieloma múltiple muestran una clara diferencia en el perfil de

proteínas que unen PNA entre sí y que algunas células plasmáticas de pacientes no tienen una forma de CD44 que ligue PNA (245). De todos modos CD44 se encuentra en células plasmáticas normales de médula (246) y puede jugar un rol principal en su tráfico (*homing*).

Otra candidata es la integrina $\alpha 4\beta 1$ ya que es expresada por las células plasmáticas normales de médula ósea humana aunque es dudoso que su ligando VCAM-1 se encuentre en el endotelio de la médula y la unión es a la fibronectina de estroma, es decir que el rol de $\alpha 4\beta 1$ puede ser permitir la permanencia en ese tejido después de producido el trasvasamiento (247).

Más recientemente se demostró que CD22 puede intervenir en el tráfico linfocitario hacia la médula ósea. CD22 es una proteína de membrana específica de células B que funciona como un regulador negativo de su señalización pero también reconoce ácido siálico en glicanos de células diana. Usando una forma recombinante soluble del receptor (CD22-Fc) se determinó que los ligandos para CD22 están expresados en células del endotelio sinusoidal de la médula ósea murina pero no en otros tejidos. Ratones tratados con CD22-Fc o con anticuerpo anti-CD22 redujeron en un 50 % las células B maduras recirculantes en médula ósea sin afectar su número en el bazo (248). Se ha observado que en el proceso de tránsito la médula ósea produce un quimioatrayente para las células B que se desprenden de los centros germinales (242), que podría ser CXCL12 (SDF-1), una quimiocina expresada por la médula ósea, la pulpa roja del bazo y los cordones medulares de ganglios linfáticos cuyo correspondiente receptor, CXCR4, es expresado por las células plasmáticas (249).

C.4.4. La producción de anticuerpos en la médula ósea por inmunización oral

El caso de la aparición de CSA en la médula ósea por inmunización oral es particular porque por muchos años ha habido un vacío experimental que impidió echar luz a la cuestión de si por una inmunización por la vía de las mucosas la médula ósea recibe CSA, como lo hace cuando se aplica una inmunización sistémica.

Al momento en que nosotros iniciamos nuestros experimentos, había virtualmente un único trabajo que estudiaba la importancia de la médula ósea en la producción de anticuerpos específicos IgA en el transcurso de una inmunización por las mucosas con antígenos T-dependientes no replicantes (Alley, CD y col. 1986; Ref. 250), pese a que el tráfico de células B precursoras de IgA estimuladas en el GALT podía sospecharse porque los cultivos de médula ósea resultan en una gran producción de IgA (251-253). Esto último no descarta la posibilidad de que la médula ósea posea un ambiente que favorezca una tardía diferenciación con conmutación al isotipo IgA que no ocurre en otros sitios sistémicos, aunque la observación de que los ratones libres de gérmenes tienen un déficit de células IgA⁺ en la médula ósea sostiene la hipótesis de la conexión GALT-médula ósea (227).

Investigar el modo en que con una inmunización oral aparecen CSA específicas en la médula ósea y el bazo es de obvia importancia para el desarrollo de vacunas por las mucosas que brinden protección sistémica sostenida en el tiempo. En el citado trabajo de Alley, CD y col. (250) se utilizan glóbulos rojos de oveja y sólo observan CSA IgA anti-glóbulos rojos luego de administrar el antígeno por vía oral en forma crónica.

En el presente trabajo, nosotros aprovechamos la gran capacidad de la toxina colérica como antígeno en las mucosas para estudiar cómo una respuesta inmune iniciada en el GALT (con una o pocas dosis de antígeno) se integra en la respuesta inmune de anticuerpos a nivel celular, para lo cual nos fijamos los objetivos que se detallan a continuación.

OBJETIVOS

Para evaluar al GALT como parte integrante de todo el Sistema Inmune durante una inmunización en la mucosa intestinal proponemos:

- 1) Investigar a la médula ósea como órgano productor de anticuerpos.
- 2) Determinar la cinética de aparición de CSA específicas en médula ósea, bazo y GALT.
- 3) Estudiar el origen y la dinámica poblacional de las CSA del bazo.
- 4) Analizar el rol de la médula ósea en la respuesta de memoria.
- 5) Evaluar los mecanismos celulares que mantienen a largo plazo la producción de anticuerpos.

MATERIALES Y MÉTODOS

D.1. Animales:

Para los estudios cinéticos de aparición de anticuerpos y CSA específicos se emplearon ratas Wistar exocriadas provenientes de la colonia del Bioterio de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA.

Para los experimentos de transferencia de células de órganos linfoides fueron utilizadas ratas endocriadas Wistar WHAK/Hok con certificado de salubridad para gérmenes específicos del Bioterio de la Facultad de Veterinaria de la UNLP, La Plata, cepa originaria del Jackson Laboratory (Bar Harbor, EEUU).

Todos los animales fueron mantenidos con fotoperíodo constante de doce horas de luz por día en ambiente con temperatura de entre 18 °C y 24 °C, con disponibilidad de agua y alimento *ad libitum* durante todo el período de duración de los experimentos. El alimento balanceado usado (Cooperación para rata y ratón, Cooperativas Agrícolas Argentinas) poseía proteína bruta (mínimo) 23 %, extracto etéreo (mínimo) 5 %, fibra cruda (máximo) 6 %, minerales totales (máximo) 10 %, Calcio 1,3 %, Fósforo (disponible) 0,8 %, humedad (máxima) 12 %.

D.2. Esquemas experimentales de inmunización:

D.2.1. Inmunización intra-placas de Peyer (ipP):

Ratas Wistar hembras de 8 o 35 semanas de edad, en grupos de 4 a 6 animales fueron inoculadas con 20 µg de toxina colérica purificada de *Vibrio cholerae* (Sigma Chemical Co, St. Louis) mediante inyección ipP. Distintos conjuntos de animales fueron sacrificados a la primera, segunda o tercera semana post-inoculación. Se prepararon, individualmente de cada rata, suspensiones celulares de placas de Peyer, ganglio mesentérico, bazo y médula ósea.

D.2.2. Una, dos o tres dosis por vía intragástrica (ig):

Se formaron tres grupos de 4 a 6 ratas Wistar hembras de 8 semanas de edad. Un grupo de animales fue inoculado con 20 µg de toxina colérica. Otro lote de ratas recibió dos

administraciones de 20 µg de toxina colérica cada una con un intervalo de una semana entre una y otra dosis. El tercer conjunto de animales fue inmunizado con tres dosis de 20 µg de toxina colérica cada una a intervalos semanales entre cada intubación.

Todos los grupos fueron sacrificados a las dos semanas posteriores a la última dosis recibida.

Se obtuvieron suspensiones celulares individuales para cada rata de placas de Peyer, ganglio mesentérico, bazo y médula ósea.

D.2.3. Cinética de los primeros días de la respuesta hacia una dosis ig:

Ratas Wistar de entre 8 y 12 semanas de edad fueron inmunizadas por vía oral con una dosis de 20 µg de toxina colérica. En grupos de 4 a 6 animales, las ratas fueron sangradas a blanco a los 2, 5, 7 y 11 dpi. De cada animal se obtuvo el suero, se extrajo fluido intestinal y se prepararon suspensiones celulares individuales de placas de Peyer, ganglio mesentérico, bazo y lámina propia de intestino delgado.

Parte de este esquema experimental también fue empleado para realizar cultivos primarios de órganos linfoides como se explicará más adelante.

D.2.4. Respuesta anamnésica en una inmunización oral:

Ratas de 8 semanas de edad, en grupos de cuatro animales, recibieron una primera inmunización de 20 µg de toxina colérica por vía ig. Tres meses después les fue administrado un desafío consistente en otros 20 µg de toxina colérica por la misma vía.

A los 2 y 5 dpi se obtuvo suero y fluido intestinal de cada rata y se prepararon suspensiones celulares de las placas de Peyer, ganglio mesentérico, bazo y lámina propia de intestino delgado de cada individuo.

D.2.5. Cinética de la respuesta a largo plazo luego de tres dosis ig:

Ratas de ocho semanas de edad fueron inmunizadas con tres dosis de 20 µg de toxina colérica cada una por la ruta oral con intervalos de una semana entre una dosis y la siguiente. De lotes de 4 a 6 animales a los 7, 21, 60, 90, 150, 240 y 300 dpi se obtuvo fluido

intestinal y suero en cada rata y se realizaron suspensiones celulares individuales de placas de Peyer, ganglio mesentérico, bazo y médula ósea.

D.2.6. Respuesta anamnésica luego de tres dosis ig:

Grupos de 4 a 6 animales fueron primados con tres dosis de toxina colérica de igual modo que en el punto 5. Ocho meses después de la última inmunización se les inoculó un desafío de 20 μg de toxina colérica por la vía ig. A los 3 y 5 dpd se colectó fluido intestinal y se extrajeron células de los mismos órganos señalados en el punto 5.

D.2.7. Inmunizaciones ig en ratas a las que se les extirpó el bazo:

A ratas de 16 semanas de edad se les extirpó el bazo, como controles se emplearon ratas que no sufrieron la extirpación. Veinte días después de la esplenectomía recibieron 2 inmunizaciones ig de 20 μg de toxina colérica cada una con intervalo de 7 días entre dosis. A los 21 días luego de la última inoculación se obtuvo suero de cada rata y se realizaron suspensiones celulares de médula ósea, ganglio mesentérico y (en los controles) bazo.

D.2.8. Estudios de transferencia adoptiva de memoria:

Dos ratas Wistar WHAK/Hok endocriadas de doce semanas de edad fueron inmunizadas con tres dosis de 20 μg de toxina colérica cada una mediante intubación ig con intervalos semanales entre cada inoculación.

Luego de 10 meses estos animales fueron sacrificados para ser empleados como dadores de células. Se extrajo el ganglio mesentérico, bazo y médula ósea de los dadores y se preparó para cada órgano una suspensión celular común de todos los dadores, en una fracción de estas células se determinó la cantidad de CSA antitoxina.

Por otro lado distintas cantidades de células de cada órgano fueron transferidas a receptores singeneicos no inmunizados de once semanas de edad por inyección intravenosa en la vena lateral de la cola.

Como se explica más adelante, a una fracción de las suspensiones celulares de bazo y médula ósea les fueron removidos los linfocitos T por inmunocitoaderencia (*panning*) empleando anticuerpo monoclonal anti-CD3 (clon G4.18, Pharmingen, San Diego). A otras

fracciones de las mismas suspensiones celulares se les separaron los linfocitos B por inmunocitoadherencia con anticuerpo monoclonal anti-CD45RA (clon OX33, Pharmingen).

Las suspensiones celulares a las que se les quitaron las células B o las células T fueron transferidas a receptores singeneicos por inoculación intravenosa.

Los animales receptores fueron desafiados por la vía oral con dos dosis de 20 μ g de toxina colérica cada una al segundo y cuarto días posteriores a la transferencia. A los seis días luego del último desafío, de los animales receptores se obtuvo el fluido intestinal y se prepararon suspensiones celulares individuales de ganglio mesentérico, bazo y médula ósea

NOTA: En todos los experimentos, en las suspensiones celulares que se obtuvieron de los órganos extraídos o de los cultivos realizados, se investigó la cantidad de CSA antitoxina colérica mediante la técnica de ELISA spot (ELISPOT).

Previo a la extracción de los órganos a las ratas siempre se les extrajo sangre para obtener muestras de suero. Los niveles de anticuerpos antitoxina presentes en las muestras de suero y fluido intestinal de cada rata se determinaron mediante ELISA.

D.3. Administración de antígeno:

D.3.1. Inoculación ipP:

Las ratas fueron ayunadas (pero con acceso libre al agua de bebida) aproximadamente durante 18 horas y anestesiadas profundamente con éter etílico. Se trabajó con instrumental estéril y en área desinfectada se colocó al animal sobre una tabla quirúrgica, se le limpió el abdomen con etanol 96° grado farmacéutico o con Povidona yodada 10 %, lauril sulfato de sodio 0,2 % (Difexon PVPI, Andreu). Tomando la pared abdominal en su línea media con una pinza para microdissección, se le hizo una incisión de entre 10 y 15 mm con una tijera recta de microdissección hasta llegar a la cavidad peritoneal.

Con una pinza de punta curva sin diente se extrajeron delicadamente asas del intestino delgado localizando las placas de Peyer hasta exponer cinco de ellas. Se inocularon 2 o 3 μ l en cada placa de Peyer (según su tamaño) de una solución 2 μ g/ μ l de toxina

colérica purificada en 0,05 M de buffer Tris.HCl pH 7,5 hasta llegar a un inóculo de 20 µg de toxina por animal. La inyección ipP se realizó con una microjeringa de 10 µl con aguja de punta biselada calibre 26s (Hamilton Co. Reno).

Finalmente se introdujo el intestino nuevamente en la cavidad peritoneal y se suturaron independientemente la musculatura abdominal y la piel con sutura de seda tamaño 5-0, aguja curva de 20 mm con punta redonda.

D.3.2. Inoculación ig:

Se empleó sonda para alimentación nasogástrica de prematuros, flexible, siliconada de 1,4 mm de diámetro (Tipo K-35, Koler) o un catéter tipo Tom Cat 3½ Fr. (Sovereign, Sherwood Medical) semirígido, con punta roma y apertura lateral.

Las ratas fueron ayunadas durante 18 horas para disminuir la acidez estomacal y permanecieron con libre acceso al agua de bebida. El tubo fue pasado hasta el estómago y no fue necesaria mordaza bucal.

Mediante una jeringa que se conectó a la sonda se descargó 1 ml de una solución de 20 µg/ml de toxina colérica diluida en PBS, 3 % bicarbonato de sodio para neutralizar el pH ácido del estómago.

D.4. Extracción de fluido intestinal:

Las ratas fueron ayunadas durante 16 a 20 horas previas a la extracción pero con ingestión de agua libre. Luego de ser sacrificadas por sangrado a blanco se diseccionó el intestino delgado entero, excepto la porción de duodeno próxima al estómago que contiene la apertura del conducto biliar, y se lo enjuagó en PBS frío para eliminar restos de sangre. Se lo cortó transversalmente en dos mitades que se depositaron en una placa de Petri con PBS frío. Todo el procedimiento se llevó a cabo trabajando sobre hielo y con todas las soluciones previamente enfriadas en hielo.

Para extraer el contenido intestinal e inhibir su actividad proteolítica se adaptó un procedimiento ya descrito (254). Se hicieron pasar 2 ml de una solución 50 mM EDTA, 0,1 mg/ml inhibidor de tripsina de soja (Sigma Chemical Co.) por la luz intestinal de cada mitad de intestino. Para ello se tomó la solución inhibidora de a un mililitro con pipeta de transferencia de polietileno con bulbo incluido, la punta de la pipeta se introdujo en uno de los extremos del intestino y se descargó la solución en el interior haciendo vaciar todo su contenido dentro de un tubo cónico de centrifuga de 15 ml.

Luego de colectado el contenido de todo el intestino se le agregaron 20 μ l de solución 100mM de PMSF (Fluoruro de Fenilmetilsulfonilo, Sigma) en etanol como inhibidor de proteasas y 100 μ l de suero fetal bovino (SFB; Gibco BRL) como sustrato alternativo de alguna potencial actividad proteolítica remanente. Se homogeneizó la muestra y se centrifugó 5 minutos a 10.000 r.p.m. Se recuperó el sobrenadante, al que se le agregaron otros 20 μ l de solución de PMSF y 100 μ l de SFB. Se mezcló, alicuotó y congeló rápidamente a -20 °C hasta el instante de usarla.

D.5. Preparación de suspensiones celulares de órganos linfáticos

En todos los casos las ratas, con ayuno de alimento pero no de líquido, fueron anestesiadas por inhalación de vapores de éter etílico y muertas por sangrado a blanco mediante punción cardíaca. La extracción de sangre se realizó sin anticoagulantes para recuperar muestras de suero.

Se limpió el abdomen con etanol 96° y se disecaron los órganos de interés. En todos los casos se trabajó sobre hielo y con las soluciones enfriadas.

D.5.1. Células de placas de Peyer:

Se tomaron los intestinos luego de la extracción de fluido intestinal. En los experimentos en los que no se recuperó el contenido del intestino simplemente se lo enjuagó previamente en buffer citrato-fosfato.

Examinando bajo lupa se localizaron las placas de Peyer y se las separó del intestino cortándolas con tijera para microdissección curva. Se incubaron las placas en 1 o 2 ml de buffer citrato-fosfato, 1 mM ditiotreitól durante 3 minutos a temperatura ambiente agitando vigorosamente para fluidificar el mucus como se describió previamente (255). Aún sin disgregar, las placas de Peyer se lavaron 5 veces con buffer citrato-fosfato y fueron colocadas sobre una malla de acero inoxidable que se apoyaba sobre una placa de Petri, manteniéndolas húmedas con medio de cultivo RPMI 1640 (Gibco), suplementado con 5 % de SFB. Con un émbolo de jeringa de 3 o 5 cc se las disgregó, forzando a las células desprendidas a atravesar la malla. Se tamizó agregando constantemente medio de cultivo para evitar que se seque el tejido y recuperar la mayor cantidad de células.

La suspensión celular cruda fue pasada a través de una columna rellena con 1 cc de lana de nylon previamente embebida en el medio de cultivo para eliminar restos de tejidos y material agrumado.

El eluido con células fue diluido al medio con buffer citrato-fosfato, se centrifugó 5 minutos a 2000 rpm y las células se resuspendieron en buffer. La suspensión celular se lavó dos veces con medio de cultivo, resuspendiendo finalmente en medio con 10 % SFB. Se calculó la concentración celular diluyendo una alícuota en solución de Turk (violeta de genciana en ácido acético al 3 %) y contando en hemocitómetro (cámara de Neubauer) o contando el número de células viables por el método de exclusión del azul tripán.

D.5.2. Células de la lámina propia del intestino delgado:

Luego de extraído el fluido intestinal y removidas las placas de Peyer se utilizó una modificación de una técnica publicada por otros autores (256). El intestino embebido en buffer citrato-fosfato frío se extendió sobre una toalla de papel y se lo abrió longitudinalmente por la línea del mesenterio cortando con tijera recta para microdissección. Se sumergieron las partes en buffer citrato-fosfato dentro de una placa de Petri de 10 cm de diámetro y con una pinza se las sacudió con energía para desprender los restos de contenido intestinal. Además se separó todo el tejido adiposo adyacente.

Los tejidos fueron incubados 3 minutos con agitación en 10 ml de buffer citrato-fosfato, 1 mM ditioneitol a temperatura ambiente en un vaso de precipitados para desprender el mucus.

Se los lavó dos veces con citrato-fosfato en placas de Petri sobre hielo y luego se incubó en 10 ml de buffer citrato-fosfato, 1,5 % albúmina de suero bovino (BSA) durante 12 minutos a 37 °C con agitación moderada en vaso de precipitados. Luego los tejidos fueron pasados a un tubo cónico de centrifuga de 50 ml y se los "vortexeó" vigorosamente por 30 segundos para desprender el epitelio. Posteriormente el resto del intestino fue transferido a placas de Petri y lavado allí dos veces con citrato-fosfato sobre hielo. Se cortaron los segmentos de intestino en pequeños trozos (1 o 2 mm de lado).

Los trozos de tejido fueron colocados sobre una malla de acero inoxidable y se los mantuvo mojados con citrato-fosfato. Con el émbolo de una jeringa de 3 o 5 cc se disgregó el tejido forzando el desprendimiento de células y a que estas atravesen el tamiz, agregando abundante y constantemente buffer para que el tejido no se seque y facilitar la recuperación celular. La suspensión celular se colectó en un vaso de precipitados de 50 ml colocado debajo de la malla de acero y sobre hielo.

Para eliminar restos de tejidos y células muertas, la suspensión celular obtenida fue pasada a través de una columna rellena con 5 cc de lana de nylon previamente humedecida en buffer citrato-fosfato frío. Se recogió el eluido en tubos cónicos de 15 ml y se centrifugó 7 minutos a 2000 r.p.m. para luego resuspender en 1 ml de citrato-fosfato, 1,5 % BSA. Si la suspensión poseía restos de tejidos o grumos se la pasaba por segunda vez a través de una columna con 1,5 cc de lana de nylon previamente embebida en medio de cultivo RPMI 1640, 5 % SFB frío. El eluido de células se centrifugó 3 minutos a 2000 r.p.m. y se resuspendió en 1 ml de medio de cultivo. Para desechar fibras que se depositan en el fondo del tubo, se dejó decantar 3 o 4 minutos y se pasó el sobrenadante a otro tubo. Se lavó por centrifugación resuspendiendo finalmente en medio RPMI 1640, 10 % SFB. Se cuantificó la viabilidad celular por exclusión del azul tripán.

D.5.3. Células de ganglio mesentérico:

Al abrir el abdomen y antes de remover el intestino, se desplegó un poco el mesenterio en la zona del extremo del íleon cercana al colon. Cortando con tijera de microdissección se extirpó la cadena ganglionar que está incluida en la delgada lámina que forma el mesenterio.

Se colocó el conjunto del ganglio mesentérico en una placa de Petri con medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con 10 % SFB. Con pinza y tijera de microdissección se cortó y eliminó toda la grasa visible que rodea los ganglios linfáticos.

Se colocaron los ganglios sobre una malla de acero inoxidable con medio de cultivo. Los ganglios fueron disgregados presionando con el émbolo de una jeringa de 3 o 5 cc. Las células que fueron separadas se recolectaron en una placa de Petri. La suspensión celular fue filtrada en una columna con 1 cc de lana de nylon previamente humedecida con medio de cultivo frío para retener restos de tejidos y células muertas. El eluido de células se centrifugó 3 minutos a 2000 r.p.m. Se lavaron las células dos veces y resuspendieron en 1 ml de RPMI 1640, 10 % SFB. Se contó la concentración celular en hemocitómetro (cámara de Neubauer) a partir de una suspensión preparada en solución de Turk o, para cuantificar células viables, por exclusión del azul tripán.

D.5.4. Células de bazo:

Se disecó el bazo entero y se lo colocó con 4 ml de medio de cultivo RPMI 1640, 5 % SFB en una placa de Petri de 5 cm de diámetro sobre hielo. Se perfundió el bazo con 2-3 ml de medio de cultivo usando una jeringa de 3 o 5 ml con aguja calibre 21G (0,8 mm). En ocasiones, para facilitar el desprendimiento de células, se cortaron los extremos del bazo y presionó suavemente con el émbolo de una jeringa en las zonas donde se había inyectado medio de cultivo. Cuando el órgano se vació de una cantidad elevada de células, se tomaron las células liberadas con una pipeta de transferencia plástica con bulbo y se las colocó en tubos de Kahn. Para eliminar grumos o restos de tejidos, el contenido de los tubos decantó 3 o 4 minutos en hielo en posición vertical y se pasó el sobrenadante a otro tubo, eliminando esos restos. Se centrifugó 5 minutos a 2000 r.p.m. y se descartó el sobrenadante.

Para lisar los eritrocitos, el pellet de células fue resuspendido en 1 o 2 ml de una solución 0,017 M Tris.HCl, 0,144 M NH₄Cl pH 7,2 a temperatura ambiente y se incubó 4 minutos a temperatura ambiente. Inmediatamente de cumplido el tiempo los tubos fueron inundados con medio de cultivo frío y centrifugados 5 minutos a 2000 r.p.m. Las células fueron lavadas dos veces por centrifugación con medio de cultivo. Si se formaban grumos de restos celulares, se los removía con la punta de una pipeta Pasteur.

La resuspensión final se realizó en medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con 10 % SFB. La concentración celular se calculó en hemocitómetro (cámara de Neubauer) diluyendo una alícuota en solución de Turk o se contó el número de células viables por el método de exclusión del azul tripán.

D.5.5. Células de la médula ósea del fémur:

Se desinfectó la piel de una pata trasera con etanol 96°. La piel fue cortada y separada de los músculos de la pata con tijera de microdissección. Se separó el fémur de la musculatura cortando a ésta al ras del hueso. Las articulaciones con la tibia y la cadera fueron cortadas con una tijera fuerte. El hueso fue colocado dentro de PBS frío en una placa de Petri sobre hielo. Con una pinza fuerte se desgarró el cartílago de la articulación con la tibia, separándolo del fémur. El fémur fue enjuagado en PBS y con una tijera fuerte o alicate se cortaron las epífisis de ambos extremos exponiendo la médula ósea.

El fémur fue colocado en otra placa de Petri con 3 o 4 ml de medio de cultivo RPMI 1640, 5 % SFB sobre hielo y se vació la médula haciendo pasar medio de cultivo desde uno de los extremos abiertos del hueso hacia el otro con una jeringa de 3 o 5 cc con aguja calibre 21G, de modo similar a un método descrito (250). La operación fue repetida hasta vaciar toda la médula. Se disgregó la médula ósea en el medio de cultivo aspirándola y descargándola sobre la placa de Petri con la misma jeringa varias veces.

La suspensión celular fue colocada en un tubo de Kahn, se dejó decantar 3 o 4 minutos. Si decantaron grumos, se pasó la suspensión a otro tubo. Se centrifugó 5 minutos a 2000 r.p.m. y se descartó el sobrenadante. El pellet de células fue resuspendido y se incubó en 1 ml de solución Tris.HCl/ NH₄Cl pH 7,2 durante 4 minutos para lisar los eritrocitos.

Inmediatamente de cumplido el tiempo, el tubo fue inundado con medio de cultivo y se centrifugó 5 minutos a 2000 r.p.m. Se lavaron las células y la suspensión celular se ajustó a una determinada concentración trabajando de igual modo al descrito para células de bazo.

D.6. Ensayo de ELISA spot (ELISPOT) para cuantificar CSA anti-toxina colérica

El método de ELISPOT permite enumerar en forma individual a las CSA presentes en una muestra mediante una técnica inmunoenzimática sobre fase sólida por la cual los lugares donde estaban decantadas las células secretoras se revelan como puntos (*spots*) de depósito de un colorante insoluble. La siguiente es una adaptación realizada en nuestro laboratorio por Juan Fló basada en la técnica original (257 y 258) y su modificación para cólera (259 y 260).

Para evitar la acumulación de células en la periferia de los pocillos de placas de cultivo, debido al menisco que forma el líquido contra las paredes (efecto de borde) y que provoca una disminución de la sensibilidad, se utilizaron las tapas de las placas de cultivo de 24 pocillos de poliestireno (261) que poseen rebordes muy bajos que definen áreas circulares que se corresponden con la boca de los pocillos de la placa de cultivo (Corning Glass Works, Corning NY).

Cada una de las áreas de las tapas de las placas de cultivo fueron cubiertas con 200 μ l de una solución de 6 μ g/ml de monosialo-gangliósido GM1 (Sigma Chemical Co.) en PBS y se dejó adhiriendo toda la noche a temperatura ambiente en cámara húmeda.

Al día siguiente se enjuagaron las tapas tres veces con PBS, se volcó el líquido y se cubrieron las áreas con toxina colérica purificada (Sigma) a una concentración de 6 μ g/ml diluida en PBS. Se utilizaron 170 μ l por cada área y se incubó toda la noche a 4 °C en cámara húmeda. Se efectuaron controles sin antígeno.

Luego se lavó la placa tres veces con PBS y se bloquearon los sitios libres de unión a proteínas cubriendo las tapas con medio de cultivo RPMI 1640, 10 % SFB, incubando 2 horas en cámara húmeda a 37 °C.

Paralelamente se fueron preparando distintas concentraciones de cada una de las suspensiones celulares a analizar para que al menos una de las concentraciones pueda entrar en el rango de lectura óptimo (entre 20 y 150 *spots*) para permitir el conteo y minimizar los errores. Normalmente se hicieron diluciones seriadas al medio o al quinto, el rango de concentraciones a preparar fue determinado por experimentos previos.

En cuanto estas suspensiones estuvieron preparadas, se volcó el medio de cultivo bloqueante y se sembraron las distintas áreas con 130 μ l de las suspensiones celulares correspondientes. Se incubó en atmósfera con 5 % CO₂, 100 % humedad en incubadora bien nivelada y a 37 °C durante 6 horas.

Durante este tiempo las CSA específicas liberaron anticuerpos antitoxina los que se unieron a las moléculas de antígeno que estaban adheridas a la placa en el punto donde se encontraba depositada cada célula plasmática y sus adyacencias.

Cumplido el plazo de incubación se eliminaron las células mediante seis lavados con PBS, 0,05 % Tween 20 intercalando entre ellos 2 lavados con agua destilada, 0,05 % Tween 20 durante 30 segundos cada uno para provocar la ruptura por shock osmótico de las células más adheridas.

Las placas fueron incubadas toda la noche a 4 °C en cámara húmeda con 110 μ l por área con los correspondientes anticuerpos (IgG) policlonales fabricados en cabra, específicos para el isotipo de inmunoglobulina de rata que se deseó revelar y purificados por afinidad:

Anticuerpos anti-cadena γ de IgG de rata (cat. R5130, Sigma).

Anticuerpos anti-cadena α de IgA de rata (cat. A110- 102A, Bethyl Laboratories Inc.).

Anticuerpos anti-cadena μ de IgM de rata (cat. 55739, Organon Tecknika, Cappel Division).

Cada uno de estos antiseros fue diluido en PBS-Tween en una proporción que fue determinada por experimentos de titulación previos, eligiendo la mayor dilución que aún revela la mayor cantidad de puntos específicos con buena intensidad y mínima coloración de fondo.

Se lavó cinco veces con PBS-Tween para eliminar el anticuerpo no unido.

Se incubó 2 horas a temperatura ambiente en cámara húmeda con 110 μ l de anticuerpos hechos en conejo anti-IgG (cadenas H y L) de cabra, purificados por afinidad y conjugados con peroxidasa de rabanito (cat. 611620, Zymed Laboratories Inc. San Francisco) diluido en PBS- Tween. La dilución de trabajo fue determinada por titulaciones previas con los mismos criterios empleados para los anticuerpos anti-inmunoglobulinas de rata.

Se lavó cinco veces con PBS-Tween.

Los puntos de producto coloreado insoluble (debidos a los anticuerpos secretados por las células que se buscan cuantificar) fueron desarrollados cubriendo con solución de sustrato revelador (160 μ l/área) que consiste en una solución al 1 % en agar noble (Difco Laboratories) con 0,8 mg/ml para-fenilendiamina (PPD, Sigma), 0,1 % v/v peróxido de hidrógeno 30 vol.(Parafarm, Droguería Saporiti) diluidos en PBS. Para ello se contó con una solución al 2 % de agar en PBS, fundido y llevado a 45 °C en baño termoestabilizado. En el instante de usarla se preparó una solución de 1,6 mg/ml de PPD en PBS a 45 °C en baño a la que se le agregó el H₂O₂ tal que dio una solución 0,2 % v/v. Inmediatamente se mezclaron 1 vol. del agar con 1 vol. de sustrato y con ella se cubrieron las áreas descriptas.

Las placas se mantuvieron en oscuridad entre 10 y 15 minutos mientras se depositaban los cristales oscuros del producto de la reacción enzimática formando puntos visibles.

La reacción se detuvo sumergiendo en agua las placas unos minutos y al mismo tiempo se fueron contabilizando los puntos, en algunos casos con la ayuda de una lupa compuesta de bajo aumento (6X o 12X) y los datos fueron ajustados a números de CSA específicos (cada una formadora de un punto) por cada 10⁷ células nucleadas.

La especificidad del ensayo fue determinada con experimentos previos en los que se ensayó la capacidad de células de bazo provenientes de animales inmunizados y no inmunizados con toxina colérica de formar puntos en las placas cubiertas con la toxina o

con seroalbúmina bovina o sin antígeno. Solamente las células de las ratas inmunizadas probadas en las placas cubiertas con toxina colérica dieron resultados positivos, mientras que las pruebas hechas con células de animales no inmunizados o en placas cubiertas con BSA fueron negativas.

Para validar cada experimento, células de bazo de un control positivo fueron ensayadas en cada placa.

D.6.1. Cálculo del número total de CSA antitoxina por órgano

Para estimar las cantidades totales de CSA antitoxina de cada isotipo que tienen los órganos (número absoluto) es necesario conocer la cantidad total de células que poseen los órganos estudiados. Para ello, en algunos casos, la preparación de las suspensiones celulares se realizó en forma exhaustiva hasta vaciar completamente de tejido linfoide a los órganos y se contó la cantidad total de células nucleadas de cada uno.

En el caso de la médula ósea esta operación se hizo con un fémur. Mediante experimentos de incorporación de Fe^{59} , Deenen y col. (262) demostraron que en la rata un fémur representa el 9 % del total de la médula ósea de un individuo. Nosotros usamos esta información para calcular la cantidad total de células de toda la médula ósea a partir del número total de células de un solo fémur.

D.7. Ensayo de ELISA para determinar los niveles de anticuerpos anti-toxina colérica

Para evaluar la presencia de anticuerpos anti-toxina colérica en las muestras de suero y fluido intestinal se realizó un ensayo de ELISA con modificaciones a uno descrito por Lycke (255, 259 y 263).

A placas de microtitulación para ELISA de 96 pocillos de poliestireno con fondo plano (Corning, Corning Costar Co.) se les agregó 100 μ l en cada pocillo de una solución 3 μ g/ml de monosialo-gangliósido GM1 (Sigma) en PBS y se dejó adsorber toda la noche a temperatura ambiente en cámara húmeda.

Luego de lavar cuatro veces con PBS, se cubrió con 100 μ l por pocillo de toxina colérica purificada (Sigma) diluida a 3 μ g/ml en PBS. Se incubó toda la noche a 4 °C en cámara húmeda. Se prepararon algunos pocillos sin toxina colérica como controles.

Se volcó el antígeno y agregó 200 μ l por pocillo de leche descremada en polvo (Molico, Nestlé S.A.) al 8 % en PBS y se incubó 2 horas a 37 °C en cámara húmeda para bloquear los sitios de unión a proteínas aún libres.

Se lavó 5 veces con PBS, 0,05 % Tween 20.

Se sembraron 100 μ l de las diluciones de las muestras de suero y fluido intestinal en PBS-Tween. Las muestras de fluido intestinal fueron previamente centrifugadas 5 minutos a 10.000 r.p.m. y se analizaron a las diluciones iniciales de 1/5 y 1/50. Los sueros fueron analizados a las diluciones iniciales de 1/25 y 1/500 para las muestras débiles y a las diluciones 1/100 y 1/10.000 para las muestras fuertes. A partir de esas diluciones se efectuaron series de diluciones al medio en la placa. Cada muestra fue también probada en pocillos sin antígeno adherido.

Las muestras fueron incubadas 1 hora a 37 °C en cámara húmeda. Luego se lavaron las placas cinco veces con PBS- Tween.

Las distintas clases de anticuerpos antitoxina fueron detectadas agregando 100 μ l por pocillo de los antisueros específicos hechos en cabra contra los correspondientes isotipos de rata y purificados por afinidad. Es decir que se usaron los mismos anticuerpos anti-cadenas γ , α o μ de inmunoglobulina de rata ya descritos en la técnica de ELISPOT, aunque ahora fueron diluidos en PBS-Tween a las concentraciones que se determinaron en titulaciones previas con la técnica de ELISA, eligiendo la mayor dilución que aún dio el título máximo en muestras positivas y mínimos inespecíficos a las mismas diluciones analizadas.

Se incubó 1 hora a 37 °C en cámara húmeda y luego se lavó cinco veces con PBS-Tween.

Se colocaron 100 μ l por pocillo de inmunoglobulina de conejo anti-IgG (molécula entera) de cabra, purificada por afinidad y conjugada con peroxidasa de rabanito (cat. A5420, Sigma) diluida en PBS-Tween a la concentración previamente determinada por ensayos en damero, eligiendo la mayor dilución de conjugado que aún permitió detectar el máximo título de un suero antitoxina con niveles mínimos de señal inespecífica.

Se incubó 1 hora a 37 °C en cámara húmeda y se lavó cinco veces con PBS-Tween.

Se colocaron 100 μ l por pocillo de la solución del sustrato consistente en 1 mg/ml de o-fenilendiamina (OPD, Sigma), 0,05 % v/v peróxido de hidrógeno 30 vol. en buffer citrato fosfato pH 5,0 preparados en el momento de usar.

Las placas fueron mantenidas entre 10 y 15 minutos a temperatura ambiente en oscuridad y se detuvo la reacción agregando 50 μ l/pocillo de SO_4H_2 2 N. Se midió la densidad óptica (DO) a 492 nm en un lector de placas (Modelo 980, Metrolab).

Los niveles de antitoxina de las muestras de sueros y fluidos intestinales fueron expresados como unidades arbitrarias de ELISA tomadas como la recíproca de la última dilución de la muestra que tiene una densidad óptica por encima del punto de corte. El punto de corte se fijó en 0,2 de absorbancia por encima de la señal de fondo (blancos sin antígeno adsorbido al soporte). Experimentos previos en nuestro laboratorio mostraron que en las curvas dosis-respuesta de ELISA de un número elevado de ratas normales la media de absorbancia más 3 veces el desvío standard nunca supera el valor de 0,2 de DO a diluciones en los que los sueros de animales inmunizados siempre mostraron una absorbancia mayor a ese valor (263).

En cada experimento se corrió una muestra positiva de referencia y controles normales no inmunizados.

D.8. Cultivos primarios de células de órganos linfáticos

Para preparar cultivos de células de los órganos que se estudiaron se procedió a disecar estos órganos trabajando en condiciones de esterilidad. Las suspensiones celulares se prepararon como se describe arriba excepto que se trabajó con normas de esterilidad y el proceso se llevó a cabo en una campana de flujo laminar estéril.

Se sembraron $3 \cdot 10^6$ células de los órganos individuales en un volumen de 1 ml en placas de cultivo de 24 pocillos por triplicado y en medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con 10 % SFB, 25 mM HEPES (ácido N-2-hidroxi-etilpiperazina -N'-2-etanosulfónico), 2 mM l-glutamina, 0,05 mM 2-mercaptoetanol, 100 U/ml penicilina y 100 µg/ml estreptomicina. En paralelo se efectuaron controles de proliferación positiva agregando al medio 1 µg/ml de Concanavalina A.

Los cultivos fueron incubados durante 4 días a 37 °C con atmósfera de 5 % CO₂, 100 % de humedad.

Finalizado el período de cultivo se cosecharon las células resuspendiéndolas con pipeta. Se las lavó por centrifugación con medio de cultivo. Se calculó el número de células viables por el método de exclusión del azul tripán y se prepararon concentraciones celulares adecuadas para investigar la presencia de CSA antitoxina por ELISPOT.

D.8.1. Cultivos con bloqueo de la presentación antigénica vía el MHC clase II

Algunos cultivos de células de bazo se realizaron con la presencia o ausencia de cantidades inhibitorias de anticuerpo monoclonal anti-antígeno Ia de rata del CMH Clase II (clon MRC OX-6, Seralab).

D.8.2. Cultivos en ausencia de células adherentes

Otros experimentos fueron efectuados previa eliminación de las células adherentes. Para ello se colocaron $2 \cdot 10^7$ células de las suspensiones individuales enteras en placas de

Petri para cultivos de tejidos de poliestireno (Corning) de 5 cm de diámetro en medio de cultivo completo. Se incubó 2 horas a 37 °C con 5 % CO₂.

Siempre cuidando las condiciones de esterilidad se recuperaron delicadamente las células que no se adhirieron y se ajustó la concentración celular para proceder al cultivo de 4 días de igual modo que con las suspensiones celulares enteras.

D.9. Eliminación de células B o T por inmunocitoadherencia (*panning*)

Basados en métodos clásicos para separación de poblaciones de linfocitos (264-266.), placas de Petri de 10 cm de diámetro de poliestireno grado bacteriológico (Falcon) fueron cubiertas con 4 ml de anticuerpos de cabra anti-IgG (cadenas H y L) de ratón purificado por afinidad (cat. F7340, Acurate) a una concentración de 25 µg/ml en buffer carbonato-bicarbonato pH 9,6. Para poder cubrir con ese volumen, primero se extendieron en toda la superficie de la placa (que debe estar en una superficie horizontal bien nivelada) 15 ml de la solución de anticuerpos, delicadamente y sin inclinar la placa se extrajeron por pipeteo 11 ml de la solución cuidando de que no se corte la película de líquido, este volumen que se quitó se utilizó en otras placas. Se dejó absorber el anticuerpo 2 horas a temperatura ambiente.

Luego se recuperó la dilución del anticuerpo (sirve para varios usos) y se enjuagó la placa cuatro veces con PBS. Se volcó el buffer y se agregó medio de cultivo RPMI 1640, 10 % SFB para bloquear los sitios de unión a proteínas aún libres. Se incubó al menos 30 minutos a temperatura ambiente.

Paralelamente, células provenientes de las suspensiones de bazo o médula ósea de las ratas dadoras en los experimentos de transferencia adoptiva fueron marcadas con anticuerpo monoclonal anti-CD3 (clon G4.18, Pharmingen) o anti-CD45RA (clon OX33, Pharmingen) para señalar a las células T y B respectivamente. Las cantidades de monoclonales usadas (que fueron evaluadas por experiencias previas) se diluyeron en medio de cultivo con 10 % SFB y la marcación se incubó 20 minutos a 0 °C.

Luego de lavar las células 2 veces con medio de cultivo, se sembraron $5 \cdot 10^7$ células en cada placa de Petri (que poseían adsorbido el anticuerpo anti-IgG de ratón) y se dejaron adhiriendo 90 minutos a 4°C en 4 ml de medio de cultivo con 10 % SFB. A los 45 minutos las placas fueron agitadas muy suavemente.

Se colectó la fracción de células no adheridas inclinando un poco la placa y aspirando el líquido sin provocar reflujo. Suavemente se agregaron varias gotas de medio sobre la superficie inclinada para producir un leve arrastre de las células no adheridas y se volvió a aspirar el medio cuidando de no desprender las células adheridas. Se calculó la concentración celular obtenida contando en un hemocitómetro una dilución de células en solución de Turk y se concentraron por centrifugación y resuspensión en un menor volumen de medio de cultivo para inyectarlas en los receptores singeneicos.

Se reservaron alícuotas de los distintos tratamientos para evaluar el grado de contaminación por citometría de flujo.

Como la mayoría (aproximadamente el 90 %) de las células nucleadas de bazo son linfocitos, a las fracciones a las que se les eliminaron los linfocitos T las llamamos "fracción de células B" e inversamente a las suspensiones a las que se les separaron los linfocitos B las llamamos "fracción de células T". Por otra parte debido a que solamente alrededor de un 20 % de las células nucleadas de médula ósea son linfoides a las poblaciones que fueron depletadas de linfocitos T o B se las denominó "fracción sin células B o T" respectivamente.

D.10. Esplenectomías

Las ratas fueron ayunadas aproximadamente durante 18 horas manteniendo el libre acceso al agua para beber. Cada animal fue anestesiado profundamente con éter etílico y se le desinfectó el abdomen con Povidona iodada (Difexon PVPL). Trabajando con instrumental estéril se realizó una laparotomía en la parte izquierda del abdomen y por ella se extrajo el bazo. Se cortó la lámina de tejido conectivo que se une al bazo cuidando de no cortar vasos sanguíneos importantes. Con sutura de seda tamaño 5-0 en aguja curva se practicó un nudo en la zona del mesenterio atravesada por la arteria y la vena esplénica de

modo de interrumpir la circulación del bazo. Para extirpar el bazo se cortó el tejido que quedó entre la cápsula y el nudo realizado.

Para terminar se introdujo en la cavidad peritoneal el tejido que asomaba fuera del abdomen y se suturaron por separado la musculatura del abdomen y la piel con similar aguja y sutura.

D.11. Cuantificación de poblaciones celulares por citometría de flujo

D.11.1. Análisis de linfocitos T y B en médula ósea de rata adulta:

Se prepararon suspensiones celulares de médula ósea de ratas de 1 año de edad como se describió arriba. Una alícuota conteniendo 10^6 células fue resuspendida en 30 μ l de anticuerpo monoclonal anti-CD3 (clon G4.18 Pharmingen) o anti-CD45RA o A/B (clon OX33, Pharmingen) diluidos en RPMI 1640, 5 % SFB a la concentración determinada en una titulación previa. Se incubó por 30 minutos sobre hielo. Como controles negativos algunas células fueron tratadas con anticuerpos del mismo isotipo pero sin especificidad reconocida (Pharmingen).

Las células fueron lavadas por centrifugación 3 veces con PBS.

Se resuspendieron las células en 30 μ l de la fracción F(ab')₂ de IgG de cabra anti-IgG de ratón conjugada con isotiocianato de fluoresceína (FITC) que no presenta cruzamiento con IgG de rata (cat.55512, Cappel) a una dilución previamente determinada por titulación en damero. Se incubó 30 minutos sobre hielo.

Se eliminó el anticuerpo no unido lavando 3 veces con PBS.

Todas las muestras fueron resuspendidas en 1 ml de PBS y analizadas por citometría de flujo en un FACScan (Becton Dickinson) del Servicio de Inmunogenética del Hospital de Clínicas Gral. José de San Martín, UBA.

El análisis de la población de linfocitos se realizó a partir de la típica región que, por tamaño y granulosidad, determinan en el gráfico de dispersión de luz lateral *versus* luz frontal.

D.11.2. Análisis de contaminación con linfocitos T o B en las poblaciones depletadas por inmunocitoadherencia:

Se resuspendieron $2 \cdot 10^6$ células, provenientes del tratamiento de depleción descrito más arriba, en 30 μ l anticuerpo monoclonal anti-CD45RA o anti-CD3 diluido a un grado determinado por ensayos previos en medio RPMI 1640, 5 % SFB.

Se incubó durante 20 minutos en hielo y luego se lavó dos veces con medio de cultivo.

Se resuspendieron las células en 30 μ l de la fracción F(ab')₂ de inmunoglobulina de cabra anti-IgG de ratón conjugada con FITC que no cruza con rata (Cappel) diluida en RPMI 1640, 5 % SFB a una concentración previamente determinada por titulación en damero.

Se incubó 20 minutos en hielo y se lavó 2 veces con medio de cultivo. Las células fueron resuspendidas en 1 ml de PBS y analizadas por citometría de flujo.

D.12. Determinación de la permanencia de complejos antígeno-anticuerpo en órganos linfáticos secundarios

Se buscó determinar si los complejos antígeno-anticuerpo permanecen en los órganos linfáticos por medio de un estudio que indica si los anticuerpos circulantes están ejerciendo un control negativo sobre la producción *de novo* de anticuerpos.

Ratas Wistar WHAK/Hok fueron inmunizadas con toxina colérica por la ruta ig. En el intervalo de 12 meses se realizaron varios sangrados exploratorios para medir la caída del título de anticuerpos antitoxina en la circulación. A los 12 meses los títulos de los

anticuerpos declinaron aproximadamente un logaritmo y a ese tiempo se sometió a los animales a un severo sangrado hasta extraer entre un 35 y 45 % de la volemia del animal. Se consideró que una rata tiene 65 ml de sangre por Kg de peso (267).

Para realizar estos sangrados se practicó punción cardíaca con jeringas de 10 cc y aguja calibre 21G bajo anestesia de vapores de éter etílico. Alternativamente se anestesió a los animales hasta un plano profundo por casi 1 hora con una inyección intraperitoneal de 1,05 ml/Kg de una mezcla de 40 mg/ml Ketamina (Holliday-Scott S.A.), 5 mg/ml de Xilacina (Rompun®, Bayer), y luego se cortó el extremo de la cola y repetidas veces se apretó con los dedos pulgar e índice la base de la cola deslizando los dedos hasta la punta de la cola manteniendo siempre la presión de modo de facilitar un lento sangrado por varios minutos. Para reponer electrolitos en todos los casos se inyectaron 6-7 ml de Solución Fisiológica de ClNa en forma intraperitoneal o subcutánea. Se trabajó en una sala a 30 °C hasta que los animales despertaron de la anestesia.

Cinco días después se tomaron muestras de suero y las ratas fueron sacrificadas. Se analizó la cantidad de IgG antitoxina por ELISA en los sueros de los sangrados masivos y en los del día del sacrificio.

D.13. Análisis estadístico

Se hicieron comparaciones estadísticas no paramétricas de 2 muestras provenientes de distintos tratamientos usando la prueba U de Mann-Whitney y la prueba de Wilcoxon para 2 muestras (268 y 269). Se consideraron con diferencias significativas las comparaciones con $P < 0,05$. Se aplicó transformación logarítmica a los títulos de anticuerpos obtenidos por ELISA para poder comparar las medias de 2 muestras diferentes.

D.14. MEDIOS, BUFFERS Y OTRAS SOLUCIONES

Buffer Fosfato Salino según Dulbecco (PBS)¹

Cloruro de potasio	0,2 gr
Fosfato monobásico de potasio, anhidro	0,2 gr
Cloruro de sodio	8,0 gr
Fosfato dibásico de sodio, anhidro	1,15 gr
pH a temperatura ambiente	7,5 ± 0,3
Agua destilada	c.s.p. 1 litro.

1. Dulbecco R y Vogt M. 1957. J. Exp. Med. 106:167-69.

Medio de cultivo RPMI 1640 de Moor y col.²

Como desarrollaron Moore y col., completado con el agregado de:

Bicarbonato de sodio	2,0 gr/l
HEPES (N-[2-Hidroxietil]piperazina- N'-[ácido 2-etanosulfónico])	5,96 gr/l
l-Glutamina	0,3 gr/l
Penicilina G	100.000 U/l
Estreptomocina, sulfato	0,1 g/l.

Para lavados de suspensiones celulares y tinciones de inmunofluorescencia se suplementó con:

Suero fetal bovino (SFB) 50 ml/l.

Para ELISPOT, cultivos de células y *panning* se suplementó con:

SFB 100 ml/l.

Para cultivos de linfocitos se agregó además:

2-Mercaptoetanol para llegar a una concentración de 0,05 mM.

2. Moore GE, Gerner RE y Franklin HA. 1967. JAMA, 199:519-24.

Moore GE y Kitamura H. 1968. NY State Journal of Medicine. 68:2054-60.

Moore GE y Woods LK. 1976. Tissue Culture Association Manual. 3:503-8.

Solución de bicarbonato para inoculación intragástrica

Bicarbonato de sodio	3 gr
PBS	c.s.p. 100 ml.

EDTA-Inhibidor de tripsina

EDTA (ácido etilendiamino tetraacético)	1,46 gr
Inhibidor de Tripsina de Soja, tipo I-S	10 mg
Agua destilada	c.s.p. 100 ml.

Primero solubilizar el EDTA y ajustar a pH 6 con NaOH diluido, luego disolver el inhibidor de tripsina.

PMSF 100 mM

PMSF (fluoruro de fenilmetilsulfonilo)	17,42 gr
etanol 96 grados	100 ml.

Soluciones para preparar suspensiones celulares

Buffer Citrato-Fosfato

Citrato trisódico, dihidrato	14,70 gr
Cloruro de sodio	5,61 gr
Fosfato monobásico de potasio, anhidro	1,089 gr
Fosfato dibásico de sodio, anhidro	0,795 gr
Cloruro de potasio	0,112 gr
Agua destilada	c.s.p. 1 litro
Verificar y ajustar a pH $7,2 \pm 0,3$.	

Buffer Citrato-Fosfato-Ditiotreitol (DTT)

Ditiotreitol	0,154 gr
Buffer citrato-fosfato	c.s.p. 1 litro.

Buffer Citrato-Fosfato-BSA

Albúmina de suero bovina, fracción V	15 gr
Buffer citrato-fosfato	c.s.p. 1 litro.

Azul Tripán para recuento de viabilidad de células³

Azul tripán	40 mg
Cloruro de sodio	850 mg
Agua destilada	c.s.p. 100 ml.

Solución de Turk para recuento de leucocitos³

Acido acético glacial 3 ml
Violeta de genciana 0,01 gr
Agua destilada c.s.p. 100 ml.

Solución para lisis de eritocitos³

Solución A: Cloruro de amonio, anhidro 8,3 gr
Agua destilada c.s.p. 1 litro.

Solución B: Tris base (Tris(hidroximetil) aminometano) 20,6 gr
disolver en 900 ml de agua destilada
ajustar a pH 7,65 con HCl 1 M
llevar con agua destilada a 1 litro.

Solución de trabajo (0,14 M NH₄Cl; 0,017 M Tris.HCl):

Solución A 90 ml
Solución B 10 ml
Verificar y ajustar a pH 7,2 con HCl.

3. Mishell BB y Shiigi SM Eds. 1980. Selected Methods in Cellular Immunology. Freeman WH y Co. San Francisco.

Panning

Buffer Carbonato-Bicarbonato 0,05 M para adsorción al poliestireno

Carbonato de sodio, anhidro 1,59 gr
Bicarbonato de sodio 2,93 gr
Agua destilada c.s.p. 1 litro
Ajustar a pH 9,6.

ELISA y ELISPOT

PBS-Tween

Tween 20 (Monolaurato de polioxietilen sorbitan) 0,5 ml
PBS c.s.p. 1 litro.

Agua-Tween

Tween 20 0,5 ml
Agua destilada c.s.p. 1 litro.

Solución de Sustrato Revelador para ELISPOT

Gel de Agar: Agar grado electroforético
o para inmunodifusión 2 gr
PBS c.s.p. 100ml.

Minutos antes del revelado fundir el Gel de Agar y mantenerlo a 47 °C.

Al momento de revelar preparar:

Solución de PPD: para-Fenilendiamina 160 mg
PBS entibiado a 47 °C c.s.p. 100 ml.

ahora mezclar 1 volumen de Gel de Agar
1 volumen de Solución de PPD
H₂O₂ 30 vol. para llegar a concentración 0,1 % v/v.

Buffer Citrato-Fosfato pH 5,0 para revelar ELISA

Solución A: Acido cítrico, anhidro 19,2 gr
Agua destilada c.s.p. 1 litro.

Solución B: Fosfato dibásico de sodio, anhidro 28,4 gr
Agua destilada c.s.p. 1 litro.

luego mezclar Solución A 243 ml
Solución B 257 ml
Agua destilada c.s.p. 1 litro
verificar y ajustar a pH 5,0.

Sustrato para ELISA

Disolver y mezclar en el instante de usar:

orto-Fenilendiamina (OPD) 100 mg
Buffer citrato-fosfato pH 5,0 c.s.p. 100 ml
H₂O₂ 30 vol. para llegar a concentración 0,05 % v/v.

RESULTADOS

E.1. CSA ANTITOXINA EN MEDULA OSEA POR INMUNIZACION EN LA MUCOSA INTESTINAL

E.1.1. Rápida aparición y acumulación de CSA antitoxina en médula ósea luego de inmunizaciones intragástricas

Para investigar si una o más inmunizaciones orales con 20 µg de toxina colérica son capaces de provocar la aparición de CSA específicas en médula ósea y para establecer si luego de uno o más reestímulos la cantidad de CSA antitoxina alojadas en este órgano se incrementa preferencialmente respecto a otros órganos linfoides (como ocurre durante una inmunización sistémica) las ratas fueron inmunizadas en principio con una dosis de toxina colérica por la vía ig o con dos o tres dosis del antígeno a intervalos semanales.

A las dos semanas siguientes a una inmunización con una única dosis de toxina colérica se encontró que en médula ósea y bazo había bajas cantidades de CSA antitoxina de isotipo IgA o IgG por millón de células nucleadas. En cambio un importante número de CSA específicas fue detectado en el ganglio mesentérico para las dos clases de inmunoglobulinas estudiadas (Figura 1).

Luego de haber inoculado dos dosis de toxina colérica el número de CSA antitoxina de isotipo IgG o IgA por millón de células en médula ósea y placas de Peyer sufrió un incremento de cinco veces respecto a los valores observados en animales que recibieron sólo una dosis de antígeno, mientras que para el ganglio mesentérico y el bazo dicho incremento fue de tres veces. Los resultados obtenidos luego de administrar tres dosis de toxina colérica no fueron diferentes de aquellos del esquema de dos dosis de antígeno. En todos los experimentos el ganglio mesentérico fue el órgano que expresó el mayor número de CSA antitoxina de isotipo IgG o IgA por millón de células.

Con el objeto de analizar si en la médula ósea se produjo una localización preferencial de las CSA antitoxina del isotipo IgA en comparación a los otros tejidos linfoides considerados, fue calculada para cada órgano la proporción

Número de CSA antitoxina
de isotipo IgA/10⁶ células

Número de CSA antitoxina
de isotipo IgG/10⁶ células

encontrándose que en la médula ósea esta proporción fue significativamente mayor que para bazo y ganglio mesentérico en cualquiera de los esquemas de inmunización con una, dos o tres dosis de antígeno (Figura 2).

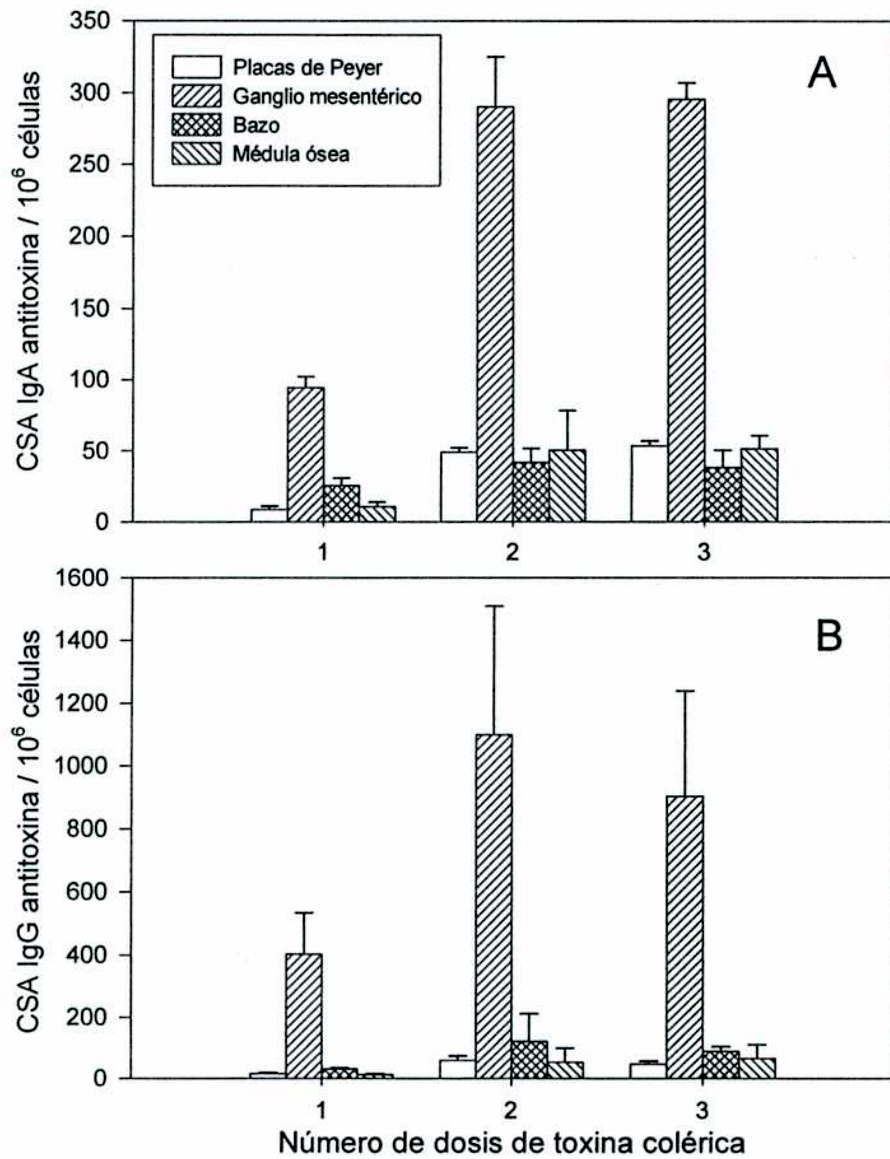
Por ser un dato más representativo de la contribución relativa de cada órgano al total de las CSA antitoxina en todo el organismo se calculó el número absoluto de CSA antitoxina de clase IgA o IgG por órgano. Con una sola dosis de antígeno la médula ósea pronto se convirtió en el principal órgano que contiene CSA antitoxina de isotipo IgA. Este predominio se acentuó luego de dos o tres dosis de toxina colérica (Figura 3). En cuanto a las CSA que sintetizan el isotipo IgG, luego de una única inoculación de antígeno el ganglio mesentérico fue el órgano que más CSA específicas contiene. Con dos inmunizaciones la médula ósea y el ganglio mesentérico alojaron similares cantidades de CSA antitoxina de clase IgG pero tras una tercera dosis de antígeno la médula ósea pasó a ser el órgano principal.

E.1.2. Una única inmunización directa en las placas de Peyer genera CSA antitoxina en médula ósea

Para apoyar la idea de que en los experimentos anteriores la respuesta de CSA antitoxina observada se debe a una estimulación local del GALT provocada por la administración ig de antígeno se procedió a inyectar ratas Wistar exocriadas con 20 µg de toxina colérica por vía ipP para asegurar que el antígeno alcance el GALT en forma directa.

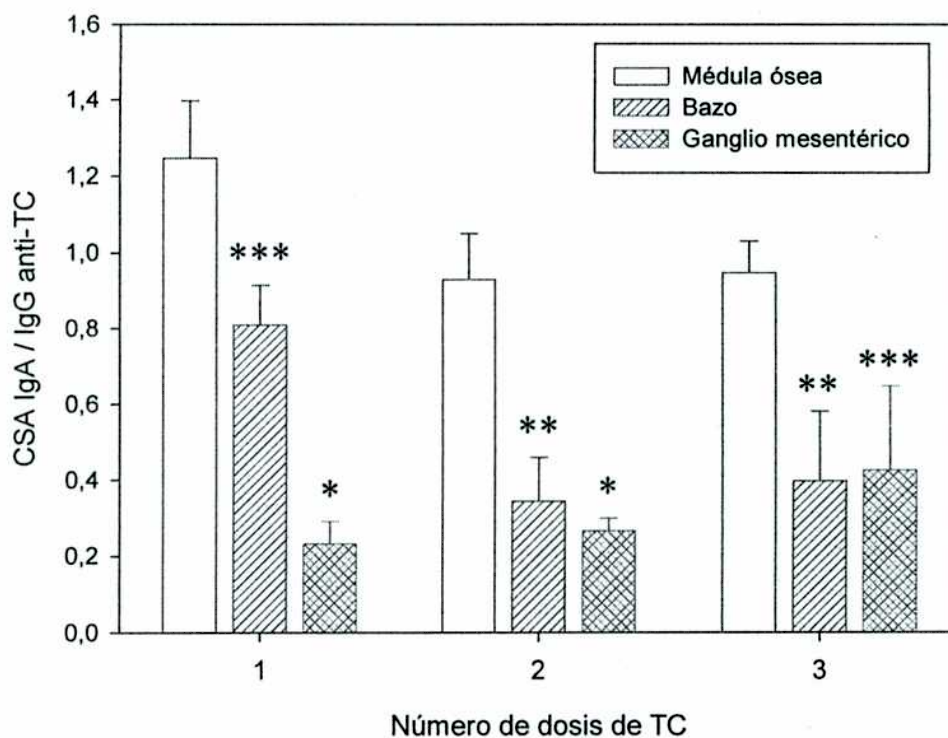
Al trabajar con ratas de 8 semanas de edad se observó que a la primer semana posterior a la inmunización ya fue posible detectar, aunque en bajas cantidades, CSA antitoxina en médula ósea y había similar número de CSA del isotipo IgA y del IgG. En placas de Peyer y en mayor medida en ganglio mesentérico y bazo se encontraron mayores cantidades de CSA antitoxina por millón de células nucleadas que en médula ósea y en estos casos el número de CSA antitoxina de clase IgG por millón de células fue superior al

Figura 1.



Número de CSA antitoxina de isotipo IgA (A) o IgG (B) por millón de células nucleadas. Ratas de 8 semanas de edad fueron inoculadas por la vía intragástrica con 1, 2 o 3 dosis de toxina colérica con intervalos de una semana entre cada dosis para los individuos que recibieron más de una inoculación. Se cuantificó el número de CSA antitoxina para cada órgano a los 15 días después de la última inoculación, empleando la técnica de ELISPOT. En todos los casos las barras expresan las medias más los errores estándar (ES) mostrados como líneas. El tamaño de los grupos experimentales (n) fue de 4 a 6 animales.

Figura 2.



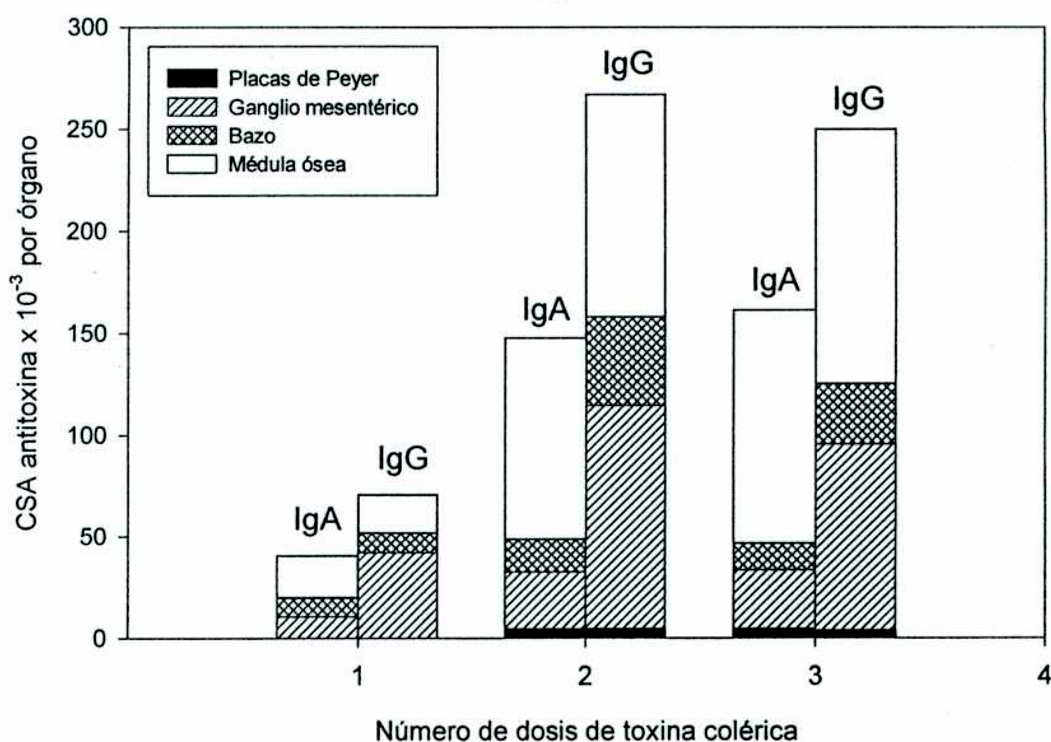
Proporción de CSA antitoxina de isotipo IgA sobre CSA antitoxina de isotipo IgG.

Las ratas fueron inoculadas por la vía ig con 1, 2, o 3 dosis de toxina colérica en los días 0, 7 y 14. Para cada caso se calculó el número de CSA antitoxina en la médula ósea, bazo y ganglio mesentérico a los 15 días después de la última dosis de antígeno.

Medias \pm ES (n = 4 o 6).

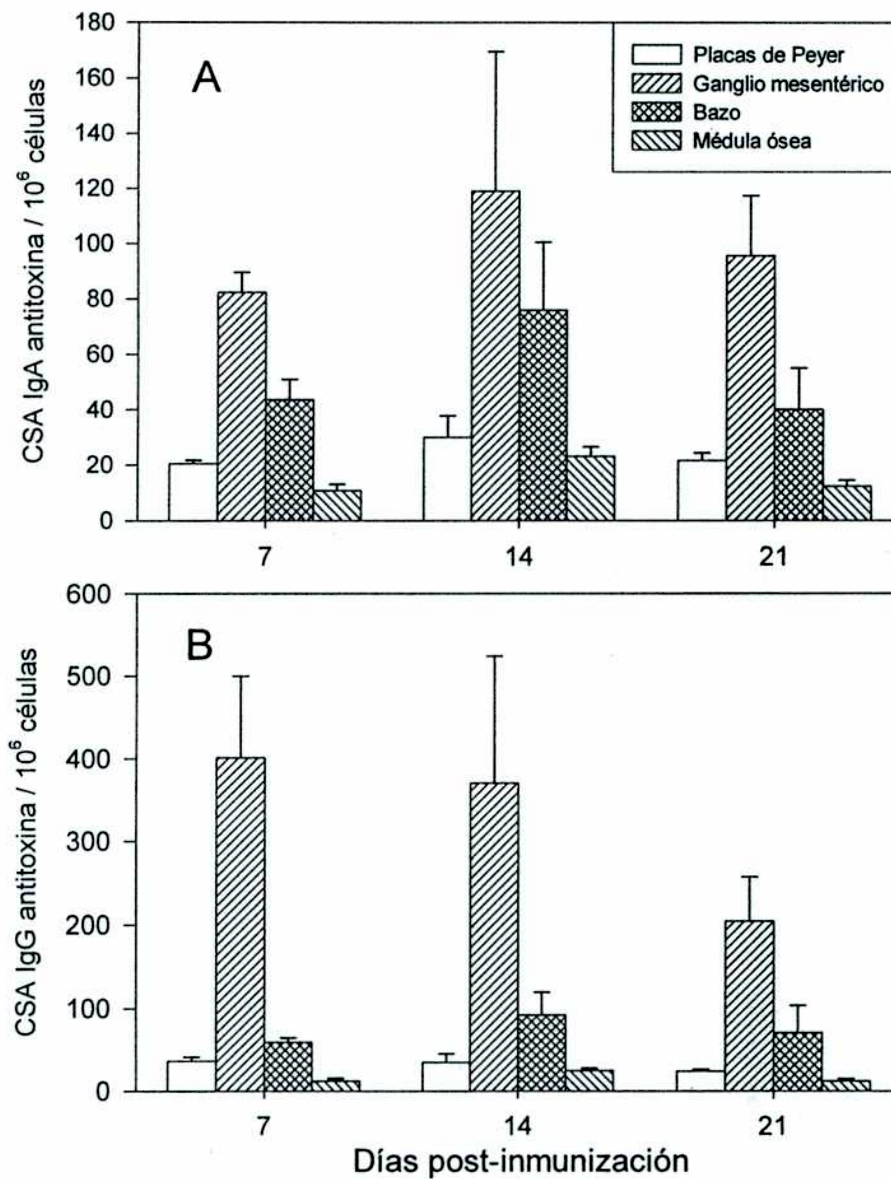
* $P < 0,001$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,05$ al comparar el bazo y el ganglio mesentérico contra la médula ósea por la prueba U de Mann-Whitney.

Figura 3.



Cantidad de CSA antitoxina por órgano en las placas de Peyer, ganglio mesentérico, bazo y médula ósea. Ratas de 8 semanas de edad fueron inoculadas con entre 1 a 3 dosis de toxina colérica en forma ig y sacrificadas a los 15 días luego de la última dosis. Para calcular el número de células de la médula ósea se consideró que un fémur de rata posee el 9 % del total de la médula ósea del individuo. En cada barra (CSA de isotipo IgA o IgG), el segmento correspondiente a alguno de los órganos (placas de Peyer, ganglio mesentérico, bazo o médula ósea) representa la media del número total de CSA.

Figura 4.



Número de CSA antitoxina de isotipo IgA (A) o IgG (B) por millón de células nucleadas luego de una inmunización intra-placas de Peyer. Ratas de 8 semanas de edad fueron inoculadas con toxina colérica al día 0 en lotes de 4 o 6 animales que fueron sacrificados a los días 7, 14 o 21 para cuantificar las CSA IgA o IgG en cada órgano estudiado. Los resultados se expresan como medias \pm ES.

número de CSA antitoxina de clase IgA por millón de células (Figura 4).

A la segunda semana posterior a la inmunización en el bazo y en la médula ósea se detectó un incremento de dos veces en el número de CSA por millón de células tanto para las de isotipo IgG como para las de IgA, mientras que no se registró tan alto aumento en el número de CSA específicas en placas de Peyer ni en ganglio mesentérico.

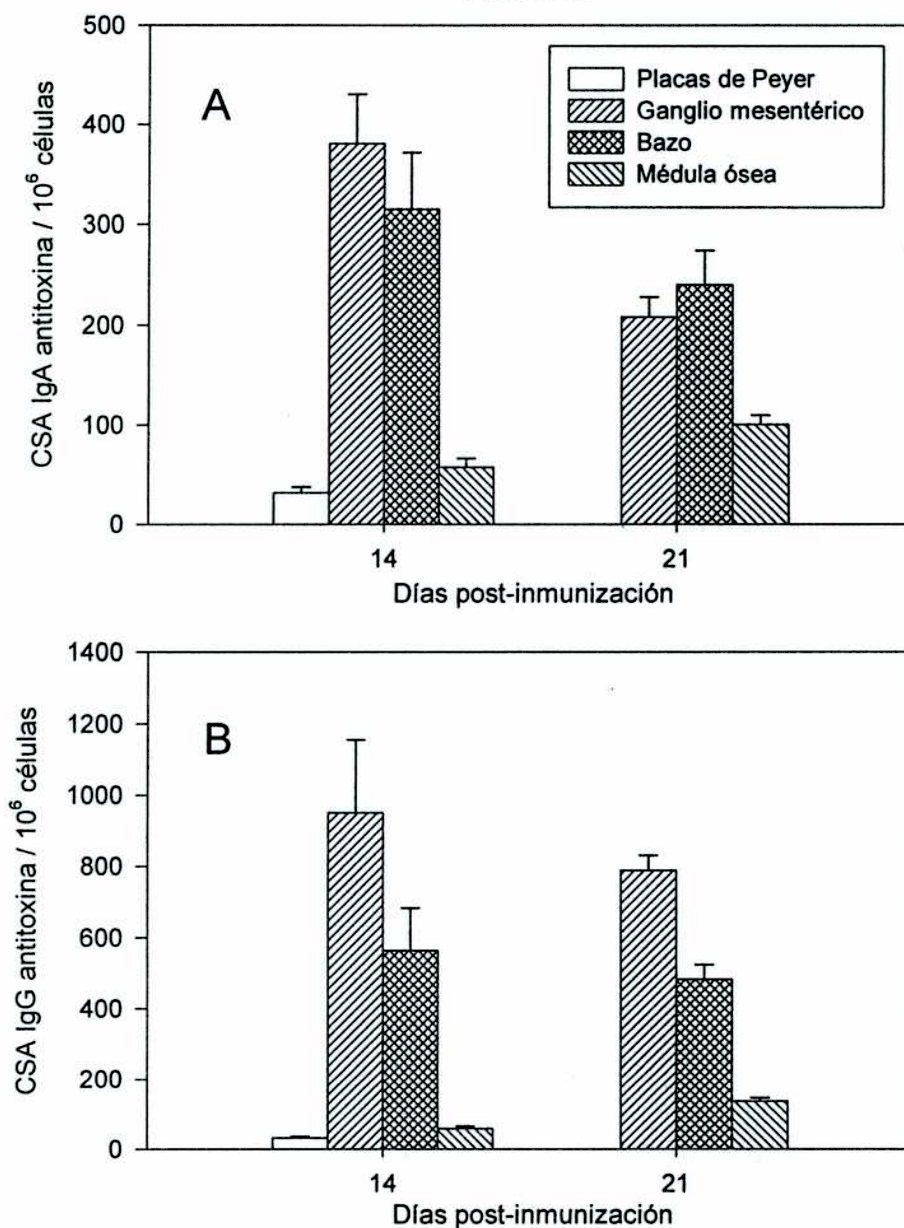
A la tercer semana post-inmunización comenzó la disminución de las CSA en los órganos linfoides estudiados. Nuevamente el ganglio mesentérico fue el órgano con mayor número de CSA antitoxina por millón de células nucleadas.

E.1.3. La aparición de células plasmáticas en médula ósea no decae con la edad

Para evaluar si la importancia de la médula ósea como lugar de síntesis de anticuerpos antitoxina varía con la edad se repitió la inmunización ipP pero ahora en ratas de 35 semanas de edad. Se determinó que a esta edad en médula ósea, ganglio mesentérico y bazo los números de CSA específicos fueron mayores a los observados en ratas de 8 semanas de edad para las dos clases de inmunoglobulinas estudiadas (Figura 4 vs Figura 5). Por otra parte mientras que en la médula ósea la mayor cantidad de CSA antitoxina se observó a la tercer semana post-inmunización, en placas de Peyer, ganglio mesentérico y bazo los números de CSA antitoxina alcanzaron un máximo a la segunda semana post-inmunización (Figura 5). También se observó que la médula ósea posee una mayor cantidad de CSA antitoxina por millón de células que las placas de Peyer, tanto para las CSA de IgA como para las de IgG. Además el ganglio mesentérico, seguido por el bazo, es el órgano que en el pico de la respuesta expresa el mayor número de CSA específicas del isotipo IgG o IgA por millón de células nucleadas.

Para analizar si la contribución relativa de la médula ósea al total de las CSA antitoxina de clase IgA se modifica con la edad se calcularon, en las ratas de 8 y 35 semanas de edad, las proporciones del

Figura 5.



Cantidad de CSA antitoxina de isotipo IgA (A) e IgG (B) por millón de células nucleadas en ratas de 35 semanas de edad luego de una inmunización ipP. Las ratas fueron inoculadas con toxina colérica en el día 0 en grupos de 4 a 6 animales y sacrificadas a los días 14 o 21 para determinar las CSA IgA e IgG en los órganos estudiados. Medias \pm ES.

Número de CSA antitoxina de isotipo IgA
en médula ósea

Número de CSA antitoxina de isotipo IgA
en el bazo

resultando que no surgieron diferencias significativas del valor de esta proporción entre animales de las dos edades estudiadas (Tabla I).

Tabla I. Proporción del número de CSA antitoxina en la médula ósea sobre las CSA en el bazo para los isotipos IgA o IgG.^a

Isotipo de las CSA	tiempo de la determinación (dpi)	CSA en médula ósea / CSA en bazo ^b	
		Edad de las ratas utilizadas	
		8 semanas	35 semanas
IgA	14	0,28 ± 0,16	0,18 ± 0,14
	21	0,216 ± 0,074	0,31 ± 0,25
IgG	14	0,22 ± 0,13	0,112 ± 0,053
	21	0,177 ± 0,042	0,30 ± 0,22

^aRatas de 8 o 35 semanas de edad fueron inmunizadas con toxina colérica ipP y sacrificadas a los 14 o 21 dpi para determinar la cantidad de CSA como en las figuras 4 y 5.

^bMedias ± desvto standard (DS).

Además tampoco se encontraron diferencias en la proporción de

Número de CSA antitoxina de isotipo IgG
en médula ósea

Número de CSA antitoxina de isotipo IgG
en el bazo

cuando las dos edades fueron comparadas, probablemente debido al tamaño y alta varianza de las muestras.

Sin embargo la razón

Número de CSA antitoxina de isotipo IgA
en médula ósea

Número de CSA antitoxina de isotipo IgA
en placas de Peyer

en ratas de 8 semanas de edad fue significativamente menor que en ratas de 35 semanas. También la razón

$$\frac{\text{Número de CSA antitoxina de isotipo IgG en médula ósea}}{\text{Número de CSA antitoxina de isotipo IgG en placas de Peyer}}$$

fue menor en las ratas de 8 semanas que en las ratas de 35 semanas de edad. Estas diferencias fueron encontradas en 2 experimentos independientes (Tabla II) e indican que la aparición de células plasmáticas en médula ósea luego de una inmunización intestinal no decae con la edad.

Tabla II. Variación con la edad de la proporción del número de CSA antitoxina en la médula ósea sobre las CSA en las placas de Peyer para los isotipos IgA o IgG.^a

Experimento	Isotipo de las CSA	CSA en médula ósea / CSA en placas de Peyer ^b		
		Edad de las ratas utilizadas		Significancia ^c
		8 semanas	35 semanas	
I	IgA	0,72 ± 0,42	3,2 ± 1,7	<i>P</i> < 0,01
	IgG	0,76 ± 0,50	1,86 ± 0,59	<i>P</i> = 0,025
II	IgA	0,89 ± 0,35	3,43 ± 0,82	<i>P</i> < 0,01
	IgG	1,25 ± 0,49	5,85 ± 0,92	<i>P</i> < 0,01

^aRatas de 8 o 35 semanas de edad fueron inmunizadas con toxina colérica ipP y sacrificadas a los 14 dpi para determinar la cantidad de CSA antitoxina de isotipo IgA o IgG en la médula ósea y en las placas de Peyer.

^bMedias ± DS.

^cPrueba de Wilcoxon para 2 muestras y prueba U de Mann-Whitney.

E.1.4. La médula ósea tiende a acumular CSA del isotipo IgA luego de una inmunización ipP

Quando se buscó establecer si en la médula ósea hay una localización preferencial (con respecto a los otros órganos estudiados) de las CSA antitoxina que expresan el isotipo IgA, se puso atención a la proporción

Número de CSA antitoxina
de isotipo IgA/10⁶ células

Número de CSA antitoxina
de isotipo IgG/10⁶ células

que se establece en cada órgano para cada una de las dos edades bajo estudio. Esta proporción fue, en la médula ósea, significativamente mayor que en el ganglio mesentérico o el bazo para ratas de 35 y 8 semanas de edad (Figura 6).

Para tener una medida representativa de la contribución relativa de cada órgano al total de CSA antitoxina se calculó el número absoluto de CSA antitoxina por órgano. Se observó que en los experimentos con ratas de 35 semanas de edad, a los 21 dpi la médula ósea se ha convertido en el órgano que más CSA específicas de los isotipos IgA e IgG alberga (sin tener en cuenta el intestino; Figura 7). En la misma situación se encontró la médula ósea a los 14 dpi en los experimentos realizados con ratas de 8 semanas de edad y a los 21 dpi la médula ósea también prevaleció en el mantenimiento de CSA antitoxina de clase IgA aunque compartió este papel principal con el bazo respecto a alojar células plasmáticas antitoxina de clase IgG.

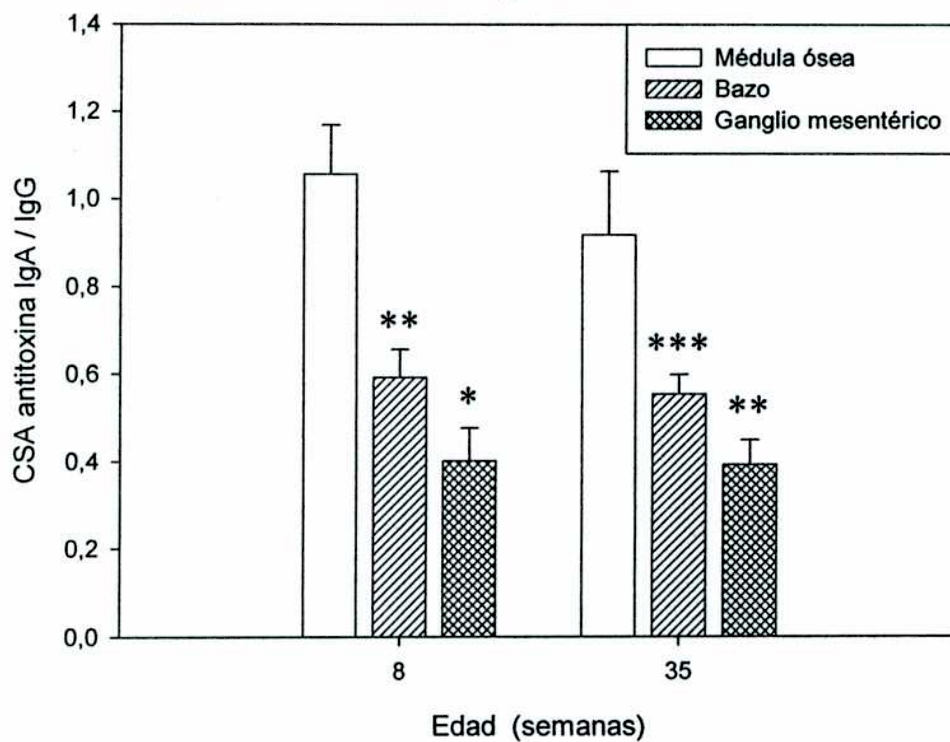
E.2. EN LA ETAPA MAS TEMPRANA DE LA INMUNIZCION ORAL CON TOXINA COLERICA SE PRODUCE UNA PRESENTACION DIRECTA EN EL BAZO

E.2.1. En el bazo se produce la más rápida aparición de CSA con una inmunización oral y esta rápida respuesta es rica en IgM

Conociendo que con una única dosis de toxina colérica por vía ig ya era posible detectar células plasmáticas específicas incluso en médula ósea, se quiso averiguar qué tan temprano aparecen las CSA antitoxina en el organismo de los animales inmunizados y cuales son los órganos involucrados en la inducción primaria de la respuesta inmune de anticuerpos.

En el corto plazo de 48 horas posteriores a la inmunización oral no se detectaron

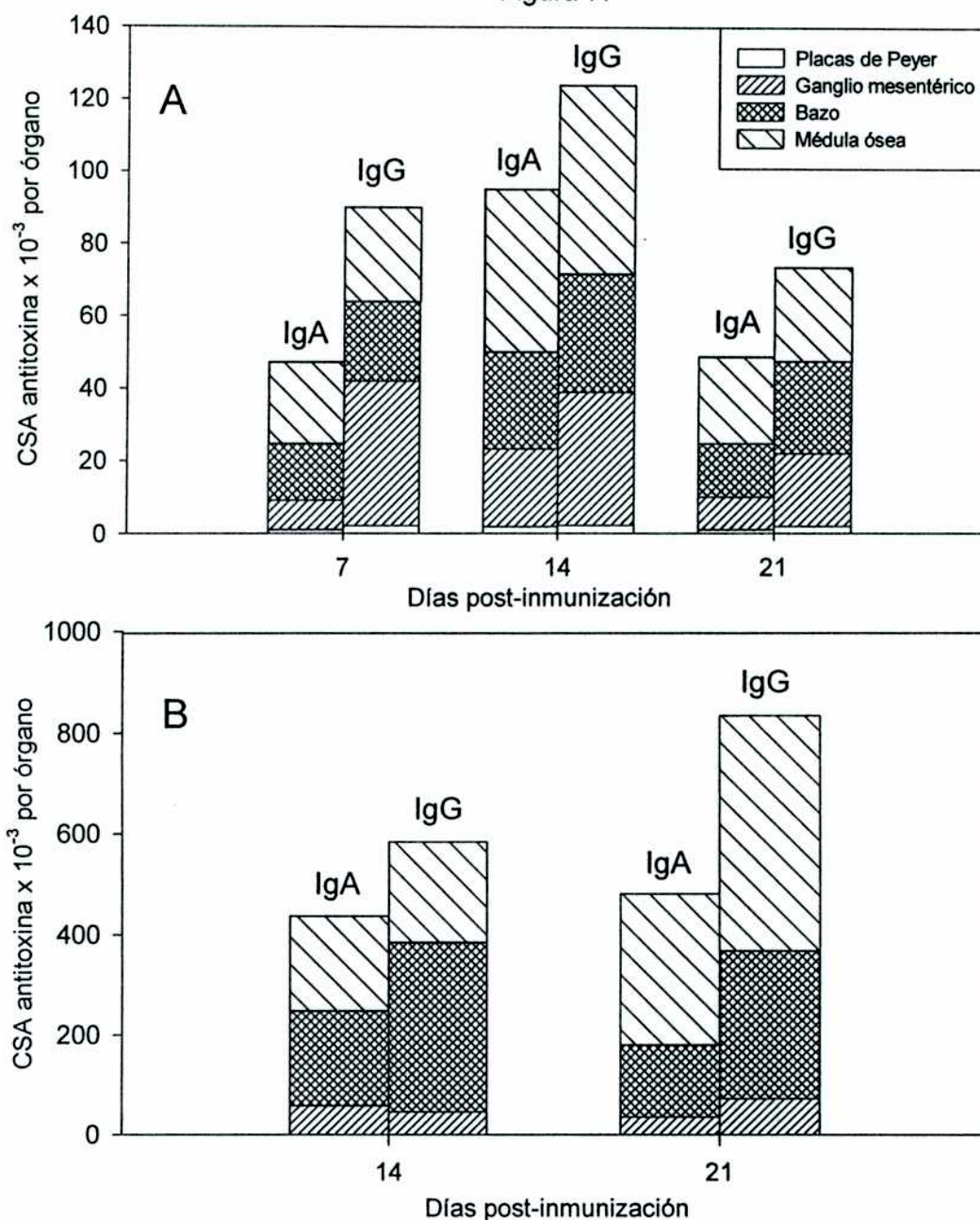
Figura 6.



Proporción de CSA antitoxina de isotipo IgA sobre CSA antitoxina de isotipo IgG en ratas de 8 y 35 semanas de edad. Los animales fueron inoculados ipP con toxina colérica en el día 0 y sacrificados a los 14 dpi para calcular los números de CSA antitoxina en la médula ósea, bazo y ganglio mesentérico. Medias \pm ES.

* $P < 0,001$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,05$ al comparar el bazo y el ganglio mesentérico contra la médula ósea con la prueba de U de Mann-Whitney.

Figura 7.



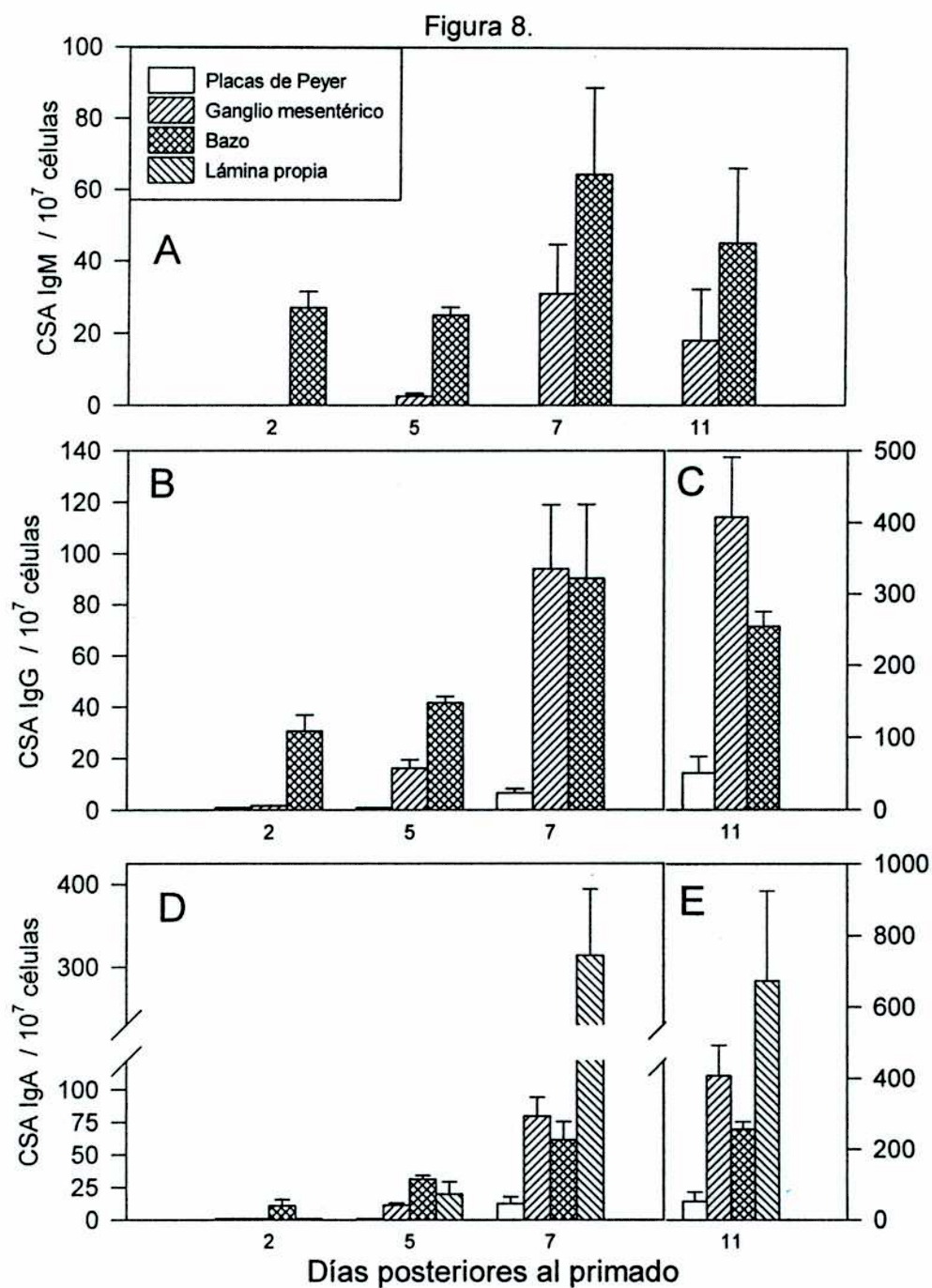
Cantidad total de CSA antitoxina por órgano luego de una inmunización ipP con toxina colérica. Ratas de 8 semanas de edad (A) y de 35 semanas de edad (B) fueron inmunizadas en el día 0 y se midió el número de CSA de isotipo IgA e IgG (expresados como barras) en los días 7, 14 o 21. Los segmentos dentro de cada barra corresponden a los valores medios ($n = 4$ o 6) encontrados en las placas de Peyer, ganglio mesentérico, bazo y médula ósea.

CSA antitoxina ni en ganglio mesentérico ni en placas de Peyer pero sí aparecieron en el bazo. De las CSA específicas halladas, el 45 % expresaron el isotipo IgG y un 40 % el IgM, el isotipo IgA fue expresado sólo por el 15 % de ellas (Figura 8).

Transcurridos 5 días de la inmunización el bazo continuó siendo el órgano que aloja la mayor cantidad de CSA antitoxina por millón de células nucleadas pero ya se encontró un pequeño número de CSA antitoxina por millón de células en ganglio mesentérico. El 27 % de las CSA antitoxina del bazo sintetiza el isotipo IgM mientras que dicho isotipo es casi inexistente en ganglio mesentérico. También se encontraron unas pocas CSA antitoxina de clase IgA en la lámina propia del intestino delgado.

A la semana post-inoculación se detectó un brusco incremento en el número de CSA antitoxina por millón de células en el ganglio mesentérico, en particular las que expresan el isotipo IgA e IgG alcanzan los valores medidos en bazo debido a que aunque en este último órgano también se produjo un incremento del número de CSA respecto a las cantidades encontradas a los 5 dpi éste no fue tan marcado. Sin embargo respecto a las CSA antitoxina de isotipo IgM el bazo continuó exhibiendo la mayor cantidad. Además bajas cantidades de células plasmáticas antitoxina de la clase IgA o IgG fueron observadas en placas de Peyer. En la lámina propia del intestino delgado se evidenció un aumento muy notable del número de CSA específicas del isotipo IgA.

Pasados 11 días de la inmunización se midió un nuevo importante aumento del número de CSA antitoxina en todos los órganos estudiados, aunque ahora restringido a las células que expresan las clases IgG o IgA. A este tiempo el ganglio mesentérico superó al bazo en el número de CSA antitoxina de isotipo IgG o IgA por millón de células aunque esto no ocurrió con las CSA específicas que sintetizan clase IgM. En las placas de Peyer se detectó un incremento de cinco veces en la cantidad de CSA antitoxina del isotipo IgA o IgG pero no se encontraron células plasmáticas específicas de clase IgM. Por otra parte el órgano que evidenció mayor cantidad de CSA antitoxina de isotipo IgA por millón de células nucleadas fue la lámina propia del intestino delgado.



Número de CSA anti-toxina colérica luego de un primado vía ig. Ratas de 8 semanas de edad fueron inoculadas con toxina colérica al día 0 y por grupos de entre 4 y 6 animales se les extrajeron los órganos a los días 2, 5, 7 (A, B y D) u 11 (A, C y E) para determinar la cantidad de CSA de isotipo IgM (A), IgG (B y C) e IgA (D y E) por cada 10^7 células nucleadas en las placas de Peyer, ganglio mesentérico, bazo y lámina propia intestinal. Medias \pm ES.

E.2.2. La cinética de anticuerpos antitoxina en suero y fluido intestinal sigue en forma coherente a la aparición de CSA

A las 48 horas siguientes a la inmunización no se detectaron anticuerpos antitoxina ni en suero ni en fluido intestinal (Figura 9).

El análisis de la cinética de la respuesta de anticuerpos antitoxina liberados al suero demostró que para el isotipo IgM al quinto dpi hubo niveles relevantes de anticuerpos específicos en siete de entre nueve animales estudiados. A los siete dpi se encontró que todos los individuos expresan IgM específica y a mayores niveles de respuesta. Pero al undécimo día ya se midió una ligera retracción de las cantidades relativas de anticuerpos antitoxina de clase IgM.

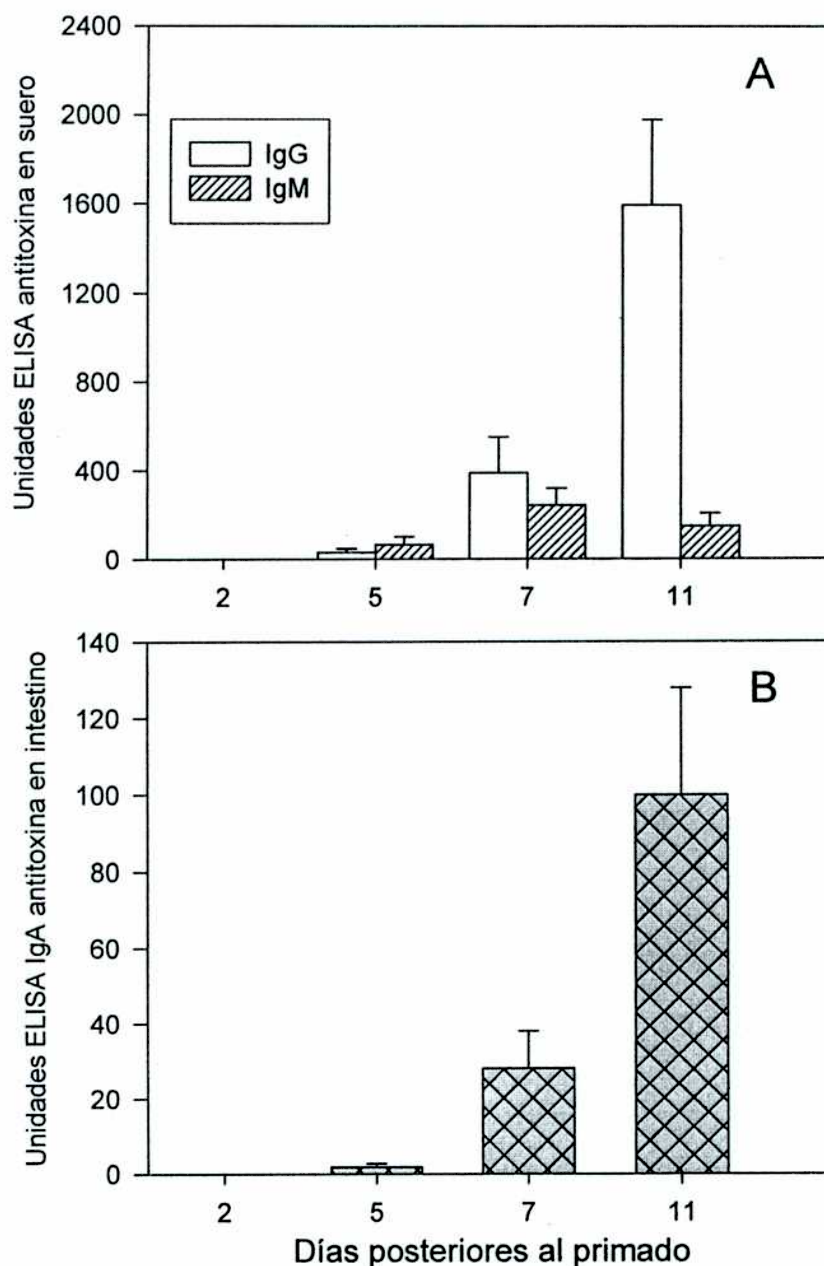
En cuanto a los primeros días de desarrollo de la respuesta de anticuerpos antitoxina que corresponden a la clase IgG en suero, a los cinco dpi se observó que solamente tres de nueve animales investigados mostraron niveles de anticuerpos específicos por encima de la señal de fondo de los individuos controles sin inmunizar. Al séptimo y undécimo días se detectó un marcado incremento de los valores de la antitoxina de isotipo IgG.

Con la cinética de la respuesta de anticuerpos antitoxina de isotipo IgA que aparecieron en los lavados intestinales se determinó que a los cinco dpi sólo tres de entre nueve ratas inmunizadas tuvieron niveles detectables de antitoxina de este isotipo. En el séptimo día se encontró que la cantidad de anticuerpos específicos sufrió un intenso aumento. Al undécimo dpi se midió un incremento de tres veces en los valores de anticuerpos antitoxina de isotipo IgA respecto a las cantidades registradas a los siete días en el fluido intestinal.

E.2.3. Los precursores de CSA antitoxina aparecen en bazo antes que en ganglio mesentérico luego de la inmunización por vía ig

Debido a que a las 48 horas posteriores a una única inmunización con toxina colérica por vía ig no fueron detectadas CSA antitoxina en el ganglio mesentérico y

Figura 9.



Niveles de anticuerpos antitoxina de isotipos IgM e IgG en el suero (A) y de isotipo IgA en el fluido intestinal (B) luego del primado oral. Grupos de seis ratas de 8 semanas de edad fueron inoculados con toxina colérica por la vía ig en el día 0 y se tomaron muestras del suero y del fluido intestinal en los días 2, 5, 7 y 11 para cuantificar los anticuerpos específicos por la técnica del ELISA. Medias \pm ES.

conociendo que cuando se inmuniza por esta vía, por un lado hay diferenciación local a CSA y por otro lado los linfocitos B estimulados en las placas de Peyer migran al ganglio mesentérico, se planteó la cuestión si las células B respondedoras a la toxina colérica provenientes de las placas de Peyer aún no migraron hacia el ganglio mesentérico a las 48 horas de la administración del antígeno o si ya se encuentran en el ganglio mesentérico pero todavía no alcanzaron el grado final de maduración y por ese motivo no se detectaron CSA específicas a ese tiempo.

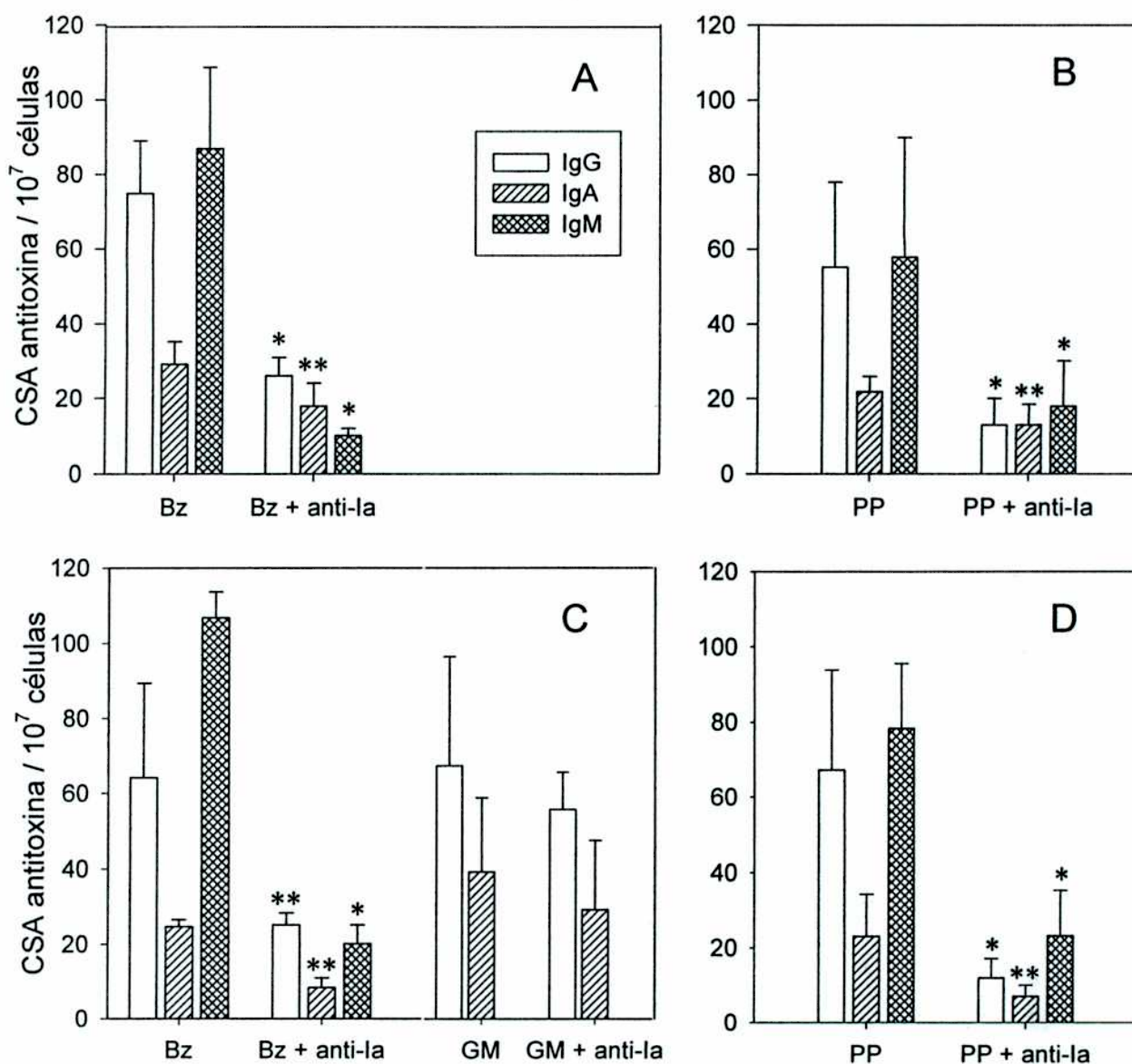
Para responder a esta cuestión se prepararon cultivos con las suspensiones celulares del bazo de ratas de 1 y 2 dpi y con células del ganglio mesentérico de ratas inmunizadas 48 horas antes con una dosis ig de toxina colérica. Luego de cuatro días de cultivo las células fueron recuperadas y se evaluó la presencia de CSA antitoxina por ELISPOT (Figura 10). En los cultivos del ganglio mesentérico apareció una población de CSA específica que presentaron una distribución de isotipo con mayoría de IgG (65 % de las células) seguida de IgA (35 %). En cambio a partir de células de bazo fueron observadas muchas CSA antitoxina que expresaron el isotipo IgM. Además las cantidades de CSA antitoxina por millón de células fueron mayores que en los cultivos de ganglio mesentérico. Estos resultados indican que a las 24 horas de la inmunización ig en el bazo ya se encuentran los elementos necesarios para la aparición de células plasmáticas antitoxina.

E.2.4. Presentación *in situ* en el bazo luego de la inmunización oral con toxina colérica

El hecho de encontrar en los cultivos de bazo una alta proporción de CSA antitoxina del isotipo IgM podría deberse a que en este órgano se produce una presentación *in situ* de la toxina colérica. Para investigar esta hipótesis las suspensiones celulares de bazo, ganglio mesentérico y placas de Peyer de animales inmunizados 1 o 2 días antes con una dosis oral de toxina colérica fueron cultivadas durante cuatro días en presencia de anticuerpo monoclonal anti-antígeno Ia de clase II del MHC de rata, en cantidades inhibitorias de la presentación antigénica. Posteriormente se contaron las CSA específicas que se formaron.

Sorprendentemente en los cultivos de bazo se detectó una disminución significativa en el número de CSA antitoxina por millón de células para los tres isotipos de inmunoglo-

Figura 10.



Número de CSA antitoxina en cultivos primarios de bazo (Bz), ganglio mesentérico (GM) y placas de Peyer (PP) de ratas primadas con 24 horas (A y B) o 48 horas (C y D) de antelación. Grupos de seis ratas de 8 semanas de edad fueron primadas con toxina colérica por la vía ig y posteriormente se emplearon suspensiones celulares de cada órgano para preparar cultivos en presencia (+ anti-Ia) o ausencia de cantidades inhibitorias del anticuerpo monoclonal anti-Ia (MHC Clase II; clon OX6). Luego de 4 días de cultivo se determinó la cantidad de CSA específicas de clase IgG, IgA e IgM.

Medias \pm ES.

Se utilizó la prueba U de Mann-Whitney, * $P < 0,001$; ** $P < 0,01$.

bulinas estudiados en comparación a los cultivos que no recibieron AcM anti-Ia (Figura 10). La magnitud del descenso fue tal que las cantidades de CSA específicas al término de los cultivos casi alcanzaron los valores existentes antes del cultivo.

Además interesantemente una caída similar de las cantidades de CSA fue determinada en los cultivos de placas de Peyer en presencia de AcM anti-Ia pero eso no ocurrió en los cultivos de células de ganglio mesentérico. Estos resultados sostienen la idea de que una presentación local sucede en el bazo.

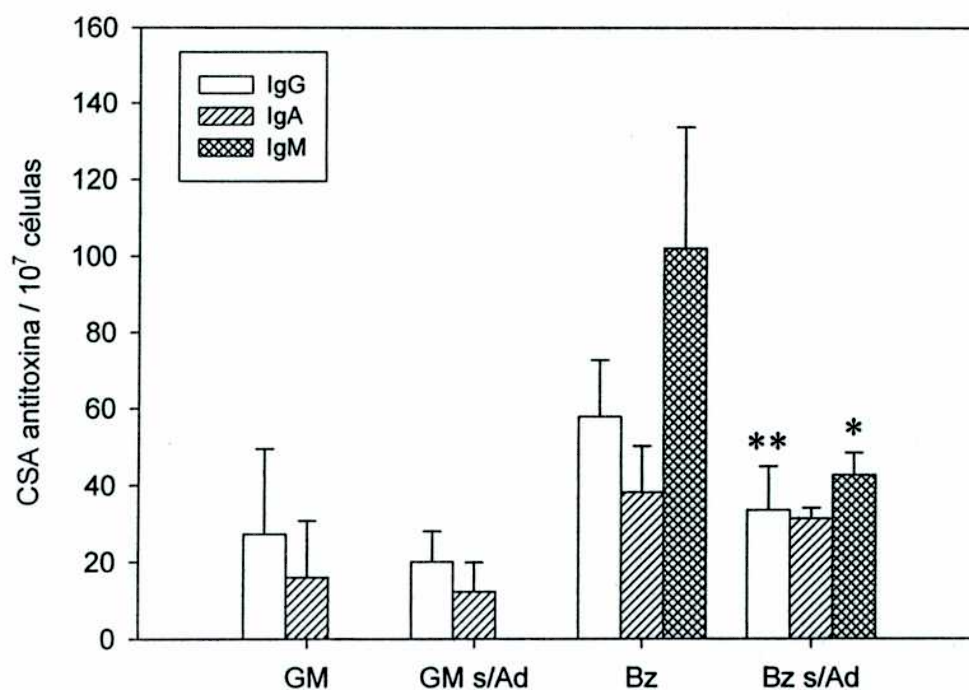
Alternativamente se repitió el experimento de cultivos con células de bazo y ganglio mesentérico provenientes de ratas inmunizadas 24 y 48 horas antes con una dosis oral de toxina colérica pero ahora las suspensiones celulares fueron depuradas de las células adherentes previo a la incubación de 4 días y finalmente se cuantificaron las CSA específicas que se formaron. Si bien se encontró una ligera disminución en la cantidad de CSA antitoxina de los isotipos IgG e IgA por millón de células en los cultivos de ganglio mesentérico que carecen de células adherentes respecto a los cultivos completos del mismo órgano esta diferencia no resultó significativa (Figura 11). Pero en los cultivos de bazo sí aparecieron disminuciones significativas del número de CSA antitoxina en los depletados de células adherentes en comparación a los cultivos enteros del mismo órgano. Estas diferencias fueron más marcadas en las CSA del isotipo IgM y también fueron detectadas en las secretoras de IgG.

Tomado todo junto las evidencias sostienen la hipótesis de que en el bazo se desarrolla una presentación *in situ* luego de una inmunización oral con toxina colérica y que genera células plasmáticas que liberan anticuerpos circulantes antes que las células emigrantes del GALT lleguen al ganglio mesentérico. Esta rápida comunicación entre el bazo y la mucosa intestinal ha sido una novedad inesperada.

E.2.5. El bazo no es un eslabón en la cadena de eventos que llevan a la aparición de CSA en médula ósea pero sí es sitio de paso al ganglio mesentérico

En los primeros días de la inmunización oral se encontraron CSA antitoxina en el

Figura 11.



Número de CSA antitoxina en cultivos primarios del ganglio mesentérico (GM) y bazo (Bz) de ratas primadas 2 días antes. Grupos de cuatro a seis ratas de entre 8 y 12 semanas de edad fueron inmunizadas con toxina colérica en forma ig y con posterioridad se prepararon cultivos de 3×10^6 células / pocillo con suspensiones celulares enteras de los órganos o con la fracción que resultó de eliminar las células adherentes (s/Ad). Luego de 4 días de incubación se determinaron las cantidades de CSA antitoxina de isotipo IgG, IgA e IgM. Medias \pm ES. Se empleó la prueba U de Mann-Whitney

* $P < 0,01$; ** $P < 0,05$.

bazo y parte de ellas se debieron a una presentación directa en este órgano. Esto nos llevó a investigar si las células plasmáticas que aparecen en el bazo migran a la médula ósea. Es decir que se quiso ver cómo la falta de bazo puede alterar las cantidades de CSA que aparecen en médula y ganglio mesentérico luego de la inmunización oral.

Con dicho fin, a un grupo de ratas les fueron extirpados los bazos y luego inmunizadas. Tres semanas después de la 2ª dosis los números de CSA que aparecieron en la médula ósea y el ganglio mesentérico fueron comparados contra los controles que no sufrieron la esplenectomía.

En médula ósea los números de CSA antitoxina de isotipo IgG (que aparecieron luego de la inmunización) fueron significativamente mayores en los animales que carecían de bazo en comparación a las ratas no operadas (Tabla III). Las CSA de isotipo IgA que aparecieron en médula ósea mostraron una tendencia a estar en mayor cantidad en las ratas sin bazo que en los controles, pero no podemos tomar a este aparente aumento como significativo ($p = 0,1$).

Tabla III. Cantidad de CSA antitoxina de isotipo IgG e IgA en la médula ósea y el ganglio mesentérico de ratas que sufrieron la esplenectomía en forma previa a la inmunización.^a

Organo	Esplenectomía	Número de CSA antitoxina / 10 ⁶ células ^b	
		IgG	IgA
Médula ósea	SI	28 ± 12 ^c	12 ± 6 ^e
	NO	12 ± 7 ^c	5 ± 5 ^e
Ganglio mesentérico	SI	26 ± 21 ^d	12 ± 5
	NO	94 ± 70 ^d	10 ± 4

^aRatas de 16 semanas de edad a las que se les extirpó el bazo o controles que conservan el bazo, recibieron dos inmunizaciones ig (veinte días después de la esplenectomía) con un intervalo de 7 días entre dosis. A los 21 días después de la última inoculación se determinó el número de CSA específicas de isotipo IgG e IgA por cada 10⁶ células nucleadas en médula ósea y ganglio mesentérico.

^bMedias ± DS de lotes de 5 animales.

Comparación con la prueba U de Mann-Whitney

^c $P = 0,04$ ^d $P = 0,02$ ^e $P = 0,1$ (no significativo).

Por otro lado el ganglio mesentérico de las ratas que no poseían bazo sufrió una

pérdida significativa de CSA antitoxina de isotipo IgG, sin embargo los números de CSA de isotipo IgA en ganglio mesentérico fueron similares con ambos tratamientos.

Además los títulos de anticuerpos antitoxina de clase IgG en suero fueron similares en los animales a los que se les extirpó el bazo y en los controles (medias del logaritmo de los títulos: 4,6 y 4,4 respectivamente).

Estos resultados muestran que (al menos para las células de isotipo IgG) la médula ósea recibe mayor cantidad de CSA específicas si el individuo no posee bazo. Es decir que en ausencia de bazo, las células que migran desde el intestino no encuentran el bazo y la médula ósea actuaría como órgano sustituto que tiende a compensar el defecto. La producción de anticuerpos en médula ósea no depende de las CSA que se originan en bazo.

Interesantemente en ganglio mesentérico parece haber una onda de poblamiento de CSA de clase IgG originada desde el bazo, que se refleja en una caída de las cantidades de dichas CSA en las operadas. Que el bazo y el ganglio mesentérico sean órganos con baja proporción de CSA de clase IgA puede ser la causa de que estos efectos sean de poca importancia y no se los detecte al analizar lo que pasa con el isotipo IgA.

E.3. RESPUESTA DE MEMORIA EN EL GALT Y EN EL BAZO

E.3.1. La respuesta secundaria en el GALT posee las características de la memoria clásica: mayor rapidez y expansión

Habiéndose observado que luego de una única inmunización oral con toxina colérica el bazo fue el primer órgano en el que apareció respuesta de células B antitoxina se quiso conocer como se establece la respuesta temprana ante una nueva dosis cuando ya se han alojado células de memoria en el GALT. Con dicha finalidad, a ratas que fueron primadas oralmente con toxina colérica 3 meses antes se les inoculó un desafío antigénico de toxina por la misma vía y a los 2 y 5 dpi se investigó la presencia de CSA antitoxina en los órganos de interés.

A los dos dpd se observó que, a diferencia de lo ocurrido durante el primado, aparecieron similares cantidades de CSA antitoxina por millón de células nucleadas en el ganglio mesentérico y en el bazo para los isotipos IgA e IgG (Figura 12). Además se detectaron niveles bajos de CSA antitoxina de los isotipos IgG e IgA en placas de Peyer. En la lámina propia del intestino delgado aparecieron cantidades de CSA antitoxina de isotipo IgA por millón de células similares a las de las CSA específicas de clase IgG de bazo y ganglio. Esto último es muy diferente a lo ocurrido en el primado, en donde recién comenzaban a aparecer CSA en lámina propia a los 5 dpi.

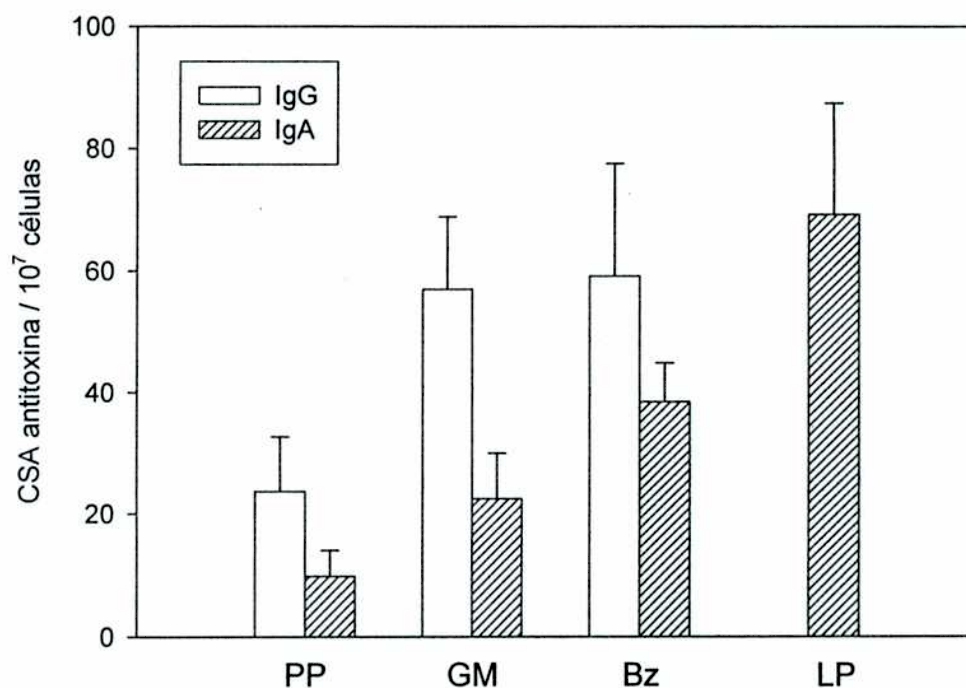
A los cinco días siguientes al desafío resaltó un explosivo aumento del número de CSA antitoxina de los isotipos IgA e IgG por millón de células en todos los órganos estudiados (Figura 13). Las placas de Peyer y el ganglio mesentérico tuvieron un aumento de entre 25 y 50 veces respecto a las cantidades registradas a los 2 dpd. En particular para las placas de Peyer es llamativa la diferencia entre el contenido de CSA específicas por millón de células a los 5 dpd y al observado a ese mismo tiempo luego del primado, cuando todavía no aparecía respuesta. El bazo presentó un aumento de alrededor de 20 veces en la cantidad de CSA antitoxina de clase IgG o IgA en comparación a los niveles hallados a los 2 dpd. Además la lámina propia del intestino delgado exhibió un aumento de aproximadamente 10 veces para las CSA antitoxina de isotipo IgA por millón de células entre los dos tiempos considerados.

Estos datos indican que hay una respuesta inmune de memoria inducida en las placas de Peyer y tal vez en parte en el ganglio mesentérico. Además es probable que luego del primado, células de memoria se hayan distribuido por la lámina propia y responden allí al desafío antigénico. Aunque la aparición de CSA antitoxina en el bazo a los 2 dpd podría también deberse en parte a una presentación *in situ*.

E.3.2. Presentación *in situ* de la toxina colérica en el bazo durante un desafío oral

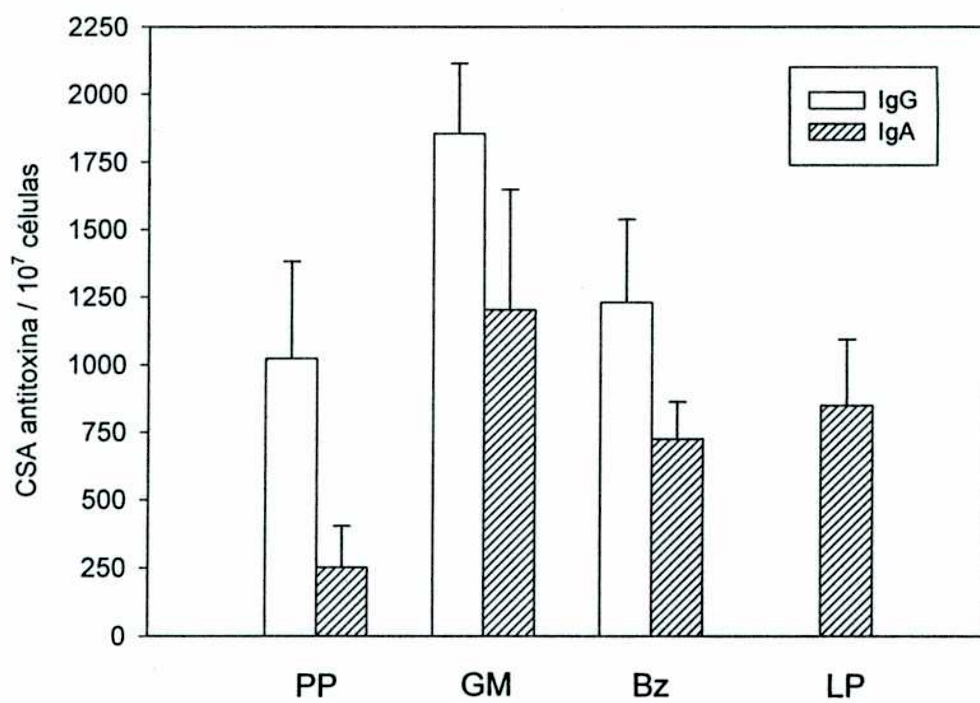
Para averiguar si en la respuesta de memoria oral el bazo vuelve a tener presentación local de la toxina colérica, nuevamente se realizaron cultivos de células de bazo pero ahora a partir de ratas inmunizadas por vía ig con 2 dosis de toxina colérica y un

Figura 12.



Número de CSA antitoxina a los 2 días posteriores al desafío luego de una inmunización oral. Grupos de cuatro ratas de 8 semanas de edad fueron primados con toxina colérica vía ig y desafiadas con el antígeno 3 meses después (cuando ya no se detectan CSA) por la misma vía. Dos días después del desafío se investigó la cantidad de CSA antitoxina de isotipo IgG e IgA en las placas de Peyer (PP), bazo (Bz) y lámina propia intestinal (LP) por la técnica de ELISPOT. Medias ± ES.

Figura 13.



Número de CSA antitoxina a los 5 días posteriores al desafío luego de una inmunización oral. Ratas de 8 semanas de edad (en grupos de 4) fueron primadas con toxina colérica vía ig y desafiadas con el antígeno por la misma vía 3 meses después. Cinco días después del desafío se investigó la cantidad de CSA antitoxina de isotipo IgG e IgA en las placas de Peyer (PP), bazo (Bz) y lámina propia intestinal (LP) por ELISPOT. Medias ± ES.

intervalo de 90 días entre dosis. Los cultivos fueron hechos a las 48 horas de dada la 2ª dosis de toxina y en presencia o ausencia de AcM anti-antígeno Ia de Clase II del MHC de rata.

Se detectó una marcada disminución del número de CSA antitoxina de clase IgM en los cultivos de bazo con AcM anti-Ia en comparación a los controles (Figura 14). A pesar de que también apareció una caída significativa de la cantidad de CSA específicas de isotipo IgG en los cultivos tratados con AcM anti-Clase II, este descenso no fue tan brusco como en los mismos experimentos que estudiaron la presentación durante el primado (Figuras 10 vs. 14). Además no surgieron diferencias significativas entre los números de las células plasmáticas antitoxina de clase IgA provenientes de los cultivos con o sin tratamiento.

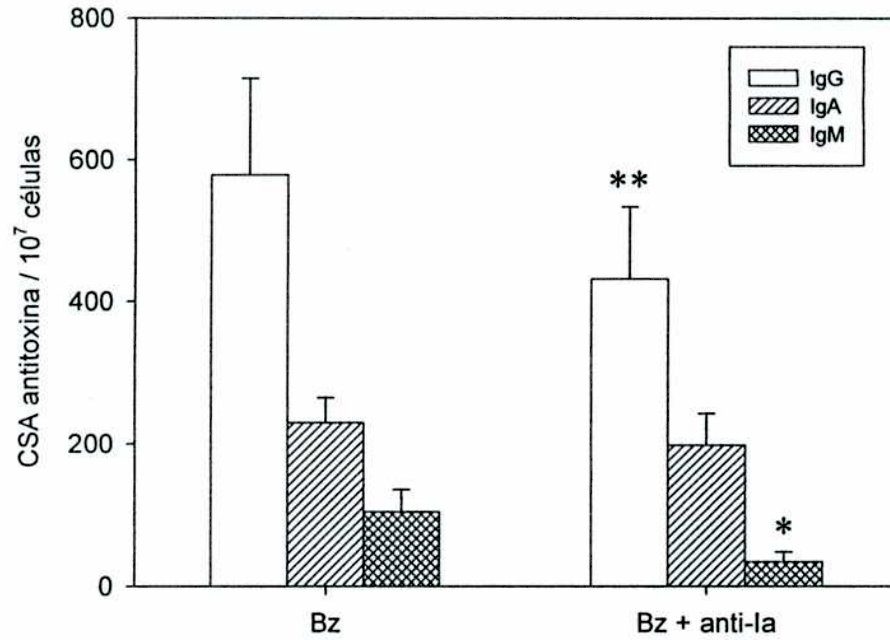
E.3.3. La cinética de los anticuerpos antitoxina en suero e intestino va en paralelo con la de CSA

Cuando se investigó la aparición de anticuerpos antitoxina en muestras de sueros de los animales tratados con el desafío de antígeno luego de 3 meses del primado se encontró que a los dos dpd había una reducida cantidad de anticuerpos específicos de la clase IgM e IgG (Figura 15A). Pero a los 5 dpd se produjo un gran incremento en los niveles de anticuerpos antitoxina, especialmente para los de isotipo IgM en los que el aumento observado fue de 9 veces los valores medidos a los 2 dpd. Para los anticuerpos específicos de isotipo IgG dicho incremento fue de cuatro veces y media.

Un fenómeno similar se descubrió en los fluidos intestinales de estos experimentos para los anticuerpos antitoxina de clase IgA, en donde los niveles a los 5 dpd fueron alrededor de 20 veces superiores a las cantidades encontradas a los 2 dpd (Figura 15B).

Este perfil de incremento de anticuerpos antitoxina en suero y fluido intestinal está de acuerdo con los incrementos en los números de CSA antitoxina de clase IgA o IgG por millón de células del GALT y del bazo observados entre el segundo y quinto dpd.

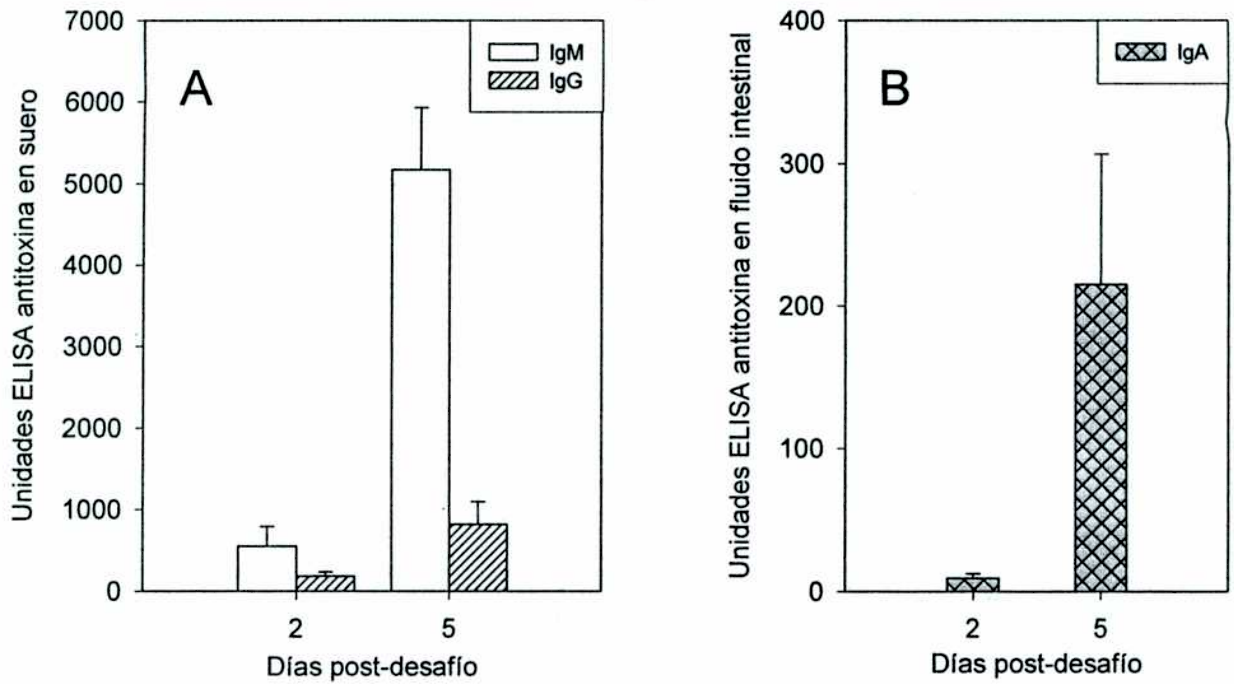
Figura 14.



Número de CSA antitoxina en cultivos primarios de bazo (Bz) de ratas primadas y posteriormente desafiadas con toxina colérica en forma oral. Dos grupos de cuatro ratas de entre 8 y 12 semanas de edad fueron inmunizados y desafiados (en ambos casos por vía ig) 3 meses después. A los 2 días de inoculados los desafíos se prepararon cultivos con células de bazo en presencia (+ anti-Ia) o ausencia de anticuerpo monoclonal anti-Ia (MHC Clase II; clon OX6). Luego de 4 días de cultivo se determinó la cantidad de CSA de isotipo IgG, IgA e IgM. Medias \pm ES.

Se utilizó la prueba U de Mann-Whitney * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$.

Figura 15.



Unidades ELISA antitoxina a los 2 y 5 días posteriores a un desafío oral. Grupos de cuatro ratas fueron inmunizados con toxina colérica en forma ig y a los 3 meses desafiados con el antígeno por la misma vía. Los niveles de anticuerpos antitoxina de isotipo IgM e IgG en el suero (A) e IgG en el fluido intestinal (B) fueron determinados por ELISA en los días 2 y 5 post-desafío. Medias \pm ES.

E.4. IMPORTANCIA FUNDAMENTAL DE LA MEDULA OSEA PARA MANTENER LA INMUNIDAD A NIVEL SISTEMICO CON UNA INMUNIZACION ORAL

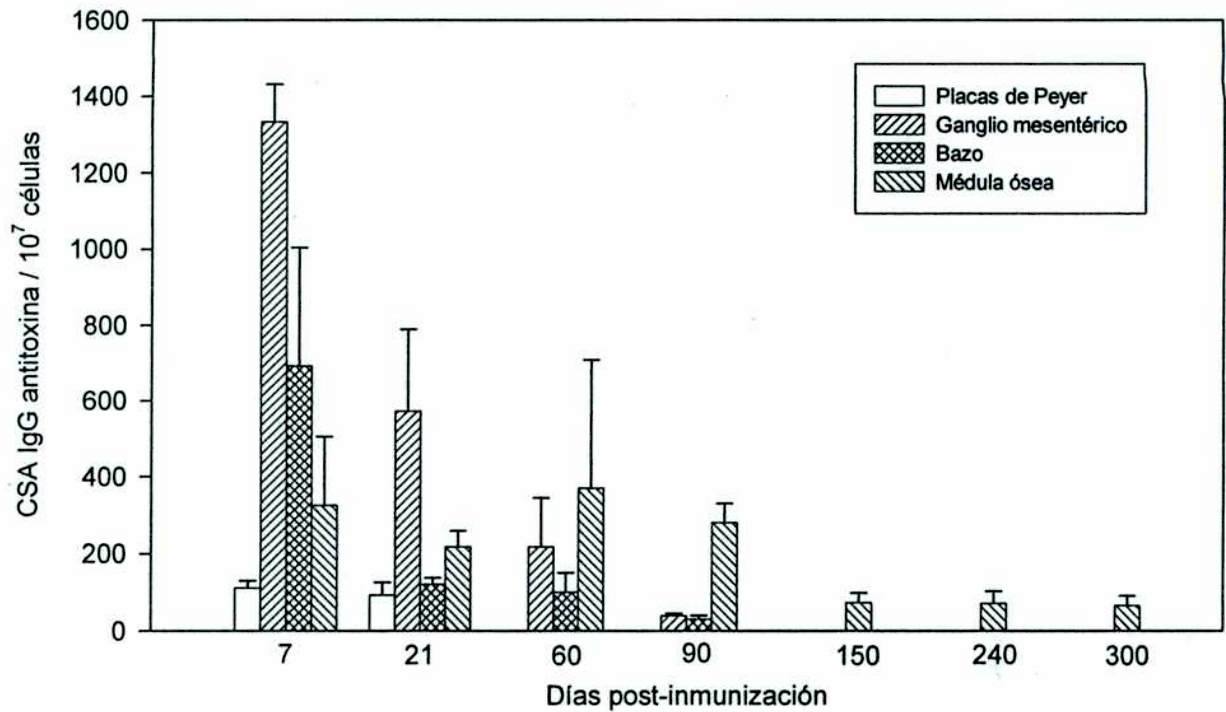
E.4.1. La médula ósea es el único órgano sistémico que sintetiza anticuerpos a largo plazo luego de una inmunización oral

Habiendo encontrado que luego de inmunizar con tres dosis de toxina colérica por vía oral la médula ósea se convirtió en el principal contribuyente de anticuerpos antitoxina del suero a la 2ª semana posterior a la última inmunización, se quiso averiguar si esta condición se mantiene durante los meses siguientes y cómo crece y decae la respuesta inmune a lo largo del tiempo. Para responder a estas preguntas, se repitió el esquema de inmunización con tres dosis de toxina colérica por vía ig y se analizó por ELISPOT a distintos tiempos la cantidad de CSA específicas en los diferentes órganos.

En las placas de Peyer se encontraron CSA antitoxina para las dos clases de inmunoglobulinas estudiadas (IgG e IgA) sólo hasta la tercer semana post-inmunización (Figuras 16 y 17). Desde los dos meses en adelante ya no fueron detectadas CSA específicas en este órgano.

Para los demás órganos las cantidades de CSA antitoxina del isotipo IgG variaron como se describe (Figura 16). El bazo sufrió un marcado descenso a partir de los 21 dpi que continuó hasta los cinco meses siguientes a la última dosis de antígeno cuando ya no se detectaron células plasmáticas específicas. El ganglio mesentérico se mantuvo hasta la tercer semana como el órgano con mayor cantidad de CSA antitoxina por millón de células, pero estos valores están en descenso y también a los cinco meses dejaron de observarse estas CSA en este órgano. La médula ósea no fue el órgano con mayor cantidad de CSA antitoxina por millón de células durante las primeras semanas, pero conservó su nivel por tres meses. Al quinto mes siguiente a la inmunización si bien hubo una importante disminución en los niveles de linfocitos que secretan antitoxina, la médula ósea pasó a ser el único órgano que secreta IgG antitoxina hacia el suero y esta actividad se mantuvo al menos durante diez meses después de la inmunización.

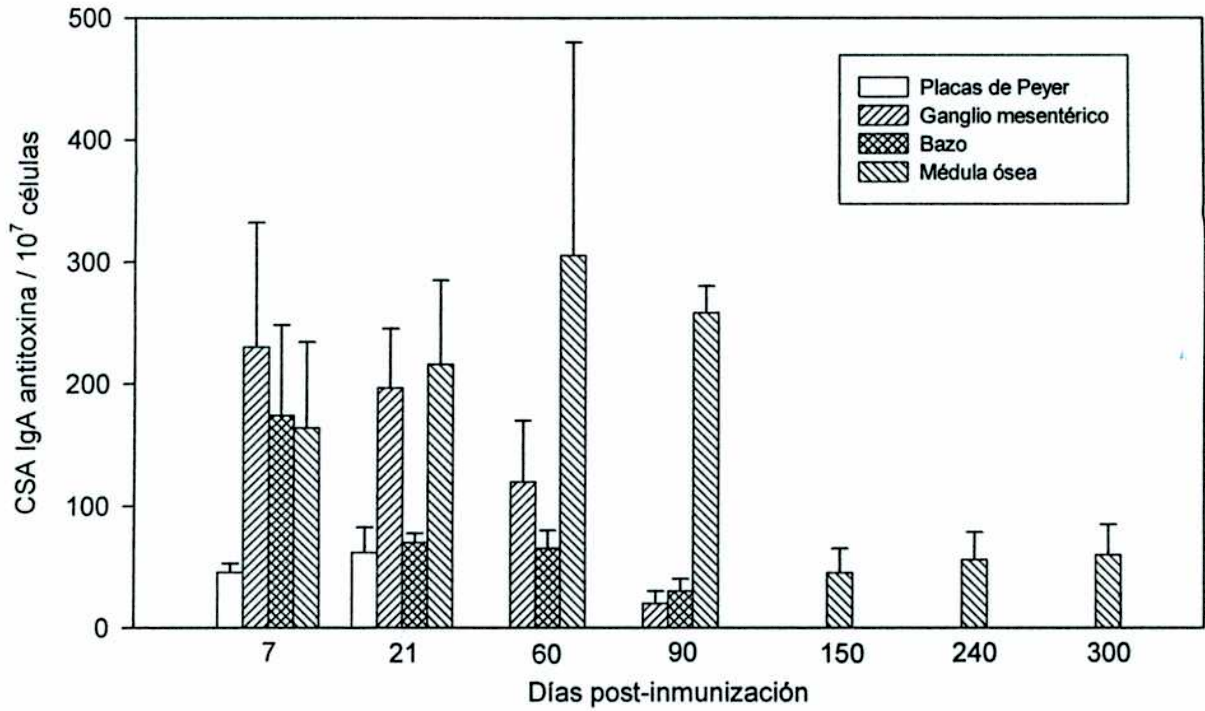
Figura 16.



Análisis cinético de la frecuencia de CSA antitoxina de isotipo IgG en las placas de Peyer, ganglio mesentérico, bazo y médula ósea luego de una inmunización oral.

Las ratas (en lotes de 3 a 6 animales para cada punto de la cinética) fueron primadas con 3 dosis ig de toxina colérica con intervalos de una semana entre cada dosis. El número de CSA IgG antitoxina de cada órgano fue determinado por ELISPOT a varios intervalos de tiempo post-inmunización. El día de la última inoculación de antígeno fue tomado como el día 0 del experimento. Medias \pm ES.

Figura 17.



Análisis cinético de la frecuencia de CSA antitoxina de isotipo IgA en las placas de Peyer, ganglio mesentérico, bazo y médula ósea luego de una inmunización oral.

Las ratas (en lotes de 3 a 6 animales para cada punto de la cinética) fueron primadas con 3 dosis ig de toxina colérica, con intervalos de una semana, y luego se determinó el número de CSA IgA antitoxina de cada órgano por ELISPOT a varios intervalos de tiempo post-inmunización. El día de la última inoculación de antígeno fue tomado como el día 0 del experimento. Medias \pm ES.

La cinética del número de CSA antitoxina de isotipo IgA en los distintos órganos fue la siguiente (Figura 17). En bazo a las 3 semanas post-inmunización se observó un serio descenso en el número de CSA antitoxina, lo que no ocurrió en ganglio mesentérico ni en médula ósea. Esta disminución en bazo fue progresiva y a los cinco meses ya no se detectaron células con esta especificidad. En el ganglio mesentérico el comienzo del descenso en los niveles de CSA antitoxina se observó a los sesenta dpi y a los ciento cincuenta días ya estaba concluido. Por el contrario el análisis en la médula ósea indicó que sus niveles de células plasmáticas antitoxina se mantuvieron elevados hasta los noventa días siguientes a la inmunización y aunque a los cinco meses sufrió una disminución significativa en las cantidades de CSA específicas, se convirtió a estos tiempos en el único órgano que todavía posee dicha actividad. El último tiempo investigado fue a los diez meses siguientes al primado y hasta allí se encontraron CSA antitoxina de clase IgA en médula ósea.

Estos resultados indican que la médula ósea es el órgano responsable de producir anticuerpos a nivel sistémico durante períodos de tiempo prolongados aún en una inmunización oral.

E.4.2. La médula ósea es el principal órgano que produce anticuerpos circulantes luego de una inmunización oral

Para tener una medida del grado de compromiso que expresa el tejido linfoide de los órganos analizados, en la respuesta inmune humoral en nuestro modelo de inmunización se debe tener en cuenta la proporción de linfocitos maduros en cada órgano. Es bien conocido que aproximadamente el noventa por ciento de las células nucleadas extraídas del ganglio mesentérico y del bazo son linfocitos. Para establecer los valores en médula ósea en algunos experimentos, alícuotas de suspensiones de células de médula ósea, teñidas por inmuno-fluorescencia indirecta con anticuerpos monoclonales anti-CD3 o anti-CD45RA de rata para marcar los linfocitos T y B respectivamente, fueron analizadas por citometría de flujo y se observó que sólo alrededor del ocho por ciento de las células nucleadas extraídas fueron linfocitos maduros; ya que un 20 % de las células nucleadas correspondió por tamaño y granulosidad a la población de linfocitos y de ella alrededor del 20 % fueron

linfocitos T (CD3⁺) y otro 20 % linfocitos B maduros (CD45RA⁺; Figura 18).

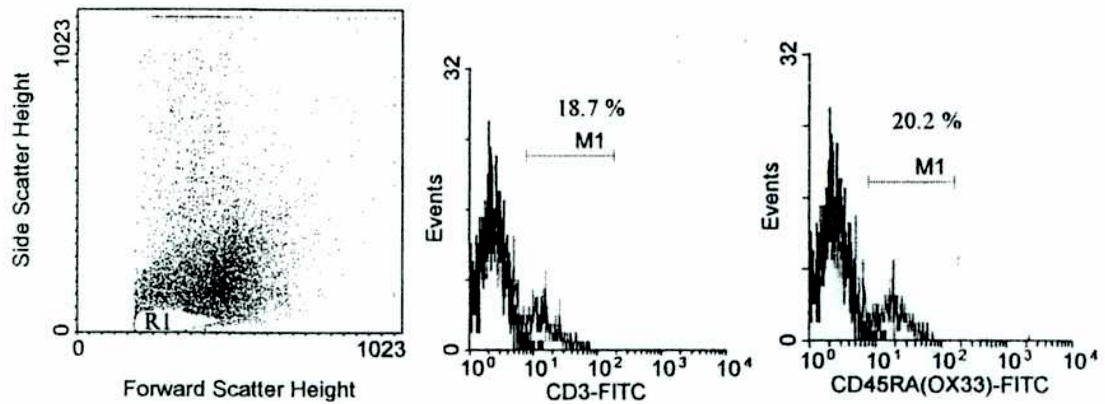
Sobre la base de estos hechos si se calcula la frecuencia de CSA antitoxina por millón de linfocitos maduros, ésta es superior en la médula ósea a todos los tiempos estudiados (datos no mostrados). Esto significa que en la médula ósea la proporción de linfocitos involucrados en sintetizar anticuerpos específicos es, en nuestro modelo experimental, mayor que la de ganglio mesentérico y bazo aún en las primeras semanas de la cinética de la respuesta humoral.

Con el fin de determinar la contribución relativa de cada órgano al total de CSA antitoxina que liberan anticuerpos hacia la circulación sistémica (tomado como el número total de células plasmáticas antitoxina que se encuentran en cada uno de los órganos estudiados) se debieron calcular los números absolutos de CSA específicas de isotipo IgG e IgA en cada órgano como se describe en el punto D.6.1 de Materiales y Métodos.

Los números absolutos de CSA antitoxina de isotipo IgG para cada órgano demostraron que a los siete dpi el bazo (con una media de 68×10^3 CSA/órgano) y la médula ósea (con 71×10^3 CSA/órgano) fueron los que poseían mayor cantidad de estas células (Figura 19A), participando con el 41 % y 43 % respectivamente del total de las CSA que secretan anticuerpos antitoxina hacia la circulación sistémica. Por su parte el ganglio mesentérico contribuyó con el 16 % del total. Transcurridos 21 días de la inmunización en el bazo se cuantificaron 12×10^3 CSA/órgano, lo que indica que allí decreció marcadamente la cantidad de células plasmáticas específicas, pasando a ser su participación al total de sólo el 16 %, similar a los valores del ganglio mesentérico. La médula ósea en cambio aumentó su aporte al total de CSA antitoxina que, con 50×10^3 CSA/órgano, es ahora de un 68 %. A los 2 meses de la inmunización la médula ósea ya tenía el 80 % de todas las CSA antitoxina de isotipo IgG del total de órganos bajo estudio y más adelante es el único órgano que produce anticuerpos circulantes.

Efectuando el mismo análisis con las CSA antitoxina de isotipo IgA, a los 7 dpi la médula ósea ya tenía la mayor cantidad de células plasmáticas específicas con una media de 37×10^3 CSA/órgano lo que constituye el 63 % del total de células que vierten anticuerpos antitoxina de este isotipo a la circulación (Figura 19B). Mientras que el bazo le siguió con

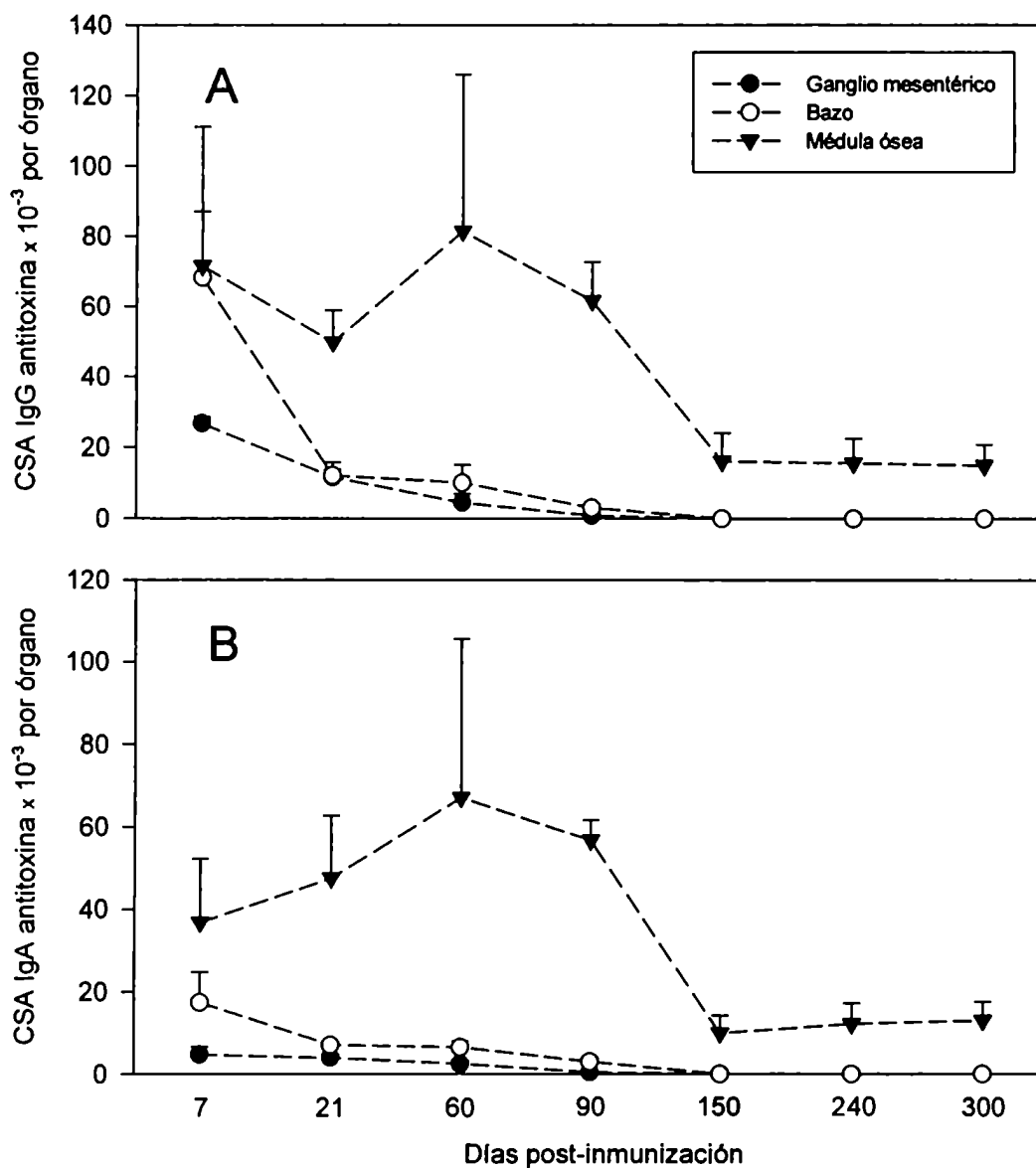
Figura 18.



Análisis de linfocitos T y B de la médula ósea en ratas de un año de edad.

Las células de la médula ósea fueron preparadas de la misma forma que para los otros experimentos como se describe en Materiales y métodos. Para el análisis de células, el portal (R1) fue fijado sobre la fracción linfoidea por su tamaño (dispersión frontal de luz o *forward scatter*) y granulosidad (dispersión lateral o *side scatter*). La región R1 contuvo el 20 % de todas las células nucleadas. Alrededor del 20 % de las células de esa región corresponde a células T ($CD3^{\text{alto}}$) y otro 20 % son células B ($CD45RA^{\text{alto}}$). Se analizaron 10000 células por su patrón de fluorescencia para cada muestra en un citómetro FACScan® (Becton-Dickinson).

Figura 19.



Análisis cinético del número total de CSA antitoxina en el ganglio mesentérico, bazo y médula ósea luego de una inmunización oral. Las ratas (en lotes de 3 a 6 animales para cada punto de la cinética) fueron primadas con 3 dosis ig de toxina colérica con intervalos semanales y luego se calculó la cantidad de CSA de isotipo IgG (A) e IgA (B) en cada órgano. Se consideró que un fémur de rata contiene el 9 % del total de la médula ósea del organismo (ver Materiales y métodos). Medias \pm ES

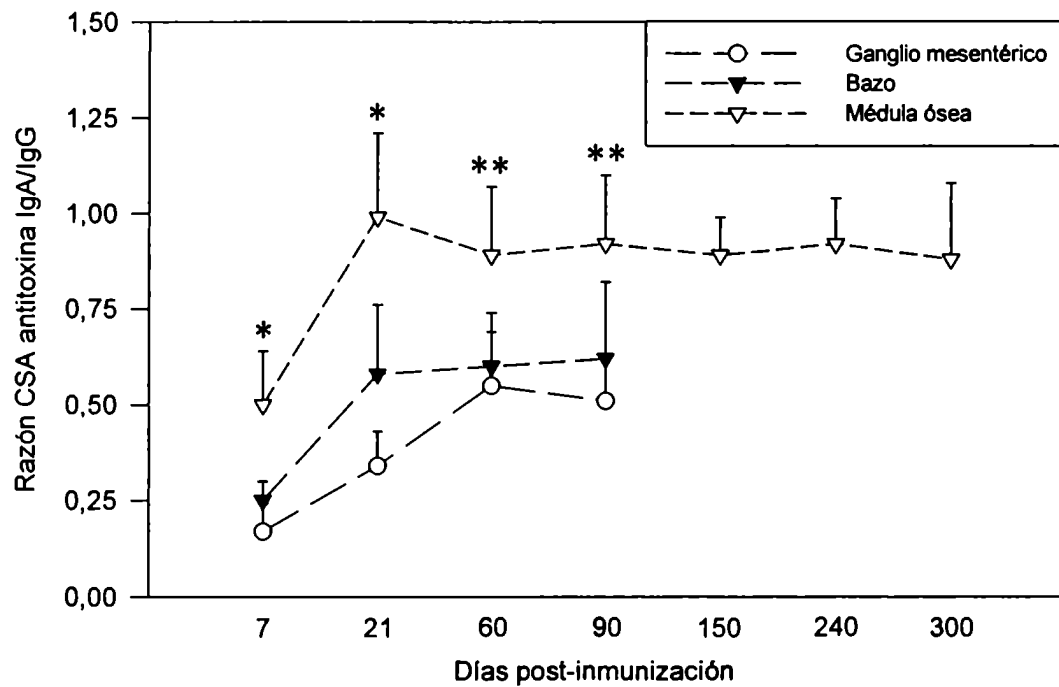
un total de 17×10^3 CSA y luego el ganglio mesentérico con $4,6 \times 10^3$ CSA totales, es decir que contienen respectivamente el 29 % y el 8 % del total. A los 21 dpi la médula ósea pasó a poseer el 81 % del total de plasmocitos antitoxina con 47×10^3 CSA/órgano, mientras que el bazo y el ganglio mesentérico sólo contribuyeron con el 12 % y el 7 % respectivamente al total de CSA específicas. Este predominio de la médula ósea se acentuó a mayores períodos post-inmunización. En todos los casos la contribución de las placas de Peyer al total de CSA antitoxina de los isotipos IgA o IgG fue igual o menor al 0,2 %.

E.4.3. La médula ósea mantiene a largo plazo la acumulación preferencial de CSA de clase IgA

Al igual que en los experimentos con inmunización ipP o con una a tres dosis de toxina colérica ig, se quiere ahora determinar si en médula ósea existe una localización preferencial de las CSA antitoxina de isotipo IgA con relación al resto de los órganos estudiados. Con este fin para cada órgano se calcularon las proporciones número de CSA antitoxina de isotipo IgA por millón de células sobre número de CSA antitoxina de isotipo IgG por millón de células a lo largo del tiempo.

A los 7 dpi la razón CSA IgA/CSA IgG en médula ósea fue aproximadamente de 0,5 un valor significativamente mayor ($P < 0,01$) a los encontrados en bazo y ganglio mesentérico que tienen medias de 0,25 y 0,17 respectivamente (Figura 20). Luego de tres semanas en médula ósea esta proporción fue 1,0 mientras que los valores de bazo y ganglio mesentérico continuaron siendo significativamente menores ($P < 0,01$). Más tarde si bien los valores medios de dicho cociente en bazo y ganglio aumentaron hasta un índice de entre 0,5 y 0,62 aún se mantienen las diferencias significativas con los niveles expresados en médula ósea ($P < 0,05$). Con posterioridad la médula ósea mantiene el cociente CSA IgA/CSA IgG en valores medios de alrededor de 0,9 más allá del tiempo en que fueron detectadas CSA específicas en bazo y ganglio mesentérico.

Figura 20.



Proporción de CSA antitoxina de isotipo IgA por CSA antitoxina de isotipo IgG en la médula ósea, bazo y ganglio mesentérico de ratas primadas con 3 dosis orales de toxina colérica. La razón IgA/IgG fue monitoreada a varios intervalos de tiempo. El día de la última inoculación del antígeno fue tomado como el día 0 del experimento. Medias \pm ES. Se utilizó la prueba U de Mann-Whitney para comparar los valores de la médula ósea contra los valores del bazo,

* $P < 0,01$; ** $P < 0,05$.

E.4.4. Los anticuerpos antitoxina en suero y lavado intestinal permanecieron por largo plazo con una inmunización ig

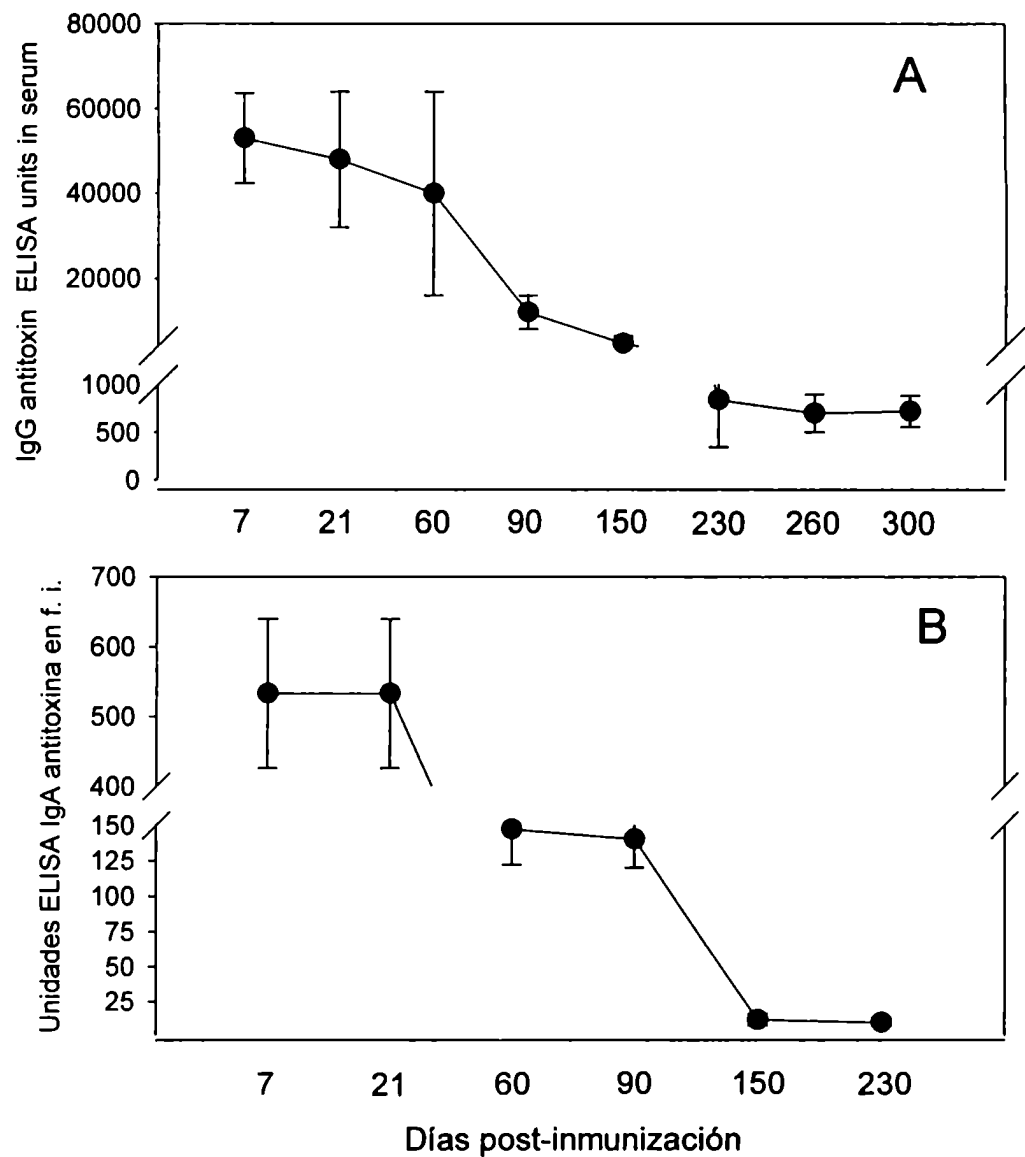
Durante los experimentos efectuados para estudiar la cinética de las CSA antitoxina a largo plazo también se tomaron muestras de suero y de lavado intestinal para observar cómo es la cinética de la respuesta de anticuerpos en la circulación sistémica y en la mucosa intestinal mediante la técnica de ELISA.

En suero se estudiaron las cantidades de IgG antitoxina encontrándose niveles máximos durante las primeras semanas post-inmunización (Figura 21A), seguido por un continuo descenso en los valores de anticuerpos, destacándose a los 90 días una caída de alrededor de 5 veces respecto a los niveles de las primeras semanas y a los 230 dpi se encontraron niveles 50 veces menores a los primeros. Sin embargo diez meses después del primado todavía fue posible detectar bajos títulos de IgG antitoxina.

En fluido intestinal se estudiaron las cantidades de IgA antitoxina en función del tiempo encontrándose un perfil de respuesta similar al de IgG específica en suero (Figura 21B). En efecto, a la segunda y tercer semana post-inmunización se detectaron los niveles máximos. Ya a los 60 días se encontró un tercio de los valores de anticuerpos de las primeras semanas y a los 150 días se verifica otra caída que alcanza niveles 40 veces menores a los máximos. Hasta los 230 días siguientes a la inmunización se detectaron anticuerpos IgA antitoxina.

Esta persistencia de los anticuerpos específicos en suero y fluido intestinal está de acuerdo con la permanencia de CSA antitoxina detectadas a largo plazo.

Figura 21.



Análisis cinético de anticuerpos antitoxina de isotipo IgG en el suero (A) y de isotipo IgA en el fluido intestinal (f. i. ; B). Lotes de entre tres y seis ratas fueron primados con 3 dosis orales de toxina colérica con intervalos semanales y luego se determinaron los niveles de anticuerpos a varios intervalos de tiempo por la técnica de ELISA. Se tomó el día 0 como aquel de la última inmunización. Medias \pm ES.

E.5. LA MEDULA OSEA ES ORGANO CLAVE PARA EL MANTENIMIENTO DE LA PRODUCCION DE ANTICUERPOS PERO NO PARA LA INDUCCION DE LA RESPUESTA DE MEMORIA

E.5.1. La memoria cuando el único órgano sistémico con CSA es la médula ósea: rápida activación del ganglio mesentérico

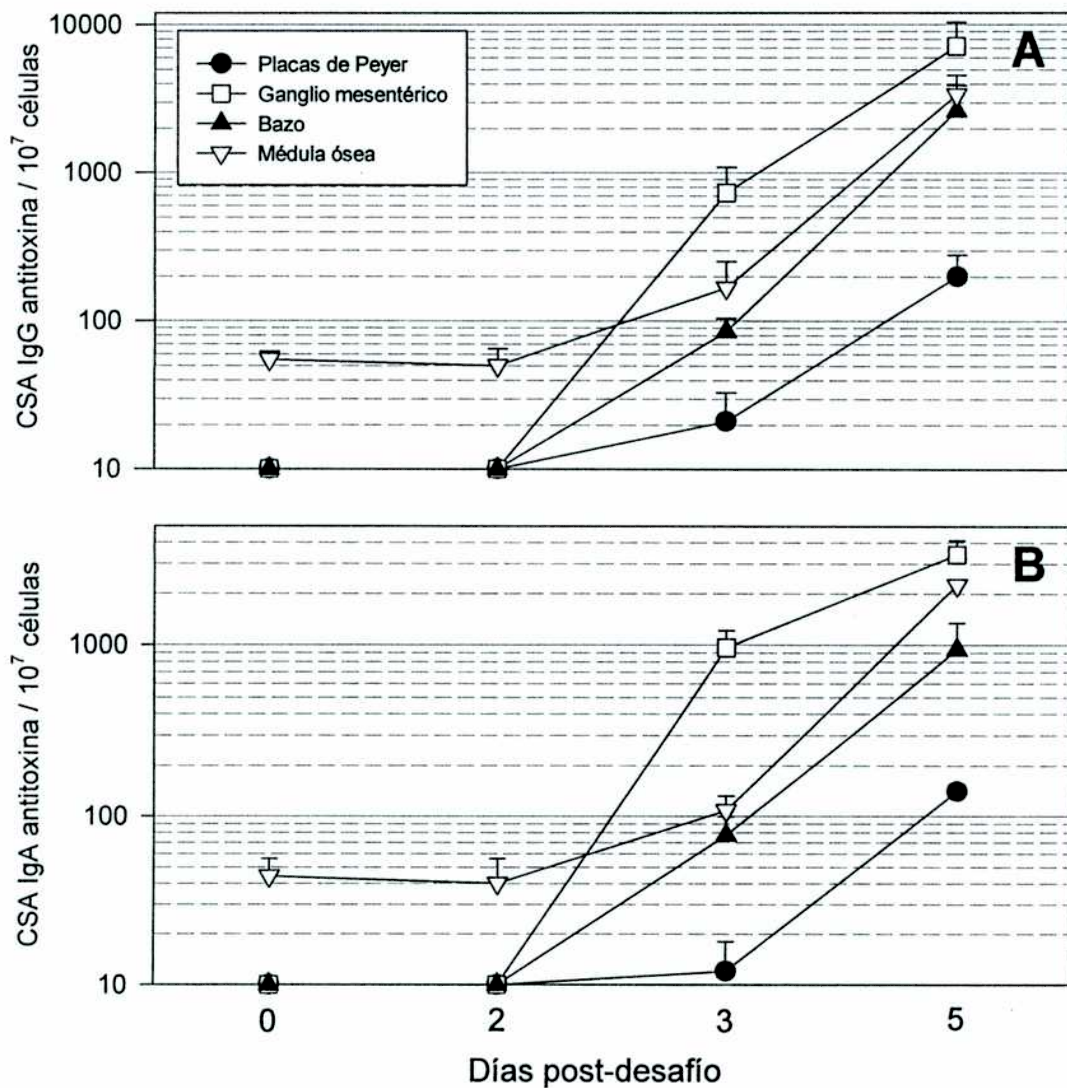
Conociendo que luego de varios meses de una inmunización con tres dosis orales de toxina colérica las CSA antitoxina quedan restringidas a la médula ósea, se buscó averiguar cuales son los órganos de esta etapa en donde se generan los primeros eventos de una respuesta de memoria luego de una dosis de desafío de antígeno.

Para ello ratas inmunizadas con tres dosis de toxina colérica diez meses antes fueron inoculadas con una dosis ig de toxina colérica como desafío y sacrificadas a los dos, tres o cinco dpd. Al segundo dpd solamente la médula ósea presentó CSA antitoxina y en cantidades que no superaron los valores encontrados en animales que no recibieron el desafío (Figura 22).

Al tercer día siguiente al desafío el ganglio mesentérico fue el órgano que expresó mayor cantidad de CSA antitoxina de isotipo IgG e IgA por millón de células nucleadas, con medias de 7.300 y 9.500 respectivamente (Figura 22). Aunque con valores muy inferiores a los del ganglio mesentérico, la médula ósea exhibió un incremento en los números de CSA específicas de los isotipos IgG e IgA por millón de células (medias de 1.700 y 1.100 respectivamente). Por su parte el bazo presentó cantidades de CSA antitoxina de isotipo IgG e IgA parecidas a las de médula ósea.

En el quinto dpd el ganglio mesentérico continuó siendo el órgano que posee mayores números de CSA antitoxina, con 71.000 CSA de isotipo IgG y 34.000 CSA de isotipo IgA por millón de células, lo que significa incrementos aproximados de 3,5 y 10 veces respectivamente con relación a los niveles hallados al tercer día. En médula ósea el contenido de CSA antitoxina de isotipo IgG e IgA aumentó veinte veces con relación a las cantidades encontradas a los 3 dpi, lo que resultó en un acercamiento a los valores del ganglio mesentérico. El bazo exhibió un aumento de 30 veces respecto a los 3 dpi en las

Figura 22.



El desafío oral con toxina colérica resulta en un rápido aumento de la frecuencia de CSA antitoxina en el ganglio mesentérico y la médula ósea. Las ratas fueron primadas con tres dosis orales de toxina y 10 meses después fueron desafiadas con una dosis oral del antígeno. La cantidad de CSA de isotipo IgG (A) e IgA (B) a los 0, 2, 3 y 5 días después del desafío fue determinada para cada órgano por ELISPOT. A los 2 días post-desafío no se observaron diferencias entre las ratas control únicamente primadas (día 0) y las ratas desafiadas y sólo la médula ósea mostró valores superiores al límite de detección (3 CSA/10⁷ células). Se utilizaron cuatro ratas para cada punto experimental. Medias ± ES.

CSA antitoxina de isotipo IgG y un incremento de 12 veces de los niveles de 3 dpi en las CSA de clase IgA. En las placas de Peyer el contenido de CSA antitoxina de isotipo IgG aumentó solamente casi 7 veces y para las de isotipo IgA 12 veces entre los 3 y 5 dpi.

El hecho de que el ganglio mesentérico tenía los más altos valores de CSA antitoxina/ 10^6 células a los 3 dpi pero que entre los 3 y 5 dpi no sostuvo un incremento tan alto como los que experimentaron médula ósea y bazo parece indicar que la respuesta de memoria (medida por la aparición de CSA antitoxina) se expresó al principio en ganglio mesentérico pero luego se expandió rápidamente a otros órganos.

E.5.2. La médula ósea es el principal contribuyente de anticuerpos circulantes durante la respuesta de memoria ante un desafío oral

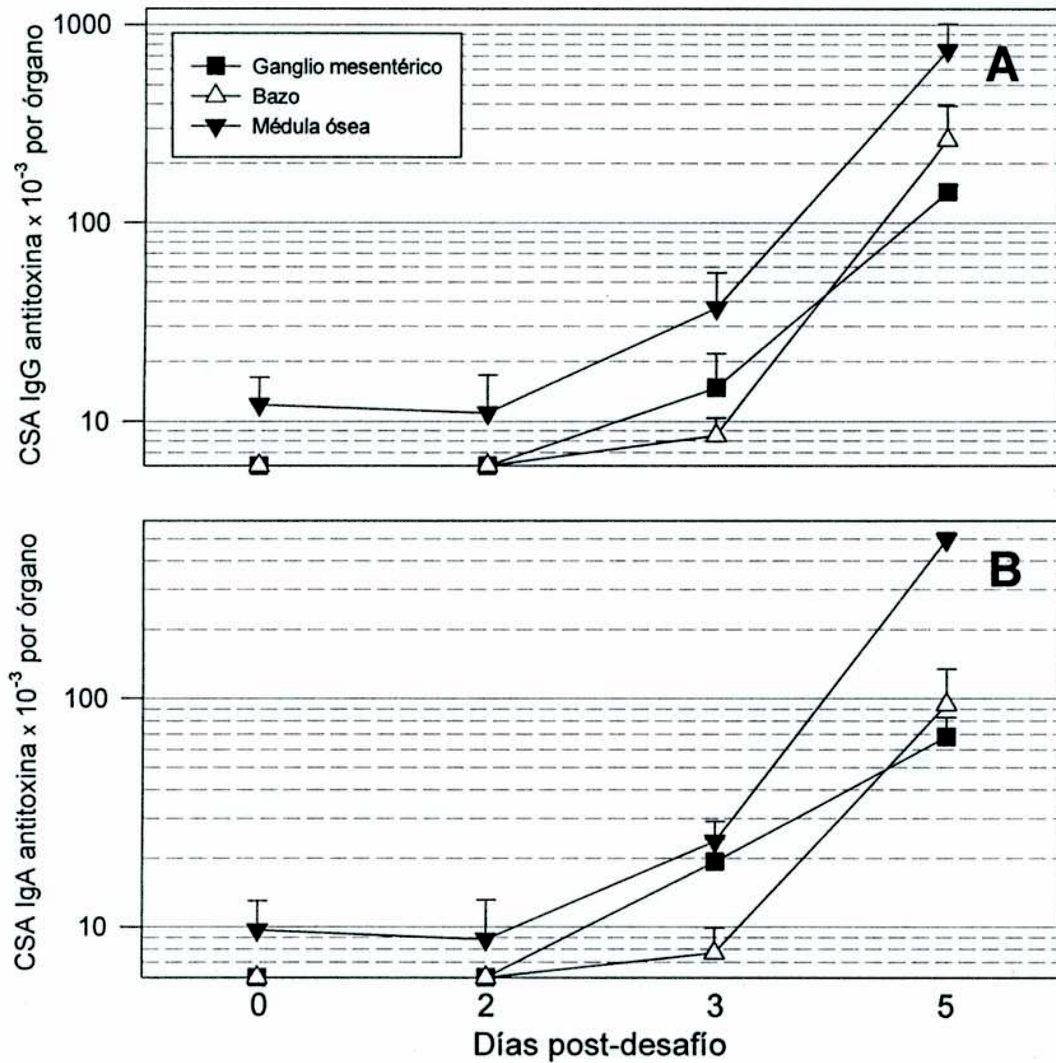
Nuevamente, como en casos anteriores, para establecer la contribución relativa de CSA antitoxina de cada órgano al organismo entero fueron calculados los números absolutos de estas células para cada órgano.

A los tres dpi la médula ósea expresó cantidades algo mayores de CSA antitoxina de clase IgG totales que el ganglio mesentérico (Figura 23) pero para las CSA antitoxina de clase IgA los números absolutos fueron similares para ambos órganos.

A los cinco dpi la médula ósea contenía la mayoría de las CSA antitoxina de clase IgG con 740×10^3 CSA (Figura 23A), en segundo orden apareció el bazo con 260×10^3 CSA antitoxina seguido del ganglio mesentérico que contuvo 140×10^3 células plasmáticas específicas. La importancia de la médula ósea es aún más notable cuando se examinan las CSA antitoxina de clase IgA (Figura 23B), ya que con 490×10^3 CSA específicas representa el 75 % del total de los cuatro órganos estudiados, mientras que en el bazo fueron cuantificadas 92×10^3 CSA antitoxina y en el ganglio mesentérico 69×10^3 CSA específicas.

En todos los casos las cantidades absolutas de CSA antitoxina en las placas de Peyer fueron inferiores al 1 % de la suma total de los cuatro órganos analizados.

Figura 23



El desafío oral con una dosis de toxina colérica indica que la médula ósea se mantiene como el órgano con el mayor número total de CSA. Grupos de cuatro ratas cada uno fueron primados con 3 dosis de toxina colérica y desafiados 10 meses después con el antígeno por la misma vía. A los 0, 2, 3 y 5 días post-desafío se determinó la cantidad total de CSA antitoxina de isotipo IgG (A) e IgA (B) en el ganglio mesentérico, bazo y médula ósea. A los 0 y 2 días post-desafío sólo la médula ósea mostró valores superiores al límite de detección. Medias \pm ES.

La médula ósea se convirtió en el principal órgano que posee CSA antitoxina capaces de secretar anticuerpos que van a circulación durante la respuesta de memoria para un desafío intragástrico.

E.5.3. Los títulos de anticuerpos antitoxina de la respuesta de memoria están en línea con la aparición de las CSA

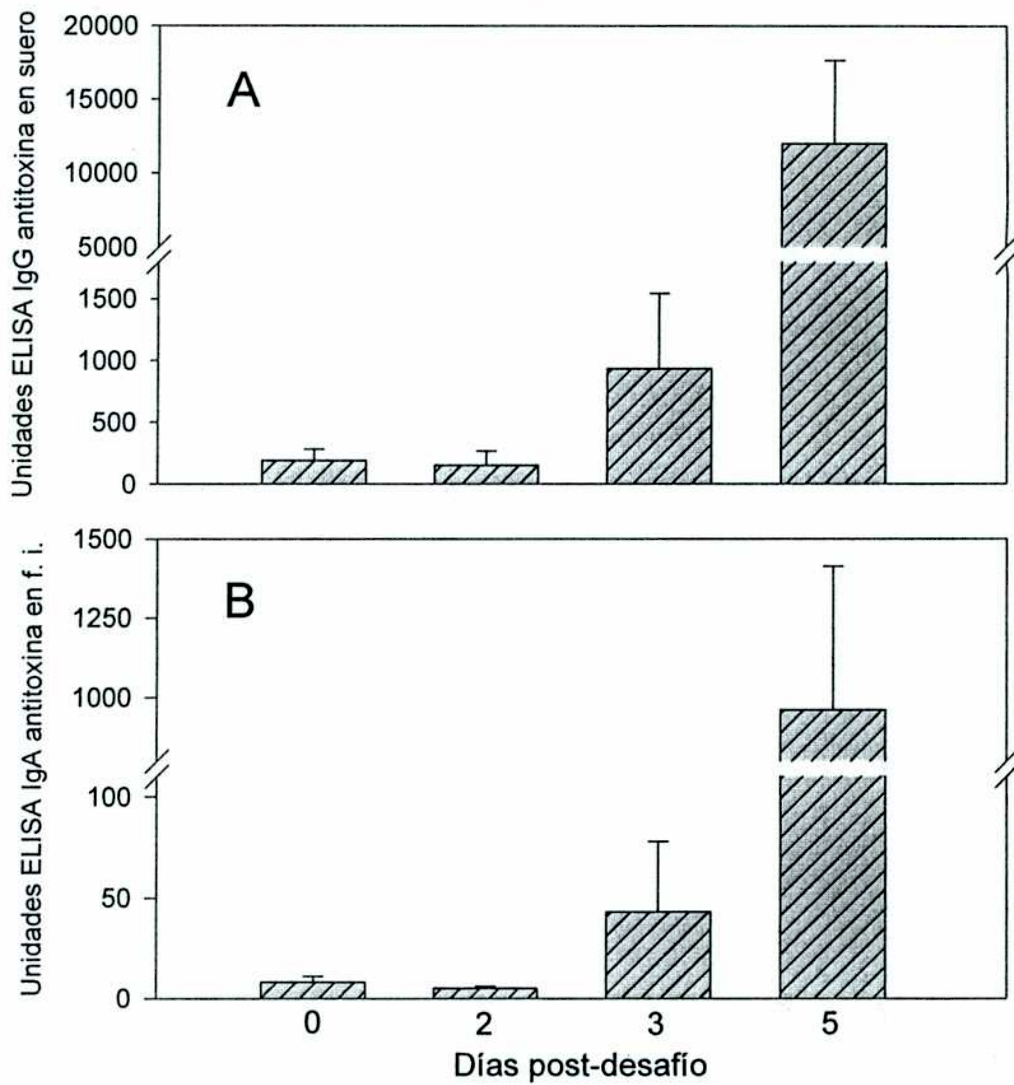
Para evaluar el aumento de anticuerpos antitoxina en los primeros días de la respuesta de memoria, a los animales primados con 3 dosis de toxina y desafiados 10 meses después con una nueva dosis ig de toxina colérica se les extrajeron muestras de suero y fluido intestinal.

En suero, a los dos dpd no se encontraron niveles de anticuerpos de clase IgG antitoxina superiores a los detectados en muestras previas al desafío (día 0; Figura 24A). Pero a los tres dpd se observó un importante aumento de las cantidades de anticuerpos específicos, este incremento continuó avanzando y al quinto dpd los valores de anticuerpos de clase IgG específicos en suero fueron notablemente superiores.

En los lavados intestinales la cinética de aparición de anticuerpos antitoxina es similar a la del suero, a los dos días siguientes al desafío aún no se detectó incremento de los anticuerpos de clase IgA específicos y a partir del tercer dpd comenzó el rápido aumento en los títulos de IgA antitoxina (Figura 24B).

Estos resultados están en armonía con la cinética de aparición de las CSA antitoxina del mismo experimento de respuesta anamnésica y siguen un comportamiento similar al de respuesta de anticuerpos de memoria cuando las ratas fueron primadas con una única dosis de toxina colérica por vía ig (Figura 15).

Figura 24.



Análisis cinético de los anticuerpos antitoxina de isotipos IgG en el suero (A) e IgA en el f. i. (B) después de un desafío oral. Las ratas (en lotes de 4 animales) fueron primadas con 3 dosis ig de toxina colérica y desafiadas con el antígeno 10 meses después por la misma vía. A los 0, 2, 3 y 5 días luego del desafío se midieron los niveles de anticuerpos por ELISA. Medias \pm ES.

E.5.4. Ensayos de transferencia adoptiva: ganglio mesentérico y bazo poseen los mayores números de células de memoria

Habiéndose encontrado que cuando se inmuniza por la ruta de las mucosas, la médula ósea es el sitio que conserva por más tiempo a las CSA en actividad y que después de un desafío antigénico también juega el rol más importante en la síntesis de anticuerpos circulantes, se buscó averiguar si la médula ósea posee un papel destacado en albergar células de memoria con nuestro modelo de inmunización.

Para ello ratas Wistar endocriadas fueron primadas con tres dosis de toxina colérica por inoculación ig para ser empleadas como donantes en experimentos de transferencia adoptiva de células. Luego de diez meses, cuando la presencia de CSA antitoxina ha decaído considerablemente, se prepararon suspensiones celulares de bazo, ganglio mesentérico y médula ósea que fueron transferidas por separado a animales receptores singeneicos mediante inyección intravenosa. Las ratas receptoras fueron desafiadas con dos dosis de toxina colérica por intubación ig al segundo y cuarto días luego de la transferencia. En el décimo día posterior a la transferencia los receptores fueron sacrificados, se obtuvieron muestras de suero y lavado intestinal y suspensiones celulares de bazo, ganglio mesentérico y médula ósea.

La mayor respuesta anamnésica se encontró en los animales que recibieron transferencia de células de bazo y ganglio mesentérico. Los niveles más elevados de IgG antitoxina en suero e IgA antitoxina en lavado intestinal fueron detectados en las ratas que recibieron 20×10^7 células de bazo de dador inmune (Tabla IV), cuando la cantidad de células transferidas fue de sólo 5×10^7 los títulos de los anticuerpos específicos en suero y fluido intestinal decrecieron considerablemente indicando que el fenómeno de transferencia de memoria fue dosis-dependiente. Por otro lado al transferir 5×10^7 células de ganglio mesentérico el incremento de los niveles de antitoxina fue (en promedio) 20 veces mayor para la IgG de suero y 10 veces para la IgA intestinal respecto de los controles sin transferir. Estos resultados fueron superiores a los detectados en las ratas que fueron transferidas con igual cantidad de células de bazo que tuvieron aumentos medios de 4,2 veces para la IgG antitoxina sérica y de 3,4 veces para la IgA específica intestinal sobre los controles que no recibieron transferencia.

Tabla IV. Transferencia adoptiva de la memoria antitoxina luego de una inmunización oral. Influencia del órgano y del número de células en la activación de la respuesta de anticuerpos.^a

Órgano de origen de las células	Número de células transferidas	Títulos de IgG antitoxina en suero ^b	Incremento de antitoxina en suero	Títulos de IgA antitoxina en fluido intestinal	Incremento de antitoxina en fluido intestinal
Ganglio mesentérico	5.10 ⁷	4500 ± 2526	20	65 ± 64	9,5
Bazo	5.10 ⁷	933 ± 611	4,2	23 ± 15	3,4
	20.10 ⁷	19200 ± 9050	87	320 ± 80	47
Médula ósea	10.10 ⁷	400 ± 120	1,8	5 ± 2	0,73
	20.10 ⁷	2400 ± 1131	11	25 ± 21	3,7
Controles	-	220 ± 109	1	6,8 ± 4,4	1

^aDiferentes cantidades de células de ganglio mesentérico, bazo o médula ósea, provenientes de animales primados con toxina colérica por la vía oral con 10 meses de anterioridad, fueron transferidas a ratas singeneicas. Como controles se emplearon animales que no recibieron transferencia de células. Las ratas receptoras y controles fueron desafiadas con toxina colérica en los días 2 y 3 posteriores a la transferencia y se valoraron los niveles de anticuerpos antitoxina de isotipo IgG en suero e IgA en fluido intestinal al día 10.

^bMedia ± DS de la media.

Los animales que recibieron transferencia de células de médula ósea expresaron una respuesta humoral de mucho menor tamaño hacia los desafíos antigénicos que los transferidos con cantidades comparables de células de bazo y ganglio mesentérico. Para emular a los títulos de los anticuerpos obtenidos en animales que recibieron 5x10⁷ células de bazo fue necesario transferir casi cuatro veces más células de médula ósea (Tabla IV). Analizando los títulos de anticuerpos de clase IgG en suero e IgA en lavado intestinal de ratas receptoras de células de médula ósea, se observó que aquí también la transferencia de memoria fue dosis-dependiente aunque nuevamente la relación no fue lineal.

Para estudiar donde se localizan las CSA antitoxina de la respuesta de memoria posterior a la transferencia de células de órganos linfoides, las CSA específicas provenientes del ganglio mesentérico, el bazo y la médula ósea del receptor fueron cuantificadas por ELISPOT.

En concordancia con lo observado al analizar los niveles de anticuerpos, las mayores cantidades de CSA antitoxina fueron observadas en los animales que recibieron transferencias de células de ganglio mesentérico o bazo. En estos dos casos se produjo una

tendencia a una mayor acumulación de CSA antitoxina en el ganglio mesentérico y la médula ósea que en el bazo (Tabla V). Cuando se transfirieron 20×10^7 células de médula ósea se encontró que las CSA antitoxina provocadas por el desafío antigénico tendieron a aparecer en mayor medida en el ganglio mesentérico que en la médula ósea o el bazo.

Estos resultados indican que aunque la médula ósea permanece como único órgano sistémico que mantiene CSA varios meses después de una inmunización oral y es el que más CSA contiene luego de un desafío antigénico, no es el que posee mayor cantidad de células de memoria por millón de células. El ganglio mesentérico y el bazo son los órganos donde se encuentran los mayores números de células de memoria antitoxina (sin tener en cuenta las mucosas) luego de la inmunización ig. Esto está de acuerdo con los experimentos en los cuales, luego del desafío oral, es en el ganglio mesentérico donde la respuesta de memoria se despierta más rápidamente (Figura 22).

Tabla V. Transferencia adoptiva de la memoria antitoxina luego de una inmunización oral. Influencia del órgano y del número de células transferidas en la activación de la respuesta de células secretoras de antitoxina.^a

Órgano de origen de las células	Número de células transferidas	CSA antitoxina / 10^7 células en ^b					
		Ganglio mesentérico		Bazo		Médula ósea	
		IgG	IgA	IgG	IgA	IgG	IgA
Ganglio mesentérico	$5 \cdot 10^7$	142 ± 74	87 ± 26	98 ± 17	58 ± 11	315 ± 11	267 ± 28
Bazo	$5 \cdot 10^7$	181 ± 73	112 ± 35	96 ± 14	67 ± 10	147 ± 35	102 ± 25
	$20 \cdot 10^7$	845 ± 576	565 ± 372	310 ± 160	188 ± 77	786 ± 136	778 ± 341
Médula ósea	$10 \cdot 10^7$	36 ± 23	24 ± 13	33 ± 21	28 ± 22	34 ± 20	24 ± 15
	$20 \cdot 10^7$	75 ± 19	108 ± 39	46 ± 12	28 ± 6	48 ± 20	42 ± 4
Controles	-	12 ± 15	11 ± 8	5 ± 4	10 ± 8	9 ± 5	9 ± 7

^aDiferentes cantidades de células de ganglio mesentérico, bazo o médula ósea, provenientes de animales primados con toxina colérica por la vía oral con 10 meses de anterioridad, fueron transferidas a ratas singeneicas. Como controles se emplearon ratas que no recibieron transferencia de células. Las ratas receptoras fueron desafiadas con toxina colérica en los días 2 y 3 posteriores a la transferencia y se determinaron los números de CSA antitoxina de isotipo IgG e IgA en ganglio mesentérico, bazo y médula ósea al día 10.

^bMedias \pm DS de la media.

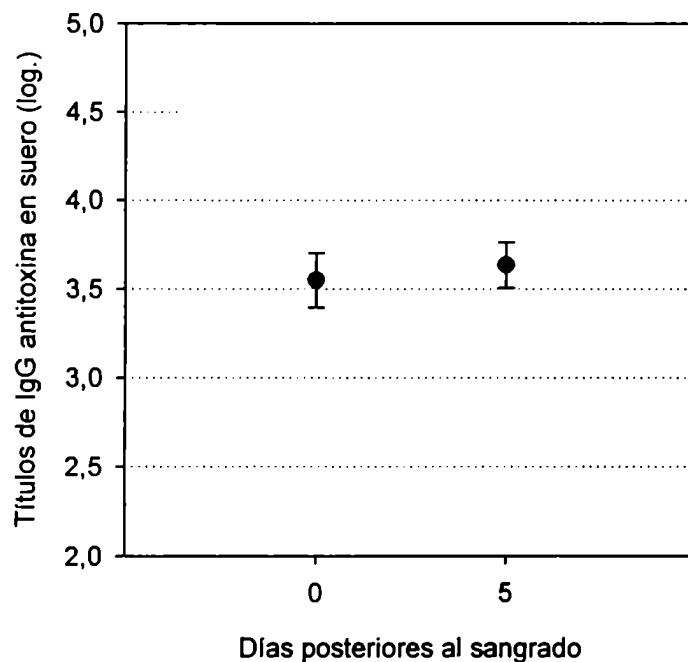
Habiendo conseguido estas evidencias buscamos determinar si las células de memoria del bazo y del ganglio mesentérico coexisten con la permanencia de antígeno. Otros autores observaron que cuando a unos animales inmunizados se les extrajo un gran volumen de sangre, luego de unos días la cantidad de anticuerpos en sangre creció por encima de los valores que el individuo tenía antes de ser sangrado y esto se explica porque al disminuir los anticuerpos circulantes queda disponible antígeno (que se conservaba en los complejos antígeno-anticuerpo en los ganglios) para reactivar células de memoria que proliferan y se transforman en células plasmáticas (270). Nosotros intentamos reproducir esos experimentos de sangrados severos en nuestro modelo de inmunización oral con toxina colérica en ratas. Los animales sufrieron la sangría masiva 12 meses luego de la inmunización y 5 días después se determinó la cantidad de anticuerpos en suero, no se encontró aumento respecto a los títulos de anticuerpos que las ratas tenían el día de la sangría masiva. En otras palabras no detectamos indicios de la presencia de toxina colérica en los individuos (Figura 25).

E.5.5. El conjunto de células de memoria contiene células B y T

El siguiente paso buscó determinar si las células de memoria generadas luego de la inmunización oral con toxina colérica y que fueron localizadas en la médula ósea son linfocitos B y/o linfocitos T. Con tal objetivo se repitieron los experimentos de transferencia adoptiva con células de bazo y médula ósea pero ahora, en el momento previo a la inoculación al receptor, fueron eliminadas las células B o las células T de las suspensiones celulares a transferir por medio de la técnica de inmunocitoadherencia (*panning*) negativa. Como antes, los animales receptores fueron desafiados con dos dosis orales de toxina colérica y sacrificados a los diez días de haber recibido la transferencia para estudiar la respuesta anamnésica.

El análisis de las cantidades de CSA antitoxina de isotipo IgG indicó que no aparecieron diferencias sustanciales cuando se transfirieron células B o T de bazo en el ganglio mesentérico ni en el bazo ni en la médula ósea de los receptores (Tabla VI). El mismo resultado se notó al analizar las cantidades de CSA antitoxina del isotipo IgA. Entre las ratas que recibieron una inoculación de células de médula ósea carentes de células B o T

Figura 25.



Títulos de los anticuerpos IgG antitoxina séricos antes y después de un sangrado severo en ratas inmunizadas por vía Ig. Siete ratas fueron inmunizadas con toxina colérica y luego de 12 meses (cuando los niveles de anticuerpos habían decrecido en forma marcada), se les aplicó un sangrado de entre el 35 y 45 % de su volemia. Se determinaron los títulos de anticuerpos en alícuotas de suero obtenidas al momento de efectuar el sangrado severo (día 0) y 5 días después. Se aplicó transformación logarítmica a los valores de los títulos, la comparación de las 2 muestras por la prueba de Wilcoxon no arrojó diferencias significativas ($P > 0,1$). Medias \pm ES.

tampoco se presentaron diferencias importantes en ninguno de los órganos estudiados en la cantidad de las CSA antitoxina del isotipo IgG generadas luego del desafío. La misma observación se efectuó para las CSA antitoxina del isotipo IgA. De nuevo el tamaño de la respuesta fue más pequeño cuando se transfirieron cantidades proporcionales de células de médula ósea que de bazo.

Por otro lado los niveles de anticuerpos antitoxina encontrados en suero y fluido intestinal de estos experimentos son consistentes con los números de CSA específicas hallados (Tabla VII). En efecto, las ratas receptoras de células B o T de bazo no tuvieron diferencias destacables entre sí en los títulos de anticuerpos específicos de IgG sérica ni de IgA intestinal. Cuando se estudiaron los valores de anticuerpos antitoxina en las ratas que recibieron una inoculación de células de médula ósea libre de células T o B no surgieron diferencias en los títulos de IgG antitoxina en suero, aunque en el caso de la IgA de fluido intestinal, los niveles detectados en los receptores de células de médula ósea sin células B no superaron los de los controles sin transferir. Nuevamente el tamaño de la respuesta anamnésica de transferencia (medida ahora por niveles de anticuerpos específicos en suero y fluido intestinal) fue más pequeño en los animales transferidos con células de médula ósea que de bazo, es decir que se necesitarían transferir muchas más células de médula ósea para desarrollar una respuesta idéntica a la del bazo.

Estos resultados indican que la población de células de memoria que se encontró en la médula ósea (y también la observada en el bazo) es fenotípicamente heterogénea y consiste de células B y células T. La ausencia de uno de estos tipos de células no anuló la expresión funcional del fenómeno de la memoria inmunológica, aunque como era de esperar varios de los parámetros estudiados disminuyeron.

Tabla VI. Transferencia adoptiva por células T o B de la memoria antitoxina luego de una inmunización oral.^a

Origen y tipo de células	Número de células transferidas	CSA antitoxina / 10 ⁷ células en ^c					
		Ganglio mesentérico		Bazo		Médula ósea	
		IgG	IgA	IgG	IgA	IgG	IgA
Bazo, células B	4.10 ⁷	119 ± 42	28 ± 8	42 ± 4	48 ± 26	27 ± 2	30 ± 6
Bazo, células T	4.10 ⁷	164 ± 50	34 ± 7	39 ± 16	23 ± 17	69 ± 51	57 ± 51
MO sin células T ^b	15.10 ⁷	58 ± 36	16 ± 16	36 ± 18	52 ± 4	29 ± 3	34 ± 7
MO sin células B ^b	15.10 ⁷	44 ± 40	18 ± 12	20 ± 8	24 ± 22	38 ± 11	26 ± 9
Controles	-	16 ± 15	9 ± 8	10 ± 4	17 ± 8	9 ± 5	8,6 ± 7

^aRatas primadas con toxina colérica por la vía oral 10 meses antes del experimento, fueron usadas como donantes de células de bazo y médula ósea (MO). Se separaron las células B o T por inmunoadherencia negativa y se las transfirió a receptores singeneicos, los que fueron desafiados con toxina colérica en los días 2 y 3 posteriores a la transferencia. Como controles se emplearon ratas que no recibieron transferencia de células.

^bDebido a que la fracción de linfocitos pequeños en la médula es menor al 20% del total de células, nos referimos a la fracción resultante de eliminar las células B o T como "MO sin células T" o "MO sin células B".

^cEl número de CSA antitoxina en el ganglio mesentérico, bazo y médula ósea fue determinado al décimo día de la transferencia. Resultados expresados como la media ± DS de la media.

Tabla VII. Transferencia adoptiva por células T o B de la memoria antitoxina luego de una inmunización oral. Activación de la producción de anticuerpos antitoxina de isotipo IgG en suero e IgA en fluido intestinal durante una respuesta de memoria adoptiva.^a

Origen y tipo de células	Número de células transferidas	Títulos de IgG antitoxina en suero ^c	Incremento de antitoxinas en suero	Títulos de IgA antitoxina en fluido intestinal ^c	Incremento de antitoxinas en fluido intestinal
Bazo, células B	4.10 ⁷	1000 ± 600	3,6	40 ± 15	5,9
Bazo, células T	4.10 ⁷	1200 ± 400	4,3	60 ± 20	8,8
MO sin células T ^b	15.10 ⁷	600 ± 200	2,1	22 ± 17	3,2
MO sin células B ^b	15.10 ⁷	600 ± 200	2,1	7,5 ± 2,5	1,1
Controles	–	280 ± 77	1	6,8 ± 4,4	1

^aRatas primadas con toxina colérica por la vía oral 10 meses antes del experimento, fueron usadas como donantes de células de bazo y médula ósea (MO). Se separaron las células B o T por inmunoadherencia negativa y se las transfirió a receptores singeneicos, los que fueron desafiados con toxina colérica en los días 2 y 3 posteriores a la transferencia. Como controles se emplearon ratas que no recibieron transferencia de células.

^bDebido a que la fracción de linfocitos pequeños en la médula es menor al 20% del total de células, nos referimos a la fracción resultante de eliminar las células B o T como "MO sin células T" o "MO sin células B".

^cEl título de anticuerpos en suero y fluido intestinal fue determinado a partir de muestras tomadas al décimo día de la transferencia. Resultados expresados como la media ± DS de la media.

DISCUSIÓN

F. LA MÉDULA ÓSEA Y LA RESPUESTA INMUNE DE MUCOSAS

Desde su descripción el MALT fue concebido como un sistema inmune bastante cerrado y con poca interacción con el resto del sistema inmune. Este concepto tomaba cuerpo al encontrarse que (1) una inmunización sistémica no induce una respuesta inmune en las mucosas y, a la inversa, una mucosa puede tener resistencia a una infección local en ausencia de reacción inmune sistémica, (2) la prominencia de la IgA en las mucosas, cuando esta inmunoglobulina es pobre en otros tejidos linfoides, (3) el ciclo de la ruta de migración celular que cumplen los linfoblastos que recibieron la inducción antigénica en una mucosa y llevan inmunidad a muchas mucosas distantes (271).

Sin embargo esta visión no es correcta desde que son conocidos también desde hace tiempo otros fenómenos que relacionan a las mucosas con otros órganos de la inmunidad. Uno de los más conocidos es la rápida translocación de IgA polimérica del suero hacia la bilis para luego ser vertida al duodeno que es un mecanismo mediado por el componente secretorio y que realizan los hepatocitos. Este proceso es muy eficiente en rata y algo menos en ratón aunque en humanos el camino de transporte hepatobiliar es un fenómeno de poca importancia ya que sus hepatocitos no expresan componente secretorio y este receptor sólo es detectado en el epitelio del conducto biliar (272).

Otro nexo es el de la tolerancia oral, que consiste en el estado de ausencia de respuesta inmune sistémica hacia un antígeno específico que fue primero administrado por el tubo digestivo. Es un fenómeno en el cual, para cualquiera de los mecanismos que lo causan, puede haber una comunicación entre las mucosas y el resto del organismo (273).

En este trabajo nosotros encontramos otras conexiones entre el GALT y el resto del sistema inmune durante una inmunización oral.

1. La médula ósea como órgano de producción de anticuerpos durante la etapa tardía de la respuesta.
2. Al menos en el caso de la toxina colérica, la inmunización por vía oral provoca una presentación de antígeno en el bazo.
3. Hay generación de células de memoria que pueden ser detectadas en órganos sistémicos.

4. Se puede provocar una respuesta de memoria a nivel sistémico.

De la producción de anticuerpos en la médula ósea (el 1º de los puntos recién señalados) ya dijimos que es una clásica función de este órgano para inmunizaciones sistémicas sin embargo no ha sido bien descripta cuando los antígenos son administrados por vía de las mucosas. En este caso sólo hay pocos trabajos que encaran el problema. Pese a esto, en una primera aproximación, dos hechos permitían suponer que la médula ósea es importante en la respuesta inmune inducida desde las mucosas: (1) cultivos de médula ósea producen gran cantidad de IgA, cuando la IgA es una inmunoglobulina minoritaria en suero y órganos linfáticos no relacionados a mucosas pero principal en las mucosas y (2) en la médula ósea de ratones libres de gérmenes estas células están en déficit, lo que sugiere que muchas de ellas están dirigidas hacia antígenos del ambiente que penetran principalmente a través de las mucosas (225, 227 y 253).

F.1. La médula ósea, principal productor parenteral de anticuerpos por inmunización en el intestino

En nuestro trabajo, utilizando toxina colérica fueron encontradas CSA antitoxina en la médula ósea con sólo 1 dosis por intubación intragástrica, aunque una 2ª y 3ª dosis oral mejoró la detección (Figura 1). La más directa inyección intra-placas de Peyer provocó una actividad similar a la que surgió con 2 dosis intragástricas, tanto en ratas jóvenes como en adultos de mayor edad (Figuras 4 y 5). Hasta estos experimentos no había precedentes de la aparición de CSA en la médula ósea con esquemas de inmunización oral tan cortos y solamente una publicación daba cuenta de la presencia de células plasmáticas en la médula ósea luego de una inmunización intragástrica. En el único artículo que, con anterioridad a nuestros experimentos, se logró demostrar la actividad de CSA de isotipo IgA en la médula ósea contra un antígeno oral, se emplearon glóbulos rojos de oveja y fueron necesarias 20 dosis orales durante 10 semanas. Alternativamente los mismos autores consiguieron un resultado similar con 14 o 28 dosis orales en días consecutivos por la ruta oral seguidas de un desafío sistémico (250). Ese informe coincide con nuestros datos en que ambos indican que en el GALT se indujeron inmunoblastos que expresan IgA y fueron responsables iniciales de la producción de IgA específica en la médula ósea.

Pero el esquema de muchas dosis en pocos días por la vía intestinal de Alley y col. provocó carencia de respuesta sistémica en una cepa de ratón expresada por muy pequeños números de CSA en el bazo. Al emplear toxina colérica, además de lograr una respuesta inmune en la médula ósea con pocas dosis orales, evitamos activar los mecanismos de tolerancia oral, por la propia naturaleza del antígeno y porque no debemos recurrir a esquemas prolongados o crónicos de administración oral.

En el caso de 3 dosis orales observamos que, aunque luego de 2 o 3 meses los niveles de anticuerpos antitoxina colérica en suero descendieron significativamente, se logró una detección positiva al menos a los 10 meses lo que indica que es posible conseguir una respuesta a largo plazo (Figura 21). Cuando se buscó cuales eran los órganos responsables de mantener estos anticuerpos en suero durante tanto tiempo se vio que únicamente la médula ósea conservaba CSA específicos (de clase IgA o IgG) luego de los 90 dpi (Figuras 16 y 17).

En cuanto a las primeras semanas de inmunización, si medimos la concentración de CSA como el número encontrado por cada 10^7 células nucleadas se observa que el ganglio mesentérico es el que más posee, y el bazo tiene niveles comparables a los de la médula ósea (Figuras 1). De todos modos cabe plantear que en el bazo el 90 % de las células nucleadas son linfocitos maduros en cambio en la médula ósea, por su carácter de órgano hematopoyético, sólo alrededor del 8 % de las células nucleadas son linfocitos maduros capaces de ser efectores de la respuesta inmune y no más del 1 % de las células son células plasmáticas (274). Con esto en cuenta nuestros resultados señalan que una parte muy importante de los linfocitos medulares en capacidad de secretar anticuerpos está dedicada a la respuesta antitoxina.

La conexión de la mucosa intestinal con la médula ósea parece estar en la migración de células activadas desde los órganos linfoides secundarios locales, comenzando en placas de Peyer y atravesando el ganglio mesentérico con notable producción de CSA. Este proceso es similar al que sucede durante una inmunización en un tejido que no es mucosa cuando la producción de anticuerpos en la médula ósea se alcanza luego de producida la captura y presentación de antígeno con proliferación de linfocitos B específicos en el ganglio linfático correspondiente (221, 222, 229 y 242).

Según nuestros datos, la médula ósea es por mucha diferencia el principal órgano que contiene la mayor cantidad de CSA antitoxina al calcular por órgano entero luego de 3 dosis orales. Para evaluar la contribución real de anticuerpos que un órgano hace al organismo debemos tomarlo como un todo. En el caso de la médula ósea roja de una rata adulta, este es un tejido que está presente en la mayoría de los huesos así que para efectuar el cálculo por órgano entero empleamos la corrección mencionada en Materiales y Métodos. Únicamente a los tempranos 7 y 15 dpi, y para células que expresan el isotipo IgG, pudieron detectarse en el bazo o el ganglio mesentérico números comparables a los de la médula (Figuras 3 y 19). Esto es válido para los órganos que pueden secretar anticuerpos a la circulación ya que no tomamos en consideración la lámina propia de las mucosas que, por su extensión, podrían poseer grandes cantidades de CSA específicas aunque el destino de estos anticuerpos es la secreción.

F.2. La médula ósea como órgano del sistema inmune asociado a mucosas

Se sabe que a medida que envejecen, los ratones sufren una pérdida de células B con inmunoglobulina en citoplasma en las placas de Peyer, mientras que la médula ósea aumenta su importancia como productor de anticuerpos (especialmente del isotipo IgA; Refs. 223 y 227). En línea con aquellos reportes, nosotros encontramos que el tamaño de la respuesta en la médula ósea de ratas de 35 semanas fue mayor que en las de 8 semanas (Figuras 5A vs 4A y Figuras 5B vs 4B). Esta respuesta más elevada en los animales de mayor edad también apareció en el bazo y el ganglio mesentérico. Pero para las placas de Peyer no hubo tal aumento y en cambio la respuesta aquí fue breve y ya no se detectó a los 21 dpi. Estos resultados son compatibles con la hipótesis de que en edades avanzadas la médula ósea puede ser reservorio de células B productoras de IgA e IgG específicas para antígenos que se introducen por las mucosas. Como en la médula ósea la población de CSA se mantiene por largos períodos, los anticuerpos producidos podrían dar protección contra reinfecciones intestinales aunque la respuesta inmune local sea ya ineficiente en reaccionar activamente contra nuevos antígenos.

En ratas, un mecanismo fisiológicamente relevante para descargar IgA en el lumen intestinal es el camino hepatobiliar, ya que los hepatocitos expresan altos niveles de receptor de inmunoglobulina polimérica, captan la IgA polimérica (IgAp) circulante y

la transfieren como IgA secretoria (275-277) y también se ha informado que IgA originada en hígado puede seguir esta ruta (278).

Si bien en humanos el camino hepatobiliar no está bien desarrollado (279 y 280), varios tejidos linfoides sintetizan IgA monomérica (IgAm) e IgAp (281). En particular, la médula ósea humana es la principal fuente de IgA en suero (251, 282 y 283) y casi el 30 % de las células plasmáticas IgA⁺ expresan IgAp (entre un 50-70 % de las células IgA2⁺ y un 20-24 % de las IgA1⁺). Además la producción de IgAp aumenta mucho en cultivos estimulados con mitógeno de *Phytolacca* (Pokeweed, PWM) y aparentemente una única CSA IgA⁺ puede producir tanto IgAp como IgAm (281).

Extrapolando estos datos, nosotros postulamos que la médula ósea de rata sintetiza IgA, y esta puede hacer una importante contribución directa al tubo intestinal (mediante la transferencia hepática) para mantener la protección contra antígenos durante un desafío o una reinfección local.

Ha sido sugerido que una acumulación de CSA como la que nosotros encontramos en la médula ósea podría servir como reservorio de células B que mantengan la memoria de anticuerpos IgA en las mucosas al, eventualmente, reentrar en circulación y repoblar el MALT (250). El hecho que la mayoría de los anticuerpos IgG e IgA sintetizados en la médula ósea están dirigidos a antígenos ambientales (217 y 225) junto a la pérdida de células B en las placas de Peyer con el avance de la edad (284) y el incremento de estas células en la médula ósea (223 y 227) han servido para sugerir esta hipótesis. Sin embargo no hay evidencia directa de tal migración y la opinión general es que una vez que las CSA han llegado al punto final de maduración ya no migran. Además nuestros datos no sostienen esto, ya que no vemos que la médula ósea sea un lugar preferencial para alojar células de memoria.

F.3. Migración de células B a médula ósea

Nuestros experimentos muestran que además del arribo de CSA a la médula ósea existe allí un tráfico preferencial de células que expresan la clase IgA, ya que la

proporción CSA IgA/CSA IgG es marcadamente mayor en la médula ósea con respecto al bazo (Figuras 6 y 20). Este hecho refuerza la hipótesis de que la médula ósea contribuye a mantener la inmunidad en las mucosas. Además entre la 1ª y 2ª dosis oral hay un incremento de 5 veces en los números de CSA de clase IgG e IgA en la médula ósea (Figura 1), mientras que en los otros órganos el aumento es de 3 veces. Lo que sugiere que (al igual que en la inmunización sistémica) la producción de anticuerpos en la médula se demora al principio pero luego queda bien establecida (Figura 3).

Las moléculas de adhesión responsables del *homing* de inmunoblastos provenientes de mucosas hacia la médula ósea no han sido claramente identificadas. En el caso de los blastos B que se originan en los ganglios linfáticos periféricos y luego se establecen en la médula ósea, ya se mencionó que una forma particularmente glicosilada de CD44 presente en los linfocitos sea la que dirige la migración a la médula (245 y 246) pero no hay datos de si este marcador se expresa en el caso de los linfocitos activados en las mucosas.

El *homing* de una célula a un órgano es un proceso complejo e involucra varios pasos que se desencadenan en secuencia, así que cuando se dice que una molécula (y su ligando) es la responsable de este fenómeno más correcto es considerarla parte de la serie de eventos.

En el caso de la mucosa intestinal se ha propuesto que los linfocitos que expresan en membrana la molécula $\alpha 4\beta 1$ sean los que se dirigen a la médula ósea y a tejidos no intestinales (247, 285 y 286).

Pero otras líneas de investigación apuntan al marcador $\alpha 4\beta 7$ como responsable del tráfico a la médula ósea, en particular para las células que producen IgA (285 y 287). También CD22 puede estar involucrado en la acumulación de células plasmáticas en la médula ósea (248).

En el proceso de tráfico se ha observado que la médula ósea produce la quimiocina CXCL12 (SDF-1) capaz de atraer a los linfoblastos B (249).

G. PRESENTACIÓN DIRECTA DE LA TOXINA COLÉRICA EN BAZO POR ADMINISTRACIÓN ORAL

Nuestros experimentos de inmunización intestinal mostraron que el primer órgano donde aparecen CSA anti-toxina colérica en la respuesta primaria fue el bazo, con resultado positivo a los 2 dpi (Figura 8). Este es el primer trabajo que describió una aparición tan temprana de células plasmáticas en el bazo con una inoculación oral. Como además a ese corto tiempo en el bazo hay una alta proporción de CSA que expresan clase IgM, pensamos que células B *naive* recibieron una estimulación antigénica directamente en este órgano.

Luego de una administración intestinal de toxina colérica se origina una respuesta inmune en la mucosa intestinal con producción de IgG antitoxina en el bazo por un mecanismo dependiente de IL-4 (288). La explicación comúnmente aceptada es que tanto la respuesta en el GALT como la del bazo provienen de una estimulación en las placas de Peyer. Idea apoyada en que cultivos de células de placas de Peyer con toxina colérica sintetizan antitoxina de isotipo IgA e IgG en cantidades similares (13) y en que precursores de células B específicas aparecen en las placas de Peyer luego de la ingestión de toxina colérica (289). Aunque recientemente ha sido publicado que la mayoría de las células IgA⁺ de lámina propia intestinal sufren conmutación de isotipo en ese mismo tejido y a partir de precursores IgM⁺ que cambian con mayor preferencia por el isotipo IgA del que lo hacen los precursores de placas de Peyer (109).

Por esto resultó inesperado que se encuentren primero CSA antitoxina en el bazo en nuestros experimentos. Sin embargo se ha observado en ratas que luego de una dosis de refuerzo de toxoide colérico intra-duodeno o intra-yeyuno, todavía a los 2 dpi no hubo incremento de células específicas de antígeno en los linfocitos circulantes del conducto torácico (153 y 290). Estos reportes no son compatibles con la explicación de que las células B específicas más tempranas que a nosotros nos aparecen en el bazo provengan de una activación en las placas de Peyer.

Nuestros resultados de cultivos celulares a 1 o 2 días luego del primado refuerzan la hipótesis de estimulación directa en el bazo. IgM fue el isotipo más expresado por las CSA provenientes de cultivos de bazo, aunque detectamos cantidades muy similares de

CSA de isotipo IgA (Figura 10). Un patrón similar se produjo en cultivos de células de placas de Peyer, pero no en el ganglio mesentérico.

Cuando realizamos los cultivos (1) habiendo eliminado previamente las células adherentes o (2) en presencia de anticuerpos monoclonales anti-Ia, para impedir la presentación *in vitro*, las cantidades de CSA generadas a partir de células del bazo se redujeron significativamente (Figuras 10 y 11). Esto confirma que hay una presentación de antígeno en el bazo. La caída más marcada se produjo en las células plasmáticas que sintetizan IgM, lo que indica que la presentación *in situ* también la observamos en las placas de Peyer como era de esperar mientras que no parece ocurrir en el ganglio mesentérico (Figuras 10 y 11).

Debemos considerar de qué forma llega el antígeno al bazo. Nosotros determinamos que hay presentación antigénica en el bazo al impedir la presentación de péptidos de la toxina en el MHC de Clase II hacia células T específicas, sin embargo la primera señal de activación de los linfocitos B específicos, que hace posible su diferenciación a CSA, es la unión del antígeno soluble (sin digestión previa) a la inmunoglobulina de superficie. Por esto sostenemos que la aparición tan temprana de CSA en el bazo se debe a la llegada de toxina colérica soluble a este órgano. Además la toxina colérica sobrante puede formar complejos inmunes con los primeros anticuerpos disponibles y depositarse sobre las células dendríticas foliculares (FDC) del bazo.

El bazo capta antígenos en sangre, así que la toxina debe alcanzar la circulación para llegar a este órgano, otros autores que observaron activación temprana de células T específicas en bazo al administrar otra proteína (citocromo c) también postularon una entrada del antígeno a la corriente sanguínea (119). En el caso particular de la toxina colérica se sabe que tiene la capacidad de incrementar la permeabilidad del intestino al menos para macromoléculas (188), facilitándose el ingreso en la corriente sanguínea desde el intestino. De modo complementario parte de la toxina colérica inoculada puede ser endocitada en la lámina propia del intestino (107) y/o en las placas de Peyer por células dendríticas que migran a órganos linfoides y presentan antígeno (51 y 291). La presentación de antígeno por células dendríticas en bazo es clave para la colaboración de las células T a la respuesta de anticuerpos y explica que en los cultivos de células de bazo con anti-Ia MHC Clase II, la disminución de CSA sea más profunda que la que

observamos en los cultivos sin células adherentes (Figura 10 vs 11). En nuestro modelo experimental las células dendríticas podrían llegar al bazo por pasaje directo del intestino a la circulación sanguínea, apoya esta posibilidad que en sangre se han hallado células dendríticas maduras y se ha propuesto que son células en camino al bazo o nódulos linfáticos (292 y 293).

A diferencia de lo que ocurre en las placas de Peyer y el bazo, en nuestros cultivos de 1 y 2 dpi no observamos presentación del antígeno en el ganglio mesentérico. Sin embargo esto no quita que la haya pocos días después; se sabe que el ganglio mesentérico recibe células dendríticas con antígeno luego de algunos días de la inmunización oral (66, 294 y 295) y que por ser el colector natural de la linfa en el intestino también debe recibir antígeno libre. Además por interacción con los primeros anticuerpos que se encuentran, se depositan complejos antígeno-anticuerpo en las FDC del ganglio mesentérico lo que permite ciclos de presentación y activación de las células B.

G.1. Poblamiento del ganglio mesentérico pero no de la médula ósea por las CSA originadas en el bazo

Nuestros trabajos de inmunización oral en ratas a las que se les había extirpado el bazo mostraron que la aparición de CSA en la médula ósea no depende de la generación de células plasmáticas en el bazo. Incluso el bazo se comporta como un competidor de la médula en captar CSA provenientes del GALT ya que en su ausencia la cantidad de CSA en la médula ósea aumenta (Tabla III). Veamos que no todas las CSA que detectamos en el bazo pueden justificarse por la presentación antigénica local a células *naive* y, en coincidencia a nuestra observación, células de placas de Peyer transferidas por inyección endovenosa a otros ratones desarrollaron altas cantidades de células IgG⁺ en el bazo (109).

Esto confirma que las células plasmáticas establecidas en la médula ósea provienen de una migración directa del GALT.

De modo interesante vemos que los linfoblastos que son inducidos en el bazo sí pueden poblar el ganglio mesentérico, es decir que el bazo colabora con el intestino al aumentar la producción de anticuerpos en el ganglio que recibe el drenaje linfático intestinal durante los primeros días de la respuesta inmune. Es posible que esta migración de células productoras de anticuerpos de bazo también ocurra hacia otros ganglios linfáticos.

H. IgA ANTITOXINA EN LA MUCOSA INTESTINAL

En los casos de los antígenos que resulten inmunogénicos por la vía oral, está postulado que ésta es la más efectiva ruta para provocar la inmunidad en el intestino y tal vez en otras superficies mucosas (10 y 11). Basándose en que pacientes que se recuperaron de infecciones intestinales como las causadas por *V. cholerae* y *E. coli* enterotoxigénica mantuvieron protección contra una reinfección con el mismo organismo por años (296 y 297), múltiples esfuerzos se han realizado para desarrollar vacunas orales que reproduzcan estos niveles de protección (189-191).

Nuestros experimentos con una dosis intragástrica indicaron que CSA específicas de clase IgA se establecieron en la lámina propia intestinal al 7º dpi en coincidencia con la detección de IgA antitoxina en los lavados intestinales (Figuras 8D y 9B). Este tiempo para la aparición de la respuesta local con una dosis de primado es coherente con la más rápida respuesta secundaria a toxina colérica por vía intestinal que fue detectada desde los 2 dpd en nuestros experimentos (Figura 12) y a tiempos más cortos aún según otros autores (164) y queda bien establecida a los 5-10 dpd (Figura 13; Refs. 153, 298 y 299).

La cinética de primado en la lámina propia que nosotros observamos, es acorde con el clásico camino de migración de linfocitos a partir de la inducción en las placas de Peyer (15, 300 y 301) para finalmente depositarse en la mucosa intestinal como células efectoras (302 y 303). Sin embargo un estudio reciente indica que el *switch* al isotipo IgA y la diferenciación a células plasmáticas se producen directamente en la lámina propia del intestino (109), esta maduración en áreas del intestino sin tejido linfoide organizado,

en donde probablemente no ocurre una eficiente maduración de afinidad de los anticuerpos, tal vez corresponda a un mecanismo más primitivo de inmunidad.

I. LA CUESTIÓN DE LAS CÉLULAS PLASMÁTICAS DETECTADAS A LARGO PLAZO

En nuestros experimentos encontramos que un antígeno no replicante administrado en forma intragástrica es capaz de provocar una respuesta de anticuerpos sistémica de larga duración que está asociada con una sostenida presencia de células plasmáticas específicas en la médula ósea (Figuras 16, 17 y 21). La correlación entre la presencia de anticuerpos y de las células plasmáticas que los originan, varios meses después de la inmunización era esperada, ya que es sabido que la vida media de las inmunoglobulinas libres es corta y (aunque variable entre las distintas subclases) no mayor a tres semanas (304-306).

Además, la cinética de aparición de las CSA específicas en nuestro modelo de mucosas resultó similar a la de las inmunizaciones sistémicas.

La “memoria de anticuerpos”, es decir la persistencia de anticuerpos secretados en mucosas o circulantes son parte de la primera línea de defensa que la respuesta adaptativa prepara para una reinfección de microorganismos patógenos. Muchas infecciones virales y vacunas, basadas en virus atenuados o en toxoides, que confieren inmunidad protectora por tiempos prolongados, causan anticuerpos circulantes que pueden ser detectados por muchos años según ha sido revisado (307).

Es pertinente hacernos algunas preguntas cruciales acerca de cómo se mantiene la permanente síntesis de anticuerpos que observamos en nuestros estudios:

¿Las células plasmáticas que secretan los anticuerpos son de corta o de larga vida?

Si son de corta vida, ¿cómo se generan las nuevas a lo largo del tiempo?

¿Es necesario que el antígeno persista a largo plazo para formar nuevas células plasmáticas?

¿Qué presiones evolutivas han enfrentado las especies durante la evolución del sistema inmune?

A continuación mencionamos las hipótesis propuestas para contestar estas preguntas y discutimos cuales son los mecanismos que estarían causando los resultados que nosotros observamos.

Hace pocos años y en forma simultanea a nuestros experimentos han aparecido trabajos de otros autores que han abierto una polémica en torno de a qué se debe la prolongada producción de anticuerpos. Especialmente los artículos que sostienen la supervivencia de las CSA por largos períodos de tiempo no habían aparecido cuando nosotros iniciamos los experimentos y nuestro modelo puede encajar en esta hipótesis.

I.1. "Memoria de anticuerpos" dependiente de antígeno

Pese a su importancia los mecanismos que mantienen la continua formación de anticuerpos no están completamente entendidos y son motivo de discusión. Hasta hace unos años la amplia mayoría de los modelos aceptados postulaba que la larga duración de anticuerpos en suero requería continua proliferación y diferenciación de las células B de memoria hacia células plasmáticas secretoras de anticuerpos (45, 308-311).

Estos modelos se basan en los datos existentes acerca de la vida media de las células plasmáticas que indicaban que esta era de unos pocos días o a lo sumo unas pocas semanas, tiempo en el que las células plasmáticas marcadas con H^3 desaparecen de los nódulos linfáticos drenantes luego de una inmunización (312-317). Un rápido empobrecimiento cuantitativo de estas células requiere un repoblamiento a partir de las células B de memoria con el fin de sustentar la respuesta humoral en marcha. Un factor clave de estas teorías es la necesidad de que el antígeno esté presente con capacidad inmunogénica para la repetida estimulación de las células B de memoria. La gran mayoría de los trabajos que las sostienen consisten en estudios de la respuesta inmune a infecciones o a antígenos que fueron inoculados con adyuvantes que causan efecto depósito, es decir modelos donde la replicación nunca puede descartarse del todo o al menos que tienden a la conservación del antígeno.

En cambio nuestro modelo experimental es un antígeno no replicante, introducido al organismo por la mucosa intestinal (un ambiente hostil a la permanencia inalterada de las proteínas) y sin adyuvante que provoque efecto depósito. En estas condiciones es aplicable solamente uno de los mecanismos dependientes de antígeno para explicar la producción de anticuerpos a largo plazo: **la retención de complejos antígeno-anticuerpo en la superficie de las FDC.**

Esta teoría ha sido bien caracterizada y es ampliamente aceptada. Los complejos inmunes conservados sobre las FDC actúan en la respuesta secundaria como reservorios del antígeno y se postula que a medida que los niveles de anticuerpos específicos circulantes declinan, las FDC pueden liberar o exponer más antígeno (de los complejos antígeno-anticuerpo en los que se iría reduciendo la proporción de anticuerpos) que ahora pueden estimular a las células B de memoria para que repueblen a la declinante población de células plasmáticas (45, 318-321).

Evidencias que sostienen la importancia del antígeno retenido en las FDC y su rol en el mantenimiento de los anticuerpos circulantes son:

1. La mayor concentración de las células formadoras de anticuerpos ocurre por una elevada proliferación en los ganglios linfáticos que poseen centros germinales (322) con gran cantidad de células dendríticas foliculares asociadas a antígeno. Estos ganglios son los que drenan el sitio donde fue inoculado el antígeno (270).
2. Ratones inyectados en la pata trasera a los que se les extirpó el ganglio linfático popliteo sufrieron un marcado descenso de los anticuerpos específicos en suero (323)
3. Una cinética de eliminación de antígeno durante una inmunización muestra que la gran mayoría del antígeno inoculado es eliminado en los primeros 3 días, pero luego la degradación de la fracción remanente en los ganglios linfáticos es mucho más lenta con una vida media promedio de 8 semanas (324)
4. En animales inmunizados a los que luego de unos meses se les practicó un severo sangrado para disminuir bruscamente la cantidad de anticuerpos circulantes se observó que luego de unos días los niveles de anticuerpos en sangre superaban a los que había en el momento del sangrado (270).

Para intentar verificar este fenómeno en nuestro modelo experimental, ratas inmunizadas por la vía oral un año antes fueron sometidas a un sangrado muy importante pero (excepto por un animal) los resultados no mostraron un aumento de los niveles de anticuerpos antitoxina en suero (Figura 25). Este resultado está en contra de la idea que la producción de anticuerpos permanece por reestímulo de antígeno conservado en las FDC. Es posible que hayamos dejado pasar demasiado tiempo y bajar mucho los niveles de anticuerpos en sangre para hacer el experimento.

No podemos dejar de mencionar otros mecanismos descriptos que explican la producción de anticuerpos a largo plazo de un modo dependiente de antígeno:

- a) Repetida exposición por contacto con fuentes externas del antígeno
- b) Infección crónica ligera de microorganismos que sobreviven en el huésped en forma asintomática.
- c) Reacción cruzada con antígenos propios del huésped o del medio ambiente.
- d) Redes idiotípicas.

El primero (a) es muy común en la naturaleza pero no se aplica a las controladas condiciones de nuestros experimentos. El segundo (b) también es muy frecuente en la naturaleza y en estudios en los que se produjo una infección aguda con virus replicante (325 y 326), pero tampoco sirve para nuestro modelo de inmunización con toxina colérica por la vía intragástrica.

Por otro lado, las hipótesis (c) y (d) plantean mecanismos potencialmente capaces de evocar una prolongada producción de anticuerpos (327 y 328). Sólo en algunos casos concretos ha sido posible justificar la continua producción de anticuerpos por reacción cruzada de antígenos que (al ser similares) imitan al antígeno usado en el primado (321). Recientemente se ha señalado que subsiguientes inducciones de antígenos no relacionados pueden estar involucradas. Nuevas respuestas inmunes provocan (a modo de colaboración por proximidad) la activación policlonal de células B de memoria y su maduración a células plasmáticas (329). En cuanto a la hipótesis que propone la intervención de redes idiotípicas, está apoyada en pocas evidencias que permitan admitir que es un mecanismo relevante en el estado fisiológico normal (321).

I.2. Crítica a la hipótesis de la persistencia del antígeno

La idea de la persistencia del antígeno como complejo en las FDC es un concepto muy difundido, sin embargo presenta algunos puntos sin resolver. Como se postula que el antígeno es retenido sobre las FDC por gran espacio de tiempo, el tiempo de vida de estas células pasa a ser otro factor a considerar, es decir que supone que las FDC que retienen el antígeno también se conservan por largo plazo, sin embargo no hay una medición de los tiempos de vida de estas células más allá de los estudios de Tew y Mandel (324) de microscopía electrónica. También hay un cálculo que estima que, al menos en humanos, las moléculas de antígeno que permanecen retenidas sobre las FDC no son suficientes para durar varios años (307).

Otro asunto poco claro es el del antígeno consumido en cada ciclo de proliferación y diferenciación de las células B, ya que se requiere el auxilio de células T y para estimular a estas se necesita la presentación de péptidos (producto de la incorporación y procesamiento del antígeno) en el CMH Clase II. Si los ciclos de pérdida y renovación de la población de las células plasmáticas son breves, el consumo de antígeno (aparte de la tasa de decaimiento del antígeno nativo mismo) sería un factor limitante de la permanencia de anticuerpos por mucho tiempo.

También se ha observado que luego de unas semanas la maduración de la afinidad de los anticuerpos (consecuencia de la mutación somática) se detiene, esto es difícil de explicar cuando se postula que hay presencia de antígeno en los folículos que provocan la estimulación intermitente de las células B (321).

Como ya se dijo, hasta hace poco la evidencia experimental señalaba que las células plasmáticas vivían pocos días y esto marcó el rumbo a las hipótesis dependientes del antígeno para explicar la continuidad temporal en la síntesis de anticuerpos. Pero aquellos trabajos fueron realizados durante los primeros días de la respuesta inmune y ahora se sabe que en ese período hay una rápida división celular seguida de gran muerte por apoptosis de las células que por hipermutación clonal forman anticuerpos que no reconocen al antígeno (330 y 331). Luego no se pueden trasladar directamente los tiempos de vida de las CSA así medidos a las células que se pueden observar mucho más tarde, ya que luego de ese período inicial la población remanente será más longeva.

Además los mencionados estudios midieron la duración de las células plasmáticas solamente en el bazo y los ganglios linfáticos y no examinaron la médula ósea, que (repetimos) es donde se encuentra la gran mayoría de las células plasmáticas meses después de la inmunización. Sólo en uno de esos trabajos se observó la tasa de renovación de las células plasmáticas en la médula ósea al medir cómo incorporan una administración continua de timidina- H^3 durante 10 días y concluyeron que el promedio de vida de las células plasmáticas en la médula ósea es aproximadamente diez veces mayor que en el bazo (317). Además se sabe que la médula ósea no retiene antígeno (332), así que si hay una continua renovación de CSA esta no se origina en la médula ósea.

I.3. "Memoria de anticuerpos" independiente de antígeno

Por nuestros resultados y los de otros autores pensamos que la duradera producción de anticuerpos que detectamos en la médula ósea en nuestro trabajo no se explica solamente por la conservación de antígeno en las FDC. Recientemente creciente evidencia, fundamentalmente originada en 2 líneas de trabajo que surgieron en paralelo con nuestras investigaciones, sostiene la teoría de que las células plasmáticas pueden tener una larga vida sin participación del antígeno. En coincidencia con nuestro trabajo estas se encuentran en la médula ósea. La ventaja de nuestro modelo es que no usamos virus replicante ni administramos el antígeno de manera que se formen depósitos artificiales de antígeno como ocurre en los trabajos de otros autores

Manz y col (333) investigaron la sobrevivencia de las células plasmáticas en la médula ósea en una respuesta secundaria hacia ovoalbúmina (OVA). Por estudios de incorporación de BrdU en las células plasmáticas que secretan anticuerpos anti-OVA encontraron que las CSA se forman en los primeros 2 meses y luego permanecen casi inalteradas por más de 90 días y sin incorporación de nuevas células plasmáticas. Además determinaron que las células plasmáticas rápidamente adquieren un fenotipo con baja expresión de MHC Clase II y de inmunoglobulina en superficie, tornándolas no reactivas al antígeno (334).

En paralelo otro grupo independiente empleó un modelo de infección aguda con el virus de la coriomeningitis linfocitaria (LCMV) que en ratones provoca una vigorosa respuesta inmune que elimina al virus del organismo en 2 semanas (231, 235 y 335). Concluyeron que algunas células plasmáticas sobreviven más de 240 días luego de su formación (336 y 337).

Tomando todo junto esto demuestra que las CSA que permanecen luego de las primeras semanas, se alojan principalmente en la médula ósea donde pueden mantenerse funcionales por largos períodos de tiempo sin intervención del antígeno. Como nosotros pensamos que ocurre cuando inmunizamos por la mucosa intestinal con toxina colérica.

Un estudio estadístico en humanos demostró que no hay correlación entre títulos de anticuerpos en suero y las correspondientes células de memoria en la circulación sanguínea (338), lo que está de acuerdo con la hipótesis de que la persistencia a largo plazo de anticuerpos circulantes se debe a células plasmáticas de larga vida y no a continua diferenciación de células B de memoria.

I.4. Críticas a la hipótesis de la independencia del antígeno

A los estudios que midieron largos tiempos de vida para las CSA contra LCMV se les ha cuestionado que miden anticuerpos anti-nucleoproteína que unen una variedad de sitios antigénicos (dan reacción cruzada con otras cepas) con afinidades variables (339). Mejor hubiera sido medir anticuerpos neutralizantes que son los que protegen en infecciones virales, no dan reacción cruzada pero decaen rápidamente (340).

Experimentos de transferencia adoptiva de linfocitos de ratones inoculados con el virus de la estomatitis vesicular (VSV) hacia ratones *naive* mostraron que las células plasmáticas que forman anticuerpos neutralizantes no se mantienen por muchos días a menos que se inocule antígeno (341). Es decir que el antígeno fue necesario para sostener la respuesta neutralizante.

Como en los trabajos que usaron el modelo de LCMV para probar que las células plasmáticas tienen un período de vida largo (337) los animales fueron irradiados para

eliminar células de memoria, también se ha objetado que este tratamiento provoca una estimulación no fisiológica y que en combinación con una posible supervivencia del virus replicante al momento de la irradiación (342) pudo haber reestimulado la formación de nuevas CSA (341).

Por nuestra parte tenemos una objeción a los trabajos que contra-argumentan con experimentos de transferencia de células plasmáticas de ratones inoculados con VSV a ratones *naive* para asignar corta vida a estas células (341). Las células plasmáticas son células especializadas en un único objetivo, fabricar anticuerpos. Se alojan en los tejidos y recién allí adquieren su morfología final, son sésiles, no circulantes. Son también células lábiles, cuando en nuestro laboratorio hacemos el ensayo de ELISPOT se debe tener gran cuidado de no destruirlas, hacer la suspensión celular con delicadeza y no resuspender bruscamente si se quieren obtener resultados. Consideramos que obtener células plasmáticas en suspensión, inyectarlas por vía intravenosa y esperar que circulen hasta trasvasar y volver a establecerse en un tejido es un proceso poco fisiológico en el que pueden perderse la mayor parte de ellas. No es frecuente encontrarse en la bibliografía con experimentos de transferencia de células plasmáticas ya maduras.

I.5. Las células plasmáticas de larga vida

Como se ve, hoy día no hay consenso definitivo por la longevidad de las células plasmáticas. Muchos de los argumentos que se oponen a la idea de que alguna población de CSA sea de larga vida son objeciones metodológicas, algunas más potentes que otras en particular con los estudios que usan virus infectivo como antígeno. Además los mencionados trabajos de Manz y col. (333 y 334), si bien se basan en una técnica trabajosa desarrollada por ellos mismos, que no fue repetida por otros, no han sido seriamente criticados y su antígeno es simplemente OVA (aunque con adyuvante).

Nosotros también empleamos un antígeno no replicante, la toxina colérica, y nuestro trabajo es el único en donde el antígeno no recibe un trato que impida su degradación: es inoculado sin adyuvante que provoque efecto depósito y por una vía con un ambiente marcadamente desnaturalizante y proteolítico (el intestino) y aún así encontramos CSA en la médula ósea casi un año después de la inmunización. Si bien no hemos hecho un seguimiento de la duración de la toxina colérica en las ratas

inmunizadas, a nuestro criterio es improbable que la toxina administrada en estas condiciones permanezca tanto tiempo en algún órgano linfoide de los animales.

En nuestra opinión, en nuestros experimentos se manifiesta la expresión de células plasmáticas de larga vida, sobre todo cuando hay indicios de que el antígeno ya ha desaparecido. Como ya dijimos, en la inmunización intragástrica hay una rápida presentación directa en el bazo y el antígeno que no es consumido al principio forma complejos inmunes que se alojan sobre las FDC. También sabemos que, pese a que todavía no detectamos presentación antigénica en el ganglio mesentérico a los 2 dpi, por las características inmunogénicas de la toxina y la ruta de inmunización elegida debe llegar antígeno al ganglio mesentérico y depositarse como complejos inmunes sobre las FDC. Sin embargo nuestros resultados indican que el antígeno no permanece por muchos meses ya que fallamos en detectarlo cuando, por sangrados severos 1 año después de la inmunización, quisimos observar el aumento de los anticuerpos circulantes debido a la activación de nuevos ciclos de proliferación y diferenciación en CSA producida por antígeno disponible de los complejos inmunes en las FDC. Esta es nuestra interpretación a la luz de nuestras investigaciones y las de otros autores que prueban razonablemente la existencia de las células plasmáticas longevas.

Lo que sí puede ser cuestionado, con la evidencia experimental disponible es que los anticuerpos que fabrican estas CSA de larga vida podrían no ser neutralizantes y cumplirían otra función en una etapa más avanzada de la infección como ser opsonizar y acelerar la respuesta secundaria.

En el caso de la toxina colérica o de otra proteína soluble es difícil que en la médula ósea no haya formación de anticuerpos antitoxina neutralizantes aún mucho después de la inmunización, ya que los epitopes efectores de la toxicidad están expuestos durante la inmunización y como inmunógenos se comportan igual que los otros epitopes, más allá de que algunos sean más inmunodominantes que otros.

Un modelo basado en la existencia de células plasmáticas de larga vida ofrece una explicación satisfactoria para muchos casos como el nuestro en los que se ha informado permanencia de anticuerpos a largo plazo.

I.6. El sentido evolutivo de las células plasmáticas de larga vida

Si como indican nuestros resultados y los de otros autores, las células plasmáticas pueden vivir un año o más en roedores, la protección que brindan es al menos la mitad de la vida del animal. De lo que ocurre en humanos no tenemos datos pero pensamos que los anticuerpos que se encuentran décadas después de la inmunización con antígenos no replicantes se deben a CSA longevas. Eventualmente por reacción cruzada o por activación policlonal (329), las células B de memoria se pueden convertir en nuevas CSA y así la población permanece durante una porción significativa de la vida del individuo.

Con un enfoque evolutivo decimos que los mecanismos inmunes que mejoran la supervivencia del individuo durante su vida fértil y la de sus crías se imponen al ser seleccionados positivamente a través de las generaciones. Esto resalta la importancia de la persistencia de las células efectoras de la inmunidad. La misma idea puede ser aplicada a la evolución humana cuando el promedio de vida no superaba la etapa fértil de las personas y así una protección que dure aproximadamente 2 décadas podía significar cubrir todo el resto de la vida de ese individuo.

Se ha reportado que la tasa de decaimiento de las células plasmáticas no muestra variaciones esenciales entre ratones jóvenes y ratones viejos, es decir que su tiempo de vida no se afecta con el envejecimiento (337). Pero por otra parte está bien establecido que la capacidad de generar nuevas respuestas inmunes empeora mucho en edades avanzadas. La permanencia de CSA en la etapa senil, que se hayan originado años atrás cuando el individuo poseía eficientes mecanismos inductores de la respuesta inmune, podría dar protección humoral pese a que luego el individuo en la vejez perdió capacidad inductora de la inmunidad.

En la naturaleza la mayoría de los patógenos que enfrenta un individuo acceden por las mucosas, lo que provoca una importante presión selectiva en la población. Es de esperar que en la evolución hayan prosperado mecanismos que combatan esta presión.

En la vida fetal de algunas especies, la IgG materna puede atravesar placenta e inmunizar pasivamente al feto. También el calostro y la leche materna poseen IgA secretoria, IgA, IgG e IgM con especificidad a los antígenos que la madre había

encontrado en el ambiente (sobre todo por las mucosas; Refs. 343 y 344), que transfieren protección al lactante contra patógenos ambientales, impidiendo la adhesión al epitelio intestinal del huésped y formando complejos que facilitan su desalojo del intestino (345). Si el encuentro de la madre con el antígeno ocurrió muy en el pasado, resultará más importante para la protección contra una infección del neonato la persistencia de células efectoras en la madre (que transfieren los anticuerpos a modo de inmunización pasiva) que la presencia de células de memoria que no se transfieren y que requieren un tiempo de espera para que el sistema inmune de la madre detecte la reinfección y se reinicie la proliferación y diferenciación en células plasmáticas que sintetizan los anticuerpos que recién ahora podrán ir a parar a la cría. Apoya esto y tiene el mismo sentido evolutivo el hecho que en general las hembras tienen títulos de anticuerpos más elevados (lo que podría redundar en un mantenimiento a más largo plazo de los niveles de anticuerpos) y mayores incidencias de autoinmunidad que los machos.

De nuevo, un enfoque evolutivo aumenta la relevancia de las CSA de larga vida, que al brindar mejor protección y supervivencia de las crías, son un carácter que fue seleccionado positivamente en la evolución.

Por otro lado el microambiente de un tejido debe ser crítico para regular la longevidad de las CSA. Como órgano hematopoyético, el microambiente que ofrece la médula ósea es, luego de la vida fetal, distinto a cualquier órgano con una rica fuente de factores de crecimiento y citoquinas. Las CSA permanecen en un medio estable al amparo de los cambios que ocurren en los folículos linfoides periféricos con la desaparición de los viejos centros germinales y formación de nuevas reacciones de centros germinales cuando surgen otros estímulos antigénicos.

J. LA MEMORIA B EN LA INMUNIZACIÓN ORAL

La memoria es una marca distintiva de la inmunidad adaptativa por la cual tras un desafío posterior con el antígeno que originariamente había efectuado la inmunización se produce un gran incremento de los niveles de anticuerpos (comúnmente más intenso que el de la primera respuesta) causado por una cinética de producción de anticuerpos que se

activa mucho más rápido y con alta expresión del isotipo IgG y, en el caso de las mucosas, IgA (Figuras 1 y 4). Esta rápida y potente respuesta de la memoria brinda mejor protección contra una nueva invasión del antígeno.

En nuestros experimentos de primado con una dosis de toxina colérica por la vía intestinal y desafío antigénico 3 meses después por la misma ruta, observamos la rapidez de la respuesta anamnésica cuando a los dos días ya detectamos CSA específicas en ganglio mesentérico en cantidades ligeramente superiores a las del bazo (Figura 12). Además también aparecieron cantidades detectables de las CSA antitoxina en las placas de Peyer, cosa que no ocurrió durante la inmunización primaria. Como en los días siguientes el gran incremento del número de células plasmáticas es al unísono y bastante parejo en todos los órganos linfoides estudiados (Figura 13), sostenemos que nuestros resultados indican que la respuesta de memoria fue inducida principalmente en las placas de Peyer y luego migró. Apoya esta hipótesis que los niveles de CSA de clase IgA que encontramos en nuestros cultivos de células de bazo realizados en presencia de anticuerpos anti-Ia se mantienen inalterados, aunque estos mismos ensayos también muestran una presentación de antígeno en este órgano debido a que hay bajas significativas en las cantidades de CSA de los isotipos IgG e IgM que se corresponden con la estimulación directa a bazo que ya destacamos en la respuesta primaria para la toxina colérica y la confirman (Figura 14).

En estos experimentos, nosotros encontramos también que la rápida respuesta de memoria B aparece en la lamina propia intestinal, representando una activación *in situ* de células de memoria que yacen en la mucosa del intestino, lo que coincide con otros autores que encontraron respuesta de IgA antitoxina en lámina propia a las 16 horas del refuerzo, un tiempo demasiado corto para recibir células reclutadas de placas de Peyer o ganglio mesentérico (164), mecanismo que actúa tiempo después según observaciones que detectaron que el pasaje de células específicas de toxoide colérico por el conducto torácico no comienza antes de 2 días después del desafío intestinal (153 y 290).

Cuando nosotros repetimos el desafío oral de toxina colérica luego de 10 meses en ratas primadas con 3 dosis intragástricas seguimos detectando memoria B pero ahora fallamos en detectar células plasmáticas a tiempos tan cortos en placas de Peyer (Figuras 12 y 13 vs Figura 22). Una pérdida parecida (aunque no completa) en la actividad de

memoria B a muy largo plazo en placas de Peyer, pero no en otros órganos, ha sido informada por Lycke y Holmgren (299).

También detectamos una cantidad mucho más elevada de CSA antitoxina a los 5 dpi en el ganglio mesentérico en nuestros desafíos a 10 meses que en el desafío al 3^{er} mes mientras que en el bazo las diferencias no fueron tan marcadas. Esto puede estar relacionado con la ausencia de expresión de células plasmáticas en las placas de Peyer que nos aparece al estudiar la memoria a los 10 meses (Figura 22 vs Figuras 12 y 13), lo que también puede estar reflejando una pérdida en la capacidad de capturar y presentar antígeno en las placas de Peyer o a un defecto en la formación de sus centros germinales. La consecuencia es que el ganglio mesentérico pase a ser la primera estación de presentación e inducción de la respuesta inmune o al menos el primer sitio donde se completa la diferenciación a CSA (346), resultando en la mayor acumulación de CSA en el ganglio mesentérico observada en la memoria a los 10 meses en comparación a los 3 meses, cuando las placas de Peyer contienen más CSA.

Los resultados aquí presentados nos permiten ver que en los desafíos a los 10 meses la médula ósea (cuando se la considera como órgano entero) ejerce el rol principal en la secreción de anticuerpos sistémicos a los 5 días posteriores al desafío oral (Figura 23). La migración de células B estimuladas desde el GALT hacia la médula ósea ocurre sólo un poco más rápido que lo descrito por otros autores con células activadas en ganglios sistémicos (231 y 244).

La larga duración de la memoria ha sido clásicamente asignada a la generación de células B de memoria de larga vida que sobreviven como linfocitos pequeños recirculantes en un estado inactivo (347 y 348). Concepto sostenido por ensayos de administración continua de timidina-[H³] (349 y 350) y por experimentos de transferencia adoptiva de células de memoria a receptores *naive*, en donde en los animales que permanecían vírgenes la memoria perduraba algunos meses (aunque si los animales receptores recibían antígeno la memoria se mantenía por más tiempo; Refs. 351-353).

Basados en esos conocimientos y en otras investigaciones se pensó que las células de memoria de larga duración revierten a un estado de células en reposo y no se dividen.

Sin embargo en las células de memoria de ratón varios marcadores difieren del fenotipo *naive* (354).

Pero el tema de la no división celular y la reversión al fenotipo *naive* en las células B de memoria a largo plazo llevó al conflictivo problema de si estas células requieren continuo contacto con antígeno persistente en cantidades residuales (355).

Cuando se repitieron los estudios de transferencia de células de memoria a receptores *naive* en condiciones más controladas resultó que se necesitaba antígeno para que (proliferación mediante) la memoria no se pierda en pocas semanas (356), modificando el dogma original.

Sin embargo poco después (con un fenotipo más definido de las células B de memoria) se encontró que las células de memoria son de larga vida y tienen pocas divisiones celulares (348). Los mecanismos de la memoria inmunológica han sido muy estudiados y discutidos en inmunizaciones sistémicas (311).

Recientemente un estudio en el modelo de infección con VSV (341) y otro en ratones transgénicos en los que se puede inducir un *switch* genético irreversible en cadena H de inmunoglobulina para generar células B de memoria con una especificidad hacia un antígeno que nunca fue inoculado en el organismo (357) confirman que las células B de memoria persisten varios meses con independencia del reconocimiento antigénico.

Como ya discutimos, en nuestra opinión existen células plasmáticas que viven mucho tiempo, así que el antígeno no es imprescindible para una larga duración de la protección por anticuerpos. Los autores que sostienen que las células plasmáticas son de corta vida también deben proponer que hay un pasaje de memoria a CSA por sucesivas reestimulaciones del antígeno específico o uno de reactividad cruzada, piensan que las células de memoria no pueden estar eximidas de los procesos de selección que ocurren para mantener la homeostasis debido a la continua entrada de células formadas *de novo* y a las expansiones clonales durante la respuesta inmune. Nosotros pensamos que para mantener una eficiente homeostasis no es imprescindible que sólo sobrevivan las células B de memoria que reciben una señal por su BCR, estamos de acuerdo con un planteo ya

efectuado (358) que parte de considerar que en el ámbito evolutivo lo esperado es que se seleccione la estrategia de dinámica celular que ofrezca la mayor diversidad de repertorio de región V de inmunoglobulina en células B periféricas en reposo; pero también creemos que es de esperar que se hayan seleccionado maneras de contribuir a la protección bastante tiempo después que haya desaparecido el antígeno del organismo. Estos mecanismos, complementarios son:

1. La supervivencia de las CSA y
2. La sobrevivencia de las células de memoria.

Además las células *naive* recién formadas y las de memoria tardía pueden estar en compartimentos separados: recirculantes por linfa y en folículos de órganos linfoides las primeras, y en parte recirculantes y en parte en zona marginal o acumuladas en médula ósea (que no tiene drenaje linfático) las otras, de forma tal que la expansión de una de las poblaciones no afecte a la otra. También parece haber una distinta compartimentación con la edad (359). Se sabe que en humanos la médula ósea fetal es muy rica en precursores y células B inmaduras pero en la del adulto predominan las B maduras (360) y algo parecido ocurre en ratones (223).

J.1. Los órganos de la memoria B en la inmunización oral con toxina colérica

Para evaluar en cuáles órganos se encuentran las células B de memoria antitoxina, realizamos experimentos de transferencia de células de animales inmunizados a receptores *naive*. Una ventaja de nuestros experimentos es que efectuamos transferencia adoptiva sobre ratas normales no irradiadas previamente y así evitamos proliferaciones que no se darían fisiológicamente y persistencia artificial. En un organismo intacto la renovación y selección de células inmunocompetentes está bajo estricto control (361), en cambio después de reducir marcadamente la cantidad de linfocitos (por irradiación o con drogas citostáticas o tóxicas), los que persisten o son transferidos desde otro organismo muestran mayores persistencias y tasas de renovación muy aumentadas gracias a mecanismos que tienden a subsanar las pérdidas sufridas y completar los nichos vacíos (361 y 362). Por otro lado, la muerte celular causada por radiación puede liberar moléculas que causan estímulos inflamatorios inespecíficos en las células productoras de anticuerpos (341). De modo más general, los estudios de dinámica poblacional de células

B mostraron grandes diferencias en los resultados entre laboratorios que usaron distintas técnicas experimentales (361-365).

Por esto buscamos las condiciones que menos alteraciones fisiológicas provoquen, así al detectar actividad de memoria es muy probable que verdaderamente ocurra como un fenómeno normal en un individuo. En contra es posible que nuestras transferencias hayan sido poco eficientes y que hayamos subestimado el tamaño de la respuesta de las células B de memoria en estos experimentos.

Cuando por transferencia adoptiva de células de la médula ósea, el ganglio mesentérico o el bazo de animales primados a receptores no inmunizados con anterioridad, buscamos encontrar qué órganos transmiten mejor la respuesta anamnésica, encontramos que basados en los incrementos de anticuerpos antitoxina en suero y lavado intestinal del huésped (Tabla IV), el ganglio mesentérico y el bazo fueron eficientes transmisores de la memoria pero la médula ósea no lo fue. Creemos que parte de este déficit se debe al bajo porcentaje de linfocitos que hay en la médula ósea incluyendo a una pobre presencia de células T CD4⁺.

Lo mismo se detectó analizando la cantidad de CSA en los órganos del huésped luego del desafío (Tabla V). La médula ósea posibilitó sólo una baja respuesta anamnésica en órganos del receptor, aunque en el ganglio mesentérico la cantidad de CSA parece un poco mayor al resto.

Por su parte, la adopción de células del ganglio mesentérico o del bazo inmunizados tuvo como destino principal el ganglio mesentérico y la médula ósea del receptor. Parece que el bazo del animal primado contiene abundantes células de memoria pero que al ser transferidas no se dirigen de preferencia al bazo del receptor. Algunos autores han propuesto que la acumulación de células B de memoria en órganos linfoides está relacionada con la existencia de pequeñas cantidades de antígeno persistente sobre las FDC (366). Sin embargo en base a que no hubo evidencias de la permanencia de antígeno en los órganos linfoides cuando hicimos sangrados severos en animales inmunizados 1 año antes (Figura 25) y a que tenemos una marcada caída de las CSA en la médula ósea y desaparición de las CSA en el bazo y el ganglio mesentérico a partir de los 150 dpi (Figura 19), no parece que en nuestro caso la permanencia de células B de

memoria en los órganos linfoides se deba a que estos poseen antígeno. En el mejor de los casos, las células de memoria se podrían haber acumulado en los órganos cuando había antígeno y luego simplemente permanecieron allí. Los órganos de destino a los que se dirigen las células de memoria transferidas están predeterminados por el patrón de moléculas de adhesión y receptores de quimiocinas que poseen las células en el momento en que se obtienen de los órganos de los dadores.

Estas células B de memoria no son efectores directos de la inmunidad, su función es permitir la respuesta aumentada y acelerada característica de la respuesta de memoria debido a 2 propiedades: (1) exhiben receptores de mayor afinidad y umbrales de activación menores a las *naive* y (2) el pool celular específico para ese antígeno está vastamente expandido en comparación al que estaba disponible en la respuesta primaria (310 y 354).

J.2. Rol de la médula ósea en la respuesta de memoria por desafío oral

Ya vimos que la médula ósea es el principal órgano que recibe CSA antitoxina luego de una inmunización oral y el único que retiene por largos períodos de tiempo CSA que producen anticuerpos que salen a circulación. Además vemos que en la respuesta de memoria provocada por un desafío oral es el órgano sistémico que recibe la mayor cantidad de CSA antitoxina desde los 5 dpd (Figura 23), aunque no resultó ser un órgano principal para la conservación las células B de memoria, véase que tuvimos que transferir 4 veces más células de médula ósea para obtener un nivel de respuesta más o menos comparable al conseguido con transferencia de células del ganglio mesentérico o del bazo (Tablas IV y V). Es decir que el principal papel que tiene la médula ósea durante la respuesta de memoria parece ser secretar anticuerpos que al circular por todo el organismo dan protección sistémica y, de entre ellos, la IgA puede ser introducida a las mucosas para la protección local; una función similar a la que posee durante la respuesta primaria que ya se ha discutido; interesantemente encontramos que luego de la transferencia de células de memoria, ahora también la médula ósea obtuvo la mayor proporción de CSA IgA/CSA IgG antitoxina (Tabla V).

Pese a que en la médula ósea la cantidad relativa de células de memoria es modesta, si consideramos que sobre el total de células, la fracción de células linfoides maduras en la médula ósea es menor a la del bazo (aún en la rata adulta), entonces los números de células B de memoria por millón de linfocitos maduros son más comparables y podemos decir que las células B de memoria no son una parte menor o secundaria de la población de linfocitos maduros en la médula ósea.

En nuestra opinión estas células de memoria son una reserva que posee el individuo y en ocasiones pueden volver a la circulación como centinelas que eventualmente serán activados por antígeno en otros tejidos linfoides. Otros autores proponen que en la misma médula ósea puede haber estímulo antigénico sobre las células B de memoria con diferenciación a CSA por un mecanismo distinto al de la reacción de centro germinal (341), nosotros creemos que justamente por carecer la médula ósea de trama de FDC y de circulación linfática este mecanismo (de existir) es secundario.

Cuando nosotros iniciamos nuestro trabajo no había consenso general de que en médula ósea se depositan células B de memoria ya que algunos autores fallaron en detectarlas con pruebas funcionales (337 y 367). Aunque la médula ósea humana posee células B con un fenotipo que claramente corresponde a células de memoria que previamente sufrieron diferenciación somática de las inmunoglobulinas y se ha sugerido que tal vez este no sea el sitio de destino final de las células de memoria (368). Posteriormente con un modelo de infección aguda viral se determinó que en médula ósea hay células B de memoria de larga vida en ausencia de antígeno, aunque el que se diferencien a CSA es estrictamente dependiente de antígeno y de células T CD4⁺ colaboradoras (341).

J.3. Memoria de células B y T en el modelo de mucosas

En nuestros experimentos estudiamos la memoria B por su capacidad de derivar en CSA de IgG e IgA, es decir que pasaron por la conmutación de isotipo de inmunoglobulina y aumentaron su afinidad por mecanismos de hipermutación somática de las regiones V de cadenas L y H. Esta estricta delimitación en el estudio de las células B de memoria ha sido aceptada y remarcada por varios autores (40, 354, 356, 364 y 369).

Además el concepto de asociar memoria B con conmutación de isotipo se reforzó con la ausencia o baja frecuencia de mutaciones somáticas en la región V de cadena L de inmunoglobulina que aparecen en las células B IgD⁺ *naive* (370-372). Sin embargo debemos decir que al mismo tiempo en que nosotros hacíamos nuestro trabajo ha surgido literatura que informa de la existencia de células B de memoria que no han pasado por la típica conmutación de isotipo, las que cambian de isotipo recién al detectar el desafío (368, 373-375) y que aún así acumulan mutaciones somáticas en las regiones variables de los genes de inmunoglobulinas, por lo que se las ha considerado de memoria (40, 376-381).

En nuestro modelo de rata nosotros no hemos realizado experimentos que detecten directamente poblaciones de memoria por el isotipo que expresan en su BCR, pero el estudio de aparición de anticuerpos antitoxina séricos en respuesta al desafío con toxina colérica en el 3^{er} mes post-inmunización mostró que los títulos de IgM fueron pequeños comparados a los de IgG (Figura 15A) y los cultivos de bazo resultaron en poca diferenciación de CSA de isotipo IgM (Figura 14), lo que indica que si en rata hubiese una importante población de células B de memoria IgM⁺, luego de la reestimulación antigénica esta población genera CSA que sufren conmutación de isotipo antes de secretar anticuerpos.

Por otra parte, los estudios que nosotros realizamos a partir de ratas inmunizadas oralmente y con transferencia adoptiva de células de bazo y médula ósea, que fueron previamente privadas de linfocitos B o de linfocitos T, hacia receptores *naive*, demuestran que a la respuesta de memoria contribuyen tanto las células B como las células T para generar nuevas CSA al desafío con toxina colérica. Resultados que coinciden con la dependencia de células T para la producción de anticuerpos neutralizantes en la respuesta de memoria observada por otros autores (341).

Estos resultados difieren con los de un artículo de otros autores que describen que la memoria para fabricar anticuerpos contra el desafío se debe a linfocitos B, sin intervención de células T (382). Sin embargo está bien establecido que el primado en mucosas con varios antígenos T-dependientes induce una onda de T colaboradoras por conducto torácico (383), una fuerte inmunidad humoral debida a fenotipo Th2 (384) y la respuesta generada por un desafío intestinal requiere células B y T de memoria

específicas (18, 173 y 385). Así es difícil pensar por qué no se requieren células T de memoria que ayuden en la respuesta B de memoria al inmunizar con toxina colérica en aquellos experimentos y sí en los nuestros. Probablemente influyan las especies usadas, los protocolos de inmunización y los modos de eliminar las poblaciones T y B en cada caso.

J.4. El aporte fisiológico de dos mecanismos

Uno de los principales mecanismos que permiten la existencia de anticuerpos por mucho tiempo son las CSA de larga vida. Otra forma es la continua o intermitente activación de células B de memoria para que se diferencien a células plasmáticas. La contribución relativa de cada uno de estos mecanismos al mantenimiento de los niveles totales de anticuerpos circulantes es aún materia de debate (386).

Dentro de los modelos de reactivación de las células de memoria, el más aceptado en la actualidad es el debido a la presencia de antígeno en los complejos inmunes sobre las FDC. Nuevos ciclos de presentación del antígeno están bajo el control de retroalimentación por los anticuerpos circulantes. En nuestro modelo experimental, los complejos inmunes de toxina colérica se deben establecer en el bazo (Figuras 10 y 11) y en el ganglio mesentérico (por ser una inoculación ig; Ref. 387).

Nuestras observaciones muestran que las cantidades de anticuerpos antitoxina van decayendo luego de 60 dpi pero se pueden detectar al menos por 300 días. Pensamos que en los primeros meses de la inmunización, además de las células plasmáticas de larga vida, una parte no bien determinada de estos anticuerpos es mantenida por activación de células B de memoria en el bazo y el ganglio mesentérico debido a que en esta etapa hay toxina colérica retenida en los complejos antígeno-anticuerpo de sus FDC.

Como resultado de estos ciclos de proliferación y diferenciación de células B de memoria también se generan nuevas células de memoria para reponer las que se han consumido y posibilitar un nuevo ciclo de proliferación y diferenciación. Esto ocurre hasta que se haya agotado el antígeno en las FDC, luego la producción de anticuerpos depende únicamente de las células plasmáticas de larga vida en la médula ósea. En nuestros experimentos esto podría ocurrir alrededor de los 150 dpi cuando hay una

marcada caída de los títulos de anticuerpos en el suero (Figura 21), aunque después de los 90 días ya no observamos CSA en el ganglio mesentérico ni en el bazo (Figuras 16 y 17) todavía podría haber una producción residual de CSA que antes de acumularse en cantidades que puedan ser detectables con nuestra técnica, migran a la médula ósea.

No tenemos forma directa de asegurar cuanto contribuyen al total de los anticuerpos las células plasmáticas de larga vida y cuanto el mecanismo de reestimulación de las células de memoria mientras hay antígeno disponible, pero parece útil señalar que después de los 150 días las CSA en médula ósea caen a una 1/4 parte de las cantidades que había a los 90 dpi (Figura 16 y 17). Sin embargo notamos que luego de los 150 dpi, la pendiente de la caída se vuelve a hacer más lenta. Suponemos que este escalón que se observa en los gráficos de los títulos de anticuerpos y números de CSA en función del tiempo es un reflejo del momento en que desaparece el antígeno del organismo.

En un enfoque utilitario, opinamos que no es conveniente diseñar vacunas en las que no esté contemplada alguna forma de prolongada persistencia del antígeno como algunos autores han sugerido (388), debido a que la pérdida en la producción de anticuerpos parece notable cuando falta el antígeno.

Finalmente debemos señalar que pese a que la reestimulación de células B de memoria por antígeno que persiste en complejos antígeno-anticuerpo sobre las FDC es un paradigma ampliamente aceptado (309 y 310), en ratones genéticamente deficientes o con centros germinales desorganizados hay transformación a células plasmáticas en médula ósea (389 y 390), maduración de la afinidad (391-393) y conmutación de isotipo (394). También bajo ciertas condiciones es posible encontrar formación de algunas células B de memoria en ausencia de FDC y centros germinales organizados (386). No sabemos si en alguna medida estos mecanismos secundarios son funcionales en animales normales y si en nuestros experimentos son en parte responsables de la aparición de células de memoria en la médula ósea.

CONCLUSIONES

Con una o pocas dosis de toxina colérica administrada en forma oral es posible inducir una respuesta inmune humoral sistémica de larga duración.

La médula ósea es el principal productor de anticuerpos circulantes y el único órgano que contiene cantidades detectables de CSA muchos meses después de la inmunización oral.

Sostenemos que una parte mayoritaria de los anticuerpos producidos en la médula ósea son el reflejo de los antígenos que el individuo encontró a través de las mucosas en el transcurso de su vida.

En nuestro modelo de inmunización oral con toxina colérica ocurre una muy temprana presentación antigénica directa en el bazo, independiente de la que ocurre en el GALT.

Apoyamos la teoría de la existencia de células plasmáticas de larga vida. Esto explica que se observen CSA casi un año después de la inmunización, cuando no encontramos evidencias de que quede antígeno en el organismo.

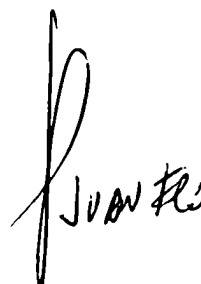
La médula ósea es el principal productor de anticuerpos circulantes durante la respuesta de memoria por inmunización oral.

Es posible transferir memoria inmunológica con células de la médula ósea, aunque el ganglio mesentérico y el bazo poseen mayor concentración de células de memoria.

En nuestro modelo, la memoria inmunológica está constituida por linfocitos B y T y ambos contribuyen a la producción de anticuerpos luego de un desafío oral.

Nuestros resultados contribuyen a sostener el concepto de que si bien el sistema inmune posee compartimentos, existe una amplia comunicación entre estos y no hay sistemas separados.


BENEDETTI, RUBÉN


JUAN PÉREZ

BIBLIOGRAFÍA

1. Harmatz PR, Bloch KJ, Brown M, Walker WA, Kleinman RE. Intestinal adaptation during lactation in the mouse. I. Enhanced intestinal uptake of dietary protein antigen. *Immunology*. 1989;67:92-5.
2. Burmeister WP, Gastinel LN, Simister NE, Blum ML, Bjorkman PJ. Crystal structure at 2.2 Å resolution of the MHC-related neonatal Fc receptor. *Nature*. 1994;372:336-43.
3. Brandtzaeg P. Molecular and cellular aspects of the secretory immunoglobulin system. *APMIS*. 1995;103:1-19.
4. Sanderson IR, Walker W. Mucosal barrier: An overview. En: Ogra P, Mestecky J, Lamm M, Strober W, Bienenstock J, McGhee J, (Eds.). *Mucosal Immunology*. 2nd ed. San Diego: Academic Press; 1999:5-17.
5. McGhee JR, Kiyono H. Mucosal immunity to vaccines: current concepts for vaccine development and immune response analysis. En: Ciardi J, et al., (Eds.). *Genetically Engineered Vaccines*. New York: Plenum Press; 1992:3-12.
6. Kraehenbuhl JP, Neutra MR. Molecular and cellular basis of immune protection of mucosal surfaces. *Physiol Rev*. 1992;72:853-79.
7. Mowat AM, Viney JL. The anatomical basis of intestinal immunity. *Immunol Rev*. 1997;156:145-66.
8. Mestecky J, Moro I, Underdown B. Mucosal immunoglobulins. En: Ogra P, Mestecky J, Lamm M, Strober W, Bienenstock J, McGhee J, (Eds.). *Mucosal Immunology*. 2nd ed. San Diego: Academic Press; 1999:133-52.
9. Tomasi TBJ, Tan EM, Solomon A, Prendergast RA. Characteristics of an immune system common to certain external secretions. *J Exp Med*. 1965;121(1):101-24.
10. Holmgren J, Czerkinsky C, Lycke N, Svennerholm AM. Mucosal immunity: implications for vaccine development. *Immunobiology*. 1992;184:157-79.
11. McGhee JR, Mestecky J, Dertzbaugh MT, Eldridge JH, Hirasawa M, Kiyono H. The mucosal immune system: from fundamental concepts to vaccine development. *Vaccine*. 1992;10:75-88.
12. Guy-Grand D, Vassalli P. Gut intraepithelial T lymphocytes. *Curr Opin Immunol*. 1993;5:247-52.
13. Elson CO, Ealding W. Generalized systemic and mucosal immunity in mice after mucosal stimulation with cholera toxin. *J Immunol*. 1984;132:2736-41.
14. O'Mahony S, Arranz E, Barton JR, Ferguson A. Dissociation between systemic and mucosal humoral immune responses in coeliac disease. *Gut*. 1991;32:29-35.
15. Cebra J, Crandall C, Gearhart P, Robertson S, Tseng J, Watson P. Cellular events concerned with the initiation, expression, and control of the mucosal immune response. En: Ogra P, Dayton D. *Immunology of Breast Milk*. New York: Paven Press; 1979:1-18.
16. Pierce NF, Koster FT. Induction and dissemination of an intestinal immune response to cholera toxin/toxoid in rats. En: Ogra P, Dayton D, (Eds.). *Immunology of Breast Milk*. New York: Raven Press; 1979:63-72.
17. Lamm M, Weisz-Carrington P, Roux M, McWilliams M, Phillips-Quagliata J. Mode of induction of an IgA response in the breast and other secretory sites by oral antigen. En: (Eds.). *Immunology of Breast Milk*. New York: Raven Press; 1979:105-14.
18. Dunkley ML, Husband AJ, Underdown BJ. Cognate T-cell help in the induction of IgA responses in vivo. *Immunology*. 1990;71:16-9.

19. Brandtzaeg P, Farstad IN. The human mucosal B-cell system. En: Ogra P, Mestecky J, Lamm M, Strober W, Bienenstock J, McGhee J, (Eds.). *Mucosal Immunology*. 2nd ed. San Diego: Academic Press; 1999:439-68.
20. Bienenstock J, McDermott M, Befus D. A common mucosal immune system. En: Ogra P, Dayton D, (Eds.). *Immunology of Breast Milk*. New York: Raven Press; 1979:91-104.
21. McDermott MR, Bienenstock J. Evidence for a common mucosal immunologic system. I. Migration of B immunoblasts into intestinal, respiratory, and genital tissues. *J Immunol*. 1979;122:1892-8.
22. Jarry A, Cerf-Bensussan N, Brousse N, Selz F, Guy-Grand D. Subsets of CD3+ (T cell receptor alpha/beta or gamma/delta) and CD3- lymphocytes isolated from normal human gut epithelium display phenotypical features different from their counterparts in peripheral blood. *Eur J Immunol*. 1990;20:1097-103.
23. Pappo J, Ermak TH. Uptake and translocation of fluorescent latex particles by rabbit Peyer's patch follicle epithelium: a quantitative model for M cell uptake. *Clin Exp Immunol*. 1989;76:144-8.
24. Owen RL, Pierce NF, Apple RT, Cray WC Jr. M cell transport of *Vibrio cholerae* from the intestinal lumen into Peyer's patches: a mechanism for antigen sampling and for microbial transepithelial migration. *J Infect Dis*. 1986;153:1108-18.
25. Farstad IN, Halstensen TS, Fausa O, Brandtzaeg P. Heterogeneity of M-cell-associated B and T cells in human Peyer's patches. *Immunology*. 1994;83:457-64.
26. Neutra MR, Frey A, Kraehenbuhl JP. Epithelial M cells: gateways for mucosal infection and immunization. *Cell*. 1996;86:345-8.
27. Neutra MR, Pringault E, Kraehenbuhl JP. Antigen sampling across epithelial barriers and induction of mucosal immune responses. *Annu Rev Immunol*. 1996;14:275-300.
28. Allan CH, Mendrick DL, Trier JS. Rat intestinal M cells contain acidic endosomal-lysosomal compartments and express class II major histocompatibility complex determinants. *Gastroenterology*. 1993;104:698-708.
29. Pappo J, Mahlman RT. Follicle epithelial M cells are a source of interleukin-1 in Peyer's patches. *Immunology*. 1993;78:505-7.
30. Bjerke K, Brandtzaeg P. Lack of relation between expression of HLA-DR and secretory component (SC) in follicle-associated epithelium of human Peyer's patches. *Clin Exp Immunol*. 1988;71:502-7.
31. Ermak TH, Bhagat HR, Pappo J. Lymphocyte compartments in antigen-sampling regions of rabbit mucosal lymphoid organs. *Am J Trop Med Hyg*. 1994;50:14-28.
32. Kelsall BL, Strober W. Distinct populations of dendritic cells are present in the subepithelial dome and T cell regions of the murine Peyer's patch. *J Exp Med*. 1996;183:237-47.
33. Pavli P, Woodhams CE, Doe WF, Hume DA. Isolation and characterization of antigen-presenting dendritic cells from the mouse intestinal lamina propria. *Immunology*. 1990;70:40-7.
34. Holt PG, Oliver J, Bilyk N, et al. Downregulation of the antigen presenting cell function(s) of pulmonary dendritic cells in vivo by resident alveolar macrophages. *J Exp Med*. 1993;177:397-407.
35. Brandtzaeg P, Baekkevold ES, Farstad IN, et al. Regional specialization in the mucosal immune system: what happens in the microcompartments? *Immunol Today*. 1999;20:141-51.
36. Chen Y, Inobe J, Marks R, Gonnella P, Kuchroo VK, Weiner HL. Peripheral deletion of antigen-reactive T cells in oral tolerance. *Nature*. 1995;376:177-80.

37. Liu LM, MacPherson GG. Antigen acquisition by dendritic cells: intestinal dendritic cells acquire antigen administered orally and can prime naive T cells in vivo. *J Exp Med.* 1993;177:1299-307.
38. Ruedl C, Hubele S. Maturation of Peyer's patch dendritic cells in vitro upon stimulation via cytokines or CD40 triggering. *Eur J Immunol.* 1997;27:1325-30.
39. Lindhout E, Koopman G, Pals ST, de Groot C. Triple check for antigen specificity of B cells during germinal centre reactions. *Immunol Today.* 1997;18:573-7.
40. McHeyzer-Williams MG, Ahmed R. B cell memory and the long-lived plasma cell. *Curr Opin Immunol.* 1999;11:172-9.
41. Lebecque S, de Bouteiller O, Arpin C, Banchereau J, Liu YJ. Germinal center founder cells display propensity for apoptosis before onset of somatic mutation. *J Exp Med.* 1997;185:563-71.
42. Liu YJ, Zhang J, Lane PJ, Chan EY, MacLennan IC. Sites of specific B cell activation in primary and secondary responses to T cell-dependent and T cell-independent antigens. *Eur J Immunol.* 1991;21:2951-62.
43. Gunn MD, Ngo VN, Ansel KM, Ekland EH, Cyster JG, Williams LT. A B-cell-homing chemokine made in lymphoid follicles activates Burkitt's lymphoma receptor-1. *Nature.* 1998;391:799-803.
44. Kim CH, Rott LS, Clark-Lewis I, Campbell DJ, Wu L, Butcher EC. Subspecialization of CXCR5+ T cells: B helper activity is focused in a germinal center-localized subset of CXCR5+ T cells. *J Exp Med.* 2001;193:1373-81.
45. Szakal AK, Kosco MH, Tew JG. Microanatomy of lymphoid tissue during humoral immune responses: structure function relationships. *Annu Rev Immunol.* 1989;7:91-109.
46. Liu YJ, Johnson GD, Gordon J, MacLennan IC. Germinal centres in T-cell-dependent antibody responses. *Immunol Today.* 1992;13:17-21.
47. Han S, Dillon SR, Zheng B, Shimoda M, Schlissel MS, Kelsoe G. V(D)J recombinase activity in a subset of germinal center B lymphocytes. *Science.* 1997;278:301-5.
48. Papavasiliou F, Casellas R, Suh H, et al. V(D)J recombination in mature B cells: a mechanism for altering antibody responses. *Science.* 1997;278:298-301.
49. van Eijk M, Defrance T, Hennino A, de Groot C. Death-receptor contribution to the germinal-center reaction. *Trends Immunol.* 2001;22:677-82.
50. Phillips NE, Parker DC. Fc-dependent inhibition of mouse B cell activation by whole anti-mu antibodies. *J Immunol.* 1983;130:602-6.
51. Tew JG, Wu J, Qin D, Helm S, Burton GF, Szakal AK. Follicular dendritic cells and presentation of antigen and costimulatory signals to B cells. *Immunol Rev.* 1997;156:39-52.
52. Taguchi T, McGhee JR, Coffman RL, et al. Analysis of Th1 and Th2 cells in murine gut-associated tissues. Frequencies of CD4+ and CD8+ T cells that secrete IFN-gamma and IL-5. *J Immunol.* 1990;145:68-77.
53. Macatonia SE, Hosken NA, Litton M, et al. Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naive CD4+ T cells. *J Immunol.* 1995;154:5071-9.
54. Cella M, Scheidegger D, Palmer-Lehmann K, Lane P, Lanzavecchia A, Alber G. Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation. *J Exp Med.* 1996;184:747-52.
55. Karem KL, Kanangat S, Rouse BT. Cytokine expression in the gut associated lymphoid tissue after oral administration of attenuated Salmonella vaccine strains. *Vaccine.* 1996;14:1495-502.

56. Powrie F, Leach MW, Mauze S, Menon S, Caddle LB, Coffman RL. Inhibition of Th1 responses prevents inflammatory bowel disease in scid mice reconstituted with CD45RBhi CD4+ T cells. *Immunity*. 1994;1:553-62.
57. Bregenholt S, Claesson MH. Increased intracellular Th1 cytokines in scid mice with inflammatory bowel disease. *Eur J Immunol*. 1998;28:379-89.
58. Groux H, Powrie F. Regulatory T cells and inflammatory bowel disease. *Immunol Today*. 1999;20:442-5.
59. Bhan AK, Mizoguchi E, Smith RN, Mizoguchi A. Colitis in transgenic and knockout animals as models of human inflammatory bowel disease. *Immunol Rev*. 1999;169:195-207.
60. Amati L, Caradonna L, Jirillo E, Caccavo D. Immunological disorders in inflammatory bowel disease and immunotherapeutic implications. *Ital J Gastroenterol Hepatol*. 1999;31:313-25.
61. Monteleone G, MacDonald TT. Manipulation of cytokines in the management of patients with inflammatory bowel disease. *Ann Med*. 2000;32:552-60.
62. Iwasaki A, Kelsall BL. Freshly isolated Peyer's patch, but not spleen, dendritic cells produce interleukin 10 and induce the differentiation of T helper type 2 cells. *J Exp Med*. 1999;190:229-39.
63. Rincon M, Anguita J, Nakamura T, Fikrig E, Flavell RA. Interleukin (IL)-6 directs the differentiation of IL-4-producing CD4+ T cells. *J Exp Med*. 1997;185:461-9.
64. Margenthaler JA, Landeros K, Kataoka M, Flye MW. CD1-dependent natural killer (NK1.1(+)) T cells are required for oral and portal venous tolerance induction. *J Surg Res*. 2002;104:29-35.
65. Frey A, Giannasca KT, Weltzin R, et al. Role of the glycocalyx in regulating access of microparticles to apical plasma membranes of intestinal epithelial cells: implications for microbial attachment and oral vaccine targeting. *J Exp Med*. 1996;184:1045-59.
66. Liu LM, MacPherson GG. Rat intestinal dendritic cells: immunostimulatory potency and phenotypic characterization. *Immunology*. 1995;85:88-93.
67. James SP, Graeff AS, Zeitz M, Kappus E, Quinn TC. Cytotoxic and immunoregulatory function of intestinal lymphocytes in *Chlamydia trachomatis* proctitis of nonhuman primates. *Infect Immun*. 1987;55:1137-43.
68. Targan SR, Deem RL, Liu M, Wang S, Nel A. Definition of a lamina propria T cell responsive state. Enhanced cytokine responsiveness of T cells stimulated through the CD2 pathway. *J Immunol*. 1995;154:664-75.
69. Offit PA, Cunningham SL, Dudzik KI. Memory and distribution of virus-specific cytotoxic T lymphocytes (CTLs) and CTL precursors after rotavirus infection. *J Virol*. 1991;65:1318-24.
70. Porcelli S, Morita CT, Brenner MB. CD1b restricts the response of human CD4-8- T lymphocytes to a microbial antigen. *Nature*. 1992;360:593-7.
71. Maric I, Holt PG, Perdue MH, Bienenstock J. Class II MHC antigen (Ia)-bearing dendritic cells in the epithelium of the rat intestine. *J Immunol*. 1996;156:1408-14.
72. Yang SK, Eckmann L, Panja A, Kagnoff MF. Differential and regulated expression of C-X-C, C-C, and C-chemokines by human colon epithelial cells. *Gastroenterology*. 1997;113:1214-23.
73. Rasmussen SJ, Eckmann L, Quayle AJ, et al. Secretion of proinflammatory cytokines by epithelial cells in response to *Chlamydia* infection suggests a central role for epithelial cells in chlamydial pathogenesis. *J Clin Invest*. 1997;99:77-87.

74. Kawanishi H, Saltzman LE, Strober W. Characteristics and regulatory function of murine con A-induced, cloned T cells obtained from Peyer's patches and spleen: mechanisms regulating isotype-specific immunoglobulin production by Peyer's patch B cells. *J Immunol.* 1982;129:475-83.
75. George A, Cebra JJ. Responses of single germinal-center B cells in T-cell-dependent microculture. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991;88:11-5.
76. Coffman RL, Lebman DA, Shrader B. Transforming growth factor beta specifically enhances IgA production by lipopolysaccharide-stimulated murine B lymphocytes. *J Exp Med.* 1989;170:1039-44.
77. Sonoda E, Matsumoto R, Hitoshi Y, et al. Transforming growth factor beta induces IgA production and acts additively with interleukin 5 for IgA production. *J Exp Med.* 1989;170:1415-20.
78. Kitani A, Strober W. Differential regulation of C alpha 1 and C alpha 2 germ-line and mature mRNA transcripts in human peripheral blood B cells. *J Immunol.* 1994;153:1466-77.
79. Defrance T, Vanbervliet B, Briere F, Durand I, Rousset F, Banchereau J. Interleukin 10 and transforming growth factor beta cooperate to induce anti-CD40-activated naive human B cells to secrete immunoglobulin A. *J Exp Med.* 1992;175:671-82.
80. McIntyre TM, Kehry MR, Snapper CM. Novel in vitro model for high-rate IgA class switching. *J Immunol.* 1995;154:3156-61.
81. Ehrhardt RO, Harriman GR, Inman JK, Lycke N, Gray B, Strober W. Differential activation requirements of isotype-switched B cells. *Eur J Immunol.* 1996;26:1926-34.
82. Sonoda E, Hitoshi Y, Yamaguchi N, et al. Differential regulation of IgA production by TGF-beta and IL-5: TGF-beta induces surface IgA-positive cells bearing IL-5 receptor, whereas IL-5 promotes their survival and maturation into IgA-secreting cells. *Cell Immunol.* 1992;140:158-72.
83. Ramsay AJ, Husband AJ, Ramshaw IA, et al. The role of interleukin-6 in mucosal IgA antibody responses in vivo. *Science.* 1994;264:561-3.
84. Fayette J, Dubois B, Vandenabeele S, et al. Human dendritic cells skew isotype switching of CD40-activated naive B cells towards IgA1 and IgA2. *J Exp Med.* 1997;185:1909-18.
85. Fujihashi K, McGhee JR, Yamamoto M, Peschon JJ, Kiyono H. An interleukin-7 internet for intestinal intraepithelial T cell development: knockout of ligand or receptor reveal differences in the immunodeficient state. *Eur J Immunol.* 1997;27:2133-8.
86. Itohara S, Mombaerts P, Lafaille J, et al. T cell receptor delta gene mutant mice: independent generation of alpha beta T cells and programmed rearrangements of gamma delta TCR genes. *Cell.* 1993;72:337-48.
87. Brandtzaeg P. Polymeric IgA is complexed with secretory component (SC) on the surface of human intestinal epithelial cells. *Scand J Immunol.* 1978;8:39-52.
88. Brandtzaeg P. Role of J chain and secretory component in receptor-mediated glandular and hepatic transport of immunoglobulins in man. *Scand J Immunol.* 1985;22:111-46.
89. Kilian M, Mestecky J, Russell MW. Defense mechanisms involving Fc-dependent functions of immunoglobulin A and their subversion by bacterial immunoglobulin A proteases. *Microbiol Rev.* 1988;52:296-303.
90. Mattu TS, Pleass RJ, Willis AC, et al. The glycosylation and structure of human serum IgA1, Fab, and Fc regions and the role of N-glycosylation on Fc alpha receptor interactions. *J Biol Chem.* 1998;273:2260-72.

91. Lindh E. Increased resistance of immunoglobulin A dimers to proteolytic degradation after binding of secretory component. *J Immunol.* 1975;114:284-6.
92. Armstrong SJ, Dimmock NJ. Neutralization of influenza virus by low concentrations of hemagglutinin-specific polymeric immunoglobulin A inhibits viral fusion activity, but activation of the ribonucleoprotein is also inhibited. *J Virol.* 1992;66:3823-32.
93. Kaetzel CS, Robinson JK, Chintalacheruvu KR, Vaerman JP, Lamm ME. The polymeric immunoglobulin receptor (secretory component) mediates transport of immune complexes across epithelial cells: a local defense function for IgA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991;88:8796-800.
94. Mazanec MB, Kaetzel CS, Lamm ME, Fletcher D, Nedrud JG. Intracellular neutralization of virus by immunoglobulin A antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992;89:6901-5.
95. Burns JW, Siadat-Pajouh M, Krishnaney AA, Greenberg HB. Protective effect of rotavirus VP6-specific IgA monoclonal antibodies that lack neutralizing activity. *Science.* 1996;272:104-7.
96. Gan YJ, Chodosh J, Morgan A, Sixbey JW. Epithelial cell polarization is a determinant in the infectious outcome of immunoglobulin A-mediated entry by Epstein-Barr virus. *J Virol.* 1997;71:519-26.
97. Lin CT, Lin CR, Tan GK, Chen W, Dee AN, Chan WY. The mechanism of Epstein-Barr virus infection in nasopharyngeal carcinoma cells. *Am J Pathol.* 1997;150:1745-56.
98. Kilian M, Russell MW. Microbial evasion of IgA functions. En: Ogra P, Mestecky J, Lamm M, Strober W, Bienenstock J, McGhee J, (Eds.). *Mucosal Immunology.* 2nd ed. San Diego: Academic Press; 1999:241-51.
99. Pumphrey R. Computer models of the human immunoglobulins. Binding sites and molecular interactions. *Immunol Today.* 1986;7(7-8):206-11.
100. Rifai A, Fadden K, Morrison SL, Chintalacheruvu KR. The N-glycans determine the differential blood clearance and hepatic uptake of human immunoglobulin (Ig)A1 and IgA2 isotypes. *J Exp Med.* 2000;191:2171-82.
101. van Egmond M, Damen CA, van Spriël AB, Vidarsson G, van Garderen E, van de Winkel JG. IgA and the IgA Fc receptor. *Trends Immunol.* 2001;22:205-11.
102. Iikura M, Yamaguchi M, Fujisawa T, et al. Secretory IgA induces degranulation of IL-3-primed basophils. *J Immunol.* 1998;161:1510-5.
103. Ochsenbein AF, Fehr T, Lutz C, et al. Control of early viral and bacterial distribution and disease by natural antibodies. *Science.* 1999;286:2156-9.
104. Murakami M, Tsubata T, Shinkura R, et al. Oral administration of lipopolysaccharides activates B-1 cells in the peritoneal cavity and lamina propria of the gut and induces autoimmune symptoms in an autoantibody transgenic mouse. *J Exp Med.* 1994;180:111-21.
105. Macpherson AJ, Gatto D, Sainsbury E, Harriman GR, Hengartner H, Zinkernagel RM. A primitive T cell-independent mechanism of intestinal mucosal IgA responses to commensal bacteria. *Science.* 2000;288:2222-6.
106. Talham GL, Jiang HQ, Bos NA, Cebra JJ. Segmented filamentous bacteria are potent stimuli of a physiologically normal state of the murine gut mucosal immune system. *Infect Immun.* 1999;67:1992-2000.
107. Rescigno M, Urbano M, Valzasina B, et al. Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nat Immunol.* 2001;2:361-7.
108. Wen L, Pao W, Wong FS, et al. Germinal center formation, immunoglobulin class switching, and

- autoantibody production driven by "non alpha/beta" T cells. *J Exp Med.* 1996;183:2271-82.
109. Fagarasan S, Kinoshita K, Muramatsu M, Ikuta K, Honjo T. In situ class switching and differentiation to IgA-producing cells in the gut lamina propria. *Nature.* 2001;413:639-43.
 110. Groux H. An overview of regulatory T cells. *Microbes Infect.* 2001;3:883-9.
 111. Perez VL, Van Parijs L, Biuckians A, Zheng XX, Strom TB, Abbas AK. Induction of peripheral T cell tolerance in vivo requires CTLA-4 engagement. *Immunity.* 1997;6:411-7.
 112. Viney JL, Mowat AM, O'Malley JM, Williamson E, Fanger NA. Expanding dendritic cells in vivo enhances the induction of oral tolerance. *J Immunol.* 1998;160:5815-25.
 113. Huang FP, Platt N, Wykes M, et al. A discrete subpopulation of dendritic cells transports apoptotic intestinal epithelial cells to T cell areas of mesenteric lymph nodes. *J Exp Med.* 2000;191:435-44.
 114. Steinbrink K, Wolf M, Jonuleit H, Knop J, Enk AH. Induction of tolerance by IL-10-treated dendritic cells. *J Immunol.* 1997;159:4772-80.
 115. Strobel S, Mowat AM, Drummond HE, Pickering MG, Ferguson A. Immunological responses to fed protein antigens in mice. II. Oral tolerance for CMI is due to activation of cyclophosphamide-sensitive cells by gut-processed antigen. *Immunology.* 1983;49:451-6.
 116. Peng HJ, Turner MW, Strobel S. The generation of a 'tolerogen' after the ingestion of ovalbumin is time-dependent and unrelated to serum levels of immunoreactive antigen. *Clin Exp Immunol.* 1990;81:510-5.
 117. Bruce MG, Ferguson A. Oral tolerance to ovalbumin in mice: studies of chemically modified and 'biologically filtered' antigen. *Immunology.* 1986;57:627-30.
 118. Bruce MG, Ferguson A. The influence of intestinal processing on the immunogenicity and molecular size of absorbed, circulating ovalbumin in mice. *Immunology.* 1986;59:295-300.
 119. Gutgemann I, Fahrer AM, Altman JD, Davis MM, Chien YH. Induction of rapid T cell activation and tolerance by systemic presentation of an orally administered antigen. *Immunity.* 1998;8:667-73.
 120. Spahn TW, Fontana A, Faria AM, et al. Induction of oral tolerance to cellular immune responses in the absence of Peyer's patches. *Eur J Immunol.* 2001;31:1278-87.
 121. Melamed D, Friedman A. In vivo tolerization of Th1 lymphocytes following a single feeding with ovalbumin: anergy in the absence of suppression. *Eur J Immunol.* 1994;24:1974-81.
 122. Chen Y, Kuchroo VK, Inobe J, Hafler DA, Weiner HL. Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis. *Science.* 1994;265:1237-40.
 123. Chen Y, Inobe J, Weiner HL. Induction of oral tolerance to myelin basic protein in CD8-depleted mice: both CD4+ and CD8+ cells mediate active suppression. *J Immunol.* 1995;155:910-6.
 124. Garside P, Steel M, Liew FY, Mowat AM. CD4+ but not CD8+ T cells are required for the induction of oral tolerance. *Int Immunol.* 1995;7:501-4.
 125. Barone KS, Jain SL, Michael JG. Effect of in vivo depletion of CD4+ and CD8+ cells on the induction and maintenance of oral tolerance. *Cell Immunol.* 1995;163:19-29.
 126. Hirahara K, Hisatsune T, Nishijima K, Kato H, Shiho O, Kaminogawa S. CD4+ T cells anergized by high dose feeding establish oral tolerance to antibody responses when transferred in SCID and nude mice. *J Immunol.* 1995;154:6238-45.
 127. Khoury SJ, Hancock WW, Weiner HL. Oral tolerance to myelin basic protein and natural recovery from experimental autoimmune encephalomyelitis are associated with downregulation of

inflammatory cytokines and differential upregulation of transforming growth factor beta, interleukin 4, and prostaglandin E expression in the brain. *J Exp Med.* 1992;176:1355-64.

128. Garside P, Steel M, Worthey EA, et al. T helper 2 cells are subject to high dose oral tolerance and are not essential for its induction. *J Immunol.* 1995;154:5649-55.
129. Seder RA, Marth T, Sieve MC, et al. Factors involved in the differentiation of TGF-beta-producing cells from naive CD4+ T cells: IL-4 and IFN-gamma have opposing effects, while TGF-beta positively regulates its own production. *J Immunol.* 1998;160:5719-28.
130. Harper HM, Cochrane L, Williams NA. The role of small intestinal antigen-presenting cells in the induction of T-cell reactivity to soluble protein antigens: association between aberrant presentation in the lamina propria and oral tolerance. *Immunology.* 1996;89:449-56.
131. Powrie F, Carlino J, Leach MW, Mauze S, Coffman RL. A critical role for transforming growth factor-beta but not interleukin 4 in the suppression of T helper type 1-mediated colitis by CD45RB(low) CD4+ T cells. *J Exp Med.* 1996;183:2669-74.
132. Barnard JA, Warwick GJ, Gold LI. Localization of transforming growth factor beta isoforms in the normal murine small intestine and colon. *Gastroenterology.* 1993;105:67-73.
133. Gonnella PA, Chen Y, Inobe J, Komagata Y, Quartulli M, Weiner HL. In situ immune response in gut-associated lymphoid tissue (GALT) following oral antigen in TCR-transgenic mice. *J Immunol.* 1998;160:4708-18.
134. Fukaura H, Kent SC, Pietrusewicz MJ, Khoury SJ, Weiner HL, Hafler DA. Induction of circulating myelin basic protein and proteolipid protein-specific transforming growth factor-beta1-secreting Th3 T cells by oral administration of myelin in multiple sclerosis patients. *J Clin Invest.* 1996;98:70-7.
135. Groux H, O'Garra A, Bigler M, et al. A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature.* 1997;389:737-42.
136. Friedman A, Weiner HL. Induction of anergy or active suppression following oral tolerance is determined by antigen dosage. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91:6688-92.
137. Miller A, Lider O, Weiner HL. Antigen-driven bystander suppression after oral administration of antigens. *J Exp Med.* 1991;174:791-8.
138. Ke Y, Kapp JA. Oral antigen inhibits priming of CD8+ CTL, CD4+ T cells, and antibody responses while activating CD8+ suppressor T cells. *J Immunol.* 1996;156:916-21.
139. Grdic D, Hornquist E, Kjerrulf M, Lycke NY. Lack of local suppression in orally tolerant CD8-deficient mice reveals a critical regulatory role of CD8+ T cells in the normal gut mucosa. *J Immunol.* 1998;160:754-62.
140. McMenamin C, Pimm C, McKersey M, Holt PG. Regulation of IgE responses to inhaled antigen in mice by antigen-specific gamma delta T cells. *Science.* 1994;265:1869-71.
141. Fujihashi K, Dohi T, Kweon MN, et al. gammadelta T cells regulate mucosally induced tolerance in a dose-dependent fashion. *Int Immunol.* 1999;11:1907-16.
142. Mengel J, Cardillo F, Aroeira LS, Williams O, Russo M, Vaz NM. Anti-gamma delta T cell antibody blocks the induction and maintenance of oral tolerance to ovalbumin in mice. *Immunol Lett.* 1995;48:97-102.
143. Ke Y, Pearce K, Lake JP, Ziegler HK, Kapp JA. Gamma delta T lymphocytes regulate the induction and maintenance of oral tolerance. *J Immunol.* 1997;158:3610-8.
144. Hanninen A, Harrison LC. Gamma delta T cells as mediators of mucosal tolerance: the autoimmune

diabetes model. *Immunol Rev.* 2000;173:109-19.

145. McMenamin C, McKersey M, Kuhnlein P, Hunig T, Holt PG. Gamma delta T cells down-regulate primary IgE responses in rats to inhaled soluble protein antigens. *J Immunol.* 1995;154:4390-4.
146. Crispe IN, Mehal WZ. Strange brew: T cells in the liver. *Immunol Today.* 1996;17:522-5.
147. Steptoe RJ, Thomson AW. Dendritic cells and tolerance induction. *Clin Exp Immunol.* 1996;105:397-402.
148. Whitacre CC, Gienapp IE, Orosz CG, Bitar DM. Oral tolerance in experimental autoimmune encephalomyelitis. III. Evidence for clonal anergy. *J Immunol.* 1991;147:2155-63.
149. Melamed D, Friedman A. Direct evidence for anergy in T lymphocytes tolerized by oral administration of ovalbumin. *Eur J Immunol.* 1993;23:935-42.
150. Akdis CA, Blaser K. Role of IL-10 in allergen-specific immunotherapy and normal response to allergens. *Microbes Infect.* 2001;3:891-8.
151. Lee HO, Miller SD, Hurst SD, Tan LJ, Cooper CJ, Barrett TA. Interferon gamma induction during oral tolerance reduces T-cell migration to sites of inflammation. *Gastroenterology.* 2000;119:129-38.
152. Pierce NF, Gowans JL. Cellular kinetics of the intestinal immune response to cholera toxoid in rats. *J Exp Med.* 1975;142:1550-63.
153. Pierce NF, Cray WC Jr. Determinants of the localization, magnitude, and duration of a specific mucosal IgA plasma cell response in enterically immunized rats. *J Immunol.* 1982;128:1311-5.
154. Pierce NF, Cray WC Jr. Cellular dissemination of priming for a mucosal immune response to cholera toxin in rats. *J Immunol.* 1981;127:2461-4.
155. Spangler BD. Structure and function of cholera toxin and the related *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. *Microbiol Rev.* 1992;56:622-47.
156. Lencer WI, Moe S, Rufo PA, Madara JL. Transcytosis of cholera toxin subunits across model human intestinal epithelia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92:10094-8.
157. Cheng SH, Rich DP, Marshall J, Gregory RJ, Welsh MJ, Smith AE. Phosphorylation of the R domain by cAMP-dependent protein kinase regulates the CFTR chloride channel. *Cell.* 1991;66:1027-36.
158. Gabriel SE, Brigman KN, Koller BH, Boucher RC, Stutts MJ. Cystic fibrosis heterozygote resistance to cholera toxin in the cystic fibrosis mouse model. *Science.* 1994;266:107-9.
159. Beubler E, Schuligoi R, Chopra AK, Ribardo DA, Peskar BA. Cholera toxin induces prostaglandin synthesis via post-transcriptional activation of cyclooxygenase-2 in the rat jejunum. *J Pharmacol Exp Ther.* 2001;297:940-5.
160. Guerrant RL, Fang GD, Thielman NM, Fonteles MC. Role of platelet activating factor in the intestinal epithelial secretory and Chinese hamster ovary cell cytoskeletal responses to cholera toxin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91:9655-8.
161. Gomariz RP, Delgado M, Naranjo JR, et al. VIP gene expression in rat thymus and spleen. *Brain Behav Immun.* 1993;7:271-8.
162. Farthing MJ. Enterotoxins and the enteric nervous system--a fatal attraction. *Int J Med Microbiol.* 2000;290:491-6.
163. Sears CL, Kaper JB. Enteric bacterial toxins: mechanisms of action and linkage to intestinal secretion. *Microbiol Rev.* 1996;60:167-215.

164. Lycke N, Holmgren J. Long-term cholera antitoxin memory in the gut can be triggered to antibody formation associated with protection within hours of an oral challenge immunization. *Scand J Immunol.* 1987;25:407-12.
165. Elson CO, Ealding W. Cholera toxin feeding did not induce oral tolerance in mice and abrogated oral tolerance to an unrelated protein antigen. *J Immunol.* 1984;133:2892-7.
166. Lycke N, Holmgren J. Strong adjuvant properties of cholera toxin on gut mucosal immune responses to orally presented antigens. *Immunology.* 1986;59:301-8.
167. Lycke N, Tsuji T, Holmgren J. The adjuvant effect of *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli* heat-labile enterotoxins is linked to their ADP-ribosyltransferase activity. *Eur J Immunol.* 1992;22:2277-81.
168. Nedrud JG, Sigmund N. Cholera toxin as a mucosal adjuvant: III. Antibody responses to nontarget dietary antigens are not increased. *Reg Immunol.* 1990-1991;3:217-22.
169. Jackson RJ, Fujihashi K, Xu-Amano J, Kiyono H, Elson CO, McGhee JR. Optimizing oral vaccines: induction of systemic and mucosal B-cell and antibody responses to tetanus toxoid by use of cholera toxin as an adjuvant. *Infect Immun.* 1993;61:4272-9.
170. Xu-Amano J, Kiyono H, Jackson RJ, et al. Helper T cell subsets for immunoglobulin A responses: oral immunization with tetanus toxoid and cholera toxin as adjuvant selectively induces Th2 cells in mucosa associated tissues. *J Exp Med.* 1993;178:1309-20.
171. Marinaro M, Boyaka PN, Finkelman FD, et al. Oral but not parenteral interleukin (IL)-12 redirects T helper 2 (Th2)-type responses to an oral vaccine without altering mucosal IgA responses. *J Exp Med.* 1997;185:415-27.
172. Wilson AD, Bailey M, Williams NA, Stokes CR. The in vitro production of cytokines by mucosal lymphocytes immunized by oral administration of keyhole limpet hemocyanin using cholera toxin as an adjuvant. *Eur J Immunol.* 1991;21:2333-9.
173. Vajdy M, Lycke N. Stimulation of antigen-specific T- and B-cell memory in local as well as systemic lymphoid tissues following oral immunization with cholera toxin adjuvant. *Immunology.* 1993;80:197-203.
174. Kusnecov AW, Cohen N, Moynihan J. Adjuvant effects of freely ingested cholera toxin on systemic antibody and DTH responses to protein antigen. *Reg Immunol.* 1992;4:153-61.
175. Bowen JC, Nair SK, Reddy R, Rouse BT. Cholera toxin acts as a potent adjuvant for the induction of cytotoxic T-lymphocyte responses with non-replicating antigens. *Immunology.* 1994;81:338-42.
176. Elson CO. Cholera toxin as a mucosal adjuvant: effects of H-2 major histocompatibility complex and Igs genes. *Infect Immun.* 1992;60:2874-9.
177. Cheng E, Cardenas-Freytag L, Clements JD. The role of cAMP in mucosal adjuvanticity of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin (LT). *Vaccine.* 1999;18:38-49.
178. Elson C, Tomasi M, Chang T, Jobling M, Holmes R. Immunogenicity and adjuvanticity of mutant cholera toxin (CT) molecules. *FASEB J.* 1995;9:A290. Abstract 1680 de Experimental Biology 95. Atlanta, Georgia. April 9-13, 1995.
179. Maeyama J, Isaka M, Yasuda Y, et al. Cytokine responses to recombinant cholera toxin B subunit produced by *Bacillus brevis* as a mucosal adjuvant. *Microbiol Immunol.* 2001;45:111-7.
180. Hajishengallis G, Hollingshead SK, Koga T, Russell MW. Mucosal immunization with a bacterial protein antigen genetically coupled to cholera toxin A2/B subunits. *J Immunol.* 1995;154:4322-32.
181. Gardby E, Wrammert J, Schon K, Ekman L, Leanderson T, Lycke N. Strong differential regulation of

- serum and mucosal IgA responses as revealed in CD28-deficient mice using cholera toxin adjuvant. *J Immunol.* 2003;170:55-63.
182. Gagliardi MC, Sallusto F, Marinaro M, Vendetti S, Riccomi A, De Magistris MT. Effects of the adjuvant cholera toxin on dendritic cells: stimulatory and inhibitory signals that result in the amplification of immune responses. *Int J Med Microbiol.* 2002;291:571-5.
 183. McGee DW, Elson CO, McGhee JR. Enhancing effect of cholera toxin on interleukin-6 secretion by IEC-6 intestinal epithelial cells: mode of action and augmenting effect of inflammatory cytokines. *Infect Immun.* 1993;61:4637-44.
 184. Bromander AK, Kjerrulf M, Holmgren J, Lycke N. Cholera toxin enhances alloantigen presentation by cultured intestinal epithelial cells. *Scand J Immunol.* 1993;37:452-8.
 185. Hornquist E, Lycke N. Cholera toxin adjuvant greatly promotes antigen priming of T cells. *Eur J Immunol.* 1993;23:2136-43.
 186. Holmgren J, Lycke N, Czerkinsky C. Cholera toxin and cholera B subunit as oral-mucosal adjuvant and antigen vector systems. *Vaccine.* 1993;11:1179-84.
 187. Lycke NY. Cholera toxin promotes B cell isotype switching by two different mechanisms. cAMP induction augments germ-line Ig H-chain RNA transcripts whereas membrane ganglioside GM1-receptor binding enhances later events in differentiation. *J Immunol.* 1993;150:4810-21.
 188. Lycke N, Karlsson U, Sjolander A, Magnusson KE. The adjuvant action of cholera toxin is associated with an increased intestinal permeability for luminal antigens. *Scand J Immunol.* 1991;33:691-8.
 189. Holmgren J, Brantzaeg P, Capron A, et al. European Commission COST/STD Initiative. Report of the expert panel VI. Concerted efforts in the field of mucosal immunology. *Vaccine.* 1996;14:644-64.
 190. Iijima H, Takahashi I, Kiyono H. Mucosal immune network in the gut for the control of infectious diseases. *Rev Med Virol.* 2001;11:117-33.
 191. Lu X, Clements JD, Katz JM. Mutant Escherichia coli heat-labile enterotoxin [LT(R192G)] enhances protective humoral and cellular immune responses to orally administered inactivated influenza vaccine. *Vaccine.* 2002;20:1019-29.
 192. Stiles BG, Garza AR, Ulrich RG, Boles JW. Mucosal vaccination with recombinantly attenuated staphylococcal enterotoxin B and protection in a murine model. *Infect Immun.* 2001;69:2031-6.
 193. Kuper CF, Koornstra PJ, Hameleers DM, et al. The role of nasopharyngeal lymphoid tissue. *Immunol Today.* 1992;13:219-24.
 194. Brandtzaeg P, Johansen F, Bækkevold E, Farstad I. Compartmentalization of the human mucosal immune system. A tonsillar B-cell subset (sIgD⁺ IgM⁻ CD38⁺) homes to regional effector sites but not to the gut. *Scand. J. Immunol.* 1998;47:620. Abstract 23 del 29th Annual Meeting of the Scandinavian Society for Immunology. Copenhagen, Denmark, June 10-14 1998.
 195. Brandtzaeg P, Farstad IN, Haraldsen G. Regional specialization in the mucosal immune system: primed cells do not always home along the same track. *Immunol Today.* 1999;20:267-77.
 196. Mizoguchi A, Mizoguchi E, Chiba C, Bhan AK. Role of appendix in the development of inflammatory bowel disease in TCR-alpha mutant mice. *J Exp Med.* 1996;184:707-15.
 197. Heritage PL, Underdown BJ, Arsenaault AL, Snider DP, McDermott MR. Comparison of murine nasal-associated lymphoid tissue and Peyer's patches. *Am J Respir Crit Care Med.* 1997;156:1256-62.
 198. Farstad IN, Norstein J, Brandtzaeg P. Phenotypes of B and T cells in human intestinal and mesenteric lymph. *Gastroenterology.* 1997;112:163-73.

199. Quiding-Jabrink M, Nordstrom I, Granstrom G, et al. Differential expression of tissue-specific adhesion molecules on human circulating antibody-forming cells after systemic, enteric, and nasal immunizations. A molecular basis for the compartmentalization of effector B cell responses. *J Clin Invest.* 1997;99:1281-6.
200. Rott LS, Briskin MJ, Butcher EC. Expression of alpha4beta7 and E-selectin ligand by circulating memory B cells: implications for targeted trafficking to mucosal and systemic sites. *J Leukoc Biol.* 2000;68:807-14.
201. Eigenmann PA. T lymphocytes in food allergy: overview of an intricate network of circulating and organ-resident cells. *Pediatr Allergy Immunol.* 2002;13:162-71.
202. Agace WW, Roberts AI, Wu L, Greineder C, Ebert EC, Parker CM. Human intestinal lamina propria and intraepithelial lymphocytes express receptors specific for chemokines induced by inflammation. *Eur J Immunol.* 2000;30:819-26.
203. Butcher EC, Picker LJ. Lymphocyte homing and homeostasis. *Science.* 1996;272:60-6.
204. Imaoka K, Miller CJ, Kubota M, et al. Nasal immunization of nonhuman primates with simian immunodeficiency virus p55gag and cholera toxin adjuvant induces Th1/Th2 help for virus-specific immune responses in reproductive tissues. *J Immunol.* 1998;161:5952-8.
205. Dumais N, Patrick A, Moss RB, Davis HL, Rosenthal KL. Mucosal immunization with inactivated human immunodeficiency virus plus CpG oligodeoxynucleotides induces genital immune responses and protection against intravaginal challenge. *J Infect Dis.* 2002;186:1098-105.
206. Ogra PL, Faden H, Welliver RC. Vaccination strategies for mucosal immune responses. *Clin Microbiol Rev.* 2001;14:430-45.
207. Dietrich G, Griot-Wenk M, Metcalfe IC, Lang AB, Viret JF. Experience with registered mucosal vaccines. *Vaccine.* 2003;21:678-83.
208. Bouvet JP, Decroix N, Pamonsinlapatham P. Stimulation of local antibody production: parenteral or mucosal vaccination? *Trends Immunol.* 2002;23:209-13.
209. Mestecky J, McGhee JR. Prospects for human mucosal vaccines. En: Ciardi J, et al., (Eds.). *Genetically Engineered Vaccines.* New York: Plenum Press; 1992:13-23.
210. Eriksson K, Holmgren J. Recent advances in mucosal vaccines and adjuvants. *Curr Opin Immunol.* 2002;14:666-72.
211. Kweon MN, Yamamoto M, Watanabe F, et al. A nontoxic chimeric enterotoxin adjuvant induces protective immunity in both mucosal and systemic compartments with reduced IgE antibodies. *J Infect Dis.* 2002;186:1261-9.
212. Yao Q, Bu Z, Vzorov A, Yang C, Compans RW. Virus-like particle and DNA-based candidate AIDS vaccines. *Vaccine.* 2003;21:638-43.
213. Pfeiffer R, Marx. Die bildungsstätte der choleraschutzstoffe. *Zeitschrift Fur Hygiene Und Infektionskrankheiten.* 1898;27:272-97.
214. Thorbecke GJ, Keuning FJ. Antibody formation in vitro by haemopoietic organs after subcutaneous and intravenous immunization. *J. Immunology.* 1953;70:129-134.
215. Askonas BA, White RG. Sites of antibody production in the guinea pig. The relation between in vitro synthesis of anti ovalbumin and gamma-globulin and distribution of antibody containing plasma cells. *Br. J. Exp. Pathol.* 1956;37:61-74.
216. Benner R, Meima F, van der Meulen GM, van Muiswinkel WB. Antibody formation in mouse bone marrow. I. Evidence for the development of plaque-forming cells in situ. *Immunology.*

1974;26:247-55.

217. Benner R, Hijmans W, Haaijman JJ. The bone marrow: the major source of serum immunoglobulins, but still a neglected site of antibody formation. *Clin Exp Immunol.* 1981;46:1-8.
218. Hijmans W, Schuit HR. Immunofluorescence studies on immunoglobulins in the lymphoid cells of human peripheral blood. *Clin Exp Immunol.* 1972;11:483-94.
219. McMillan R, Longmire RL, Yelenosky R, Lang JE, Heath V, Craddock CG. Immunoglobulin synthesis by human lymphoid tissues: normal bone marrow as a major site of IgG production. *J Immunol.* 1972;109:1386-94.
220. Anderson HR, Dresser DW. The long-term distribution of antibody-forming cells. *Eur J Immunol.* 1972;2:410-3.
221. Benner R, van Oudenaren A, de Ruiter H. Antibody formation in mouse bone marrow. IX. Peripheral lymphoid organs are involved in the initiation of bone marrow antibody formation. *Cell Immunol.* 1977;34:125-37.
222. Koch G, Osmond DG, Julius MH, Benner R. The mechanism of thymus-dependent antibody formation in bone marrow. *J Immunol.* 1981;126:1447-51.
223. Haaijman JJ, Hijmans W. Influence of age on the immunological activity and capacity of the CBA mouse. *Mech Ageing Dev.* 1978;7:375-98.
224. Benner R, van Oudenaren A, Haaijman JJ. Deficient antibody formation in the bone marrow of nude mice. *Immunology.* 1978;35:619-26.
225. Benner R, Rijnbeek AM, Bernabe RR, Martinez-Alonso C, Coutinho A. Frequencies of background immunoglobulin-secreting cells in mice as a function of organ, age, and immune status. *Immunobiology.* 1981;158:225-38.
226. Haaijman JJ, Slingerland-Teunissen J, Van Oudenaren A, Mink JG, Benner R. Kinetics of recovery of serum Ig levels and of cytoplasmic Ig positive cells in various lymphoid organs of nude mice after thymus transplantation. *Immunology.* 1980;41:279-87.
227. Haaijman JJ, Schuit HR, Hijmans W. Immunoglobulin-containing cells in different lymphoid organs of the CBA mouse during its life-span. *Immunology.* 1977;32:427-34.
228. Haaijman JJ, Slingerland-Teunissen J, Benner R, Van Oudenaren A. The distribution of cytoplasmic immunoglobulin containing cells over various lymphoid organs of congenitally athymic (nude) mice as a function of age. *Immunology.* 1979;36:271-8.
229. Dilosa RM, Maeda K, Masuda A, Szakal AK, Tew JG. Germinal center B cells and antibody production in the bone marrow. *J Immunol.* 1991;146:4071-7.
230. Szakal AK, Taylor JK, Smith JP, Kosco MH, Burton GF, Tew JJ. Kinetics of germinal center development in lymph nodes of young and aging immune mice. *Anat Rec.* 1990;227:475-85.
231. Slifka MK, Matloubian M, Ahmed R. Bone marrow is a major site of long-term antibody production after acute viral infection. *J Virol.* 1995;69:1895-902.
232. Hyland L, Sangster M, Sealy R, Coleclough C. Respiratory virus infection of mice provokes a permanent humoral immune response. *J Virol.* 1994;68:6083-6.
233. Bachmann MF, Kundig TM, Odermatt B, Hengartner H, Zinkernagel RM. Free recirculation of memory B cells versus antigen-dependent differentiation to antibody-forming cells. *J Immunol.* 1994;153:3386-97.
234. Slifka MK, Whitmire JK, Ahmed R. Bone marrow contains virus-specific cytotoxic T lymphocytes.

Blood. 1997;90:2103-8.

235. Lau LL, Jamieson BD, Somasundaram T, Ahmed R. Cytotoxic T-cell memory without antigen. *Nature*. 1994;369:648-52.
236. Gottlieb DJ, Cryz SJ Jr, Furer E, et al. Immunity against *Pseudomonas aeruginosa* adoptively transferred to bone marrow transplant recipients. *Blood*. 1990;76:2470-5.
237. Witherspoon RP, Lum LG, Storb R, Thomas ED. In vitro regulation of immunoglobulin synthesis after human marrow transplantation. II. Deficient T and non-T lymphocyte function within 3-4 months of allogeneic, syngeneic, or autologous marrow grafting for hematologic malignancy. *Blood*. 1982;59:844-50.
238. Waldmann H, Polliak A, Hale G, et al. Elimination of graft-versus-host disease by in-vitro depletion of alloreactive lymphocytes with a monoclonal rat anti-human lymphocyte antibody (CAMPATH-1). *Lancet*. 1984;2:483-6.
239. Slavin S. New strategies for bone marrow transplantation. *Curr Opin Immunol*. 2000;12:542-51.
240. Sharp A, Kukulansky T, Malkinson Y, Globerson A. The bone marrow as an effector T cell organ in aging. *Mech Ageing Dev*. 1990;52:219-33.
241. Price PW, Cerny J. Characterization of CD4+ T cells in mouse bone marrow. I. Increased activated/memory phenotype and altered TCR Vbeta repertoire. *Eur J Immunol*. 1999;29:1051-6.
242. Tew JG, DiLosa RM, Burton GF, et al. Germinal centers and antibody production in bone marrow. *Immunol Rev*. 1992;126:99-112.
243. Coico RF, Bhogal BS, Thorbecke GJ. Relationship of germinal centers in lymphoid tissue to immunologic memory. VI. Transfer of B cell memory with lymph node cells fractionated according to their receptors for peanut agglutinin. *J Immunol*. 1983;131:2254-7.
244. Kosco MH, Burton GF, Kapasi ZF, Szakal AK, Tew JG. Antibody-forming cell induction during an early phase of germinal centre development and its delay with ageing. *Immunology*. 1989;68:312-8.
245. Slupsky JR, Duggan-Keen M, Booth LA, et al. The peanut-agglutinin (PNA)-binding surface components of malignant plasma cells. *Br J Haematol*. 1993;83:567-73.
246. Barker HF, Hamilton MS, Ball J, Drew M, Franklin IM. Expression of adhesion molecules LFA-3 and N-CAM on normal and malignant human plasma cells. *Br J Haematol*. 1992;81:331-5.
247. Roldan E, Garcia-Pardo A, Brieva JA. VLA-4-fibronectin interaction is required for the terminal differentiation of human bone marrow cells capable of spontaneous and high rate immunoglobulin secretion. *J Exp Med*. 1992;175:1739-47.
248. Nitschke L, Floyd H, Ferguson DJ, Crocker PR. Identification of CD22 ligands on bone marrow sinusoidal endothelium implicated in CD22-dependent homing of recirculating B cells. *J Exp Med*. 1999;189:1513-8.
249. Hargreaves DC, Hyman PL, Lu TT, et al. A coordinated change in chemokine responsiveness guides plasma cell movements. *J Exp Med*. 2001;194:45-56.
250. Alley CD, Kiyono H, McGhee JR. Murine bone marrow IgA responses to orally administered sheep erythrocytes. *J Immunol*. 1986;136:4414-9.
251. Kutteh WH, Prince SJ, Mestecky J. Tissue origins of human polymeric and monomeric IgA. *J Immunol*. 1982;128:990-5.
252. Alley CD, Nash GS, MacDermott RP. Marked in vitro spontaneous secretion of IgA by human rib

- bone marrow mononuclear cells. *J Immunol*. 1982;128:2604-8.
253. Alley CD, MacDermott RP, Nash GS, Bertovich MJ. Suppression of in-vitro antibody production by pokeweed mitogen-stimulated human bone-marrow mononuclear cells. Evidence for a soluble suppressor substance. *Immunology*. 1983;50:387-95.
 254. Elson CO, Ealding W, Lefkowitz J. A lavage technique allowing repeated measurement of IgA antibody in mouse intestinal secretions. *J Immunol Methods*. 1984;67:101-8.
 255. Flo J, Roux ME, Massouh E. Deficient induction of the immune response to oral immunization with cholera toxin in malnourished rats during suckling. *Infect Immun*. 1994;62:4948-54.
 256. Lyscom N, Brueton MJ. Intraepithelial, lamina propria and Peyer's patch lymphocytes of the rat small intestine: isolation and characterization in terms of immunoglobulin markers and receptors for monoclonal antibodies. *Immunology*. 1982;45:775-83.
 257. Czerkinsky CC, Nilsson LA, Nygren H, Ouchterlony O, Tarkowski A. A solid-phase enzyme-linked immunospot (ELISPOT) assay for enumeration of specific antibody-secreting cells. *J Immunol Methods*. 1983;65:109-21.
 258. Sedgwick JD, Holt PG. A solid-phase immunoenzymatic technique for the enumeration of specific antibody-secreting cells. *J Immunol Methods*. 1983;57:301-9.
 259. Lycke N, Lindholm L, Holmgren J. Cholera antibody production in vitro by peripheral blood lymphocytes following oral immunization of humans and mice. *Clin Exp Immunol*. 1985;62:39-47.
 260. Lycke N. A sensitive method for the detection of specific antibody production in different isotypes from single lamina propria plasma cells. *Scand J Immunol*. 1986;24:393-403.
 261. Kusumoto Y, Ogawa T, Hamada S. Generation of specific antibody-secreting cells in salivary glands of BALB/c mice following parenteral or oral immunization with *Porphyromonas gingivalis* fimbriae. *Arch Oral Biol*. 1993;38:361-7.
 262. Deenen GJ, Hunt SV, Opstelten D. A stathmokinetic study of B lymphocytopoiesis in rat bone marrow: proliferation of cells containing cytoplasmic mu-chains, terminal deoxynucleotidyl transferase and carrying HIS24 antigen. *J Immunol*. 1987;139:702-10.
 263. Fló Diaz J, Tesis de doctorado. *Alteraciones en el Sistema Inmune Asociado al Intestino en un modelo de desnutrición durante la lactancia*. Buenos Aires: FCEyN, Universidad de Buenos Aires; 1993.
 264. Wysocki LJ, Sato VL. "Panning" for lymphocytes: a method for cell selection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1978;75:2844-8.
 265. Lewis GK, Kamin R. Separation of T and B cells using plastic surfaces coated with Anti-immunoglobulin antibodies ("Panning"). En: Mishell B, Shiigi S, (Eds.). *Selected Methods in Cellular Immunology*. San Francisco: Freeman, WH and Co; 1980:227-34.
 266. Hunt S. Preparative immunoselection of lymphocyte populations. En: Weir D, (Ed.). *Handbook of Experimental Immunology*. 4th ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications; 1986;2: Cellular Immunology:55.1-55.18.
 267. Autores no mencionados. Physiological data for common laboratory animals. En. *ICN Biochemicals and Reagents Catalog*. Irvine, CA: ICN Pharmaceuticals, Inc; 2002-2003:1325.
 268. Sokal RR, Rohlf FJ. Assumptions of analysis of variance. 13.11 Nonparametric methods in lieu of single-classification anova. En. *Biometry: The Principles and Practice of Statistics in Biological Research*. 3rd ed. New York: W H Freeman and Co; 1969:423-39.
 269. Snedecor GW, Cochran WG. Métodos cortos y no paramétricos. En *Métodos Estadísticos*. México

DF: Compaffia Editorial Continental S. A.; 1971 (6ª impresión 1979):157-74. Traducido por J. A. Reinos Fuller del original *Statistical methods*. The Iowa State University Press, Iowa, USA. 1967.

270. Donaldson SL, Kosco MH, Szakal AK, Tew JG. Localization of antibody-forming cells in draining lymphoid organs during long-term maintenance of the antibody response. *J Leukoc Biol.* 1986;40:147-57.
271. Befus A, McDermott M, Mirski S, Bienenstock J. Amplification mechanisms in mucosal immunity. En: Ogra P, Bienenstock J, (Eds.). *The Mucosal Immune System in Health and Disease*. Columbus, Ohio: Ross Laboratories; 1981:19-24.
272. Brandtzaeg P, Krajci P, Lamm ME, Kaetzel CS. Epitelial and hepatobiliary transport of polymeric immunoglobulins. En: Ogra P, Mestecky J, Lamm M, Strober W, McGhee J, Bienenstock J, (Eds.). *Handbook of Mucosal Immunology*. San Diego: Academic Press; 1994:113-26.
273. Mowat AM. Oral tolerance and regulation of immunity to dietary antigens. En: Ogra P, Mestecky J, Lamm M, Strober W, McGhee J, Bienenstock J, (Eds.). *Handbook of Mucosal Immunology*. San Diego: Academic Press; 1994:185-201.
274. Kawano MM, Mihara K, Tsujimoto T, Huang N, Kuramoto A. A new phenotypic classification of bone marrow plasmacytosis. *Int J Hematol.* 1995;61:179-88.
275. Orlans E, Peppard J, Reynolds J, Hall J. Rapid active transport of immunoglobulin A from blood to bile. *J Exp Med.* 1978;147:588-92.
276. Lemaitre-Coelho I, Jackson GD, Vaerman JP. Relevance of biliary IgA antibodies in rat intestinal immunity. *Scand J Immunol.* 1978;8:459-63.
277. Lemaitre-Coelho I, Jackson GD, Vaerman JP. High levels of secretory IgA and free secretory component in the serum of rats with bile duct obstruction. *J Exp Med.* 1978;147:934-9.
278. Jackson GD, Hansen PG, Underdown BJ. Further evidence that hepatic sources confer biliary antibody in the rat. *Immunology.* 1992;76:397-401.
279. Delacroix DL, Elkom KB, Geubel AP, Hodgson HF, Dive C, Vaerman JP. Changes in size, subclass, and metabolic properties of serum immunoglobulin A in liver diseases and in other diseases with high serum immunoglobulin A. *J Clin Invest.* 1983;71:358-67.
280. Tomana M, Kulhavy R, Mestecky J. Receptor-mediated binding and uptake of immunoglobulin A by human liver. *Gastroenterology.* 1988;94:762-70.
281. Tarkowski A, Moldoveanu Z, Koopman WJ, Radl J, Haaijman JJ, Mestecky J. Cellular origins of human polymeric and monomeric IgA: enumeration of single cells secreting polymeric IgA1 and IgA2 in peripheral blood, bone marrow, spleen, gingiva and synovial tissue. *Clin Exp Immunol.* 1991;85:341-8.
282. Mestecky J, Winchester RJ, Hoffman T, Kunkel HG. Parallel synthesis of immunoglobulins and J chain in pokeweed mitogen-stimulated normal cells and in lymphoblastoid cell lines. *J Exp Med.* 1977;145:760-5.
283. MacDermott RP, Beale MG, Alley CD, Nash GS, Bertovich MJ, Bragdon MJ. Synthesis and secretion of IgA, IgM, and IgG by peripheral blood mononuclear cells in human disease states, by isolated human intestinal mononuclear cells, and by human bone marrow mononuclear cells from ribs. *Ann N Y Acad Sci.* 1983;409:498-509.
284. Cornes J.S. Number, size and distribution of Peyer's patches in human intestine. *Gut.* 1965;6:225.
285. Butcher EC. Lymphocyte homing and intestinal immunity. En: Ogra P, Mestecky J, Lamm M, Strober W, Bienenstock J, McGhee J, (Eds.). *Mucosal Immunology*. 2nd ed. San Diego: Academic Press;

1999:507-22.

286. Drew M, Barker HF, Ball J, Pearson C, Cook G, Franklin I. Very late antigen (VLA) expression by normal and neoplastic human plasma cells; including an assessment of antibodies submitted to the Vth International Workshop on Leucocyte Differentiation Antigens using human myeloma cell lines. *Leuk Res.* 1996;20:619-24.
287. Masellis-Smith A, Belch AR, Mant MJ, Pilarski LM. Adhesion of multiple myeloma peripheral blood B cells to bone marrow fibroblasts: a requirement for CD44 and alpha4beta7. *Cancer Res.* 1997;57:930-6.
288. Vajdy M, Kosco-Vilbois MH, Kopf M, Kohler G, Lycke N. Impaired mucosal immune responses in interleukin 4-targeted mice. *J Exp Med.* 1995;181:41-53.
289. Fuhrman JA, Cebra JJ. Special features of the priming process for a secretory IgA response. B cell priming with cholera toxin. *J Exp Med.* 1981;153:534-44.
290. Husband AJ, Gowans JL. The origin and antigen-dependent distribution of IgA-containing cells in the intestine. *J Exp Med.* 1978;148:1146-60.
291. Szakal AK, Holmes KL, Tew JG. Transport of immune complexes from the subcapsular sinus to lymph node follicles on the surface of nonphagocytic cells, including cells with dendritic morphology. *J Immunol.* 1983;131:1714-27.
292. O'Doherty U, Peng M, Gezelter S, et al. Human blood contains two subsets of dendritic cells, one immunologically mature and the other immature. *Immunology.* 1994;82:487-93.
293. Kudo S, Matsuno K, Ezaki T, Ogawa M. A novel migration pathway for rat dendritic cells from the blood: hepatic sinusoids-lymph translocation. *J Exp Med.* 1997;185:777-84.
294. MacPherson GG, Jenkins CD, Stein MJ, Edwards C. Endotoxin-mediated dendritic cell release from the intestine. Characterization of released dendritic cells and TNF dependence. *J Immunol.* 1995;154:1317-22.
295. Liu LM, MacPherson GG. Lymph-borne (veiled) dendritic cells can acquire and present intestinally administered antigens. *Immunology.* 1991;73:281-6.
296. Levine MM, Black RE, Clements ML, Cisneros L, Nalin DR, Young CR. Duration of infection-derived immunity to cholera. *J Infect Dis.* 1981;143:818-20.
297. Levine MM, Nalin DR, Hoover DL, Bergquist EJ, Hornick RB, Young CR. Immunity to enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infect Immun.* 1979;23:729-36.
298. Husband AJ. Novel vaccination strategies for the control of mucosal infection. *Vaccine.* 1993;11:107-12.
299. Lycke N, Holmgren J. Intestinal mucosal memory and presence of memory cells in lamina propria and Peyer's patches in mice 2 years after oral immunization with cholera toxin. *Scand J Immunol.* 1986;23:611-6.
300. McWilliams M, Phillips-Quagliata JM, Lamm ME. Mesenteric lymph node B lymphoblasts which home to the small intestine are precommitted to IgA synthesis. *J Exp Med.* 1977;145:866-75.
301. McWilliams M, Phillips-Quagliata JM, Lamm ME. Characteristics of mesenteric lymph node cells homing to gut-associated lymphoid tissue in syngeneic mice. *J Immunol.* 1975;115:54-8.
302. Husband AJ. Kinetics of extravasation and redistribution of IgA-specific antibody-containing cells in the intestine. *J Immunol.* 1982;128:1355-9.
303. Craig SW, Cebra JJ. Peyer's patches: an enriched source of precursors for IgA-producing

- immunocytes in the rabbit. *J Exp Med.* 1971;134:188-200.
304. Fahey JL, Stell S. The immunoglobulins of mice. V The metabolic (catabolic) properties of five immunoglobulin classes. *J Exp Med.* 1965;122(1):41-58.
 305. Vieira P, Rajewsky K. The half-lives of serum immunoglobulins in adult mice. *Eur J Immunol.* 1988;18:313-6.
 306. Talbot PJ, Buchmeier MJ. Catabolism of homologous murine monoclonal hybridoma IgG antibodies in mice. *Immunology.* 1987;60:485-9.
 307. Slifka MK, Ahmed R. Long-term humoral immunity against viruses: revisiting the issue of plasma cell longevity. *Trends Microbiol.* 1996;4:394-400.
 308. Tew JG, Kosco MH, Burton GF, Szakal AK. Follicular dendritic cells as accessory cells. *Immunol Rev.* 1990;117:185-211.
 309. MacLennan IC, Liu YJ, Johnson GD. Maturation and dispersal of B-cell clones during T cell-dependent antibody responses. *Immunol Rev.* 1992;126:143-61.
 310. Gray D, Siepmann K, van Essen D, et al. B-T lymphocyte interactions in the generation and survival of memory cells. *Immunol Rev.* 1996;150:45-61.
 311. Zinkernagel RM, Bachmann MF, Kundig TM, Oehen S, Pirchet H, Hengartner H. On immunological memory. *Annu Rev Immunol.* 1996;14:333-67.
 312. Cooper E. Production of lymphocytes and plasma cells in the rat following immunization with human serum albumin. *Immunology.* 1961;4:219-31.
 313. Schooley JC. Autoradiographic observations of plasma cell formation. *J Immunol.* 1960;86(3):331-7.
 314. Makela O, Nossal G. Autoradiographic studies on the immune response. II. DNA synthesis amongst single antibody-producing cells. *J Exp Med.* 1992;115:231-44.
 315. Nossal G, Makela O. Autoradiographic studies on the immune response. I. The kinetics of plasma cell proliferation. *J Exp Med.* 1962;115:209-30.
 316. Levy M, Vieira P, Coutinho A, Freitas A. The majority of "natural" immunoglobulin-secreting cells are short-lived and the progeny of cycling lymphocytes. *Eur J Immunol.* 1987;17:849-54.
 317. Ho F, Lortan JE, MacLennan IC, Khan M. Distinct short-lived and long-lived antibody-producing cell populations. *Eur J Immunol.* 1986;16:1297-301.
 318. Mandel TE, Phipps RP, Abbot A, Tew JG. The follicular dendritic cell: long term antigen retention during immunity. *Immunol Rev.* 1980;53:29-59.
 319. Gray D. Immunological memory. *Annu Rev Immunol.* 1993;11:49-77.
 320. Wu J, Qin D, Burton GF, Szakal AK, Tew JG. Follicular dendritic cell-derived antigen and accessory activity in initiation of memory IgG responses in vitro. *J Immunol.* 1996;157:3404-11.
 321. MacLennan IC, Casamayor-Palleja M, Toellner KM, Gulbranson-Judge A, Gordon J. Memory B-cell clones and the diversity of their members. *Semin Immunol.* 1997;9:229-34.
 322. Nieuwenhuis P, Opstelten D. Functional anatomy of germinal centers. *Am J Anat.* 1984;170:421-35.
 323. Tew JG, Phipps RP, Mandel TE. The maintenance and regulation of the humoral immune response: persisting antigen and the role of follicular antigen-binding dendritic cells as accessory cells. *Immunol Rev.* 1980;53:175-201.

324. Tew JG, Mandel TE. Prolonged antigen half-life in the lymphoid follicles of specifically immunized mice. *Immunology*. 1979;37:69-76.
325. Schneider-Schaulies J, Dunster LM, Schneider-Schaulies S, ter Meulen V. Pathogenetic aspects of measles virus infections. *Vet Microbiol*. 1995;44:113-25.
326. Chantler JK, Ford DK, Tingle AJ. Rubella-associated arthritis: rescue of rubella virus from peripheral blood lymphocytes two years postvaccination. *Infect Immun*. 1981;32:1274-80.
327. Grandien A, Andersson J, Portnoi D, Coutinho A. An example of idiotypic mimicry. *Eur J Immunol*. 1997;27:1808-15.
328. Shoenfeld Y, George J. Induction of autoimmunity. A role for the idiotypic network. *Ann N Y Acad Sci*. 1997;815:342-9.
329. Bernasconi NL, Traggiai E, Lanzavecchia A. Maintenance of serological memory by polyclonal activation of human memory B cells. *Science*. 2002;298:2199-202.
330. Kelsoe G. The germinal center: a crucible for lymphocyte selection. *Semin Immunol*. 1996;8:179-84.
331. Smith KG, Hewitson TD, Nossal GJ, Tarlinton DM. The phenotype and fate of the antibody-forming cells of the splenic foci. *Eur J Immunol*. 1996;26:444-8.
332. Nossal GJ, Ada GL, Austin CM, Pye J. Antigens in immunity. 8. Localization of 125-I-labelled antigens in the secondary response. *Immunology*. 1965;9:349-57.
333. Manz RA, Thiel A, Radbruch A. Lifetime of plasma cells in the bone marrow. *Nature*. 1997;388:133-4.
334. Manz RA, Lohning M, Cassese G, Thiel A, Radbruch A. Survival of long-lived plasma cells is independent of antigen. *Int Immunol*. 1998;10:1703-11.
335. Ahmed R, Butler LD, Bhatti L. T4+ T helper cell function in vivo: differential requirement for induction of antiviral cytotoxic T-cell and antibody responses. *J Virol*. 1988;62:2102-6.
336. Slifka MK, Ahmed R. Long-lived plasma cells: a mechanism for maintaining persistent antibody production. *Curr Opin Immunol*. 1998;10:252-8.
337. Slifka MK, Antia R, Whitmire JK, Ahmed R. Humoral immunity due to long-lived plasma cells. *Immunity*. 1998;8:363-72.
338. Leyendeckers H, Odendahl M, Lohndorf A, et al. Correlation analysis between frequencies of circulating antigen-specific IgG-bearing memory B cells and serum titers of antigen-specific IgG. *Eur J Immunol*. 1999;29:1406-17.
339. Goldbaum FA, Cauerhff A, Velikovskiy CA, Llera AS, Riottot MM, Poljak RJ. Lack of significant differences in association rates and affinities of antibodies from short-term and long-term responses to hen egg lysozyme. *J Immunol*. 1999;162:6040-5.
340. Roost HP, Bachmann MF, Haag A, et al. Early high-affinity neutralizing anti-viral IgG responses without further overall improvements of affinity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92:1257-61.
341. Ochsenbein AF, Pinschewer DD, Sierro S, Horvath E, Hengartner H, Zinkernagel RM. Protective long-term antibody memory by antigen-driven and T help-dependent differentiation of long-lived memory B cells to short-lived plasma cells independent of secondary lymphoid organs. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97:13263-8.
342. Ciurea A, Klenerman P, Hunziker L, et al. Persistence of lymphocytic choriomeningitis virus at very low levels in immune mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96:11964-9.

343. Ogra S, Ogra P. Components of immunologic reactivity in human colostrum and milk. En: Ogra P, Dayton D, (Eds.). *Immunology of Breast Milk*. New York: Raven Press; 1979:185-95.
344. Porter P, Chidlow J. Response to *E. coli* antigens via local and parental routes linking intestinal and mammary immune mechanisms in passive protection against neonatal colibacillosis in the pig. En: Ogra P, Dayton D, (Eds.). *Immunology of Breast Milk*. New York: Raven Press; 1979:73-90.
345. Porter P. Adoptive immunizations of the neonate by breast factors. En: Ogra P, Dayton D, (Eds.). *Immunology of Breast Milk*. New York: Raven Press; 1979:197-206.
346. Phillips-Quagliata JM, Roux ME, Arny M, Kelly-Hatfield P, McWilliams M, Lamm ME. Migration and regulation of B-cells in the mucosal immune system. *Ann N Y Acad Sci*. 1983;409:194-203.
347. Gowans JL, Uhr JW. The carriage of immunological memory by small lymphocytes in the rat. *J Exp Med*. 1966;124:1017-30.
348. Schittek B, Rajewsky K. Maintenance of B-cell memory by long-lived cells generated from proliferating precursors. *Nature*. 1990;346:749-51.
349. Sprent J. Circulating T and B lymphocytes of the mouse. I. Migratory properties. *Cell Immunol*. 1973;7:10-39.
350. Gray D, MacLennan IC, Lane PJ. Virgin B cell recruitment and the lifespan of memory clones during antibody responses to 2,4-dinitrophenyl-hemocyanin. *Eur J Immunol*. 1986;16:641-8.
351. Askonas BA, Cunningham AJ, Kreth HW, Roelants GE, Williamson AR. Amplification of B cell clones forming antibody to the 2,4-dinitrophenyl group. *Eur J Immunol*. 1972;2:494-8.
352. Celada F. Quantitative studies of the adoptive immunological memory in mice. II. Linear transmission of cellular memory. *J Exp Med*. 1967;125:199-211.
353. Feldbush TL. Antigen modulation of the immune response. The decline of immunological memory in the absence of continuing antigenic stimulation. *Cell Immunol*. 1973;8:435-44.
354. Sprent J, Tough DF. Lymphocyte life-span and memory. *Science*. 1994;265:1395-400.
355. Sprent J. T and B memory cells. *Cell*. 1994;76:315-22.
356. Gray D, Skarvall H. B-cell memory is short-lived in the absence of antigen. *Nature*. 1988;336:70-3.
357. Maruyama M, Lam KP, Rajewsky K. Memory B-cell persistence is independent of persisting immunizing antigen. *Nature*. 2000;407:636-42.
358. Coutinho A. Lymphocyte survival and V-region repertoire selection. *Immunol Today*. 1993;14:38-40.
359. Rolink A, Haasner D, Nishikawa S, Melchers F. Changes in frequencies of clonable pre B cells during life in different lymphoid organs of mice. *Blood*. 1993;81:2290-300.
360. Nunez C, Nishimoto N, Gartland GL, et al. B cells are generated throughout life in humans. *J Immunol*. 1996;156:866-72.
361. Freitas AA, Rocha BB. Lymphocyte lifespans: homeostasis, selection and competition. *Immunol Today*. 1993;14:25-9.
362. Coutinho A. Comment. *Immunology Today*. 1993;14(1):43.
363. MacLennan I, Chan E. The dynamic relationship between B-cell populations in adults. *Immunol Today*. 1993;14:29-34.
364. Osmond DG. The turnover of B-cell populations. *Immunol Today*. 1993;14:34-7.

365. Rajewsky K. B-cell lifespans in the mouse--why to debate what? *Immunol Today*. 1993;14:40-1; discussion 41-3.
366. Tsiagbe VK, Linton PJ, Thorbecke GJ. The path of memory B-cell development. *Immunol Rev*. 1992;126:113-41.
367. Bachmann MF, Odermatt B, Hengartner H, Zinkernagel RM. Induction of long-lived germinal centers associated with persisting antigen after viral infection. *J Exp Med*. 1996;183:2259-69.
368. Paramithiotis E, Cooper MD. Memory B lymphocytes migrate to bone marrow in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94:208-12.
369. Rajewsky K. Early and late B-cell development in the mouse. *Curr Opin Immunol*. 1992;4:171-6.
370. Nicholson IC, Brisco MJ, Zola H. Memory B lymphocytes in human tonsil do not express surface IgD. *J Immunol*. 1995;154:1105-13.
371. Pascual V, Liu YJ, Magalski A, de Bouteiller O, Banchereau J, Capra JD. Analysis of somatic mutation in five B cell subsets of human tonsil. *J Exp Med*. 1994;180:329-39.
372. Klein U, Kuppers R, Rajewsky K. Human IgM+IgD+ B cells, the major B cell subset in the peripheral blood, express V kappa genes with no or little somatic mutation throughout life. *Eur J Immunol*. 1993;23:3272-7.
373. Vajdy M, Lycke N. Mucosal memory B cells retain the ability to produce IgM antibodies 2 years after oral immunization. *Immunology*. 1995;86:336-42.
374. Klein U, Rajewsky K, Kuppers R. Human immunoglobulin (Ig)M+IgD+ peripheral blood B cells expressing the CD27 cell surface antigen carry somatically mutated variable region genes: CD27 as a general marker for somatically mutated (memory) B cells. *J Exp Med*. 1998;188:1679-89.
375. Dunn-Walters DK, Isaacson PG, Spencer J. Analysis of mutations in immunoglobulin heavy chain variable region genes of microdissected marginal zone (MGZ) B cells suggests that the MGZ of human spleen is a reservoir of memory B cells. *J Exp Med*. 1995;182:559-66.
376. Agematsu K, Nagumo H, Yang FC, et al. B cell subpopulations separated by CD27 and crucial collaboration of CD27+ B cells and helper T cells in immunoglobulin production. *Eur J Immunol*. 1997;27:2073-9.
377. Maurer D, Fischer GF, Fae I, et al. IgM and IgG but not cytokine secretion is restricted to the CD27+ B lymphocyte subset. *J Immunol*. 1992;148:3700-5.
378. Liu YJ, Oldfield S, MacLennan IC. Memory B cells in T cell-dependent antibody responses colonize the splenic marginal zones. *Eur J Immunol*. 1988;18:355-62.
379. Tangye SG, Liu YJ, Aversa G, Phillips JH, de Vries JE. Identification of functional human splenic memory B cells by expression of CD148 and CD27. *J Exp Med*. 1998;188:1691-703.
380. Liu YJ, Malisan F, de Bouteiller O, et al. Within germinal centers, isotype switching of immunoglobulin genes occurs after the onset of somatic mutation. *Immunity*. 1996;4:241-50.
381. Arpin C, de Bouteiller O, Razanajaona D, et al. The normal counterpart of IgD myeloma cells in germinal center displays extensively mutated IgVH gene, Cmu-Cdelta switch, and lambda light chain expression. *J Exp Med*. 1998;187:1169-78.
382. Lycke N, Holmgren J. Adoptive transfer of gut mucosal antitoxin memory by isolated B cells 1 year after oral immunization with cholera toxin. *Infect Immun*. 1989;57:1137-41.
383. Dunkley ML, Husband AJ. Role of antigen in migration patterns of T cell subsets arising from gut-associated lymphoid tissue. *Reg Immunol*. 1989;2:213-24.

384. Jain SL, Barone KS, Michael JG. Activation patterns of murine T cells after oral administration of an enterocoated soluble antigen. *Cell Immunol.* 1996;167:170-5.
385. Vajdy M, Lycke NY. Cholera toxin adjuvant promotes long-term immunological memory in the gut mucosa to unrelated immunogens after oral immunization. *Immunology.* 1992;75:488-92.
386. Karrer U, Lopez-Macias C, Oxenius A, et al. Antiviral B cell memory in the absence of mature follicular dendritic cell networks and classical germinal centers in TNFR1^{-/-} mice. *J Immunol.* 2000;164:768-78.
387. Ahmed R, Gray D. Immunological memory and protective immunity: understanding their relation. *Science.* 1996;272:54-60.
388. Swain SL, Hu H, Huston G. Class II-independent generation of CD4 memory T cells from effectors. *Science.* 1999;286:1381-3.
389. Miyawaki S, Nakamura Y, Suzuka H, et al. A new mutation, aly, that induces a generalized lack of lymph nodes accompanied by immunodeficiency in mice. *Eur J Immunol.* 1994;24:429-34.
390. Takahashi Y, Dutta PR, Cerasoli DM, Kelsoe G. In situ studies of the primary immune response to (4-hydroxy-3-nitrophenyl)acetyl. V. Affinity maturation develops in two stages of clonal selection. *J Exp Med.* 1998;187:885-95.
391. Matsumoto M, Mariathasan S, Nahm MH, Baranyay F, Peschon JJ, Chaplin DD. Role of lymphotoxin and the type I TNF receptor in the formation of germinal centers. *Science.* 1996;271:1289-91.
392. Matsumoto M, Lo SF, Carruthers CJ, et al. Affinity maturation without germinal centres in lymphotoxin-alpha-deficient mice. *Nature.* 1996;382:462-6.
393. Fu YX, Huang G, Matsumoto M, Molina H, Chaplin DD. Independent signals regulate development of primary and secondary follicle structure in spleen and mesenteric lymph node. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94:5739-43.
394. Toellner KM, Gulbranson-Judge A, Taylor DR, Sze DM, MacLennan IC. Immunoglobulin switch transcript production in vivo related to the site and time of antigen-specific B cell activation. *J Exp Med.* 1996;183:2303-12.