



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS MOLECULAR

“Análisis del desarrollo del sistema inmune secretor de inmunoglobulinas
poliméricas en tráquea y bronquios porcinos”

TESIS

Que presenta

EDGAR RODRIGO GUZMÁN BAUTISTA

Para obtener el grado de

DOCTOR EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE
INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS MOLECULAR

Director de la Tesis

DR. MARCO ANTONIO VEGA LÓPEZ

México, D.F.

ENERO, 2016

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Inmunobiología de las Mucosas del Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular del Cinvestav-IPN, con financiamiento parcial del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (60941) y el Instituto de Ciencia y Tecnología del Distrito Federal (323/09). El autor fue becario CONACyT, CVU/No. Becario: 332187/234097, durante sus estudios de doctorado.

Dr. Marco Antonio Vega López

Director de tesis

Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular

Cinvestav-IPN

Comité tutorial

Dra. Patricia Talamás Rohana

Departamento de Infectómica y

Patogénesis Molecular

Cinvestav-IPN

Dra. Rosa María Del Ángel

Departamento de Infectómica y

Patogénesis Molecular

Cinvestav-IPN

Dr. Leopoldo Santos Argumedo

Departamento de Biomedicina Molecular

Cinvestav-IPN

Dr. Rafael Campos Rodríguez

Escuela Superior de Medicina

IPN

ÍNDICE:

| | Página |
|---|--------|
| LISTA DE ABREVIATURAS | 6 |
| LISTA DE TABLAS | 8 |
| LISTA DE FIGURAS | 8 |
| RESUMEN | 10 |
| ABSTRACT | 11 |
| INTRODUCCIÓN | 12 |
| I. ANTECEDENTES GENERALES | 13 |
| 1. Generalidades del sistema inmunitario de las mucosas | 13 |
| 2. Estructura y función del tracto respiratorio | 15 |
| 3. Inmunobiología del epitelio respiratorio | 18 |
| 4. Inmunobiología del NALT | 18 |
| 5. Inmunobiología de la mucosa respiratoria inferior | 19 |
| 6. Inmunidad respiratoria perinatal | 20 |
| II. ANTECEDENTES DIRECTOS | 21 |
| 1. Sistema inmune secretor de inmunoglobulinas poliméricas (SISIP) en el tracto respiratorio | 21 |
| 2. Inmunobiología de los linfocitos B de la mucosa respiratoria | 22 |
| 3. Transporte de inmunoglobulinas poliméricas a las superficies mucosas | 24 |
| 4. Inmunoglobulinas en la mucosa respiratoria | 26 |
| 5. El cerdo como modelo de investigación biomédico | 29 |
| 6. Bases anatomofisiológicas del tracto respiratorio porcino | 29 |
| 7. El SISIP en el tracto respiratorio porcino | 30 |
| III. JUSTIFICACIÓN | 31 |
| IV. HIPÓTESIS | 31 |
| V. OBJETIVOS | 31 |
| A. Objetivo general | 31 |
| B. Objetivos particulares | 31 |
| VI. MATERIALES Y MÉTODOS | 32 |
| 6.1 Cerdos | 32 |

| | |
|---|----|
| 6.2 Grupos de experimentación | 32 |
| 6.3 Eutanasia | 36 |
| 6.4 Obtención de muestras: | 36 |
| 6.4.1 Tejidos: | 36 |
| A) Tráquea | 36 |
| B) Bronquios mayores y accesorios porcinos | 36 |
| C) Duodeno | 37 |
| D) Conservación de los tejidos | 37 |
| 6.4.2 Secreciones mucosas | 37 |
| A) Lavado traqueal | 37 |
| B) Lavado bronquioalveolar | 38 |
| C) Secreción nasal y saliva | 38 |
| 6.4.3 Suero | 38 |
| 6.5. Inmunohistoquímica (IHQ) | 41 |
| 6.6 Cuantificación de las poblaciones celulares | 42 |
| 6.7 ELISA cuantitativa | 43 |
| 6.8 Análisis estadísticos | 45 |
| VII. RESULTADOS | 45 |
| 7.1 Estandarización de técnicas de tinción del SISIP en el tracto respiratorio porcino | 45 |
| 7.2 Identificación de células productoras de cadena J, IgM e IgA | 46 |
| 7.3 Cuantificación de CP-CJ, -IgM e -IgA en la tráquea y bronquios porcinos | 47 |
| 7.4 Expresión del SC en tráquea y bronquios porcinos | 52 |
| 7.5 Cuantificación de IgM sérica y en secreciones respiratorias | 55 |
| 7.6 Cuantificación de IgA sérica y en secreciones respiratorias | 57 |
| 7.7 Cuantificación de IgG sérica y de secreciones respiratorias | 57 |
| 7.8 Cantidad y proporción de inmunoglobulinas en el tracto respiratorio | 61 |
| 7.9 Correlación entre las células productoras de inmunoglobulinas y la secreción de inmunoglobulinas en el tracto respiratorio caudal | 61 |
| VIII. DISCUSIÓN | 65 |
| 8.1 El SISIP en la tráquea y bronquios porcinos | 65 |

| | |
|--|----|
| 8.2 Densidad celular en submucosa y lámina de la mucosa respiratoria | 65 |
| 8.3 El SC se expresa en la tráquea y bronquios de los neonatos | 67 |
| 8.4 Los MatAb son secretados en el tracto respiratorio | 68 |
| 8.5 Inmunoglobulinas monoméricas en la mucosa respiratoria | 69 |
| IX. CONCLUSIONES | 71 |
| X. PERSPECTIVAS | 72 |
| XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 73 |
| XII. ANEXOS | 85 |

LISTA DE ABREVIATURAS

Ab: Anticuerpo
APC: Célula presentadora de antígeno
BALT: Tejido linfoide asociado a bronquios
BrA: Bronquios accesorios (ramificaciones de los LB1, RB2 y RB3)
BrM: Bronquios mayores
C0D: Cerdos recién nacidos destetados
C2D: Cerdos neonatos calostrados dos días
C1.5M: Cerdos destetados
C3M: Cerdos jóvenes
C6M: Cerdos adultos
CJ: Cadena J
CP-CJ: Células productoras de cadena J
CP-IgA: Células productoras de IgA
CP-IgM: Células productoras de IgM
CP-Igs: Células productoras de inmunoglobulinas
DC: Célula dendrítica
dIgA: IgA dimérica
EPOC: Enfermedad pulmonar obstructiva crónica
FAE: Epitelio asociado a folículos
h: horas
HBSS: Solución salina balanceada de Hanks
iBALT: Tejido linfoide asociado a bronquios inducible
IgA: IgA monomérica
IgG: IgG monomérica
IHQ: Inmunohistoquímica
IRF4: Factor regulador del interferón 4
LB1: Bronquio lobular craneal izquierdo
LB2: Bronquio lobular caudal izquierdo
LBA: Lavado bronquioalveolar
LP: Lámina propia
LT: Lavado de tráquea
LTi: Células inductoras de tejido linfoide

MALT: Tejido linfoide asociado a mucosas
MatAb: Anticuerpos maternos
MB: Membrana basal
min: minutos
MIS: Sistema inmunitario de las mucosas
MUC: Mucina
NALT: Tejido linfoide asociado a nariz
PAMP: Patrones moleculares asociados a patógenos
pIgR: Receptor de inmunoglobulinas poliméricas
plgs: Inmunoglobulinas poliméricas
PRR: Receptores de reconocimiento de patrones
PMSF: *Phenylmethylsulfonyl fluoride*
RB1: Bronquio lobular craneal derecho
RB2: Bronquio lobular medio derecho
RB3: Bronquio lobular accesorio derecho
RB4: Bronquio lobular caudal derecho
SC: Componente secretor
Slgs: Inmunoglobulinas secretorias
SIgA: IgA secretoria
SIgM: IgM secretoria
SISIP: Sistema inmune secretor de inmunoglobulinas poliméricas
SM: Submucosa
SPF: *specific pathogen free*
TLCK: *Tosyl-L-lysyl-chloromethane hydrochloride*
TPCK: *Tosyl phenylalanyl chloromethyl ketone*
TSL: Linfopoyetina estromal tímica

LISTA DE TABLAS

| | Página |
|--|--------|
| Tabla 1. Deficiencia de los elementos del SISIP | 23 |
| Tabla 2. Anticuerpos primarios empleados en las IHQs del SISIP | 41 |
| Tabla 3. Análisis estadístico entre los niveles de inmunoglobulinas de los C0D y los C2D | 55 |

LISTA DE FIGURAS

| | Página |
|---|--------|
| Figura 1. Sistema inmunitario de las mucosas | 14 |
| Figura 2. Tracto respiratorio del humano | 15 |
| Figura 3. Organización de la mucosa traqueal | 16 |
| Figura 4. Células inmunes en la tráquea, bronquios y alvéolos pulmonares | 17 |
| Figura 5. Sistema inmune secretor de inmunoglobulinas poliméricas | 22 |
| Figura 6. Activación de linfocitos B en la mucosa respiratoria | 24 |
| Figura 7. Estructura del receptor de Inmunoglobulinas poliméricas (pIgR) | 25 |
| Figura 8. IgA secretoria (SIgA) | 26 |
| Figura 9. Estructura de la IgA humana | 27 |
| Figura 10. Función de las inmunoglobulinas secretorias en el lumen mucosal | 28 |
| Figura 11. Estrategia experimental para el análisis del SISIP en tráquea y bronquios porcinos | 34 |
| Figura 12. Estandarización de la tinción inmunohistoquímica para el SISIP porcino. | 35 |
| Figura 13. Obtención de la tráquea y bronquios porcinos | 39 |
| Figura 14. Zonas de estudios en tráquea, Bronquios mayores (BrM) y accesorios (BrA) porcinos | 40 |
| Figura 15. Cuantificación celular en tráquea y bronquios porcinos | 43 |

| | |
|--|----|
| Figura 16. Identificación y localización de células productoras de cadena J (A-C), IgM (D-F) e IgA (G-I) | 49 |
| Figura 17. Densidad de células productoras de cadena J, IgM e IgA en la lámina propia (A, C) y submucosa (B, D) de la tráquea (A-B) y bronquios mayores (C-D) porcinos | 50 |
| Figura 18. Relación de células positivas en la submucosa (SM)/ lámina propia (LP) de tráquea (A) y bronquios mayores porcinos (B) | 51 |
| Figura 19. Comparativo de la densidad de CP-CJ entre BrM y BrA | 51 |
| Figura 20. Cambios en los valores relativos de células positivas en la lámina propia (A-B) y submucosa (C-D) traqueal (A-C) y bronquial (B-D) | 52 |
| Figura 21. Desarrollo de la expresión del componente secretor (SC) porcino en tráquea | 53 |
| Figura 22. Desarrollo de la expresión del componente secretor (SC) porcino en bronquios mayores | 54 |
| Figura 23. Concentración de IgM sérica y en el tracto respiratorio porcino | 56 |
| Figura 24. Concentración de IgA sérica y en el tracto respiratorio caudal | 58 |
| Figura 25. Concentración de IgA en el tracto respiratorio craneal | 59 |
| Figura 26. Concentración de IgG en suero y en el tracto respiratorio | 60 |
| Figura 27. Concentración de IgG e IgA total en el tracto respiratorio porcino | 62 |
| Figura 28. Valores absolutos y relativos de IgM, IgA total e IgG en suero y en el tracto respiratorio porcino | 63 |
| Figura 29. Correlación entre la densidad celular y las inmunoglobulinas secretadas en la tráquea y bronquios porcinos | 64 |
| Figura No.30. Modelo del desarrollo del SISIP en la tráquea y bronquios porcinos | 72 |

RESUMEN

La secreción mucosal de inmunoglobulinas poliméricas (plgs) se realiza a través del sistema inmune secretor de inmunoglobulinas poliméricas (SISIP), el cual está integrado por células productoras de cadena J (CP-CJ), IgA (CP-IgA) e IgM (CP-IgM), la expresión epitelial del receptor de inmunoglobulinas poliméricas (plgR), y la eficiente liberación de las inmunoglobulinas secretorias (Slgs) al lumen mucosal (SlgA y SlgM). Alteraciones en la estructura o un deficiente desarrollo del SISIP aumentan la susceptibilidad a infecciones y enfermedades inflamatorias, principalmente en los extremos de la vida. A pesar de su importancia, los estudios sobre su desarrollo en el tracto respiratorio humano son limitados, por lo que el cerdo es una opción factible como modelo en medicina traslacional respiratoria, por su similitud anatómica, fisiológica y genética. En este trabajo se estudió el desarrollo del SISIP en la tráquea y bronquios de minicerdos vietnamita, desde el nacimiento hasta la adultez, usando inmunohistoquímica y ELISA cuantitativas. Los resultados demostraron que el componente secretor –SC- (porción extracelular del plgR) se expresa en el epitelio respiratorio desde el nacimiento e incrementa con la edad en contraste con la ausencia de CP-CJ, -IgA e IgM en dicha edad. Sin embargo, el calostro materno fue una fuente de SlgA, IgA total, SlgM e IgG en las secreciones respiratorias del neonato (lavado de tráquea –LT- y bronquioalveolar –LBA-, secreción nasal y saliva). Posteriormente, las células productoras de inmunoglobulinas (CP-Igs) incrementaron en la tráquea y bronquios de los animales destetados, jóvenes y adultos, correlacionando positivamente con la secreción de inmunoglobulinas al lumen mucosal. Los resultados demostraron que los anticuerpos maternos (MatAb) y el SC compensan la ausencia del SISIP en la tráquea y bronquios de los neonatos, encontrándose estructurado después del destete y hasta la adultez. Por otra parte, se encontraron altas concentraciones de inmunoglobulinas monoméricas (IgG e IgA) en la mucosa, sugiriendo que podrían participar en la protección local, lo que sería un aspecto novedoso a estudiar. Finalmente, el desarrollo del SISIP sugiere que la edad óptima de vacunación es después del destete, sin embargo, los neonatos podrían compensar dicha deficiencia a través del SC y la inmunidad pasiva materna.

ABSTRACT

Polymeric immunoglobulins (plgs) mucosal secretion is mediated by the plg secretory immune system (PISIS), which is composed of J-chain (JC) and antibody (IgM/IgA) producing cells (JC-AbPC), the epithelial cell expression of the plg receptor (plgR) and the efficient release of the secretory Igs (SIgs) to the mucosal lumen. A poor, uneven development or disturbances in this system may increase infection susceptibility, as observed in young and elderly people. In spite of this system's importance, few detailed studies regarding its development have been described in the lower respiratory tract of humans. Because the porcine model has been reported as a model for translational medicine to humans, we studied the tracheal and bronchial PISIS development in healthy, non-vaccinated, SPF, miniature Vietnamese pigs from birth to adulthood using immunohistochemistry and quantitative ELISA. Our results demonstrated that plgR was present at birth and its expression increased with age. In contrast, JC-AbPCs were low in neonatal pigs; however, colostrum was a source of IgM, SIgA, total IgA and IgG in respiratory secretions (trachea and bronchoalveolar lavages, nasal secretion and saliva) in piglets. JC-AbPCs steadily increased in post-weaned, young and adult pigs, correlating with considerable increases in secretory and total Igs in the trachea and bronchi. These data suggest a compensatory role of maternal Igs at the respiratory mucosa in the absence of a structured PISIS before weaning. Furthermore, monomeric Igs (IgG and IgA) may also play an important role in respiratory protection and deserves a more thorough study. Finally, SISIP development suggests that mucosal vaccination, at the respiratory tract, might be performed after weaning.

INTRODUCCIÓN

Las mucosas del organismo son superficies biológicas bajo constante estimulación antigénica. Para mantener el equilibrio entre función y protección, cuentan con mecanismos inmunobiológicos, innatos e inducibles finamente orquestados y controlados que son capaces de discernir entre las señales de peligro y las inocuas. La ausencia o deficiencia de esos mecanismos favorece la susceptibilidad a infecciones y enfermedades. El tracto respiratorio de los mamíferos es uno de dichos sitios, pero, las implicaciones bioéticas y dificultades para obtener secreciones y tejidos de humanos han limitado la investigación descriptiva, así como los estudios sobre vacunación, infecciones y enfermedades inflamatorias (Crago *et al.*, 1978; Czerkinsky *et al.*, 1987; Matzinger, 2002; Brandtzaeg, 2009; Renz *et al.*, 2011).

La secreción de inmunoglobulinas poliméricas participa en la protección de las mucosa respiratoria mediante el sistema inmune secretor de inmunoglobulinas poliméricas (SISIP) (Kaetzel, 1991; Brandtzaeg *et al.*, 2007; Corthesy, 2010; Strugnell y Wijburg, 2010; Cerutti *et al.*, 2011). En un inicio, los estudios realizados por Tomasi *et al.*, (1965) y Brandtzaeg *et al.*, (1999, 2005), sentaron las bases sobre sus elementos y transporte en el tracto gastrointestinal. En el tracto respiratorio humano, los primeros estudios sobre su papel en la protección local se obtuvieron a partir de modelos de tonsillectomía e inmunización en tonsilas (Ogra, 1971; Quiding-Jarbrink *et al.*, 1995), que posteriormente fueron descritos en el tracto respiratorio craneal y caudal del roedor (Kiyono y Fukuyama, 2004; Sun *et al.*, 2004; Tjärnlund *et al.*, 2006).

En este trabajo se analizó el desarrollo del SISIP en la mucosa respiratoria craneal (secreción nasal y saliva) y caudal (tráquea y bronquios) porcina. Primero, en los neonatos, debido a que aún se desconocen los elementos y mecanismos que mantienen la homeostasis inmunológica. Posteriormente, en los destetados y jóvenes, donde el estrés alimenticio y efectos de la madurez sexual podrían influir sobre la mucosa del tracto respiratorio. Y, finalmente, en los adultos, cuya madurez inmunológica contrasta con la aparición de enfermedades inflamatorias y/o autoinmunes. Lo anterior, con el fin de obtener información que ayude al diseño de mejores protocolos de vacunación o estrategias de modulación inmunológica.

I. ANTECEDENTES GENERALES

1. Generalidades del sistema inmunitario de las mucosas

El sistema inmunitario de las mucosas (MIS, *mucosal immune system*) se ha dividido, para su estudio, en sitios inductivos, donde se reconocen y presentan los antígenos y en sitios efectores, en los que se realizan las funciones de las células inmunes, previa migración y diferenciación celular (Figura 1, Kiyono y Fukuyama, 2004) (Brandtzaeg y Johansen, 2005, Brandtzaeg *et al.*, 2008). Lo anterior ha facilitado la comprensión de la inmunobiología de las mucosas en diversos escenarios, por ejemplo, en el estudio del efecto de la inmunidad materna, edad, género y ambiente sobre el desarrollo y maduración de las mucosas, la relación de los microorganismos patógenos y no patógenos con el hospedero y la patogénesis de algunas enfermedades inflamatorias (Crohn y alergias) (Brandtzaeg y Pabst, 2004).

Los sitios inductores y efectores forman parte del tejido linfoide asociado a las mucosas (MALT, *mucosa-associated lymphoid tissue*); incluyendo a las Placas de Peyer, el tejido linfoide asociado a nariz (NALT, *nasopharynx-associated lymphoid tissue*) y el tejido linfoide asociado a bronquios (BALT, *bronchus-associated lymphoid tissue*). En dichos compartimentos, los antígenos son capturados en la luz mucosal y transportados a la cara basolateral del epitelio del tejido a través de las Células M, las cuales se encuentran distribuidas en el epitelio asociado a folículos (FAE, *follicle-associated epithelium*). Posteriormente, los antígenos son procesados y presentados por las células presentadoras de antígeno (APC, *antigen presenting cells*) a los linfocitos T inexpertos (*naive*) o de memoria, que, a su vez, se distribuyen en la lámina propia y en los ganglios linfáticos regionales (Kiyono y Fukuyama, 2004; Sato y Kiyono, 2012). Por otro lado, las reacciones de centro germinal se realizan en los folículos mucosales, donde se favorece principalmente el cambio de isotipo de los linfocitos B hacia células plasmáticas IgA⁺ por el perfil de citocinas local: TGF- β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10.

Los linfocitos inexpertos y activados pueden migrar entre diferentes superficies mucosales debido a su capacidad para responder a patrones de migración específicos, proporcionados por adhesinas y quimiocinas (ecotaxia), por ejemplo, mediante la expresión de CCR10 en los linfocitos B IgA⁺ y su ligando CCL28 en las

células epiteliales mucosales (Kunkel *et al.*, 2003; Brandtzaeg y Pabst, 2004). En los sitios efectores, las subpoblaciones inmunes poseen diferentes perfiles inmunológicos: respuesta inmune Th1, Th2, Th17, inmunidad mediada por Linfocitos T citotóxicos o generación de células plasmáticas IgA+, IgM+, IgG+ o IgD+ (Holt *et al.*, 2008; Sato y Kiyono, 2012), por lo que el MALT puede proteger múltiples mucosas, por ejemplo, la inmunización por vía intranasal produce respuesta inmune local y en el tracto genitourinario, lo cual podría ser utilizado para desarrollar protocolos de vacunación contra el virus de la inmunodeficiencia humana y el virus del papiloma humano.

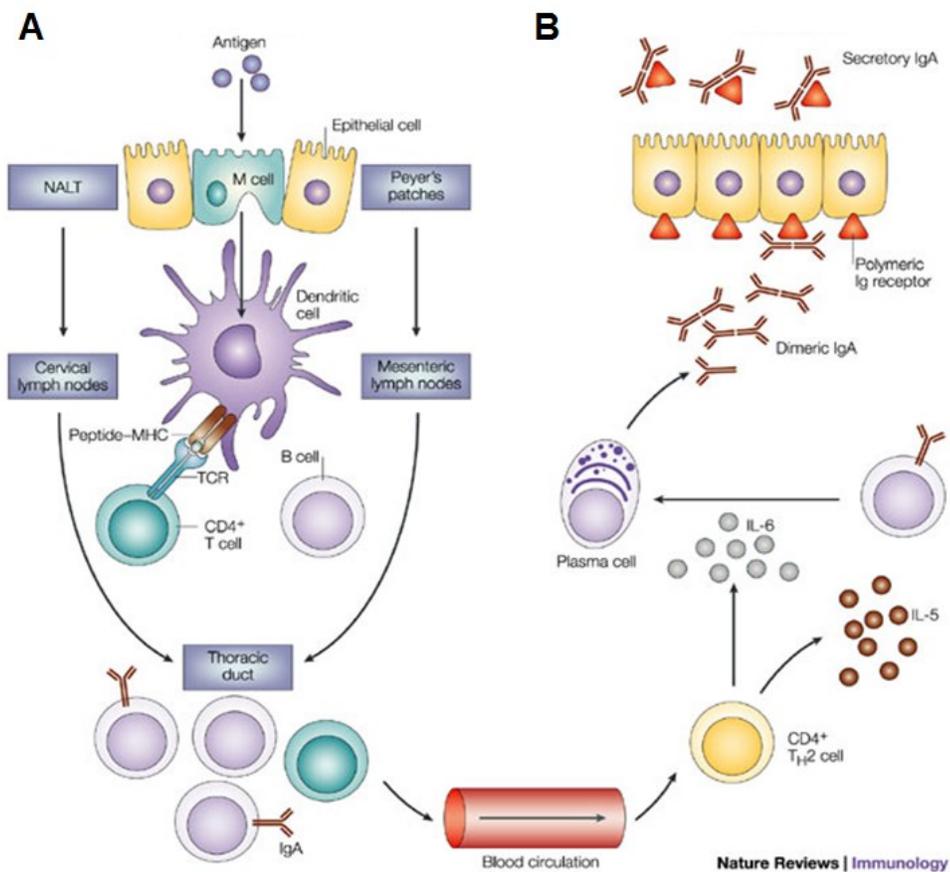


Figura 1. Sistema inmunitario de las mucosas. Mecanismos inmunológicos de los sitios inductivos, A). Del tejido linfóide asociado a nariz (NALT) y las placas de Peyer: captación, presentación de antígeno y, B). Ecotaxia de los linfocitos hacia los sitios efectores, donde se lleva a cabo la diferenciación de los linfocitos B a células plasmáticas y secreción de inmunoglobulinas secretorias al lumen mucosal. Fuente: Kiyono y Fukuyama, 2004.

2. Estructura y función del tracto respiratorio

El sistema respiratorio de los homínidos se divide en tracto superior, que comprende la cavidad nasal y orofaríngea y tracto inferior, que incluye tráquea, bronquios, bronquiolos y el espacio alveolar (Figura 2, Kato *et al.*, 2013) (Sato y Kiyono, 2012); en los cuadrúpedos se utilizan los términos craneal y caudal, respectivamente (Krejci *et al.*, 2013; Judge *et al.*, 2014,). En los humanos, dicho circuito se expone a 2000 mL de aire por cada respiración y a cerca de 10,000 litros por día en los adultos. Por lo que el tracto respiratorio es susceptible a microorganismos residentes u oportunistas (*Streptococcus pneumoniae* y *Haemophilus influenzae*) (Murphy *et al.*, 2009), microorganismos patógenos (*Corynebacterium diphtheriae* y virus de la influenza) (Hadfield *et al.*, 2000; Broadbent y Subbarao, 2011), sustancias químicas (humo del tabaco, xenobióticos) y alérgenos (polen o polvo casero). Durante el proceso de respiración, el aire se calienta y humedece en el tracto superior y, en su paso por el tracto inferior, las partículas inhaladas pueden ser atrapadas por el moco nasal y eliminadas por el movimiento mucociliar (aclaramiento mucociliar) (Reynolds, 1991). De esa forma, el aire que llega al espacio alveolar de los humanos (aproximadamente 160 m²) es prácticamente estéril, no obstante, la tráquea y bronquios pueden ser colonizados por la microbiota bajo condiciones inflamatorias (Hilty *et al.*, 2010; Huang *et al.*, 2011, Sato y Kiyono, 2012; Marsland y Gollwitzer, 2014).

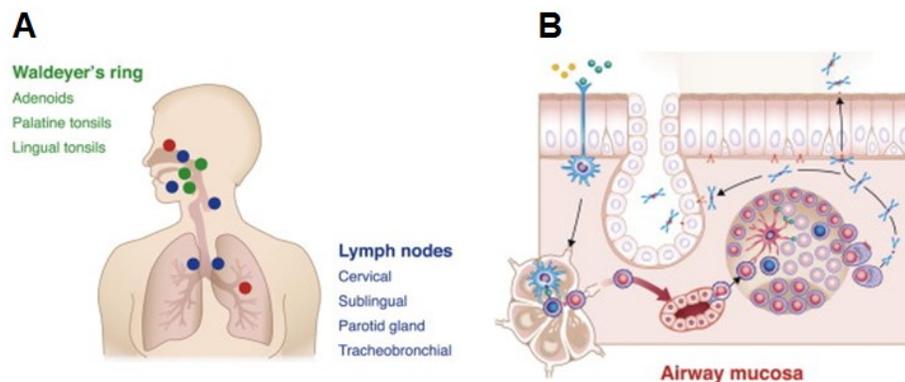


Figura 2. Tracto respiratorio del humano. A). En los humanos, el tracto respiratorio superior incluye el anillo de Waldeyer (puntos verdes) y ganglios linfáticos (puntos azules); en el tracto inferior (tráquea y pulmón) también pueden localizarse ganglios linfáticos locales. B). Ambos compartimentos cuentan con los sitios inductores y efectores (puntos rojos) del sistema inmune mucosal. Fuente: Kato *et al.*, 2013.

Los conductos aéreos separan al espacio interno del externo a través de las superficies mucosas, que incluyen al epitelio respiratorio, la membrana basal, la lámina propia (LP) y la submucosa (SM) (Figura 3). Las fosas nasales y la laringe están recubiertas por un epitelio escamoso; las turbinas nasales y el árbol traqueobronquial por un epitelio ciliar-columnar pseudoestratificado y el espacio alveolar, en su mayoría, por una monocapa epitelial (pneumocitos tipo I), en la que se realiza el intercambio gaseoso (Reynolds, 1991, Holt *et al.*, 2008).

El epitelio respiratorio posee principalmente tres tipos de células secretoras: células caliciformes, células Clara y células mucosas/serosas, todas ellas mantienen protegidas o lubricadas a las superficies mucosas. Las células del epitelio se unen a través de las proteínas de la unión estrecha (occludinas y claudinas) y adherentes (E-cadherina) y forman una barrera que produce mucinas (MUC) que pueden anclarse a la membrana celular (MUC1, 4 y 16) o secretarse al lumen mucosal (MUC2, 5AC, 5D y 19) (Thornton *et al.*, 2008; Tsukita *et al.*, 2008, Turner y Jones, 2009; Yonemura, 2011). La membrana basal proporciona soporte al epitelio respiratorio, al mismo tiempo que limita el acceso de algunas partículas, sin embargo, su permeabilidad puede afectarse ante la estimulación antigénica o inflamación (histamina), permitiendo la entrada de los microorganismos a los compartimentos mucosales y sistémicos (Reynolds, 1991).

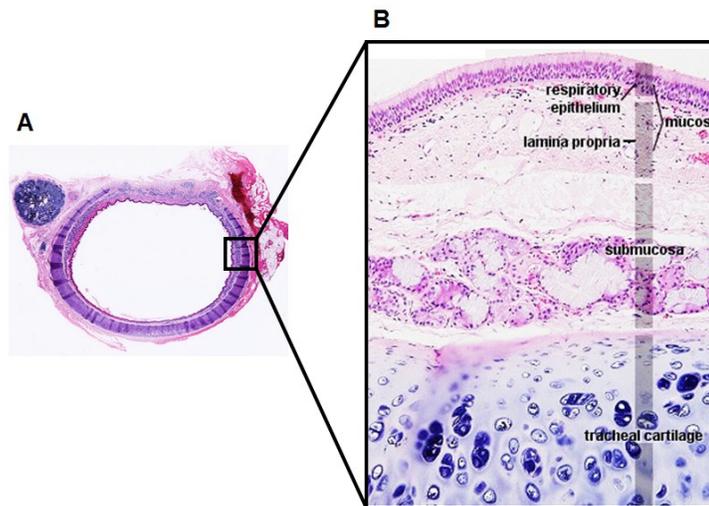


Figura 3. Organización de la mucosa traqueal. A). Corte transversal de los anillos de la tráquea. B). Se observa el epitelio respiratorio, sostenido por la membrana basal, la cual

delimita a la lámina propia y contigua a la submucosa rodeada por cartílago hialino. Adaptada de: http://medcell.med.yale.edu/histology/respiratory_system_lab/trachea.php

En la LP es posible encontrar células inmunes: linfocitos T, B, APC, células plasmáticas, mastocitos, etc. (Figura 4) (Holt *et al.*, 2008). En la submucosa traqueal y bronquial se concentra gran parte de las glándulas de secreción (mucosas y serosas) que producen grandes cantidades de moco (Evans y Koo, 2009). Los compartimentos mucosales de la tráquea y los bronquios están rodeados por cartílago hialino, cuyo espesor disminuye con las ramificaciones bronquiales, desapareciendo en los bronquiolos, alvéolos y espacio alveolar. Lo anterior demuestra que las diferencias morfológicas del tracto respiratorio se reflejan en perfiles diferenciales de secreción de mucinas, células inmunes y secreción de Igs al lumen mucosal.

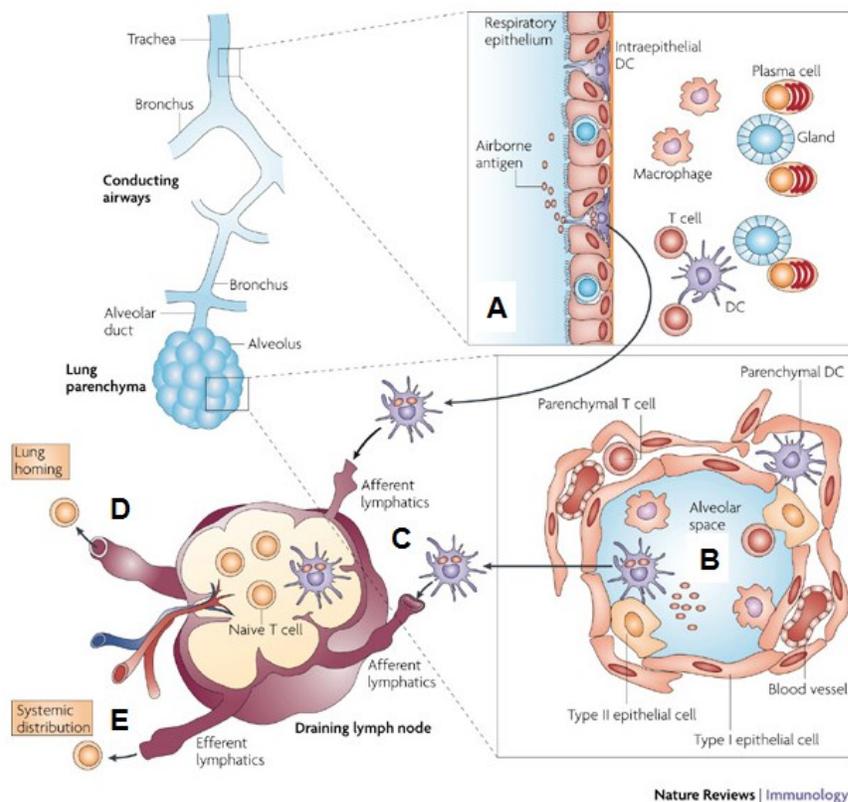


Figura 4. Células inmunes en la tráquea, bronquios y alvéolos pulmonares. En la tráquea y bronquios, A). Se han identificado diversas poblaciones inmunes en la lámina propia y submucosa. En el espacio alveolar, B). Los antígenos pueden ser reconocidos por

las células dendríticas locales y, C). Migrar a los ganglios locales para generar linfocitos antígeno-específicos, D). Que posteriormente regresan al pulmón o, E). Pasan a la circulación sistémica. Fuente: Holt *et al.*, 2008.

3. Inmunobiología del epitelio respiratorio

En el tracto respiratorio, la homeostasis entre respiración y protección se sostiene a través de estrategias físicas (Sato y Kiyono, 2012), innatas (Takeuchi y Akira, 2009; Renz *et al.*, 2011) e inducibles (Kiyono y Fukuyama, 2004). Los mecanismos físicos los proporciona el epitelio respiratorio formando una barrera impermeable que separa al ambiente interno del externo (Renz *et al.*, 2011). En condiciones basales, las células epiteliales producen factores inespecíficos para mantener protegida a las mucosas, por ejemplo: surfactantes, péptidos antimicrobianos (Hiemstra, 2007), mucinas, complemento y glicocálix (Reynolds, 1991). En contraste, la inflamación puede afectar la permeabilidad de las superficies mucosas y favorecer las señales de peligro, que a su vez puede ser reparadas por IL-25, IL-33 y la linfopoyetina estromal tímica (TSL, *thymic stromal lymphopoietin*). Los microorganismos pueden ser reconocidos por las células epiteliales mediante receptores de reconocimiento de patrones (PRR, *pattern recognition receptors*) como los TLRs, desencadenando la secreción de péptidos antimicrobianos o el reclutamiento de células fagocíticas (Hiemstra, 2007). La participación del epitelio respiratorio ha sido poco explorada durante la etapa perinatal y la senectud, sin embargo, la inducción y modulación de las señales que produce, podrían ayudar a dirigir la inmunidad contra patógenos o disminuir la susceptibilidad a enfermedades inflamatorias.

4. Inmunobiología del NALT

En el tracto respiratorio superior de los humanos, los ganglios regionales y el anillo de Waldeyer -tonsila palatina y las amígdalas-, participan en la inducción y modulación de la respuesta inmunitaria mucosal (Figura 2). Su equivalente es el NALT en el roedor, localizado a ambos lados del ducto nasofaríngeo y conformado por el FAE, venas endoteliales altas, APC, linfocitos T y B (Sosa *et al.*, 2009; Kiyono y Fukuyama, 2004). En el FAE se han identificado células M, las cuales pueden detectar y captar a los antígenos de la superficie de la mucosa (Hameleers *et al.*, 1989), transportarlos hacia la cara basolateral donde son procesados por las DC y macrófagos (Porgador *et al.*, 1998; Kiyono y Fukuyama, 2004). En el ratón, el NALT

aparece después del nacimiento (Fukuyama *et al.*, 2002), por los estímulos internos y ambientales, su formación es independientemente de la linfotóxina- $\alpha_1\beta_2$, una citocina proinflamatoria que participa en la formación de los órganos linfoides secundarios, su receptor (linfotóxina- βR) y de IL-7 (Fukuyama *et al.*, 2002, Harmsen *et al.*, 2002), a diferencia de las placas de Peyer. El precursor estromal del NALT, CD3-CD4^{low}CD45+, se regula por ID2, un factor de transcripción miembro de las proteínas inhibitorias de unión a DNA, cuya activación produce citocinas e integrinas para la acumulación de las células linfoides (Yokota *et al.*, 1999). Lo anterior proporciona al NALT los elementos necesarios para generar tolerancia inmunológica y memoria antígeno específica.

5. Inmunobiología de la mucosa respiratoria inferior

Los principales compartimentos del árbol traqueobronquial son los conductos aéreos cubiertos por tejido mucosal y el parénquima pulmonar (Figura 4) (Holt *et al.*, 2008). En dichas regiones es posible identificar diferentes poblaciones inmunes:

Conductos aéreos. Las células ciliadas y caliciformes participan en la producción y secreción de inmunoglobulinas, al igual que lo hacen las glándulas de secreción mucosa. Las DC residentes, en su mayoría son de origen mieloide, se localizan por debajo del epitelio y adyacentes a la membrana basal, permitiendo que sus prolongaciones atraviesen las uniones intercelulares hacia la luz mucosal, aunque no son buenas presentadoras de antígeno (Nelson *et al.*, 1994; Stumbles *et al.*, 1998; Jahnsen *et al.*, 2001, 2006; Tscherning *et al.*, 2001, 2006). Algo similar pasa en el intestino (Rescigno *et al.*, 2001). En el epitelio respiratorio se han identificado linfocitos intraepiteliales T CD8+ y en la LP linfocitos T CD4+ de memoria y/o efectores, células cebadas, células plasmáticas IgA+ e IgG+ y en menor cantidad IgD+ e IgM+, así como folículos de linfocitos B (Lund *et al.*, 2006), todas ellas aledañas al FAE y células M pulmonares (Teitelbaum *et al.*, 1999) u organizadas en BALT (Bienenstock *et al.*, 1973).

El desarrollo del BALT es embrionario en el conejo (Racz *et al.*, 1977) y en los ratones, en cerdos y humanos depende de los estímulos antigénicos e inflamación, por lo que se considera un tejido linfoide terciario, también llamado iBALT (BALT inducible) (Delventhal *et al.*, 1992; Chvatchko *et al.*, 1996; Tschernig y Pabst, 2000). Dentro de la organogénesis del iBALT murino, se ha descrito que no depende de

células inductoras de tejido linfoide (LTi) ni de LT- $\alpha_1\beta_2$ - LT- β R, como en el NALT, pero sí de linfocitos CD4+IL-17+ y la expresión de CXCL13 y CCL19 (Rangel-Moreno *et al.*, 2011; Zhu y Fu, 2012). La participación del iBALT en la protección contra patógenos se ha demostrado con el virus de la influenza (Moyron-Quiroz *et al.*, 2004), por lo que la inducción de iBALT, podría ser una estrategia para controlar las infecciones en las etapas de mayor susceptibilidad a infecciones.

Parénquima pulmonar. Las células inmunes pueden localizarse en la luz de los alvéolos y subyacentes al parénquima. En condiciones homeostáticas predominan los macrófagos alveolares (90%) sobre las DC, linfocitos T y B y células cebadas, a excepción de células plasmáticas, que no se encuentran en dicho compartimento (Strickland *et al.*, 1996).

6. Inmunidad respiratoria perinatal

El establecimiento de la homeostasis respiratoria inicia desde las etapas tempranas de vida a través de la señalización vía PRRs en las células epiteliales, la exclusión inmune y la inducción de tolerancia inmunológica para algunos antígenos aéreos (Amoudruz *et al.*, 2005; Renz *et al.*, 2011; Dowling y Levy, 2014). Durante el primer trimestre de gestación humana, el pulmón produce TLR-2 y TLR-4, incrementando después del nacimiento (Harju *et al.*, 2001; Petrikin *et al.*, 2010). Dentro de los primeros dos años de vida, estudios realizados en linfocitos T y monocitos demuestran que los patrones de activación y secreción de citocinas cambian con la edad, por ejemplo, el perfil de citocinas TH1 es bajo al nacimiento e incrementa posteriormente junto con la producción de IL-1 β , TNF, IL-6 e IL-12 (Yerkovich *et al.*, 2007; Corbett *et al.*, 2010; Tulic *et al.*, 2011). Así, la expresión de TLRs en el tracto respiratorio y la activación de linfocitos influyen en la inducción de respuesta inmune en los neonatos (Levy, 2007).

Algunos estudios sugieren que la inducción de tolerancia inmunológica pulmonar se relaciona con factores genéticos, inmunidad materna y estimulación antigénica temprana (“hipótesis de la higiene”). Estudios en ratones demuestran que la exposición constante a los alérgenos produce tolerancia alérgeno-específica (Holt *et al.*, 1981), e incluso puede transferirse de la madre a su descendencia (Uthoff *et al.*, 2003, Polte *et al.*, 2008) a través del paso de IgG alérgeno-específica maternal al feto durante la gestación (Blumer *et al.*, 2007) o por complejos alérgeno-anticuerpo

durante la lactancia (Verhasselt *et al.*, 2008). Además, las células epiteliales alveolares pueden presentar alérgenos a los linfocitos T y estimular la generación de linfocitos T FoxP3+IL-10+ en los neonatos, aunque aún no son del todo claros los efectos a largo plazo (Gereke *et al.*, 2009). Si bien la información obtenida en el tracto gastrointestinal se ha utilizado como referencia para el tracto respiratorio, la compartimentalización y la estimulación antigénica producen escenarios inmunológicos que necesitan ser estudiados en mayor detalle desde la gestación y postnacimiento (Vance *et al.*, 2005; Fujihashi y Kiyono 2009; Heier *et al.*, 2011; Dowling y Levy, 2014; Gollwitzer y Marsland, 2015).

II. ANTECEDENTES DIRECTOS

1. Sistema inmune secretor de inmunoglobulinas poliméricas (SISIP) en el tracto respiratorio

En las superficies mucosas, la secreción de inmunoglobulinas poliméricas (plgs) es coordinada por el SISIP (Tomasi *et al.*, 1965; Bradtzaeg y Johansen, 2005), inicialmente descrito en el intestino y posteriormente en la mucosa respiratoria (Sato y Kiyono, 2012). Los elementos que participan en la estructuración del SISIP son: las células productoras de inmunoglobulinas poliméricas, el plgR y la liberación de Slgs al lumen mucosal (Figura 5).

Los linfocitos B pueden diferenciarse a células plasmáticas en la LP de la mucosa (Bradtzaeg y Johansen, 2005; Cerutti, 2008; Corthesy, 2010). Así, los monómeros de IgA o IgM, producidos por la células plasmáticas mucosales, se unen intracelularmente a través de una proteína denominada Cadena J (CJ), dando lugar a las plgs (Johansen *et al.*, 2000, 2001). El transporte de las plg a través de las células epiteliales se conoce como transcitocis y depende del reconocimiento por el plgR. En el lado luminal, una porción del plgR es eliminada y las plgs retienen la porción extracelular, también llamada componente secretor (SC, del inglés *secretory component*), dando lugar a SlgA y SlgM (Kaetzel *et al.*, 1991; Kaetzel, 2005; Sun *et al.*, 2004; Tjärnlund *et al.*, 2006).

La SlgA y SlgM evitan que los microorganismos invadan la LP y se dispersen en las vías respiratorias a través de la “exclusión inmune”. Además, las plgs pueden unirse a microorganismos patógenos que han invadido las superficies mucosas y

neutralizar su actividad biológica (Strugnell y Wijburg, 2010). Finalmente, se ha demostrado que la ausencia del pIgR aumenta la susceptibilidad a infecciones respiratorias, debido a la falta de secreción de Sigs en las superficies mucosas (Sun *et al.*, 2004; Tjärnlund *et al.*, 2006).

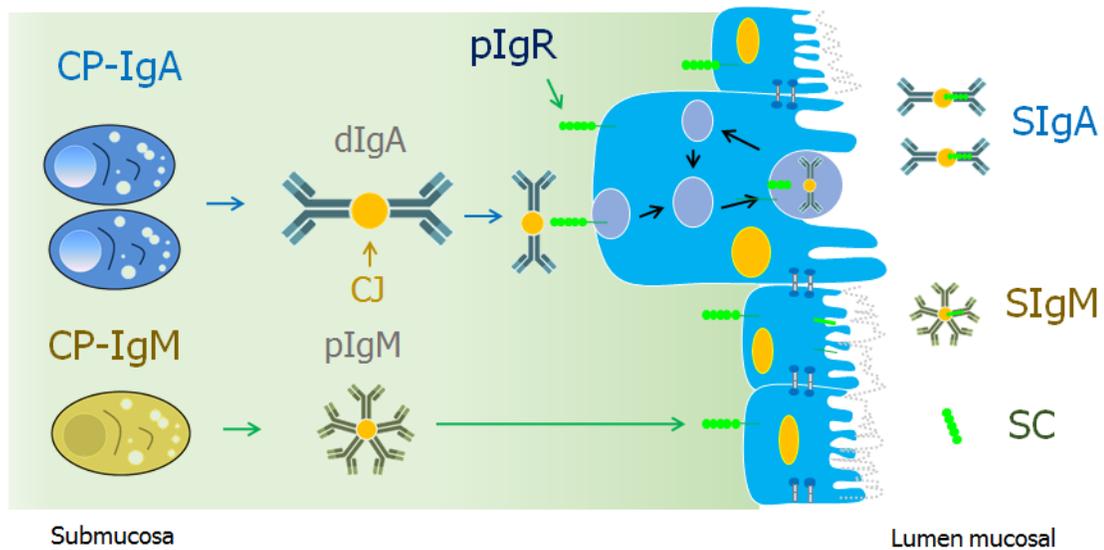


Figura 5. Sistema inmune secretor de inmunoglobulinas poliméricas. Las células productoras de IgA o IgM (CP-IgA, -IgM) sintetizan a la cadena J (CJ), la cual participa en la formación de las inmunoglobulinas poliméricas, dIga (IgA dimérica) o pIgM (IgM polimérica), que posteriormente son transportadas por el receptor de inmunoglobulinas poliméricas (pIgR) hacia el lumen mucosal y liberadas unidas al componente secretor (SC), recibiendo el nombre de inmunoglobulinas secretorias (SIgA y SIgM). Adaptado de Brandtzaeg, 2009 y Kato *et al.*, 2013.

La importancia de los elementos del SISIP ha quedado evidenciada en los roedores deficientes para cada uno de sus elementos y en inmunodeficiencias de inmunoglobulinas en humanos (Metzger, 2007; Cunningham-Rundles, 2009) (Tabla 1).

2. Inmunobiología de los linfocitos B de la mucosa respiratoria

El perfil de isotipo y ecotaxia de los linfocitos B mucosales se define por el microambiente de citocinas y las DCs locales (Macpherson *et al.*, 2008; GeurtsvanKessel *et al.*, 2009). Además, pueden circular entre los órganos linfoides secundarios y terciarios (iBALT), donde pueden activarse y diferenciarse a células

plasmáticas de larga vida (Chvatchko *et al.*, 1996; Moyron-Quiroz *et al.*, 2006; Rangel-Moreno *et al.*, 2007). En este proceso podrían participar factores identificados para el intestino, aunque los estudios confirmatorios no se han realizado para todos los casos, por ejemplo: Blimp-1 y el factor regulador del interferón 4 (IRF4), en el desarrollo de las células plasmáticas; Bcl-6, en las reacciones de centro germinal y los factores de la familia del TNF (BAFF y APRIL) durante el cambio de isotipo y supervivencia de los linfocitos B (Figura 6) (Macpherson *et al.*, 2008; Cerutti *et al.*, 2011; Kato *et al.*, 2013).

Tabla 1. Deficiencia de los elementos del SISIP

| ELEMENTO | REPERCUSIÓN | COMPENSACIÓN |
|----------------------|---|--|
| pIgR -/- (ratón) | <ol style="list-style-type: none"> Inflamación y aumento de la permeabilidad a antígenos en el epitelio mucosal. Susceptibilidad a <i>Mycobacterium tuberculosis</i> y <i>Streptococcus pneumoniae</i>. Predisposición a EPOC. Disminución de células productoras de IgA en intestino delgado y de la secreción de plg. | Aumento de IgA monomérica en suero (100 veces más respecto al normal). |
| Cadena J -/- (ratón) | <ol style="list-style-type: none"> Reducción del número de células productoras de IgA e IgM en la submucosa intestinal Mecanismo de transporte de IgA independiente al de pIgR Susceptibilidad a infecciones respiratorias no se ha evaluado. | Incremento de la IgA monomérica. |
| IgA -/- (ratón) | <ol style="list-style-type: none"> Susceptibilidad a <i>Mycobacterium tuberculosis</i> y <i>Streptococcus pneumoniae</i>. En ambos casos se logra eliminar el agente infeccioso. Deficiencia en la actividad de células T. Sinusitis, bronquitis, neumonía, alergias (inmunodeficiencia de IgA) | Incremento en los niveles de IgM, IgG1 e IgG2 en intestino y suero. Reducción de IgG3 e IgE sérica. |

Abreviaturas: EPOC: enfermedad pulmonar obstructiva crónica, plg: inmunoglobulinas poliméricas, pIgR: receptor de inmunoglobulinas poliméricas, SISIP: sistema inmune secretor de inmunoglobulinas poliméricas.

Por otro parte, las células plasmáticas migran a través de la integrina $\alpha 4\beta 1$ y el receptor de quimiocinas CCR10, cuyos ligandos son VCAM-1 en los vasos sanguíneos y CCL28 para el epitelio respiratorio (Cyster, 2003; Kiyono y Fukuyama, 2004; Brandtzaeg, 2009). Adicionalmente, en la mucosa respiratoria también se han identificado poblaciones de células plasmáticas IgG+ o IgM+, así como linfocitos B

IgM-IgD+ en la mucosa nasal y tonsilar, estos últimos inicialmente descritos como linfocitos B inexpertos (Cerutti *et al.*, 2011). Finalmente, las alteraciones en el desarrollo de los linfocitos B mucosales se asocian con la predisposición al asma, neumonitis por hipersensibilidad, fibrosis pulmonar idiopática, EPOC, sarcoidosis, enfermedades autoinmunes o en el trasplante de aloinjertos (pulmón) (Arnaboldi *et al.*, 2005; Gosman *et al.*, 2006; Cunningham-Rundles, 2008; Karlsson *et al.*, 2010; Kato *et al.*, 2013).

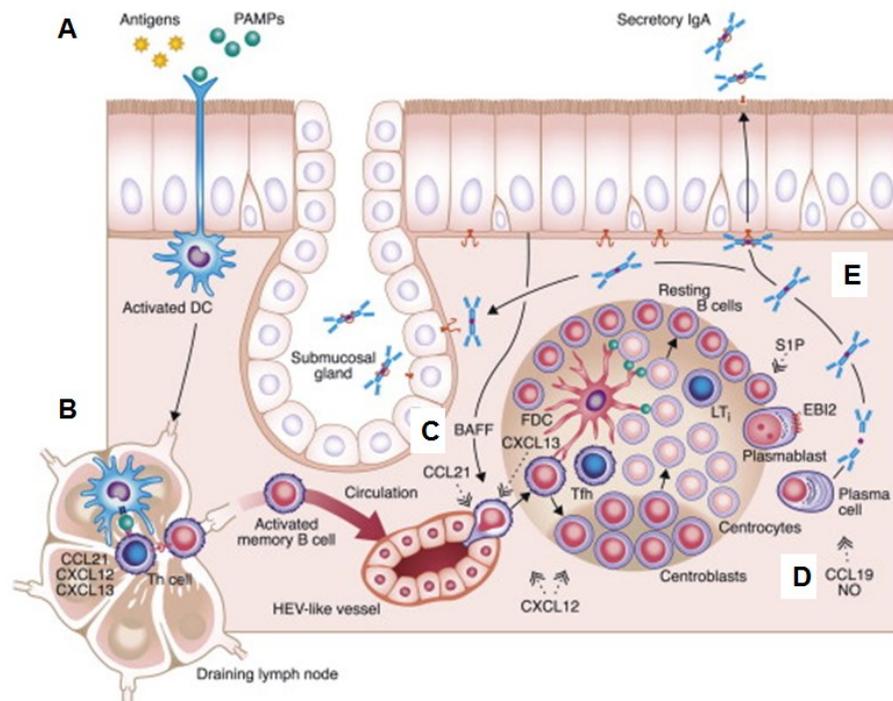


Figura 6. Activación de linfocitos B en la mucosa respiratoria. Los antígenos son reconocidos en el lumen mucosal (A) y presentados a los linfocitos B en los ganglios locales (B), donde diferentes quimiocinas influyen sobre su migración a los sitios efectores (C) y son diferenciados a células plasmáticas (D) donde producirán inmunoglobulinas que serán transportadas a las superficies mucosas (E). Fuente: Kato *et al.*, 2013.

3. Transporte de inmunoglobulinas poliméricas a las superficies mucosas

El SISIP transporta a las SIgs desde la cara basolateral de la célula epitelial a la luz mucosal a través de un proceso conocido como transcitosis. En dicho proceso participa el pIgR, una proteína que producen las células epiteliales con cinco

dominios extracelulares, un segmento transmembranal y una porción de 103 aminoácidos en la porción intracelular (Figura 7) (Kaetzel, 2005, 2014). En la transcitosis las plgs son endocitadas mediante vesículas revestidas de clatrina y transportadas por endosomas tempranos hacia la porción basolateral de las células epiteliales. Después, las plgs son translocadas a los endosomas de reciclaje apical por un proceso dependiente de microtúbulos, para después fusionar a los endosomas con la membrana plasmática apical (Johansen y Kaetzel, 2011). La liberación del complejo plgs-plgR en la porción apical, asegura que el transporte de las plgs sea unidireccional. Durante la transcitosis, las plgs se unen covalentemente al SC a través de enlaces disulfuro (Figura 8); dicho complejo, es decir, las SIgs, es liberado mediante una serina proteasa de neutrófilos (Pilette *et al.*, 2003, Ratajczak *et al.*, 2010) en el lumen mucosal (Kaetzel, 2005, 2007).

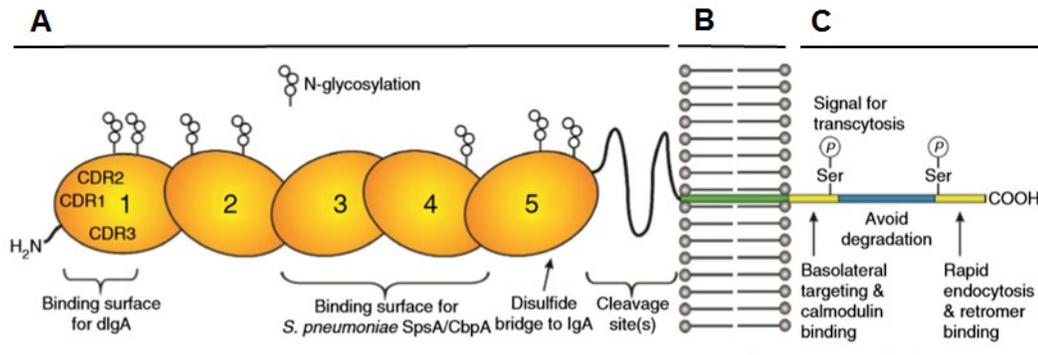


Figura 7. Estructura del receptor de Inmunoglobulinas poliméricas (plgR). Esquema del plgR donde se muestra su porción extracelular –SC, componente secretor- (A), el dominio transmembranal (B) y el intracelular (C). Fuente: Kaetzel, 2005.

Por cada ronda de transporte de SIgs se utiliza una molécula del plgR; por lo que su expresión determina el nivel de SIgs o SC en las superficies mucosas (Johansen y Kaetzel, 2011). La expresión del plgR se estimula con patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP's) y citocinas proinflamatorias en cultivos celulares (IFN- γ , TNF, IL-1, IL-4 e IL-17) (Jaffar *et al.*, 2009; Kaetzel, 2005). La disminución del plgR se asocia con un aumento en la predisposición a EPOC, infecciones y alergias (Johansen y Kaetzel, 2011). Por otra parte, el plgR puede ser utilizado como receptor de entrada para el *Streptococcus pneumoniae* en el epitelio respiratorio (Kaetzel, 2005, 2014). Esto sugiere que el plgR se originó como un

mecanismo de defensa innata, que participa en la exclusión inmune a través de interacciones no covalentes, independientemente de su unión a las plgs (Phalipon y Corthesy, 2003; Kaetzel *et al.*, 2005). Sobre la función del SC en los neonatos se sabe poco, a pesar de que podría jugar un papel compensatorio en tanto se desarrollan los mecanismos de inmunidad inducible.

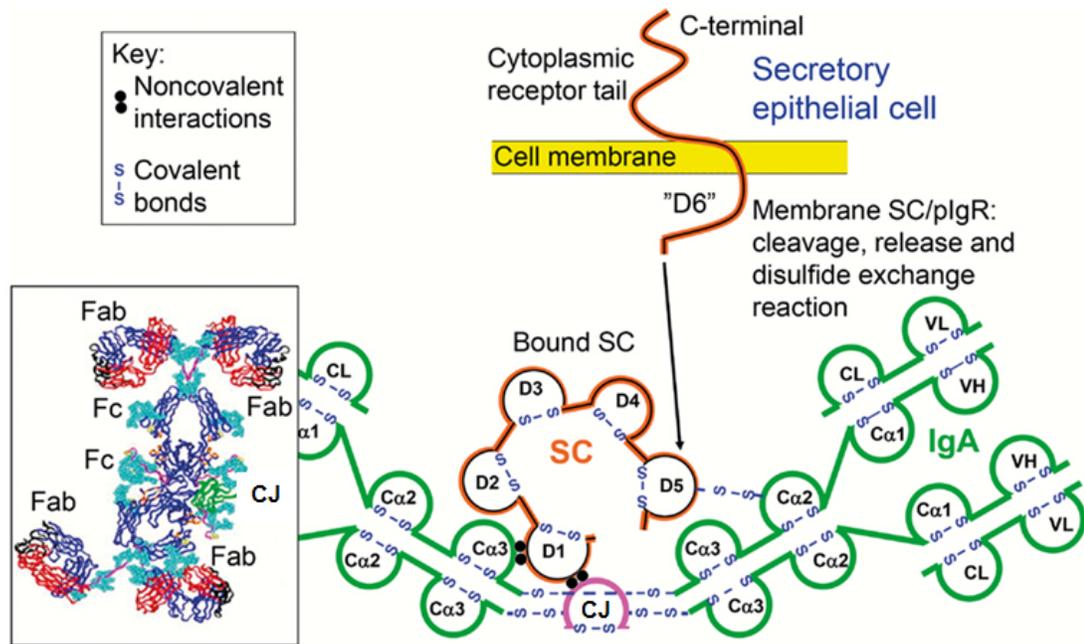


Figura 8. IgA secretoria (SIgA). La SIgA está formada por dos monómeros de IgA unidos a través de una proteína denominada cadena J (CJ). Las cadenas pesadas de la IgA se unen a dominios (D) del componente secretor (SC) por enlaces disulfuro (Cα2-D5) o enlaces no covalentes (CJ-D1-Cα3). Fuente: Brandtzaeg, 2013.

4. Inmunoglobulinas en la mucosa respiratoria

La secreción de SIgs es el paso final de la función del SISIP. Dentro de ellas, la IgA es la principal inmunoglobulina en el tracto respiratorio humano (Mestecky y McGhee, 1987; Brandtzaeg, 1999). En el pulmón predomina la SIgA en los lóbulos craneales, sin embargo, su concentración disminuye en los bronquios distales en tanto que aumenta la de IgG (Daniele, 1990; Pilette *et al.*, 2003; Brandtzaeg *et al.*, 2007; Metzger, 2007; Ehrenstein y Notley, 2010). En la secreción nasal y el lavado bronquioalveolar (LBA) se han identificado dos subclases de IgA: la IgA1 que se encuentra en ambas secreciones y, la IgA2, cuya proporción es ligeramente menor

en bronquios (Figura 9) (Cerutti *et al.*, 2011). En dichas secreciones la IgA funciona controlando a la microbiota a través de la exclusión inmune (Suzuki *et al.*, 2004; Petersson *et al.*, 2007; Obata *et al.*, 2010) o evitando la generación de clones de linfocitos B autorreactivos (Fagarasan y Honjo, 2003; Cerutti, 2008). También puede formar complejos antígeno-anticuerpo que son procesados por las DCs locales (Mantis *et al.*, 2002; Kadaoui y Corthesy, 2007), secretar a los microorganismos desde la LP hacia el lumen mucosal (Phalipon y Corthesy, 2003), neutralizar antígenos intracelulares (Fernandez, 2003) o promover su fagocitos vía Fc α RI (Figura 10) (Pasquier *et al.*, 2005).

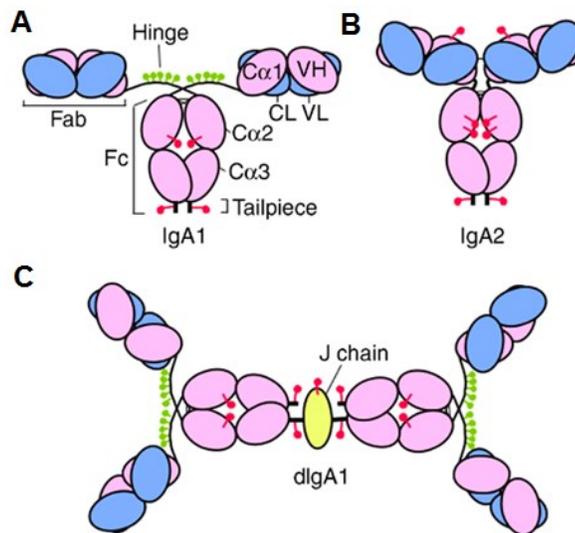


Figura 9. Estructura de la IgA humana. Estructura de la IgA1 (A) e IgA2 (B) monomérica y la IgA1 dimérica (C). Los sitios de N y O-glicosilación se muestran en rojo y verde respectivamente. Fuente: Woof y Russell, 2011.

En las secreciones respiratorias también es posible encontrar SIgM, que participa de forma muy similar a la SIgA, o inmunoglobulinas monoméricas como la IgG e IgE, que propiciarían mecanismos inflamatorios, o la IgD, cuyo papel aun no es del todo claro, aunque se ha demostrado que puede participar en la protección contra bacterias respiratorias como *Moraxella catarrhalis* y *Haemophilus influenzae* o como intermediario entre la inmunidad innata e inducible, dado que puede unirse a los basófilos y mastocitos de las tonsilas (Chen *et al.*, 2009; Cerutti *et al.*, 2011).

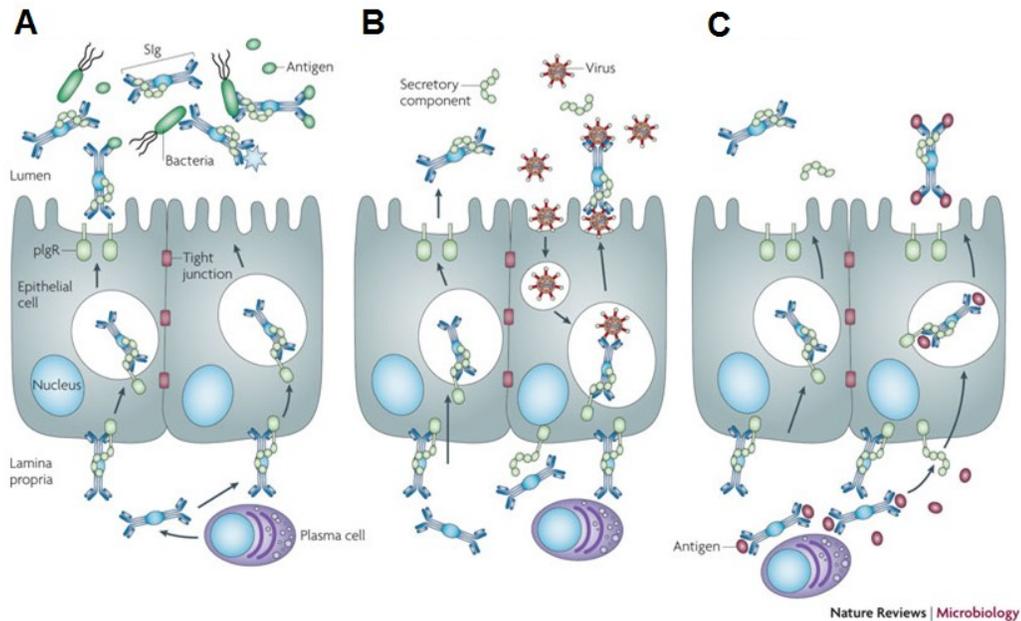


Figura 10. Función de las inmunoglobulinas secretorias en el lumen mucosal. Exclusión inmune (A), neutralización intracelular (B) y excreción de antígenos (C) a través de inmunoglobulinas secretorias (SIgA ó SIgM). Fuente: Strugnell and Wijburg, 2010.

Los pacientes con inmunodeficiencia de IgA son ligeramente más susceptibles a infecciones en el tracto respiratorio, sin embargo, el efecto protector puede ser compensado por la SIgM, IgG e IgD (Arulanandam *et al.*, 2001; Horton *et al.*, 2013). En pacientes con inmunodeficiencia común variable, los niveles de IgM séricos por lo general permanecen constantes, en tanto que la producción de IgA e IgG disminuye como consecuencia de las mutaciones de BAFF-R o TACI, pero no se afecta la secreción de SIgM (Buckley, 2004; Cunningham-Rundles y Ponda *et al.*, 2005). Otra enfermedad en la que se ha observado el papel de las inmunoglobulinas sobre las superficies mucosas es la agamaglobulinemia ligada al cromosoma X, en la que incrementan las infecciones respiratorias cuando disminuyen los niveles de IgG de origen materno en los infantes (Conley *et al.*, 2009). Por otra parte, en algunas enfermedades, la sobreproducción de inmunoglobulinas puede impactar la protección respiratoria. Por ejemplo, en el síndrome de hiper-IgM aumenta la concentración de IgM sérica y disminuyen dramáticamente los niveles de IgG, IgA, IgD e IgE; lo cual favorece la infección por *Pneumocystis carinii* (Jesus *et al.*, 2008). Los estudios demuestran que las inmunoglobulinas pueden influir en la protección local acorde al isotipo y compartimento, por lo que la información detallada sobre su

desarrollo y producción ayudará a mejorar las estrategias de protección. Finalmente, es claro que cualquier alteración en los componentes del SISIP, redundará en una menor eficiencia del sistema inmune mucosal, aumentando la susceptibilidad a enfermedades respiratorias, como se ha visto en los extremos de la vida.

5. El cerdo como modelo de investigación biomédico

El modelo porcino ha contribuido significativamente a la investigación biomédica en las últimas décadas, en parte por su proximidad anatómica, fisiológica y genética con el humano. Actualmente, el cerdo es utilizado como modelo de medicina traslacional respiratoria, incluyendo infecciones, patologías (fibrosis quística), o el diseño y mejora de estrategias terapéuticas o xenotransplantes. Sin embargo, aún existen algunas limitantes para establecer protocolos eficientes de vacunación mucosales, principalmente en los extremos de vida (Butler *et al.*, 2009a, b; Meurens *et al.*, 2012; Judge *et al.*, 2014).

En el grupo de Vega-López *et al.*, se ha establecido un modelo de estudio del sistema inmune pulmonar usando al minicerdo Vietnamita (Balam-May *et al.*, 2014, Guzmán-Bautista *et al.*, 2014). Dentro de esos estudios se incluyen nuevas estrategias de inmunización para generar respuesta inmune en la mucosa respiratoria, inmunización perinatal y el estudio del efecto de los factores de origen materno que modulan la respuesta inmunitaria neonatal. Los resultados han demostrado que existe una sólida regulación inmune de las mucosas y que los neonatos son capaces de responder a la inmunización en el tracto respiratorio.

6. Generalidades anatomofisiológicas del tracto respiratorio porcino

El tracto respiratorio porcino se divide en craneal (cavidad nasal y nasofaringe) y caudal (laringe-tórax, tráquea, bronquios-bronquiolos-parénquima pulmonar), ambos separados por la faringe. Además, los ganglios linfáticos y tonsilas porcinos son equivalentes al anillo de Waldeyer de los humanos (Figura 2) (Liebler-Tenorio y Pabst, 2006). Durante la respiración el aire atraviesa las fosas y la cavidad nasal, ambas recubiertas por un epitelio ciliado, cilíndrico, pseudoestratificado y continúa su trayecto hacia la laringe que, adicionalmente, contiene células caliciformes y agregados linfoides adyacentes al epitelio. La tráquea porcina consta de 32 a 36 anillos cartilaginosos unidos por tejido conectivo fibroelástico, se extiende a través

del tórax y se bifurca, después de corazón, dando lugar a los bronquios, bronquiolos hasta terminar en los alvéolos. El pulmón porcino se encuentra dentro de la cavidad torácica, proximal al corazón y se divide en pulmón derecho con cuatro lóbulos; craneal, medio, caudal y accesorio y pulmón izquierdo con los lóbulos craneal y caudal, todos ellos subdivididos en segmentos pulmonares (Huang *et al.*, 1990). Los pulmones están delimitados por la pleura visceral y en contacto con la cavidad torácica a través de la pleura parietal. Por último, en la cavidad torácica es posible encontrar ganglios linfáticos, dos parietales (dorsal y ventral torácico) y dos viscerales (mediastino y bronquial) que proveen de células inmunes al tracto respiratorio (Krejci *et al.*, 2013; Judge *et al.*, 2014).

7. El SISIP en el tracto respiratorio porcino

El SISIP del tracto respiratorio porcino ha sido poco estudiado, los primeros trabajos de los años 70's y 80's descubrieron a sus elementos de forma aislada y sin que posteriormente se profundizara en su desarrollo o mecanismos de inducción. La secreción nasal posee mayores concentraciones de SIgA e IgG respecto a SIgM, sin embargo, no es del todo claro el nivel de participación de cada isotipo a lo largo del tracto respiratorio (Holmgren *et al.*, 1973; Morgan *et al.*, 1980). Las células plasmáticas pueden distribuirse en la LP de la mucosa nasal (Bradley *et al.*, 1976a; Morgan *et al.*, 1980) o en la tonsila y, al igual que en el intestino, pueden migrar a los tejidos distales para realizar su función efectora (Bals *et al.*, 1998; Bradley *et al.*, 1976b). Por otra parte, la IgG secretada es producida localmente (Bradley *et al.*, 1976a; Morgan *et al.*, 1980) o ser de origen sistémico (Reynolds y Merrill, 1981), llegando al lumen mucosal a través de un mecanismo dependiente o independiente de receptor (FcRn). Al nacimiento, la falta de estructuración del SISIP podría ser compensada por la secreción de anticuerpos maternos (MatAb, *maternal antibodies*), principalmente del tipo IgA e IgG, en el tracto respiratorio (Mensik *et al.*, 1971, Bradley *et al.*, 1976a; Nechvatalova *et al.*, 2011). La permeabilidad del epitelio respiratorio disminuye con la edad e impide que los anticuerpos sistémicos sean liberados al lumen mucosal respiratorio, contrario a lo que ocurre con la inflamación que favorece la salida de inmunoglobulinas al lumen mucosal (Charley y Corthier, 1977). No obstante, aún se desconoce en detalle el desarrollo integral del SISIP en el tracto respiratorio caudal; tráquea y bronquios, por lo que su estudio proveerá de información útil para el entendimiento de la generación de protección mediada por

inmunoglobulinas en las edades de mayor susceptibilidad a infecciones y enfermedades.

III. JUSTIFICACIÓN

Las mucosas del organismo son altamente susceptibles a infecciones, especialmente en los organismos jóvenes, porque son los sitios de contacto con el ambiente, más extensos del cuerpo. Para su adecuada protección se requiere de un eficiente sistema de producción y exportación de SIgs, el cual se compone de células plasmáticas mucosales, la expresión del plgR en las células epiteliales del lumen mucosal, y la liberación eficiente de las plg a la superficie mucosal. La ausencia o falla de alguno de estos elementos derivaría en una insuficiencia de SIgs, dando como resultado la propensión a enfermedades. El estudio del desarrollo con la edad del SISIP en la tráquea y bronquios porcinos ayudará a entender la susceptibilidad a las infecciones y enfermedades y mejorar el diseño de tratamientos terapéuticos y profilácticos.

IV. HIPÓTESIS

La edad del individuo influye en la aparición organizada de los elementos del SISIP en la tráquea y bronquios porcinos.

V. OBJETIVOS

A. Objetivo general

Analizar el desarrollo de los elementos del SISIP en la tráquea y bronquios porcinos.

B. Objetivos particulares

1. Estandarizar las condiciones de tinción inmunohistoquímica para CP-CJ, CP-IgA, CP-IgM y plgR en la LP y SM de la tráquea y bronquios de minicerdos vietnamita adultos.y establecer los valores basales del SISIP.
2. Determinar los elementos del SISIP en la tráquea y bronquios de minicerdos recién nacidos, neonatos, post-destetados, y jóvenes.

3. Cuantificar el nivel de SIgs (SIgA, SIgM) y monoméricas (IgA e IgG) en la tráquea, bronquios, secreción nasal, saliva y suero en las distintas edades de los cerdos.
4. Evaluar el efecto de la lactación en la secreción de inmunoglobulinas secretorias y monoméricas en el tracto respiratorio de los recién nacidos.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

La estrategia utilizada para el análisis del SISIP se describe a continuación (Figuras 11 y 12):

6.1 Cerdos

En este trabajo se utilizaron 34 minicerdos vietnamitas (*Vietnamese pot bellied minipigs*), no vacunados, libres de patógenos específicos (SPF, *specific pathogen free*), procedentes de cerdas multíparas, de la Unidad de Producción y Experimentación de Animales de Laboratorio (UPEAL), del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (Cinvestav-IPN), Distrito Federal, México. Los animales fueron divididos en 6 grupos. Todos los procedimientos cumplieron con la Norma Oficial Mexicana: NOM-062-ZOO-1999 y con la autorización del Comité Interno para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (CICUAL) del Cinvestav-IPN.

6.2 Grupos de experimentación

A continuación se describen las características de los 6 grupos de experimentación (Figura 11):

- A) Cerdos recién nacidos (C0D). Para su obtención, una cerda progenitora fue inducida a labor de parto el día 113 de gestación (1 día antes de la fecha programada de parto) utilizando Poxina Forte® (Parfarm, México), 1 mL/20 kg de peso por vía intramuscular. Los lechones fueron separados de la cerda sin haber consumido calostro y fueron eutanizados dentro de las primeras 2 horas de nacidos, n=6 (3 hembras y 3 machos).

- B) Cerdos neonatos (C2D). Los lechones fueron alimentados libremente con calostro durante las primeras 48 horas de nacidos; el grupo se obtuvo a partir de dos camadas independientes, n=8 (1 hembra y 7 machos).
- C) Cerdos destetados (C1.5M). Los animales fueron destetados en la cuarta semana de vida y mantenidos bajo un régimen alimenticio convencional por dos semanas más, siendo eutanizados al mes y medio de edad; n=8 (6 hembras y 2 machos).
- D) Cerdos jóvenes (C3M). Los animales de 3 meses de edad fueron destetados al cumplir la cuarta semana de vida; este grupo se obtuvo usando cerdos de dos cerdas progenitoras, n=7 (4 hembras y 3 machos)
- E) Cerdos adultos (C6M). Los animales de 6 meses de edad fueron destetados al cumplir la cuarta semana de vida y se obtuvieron de una cerda progenitora, n=5 (2 hembras y 3 machos).

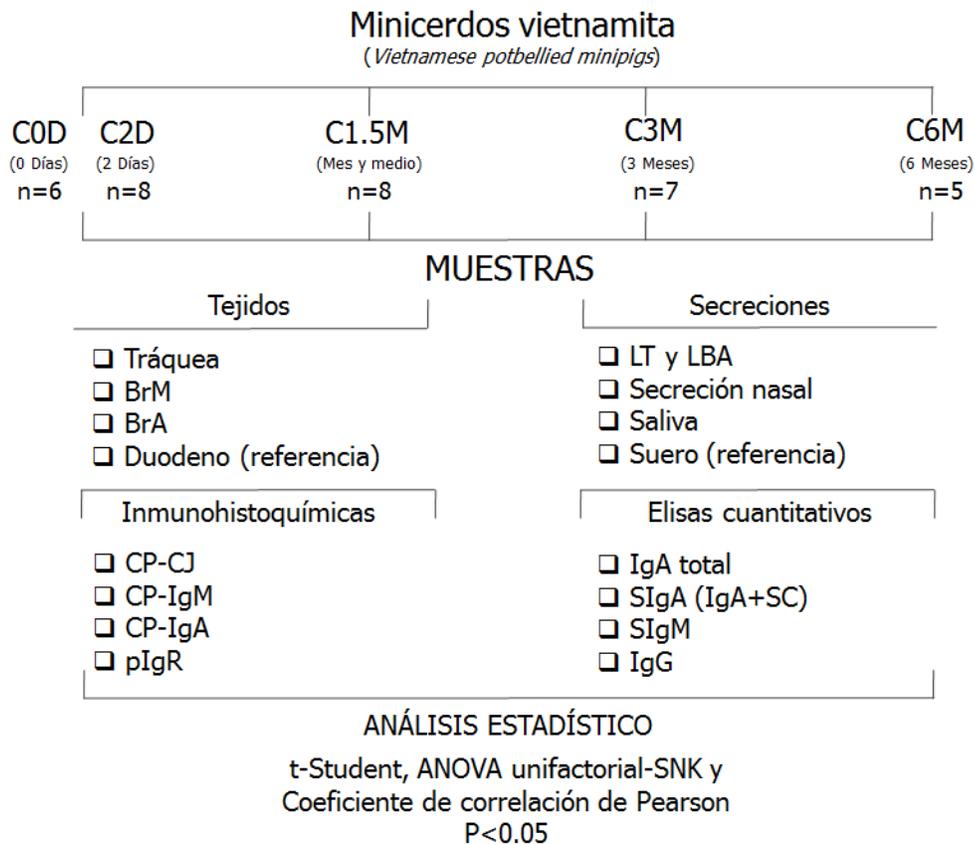


Figura 11. Estrategia experimental para el análisis del SISIP en tráquea y bronquios porcinos. Minicerdos vietnamita, de diferentes edades, fueron eutanizados para obtener muestras de tejidos y secreciones del tracto respiratorio, las cuales fueron evaluadas por inmunohistoquímica y ELISA cuantitativa. Los resultados fueron analizados estadísticamente. Abreviaturas: C0D, cerdos sin lactar (<2 horas de edad);, C2D, cerdos lactados libremente por 48 horas, C1.5M, cerdos destetados a las 4 semanas y sacrificados 2 semanas después, C3M, cerdos jóvenes de 3 meses de edad, C6M, cerdos adultos de 6 meses de edad, LT: Lavado de tráquea, LBA: Lavado bronquioalveolar, BrM: Bronquios mayores, BrA: Bronquios accesorios, CP-CJ, -IgM e -IgA: Células Productoras de Cadena J, IgM e IgA, respectivamente; SIgA: IgA secretoria, SIgM: IgM secretoria; SC: Componente secretor. ANOVA: Análisis de varianza, SNK: Student-Newman-Keuls.

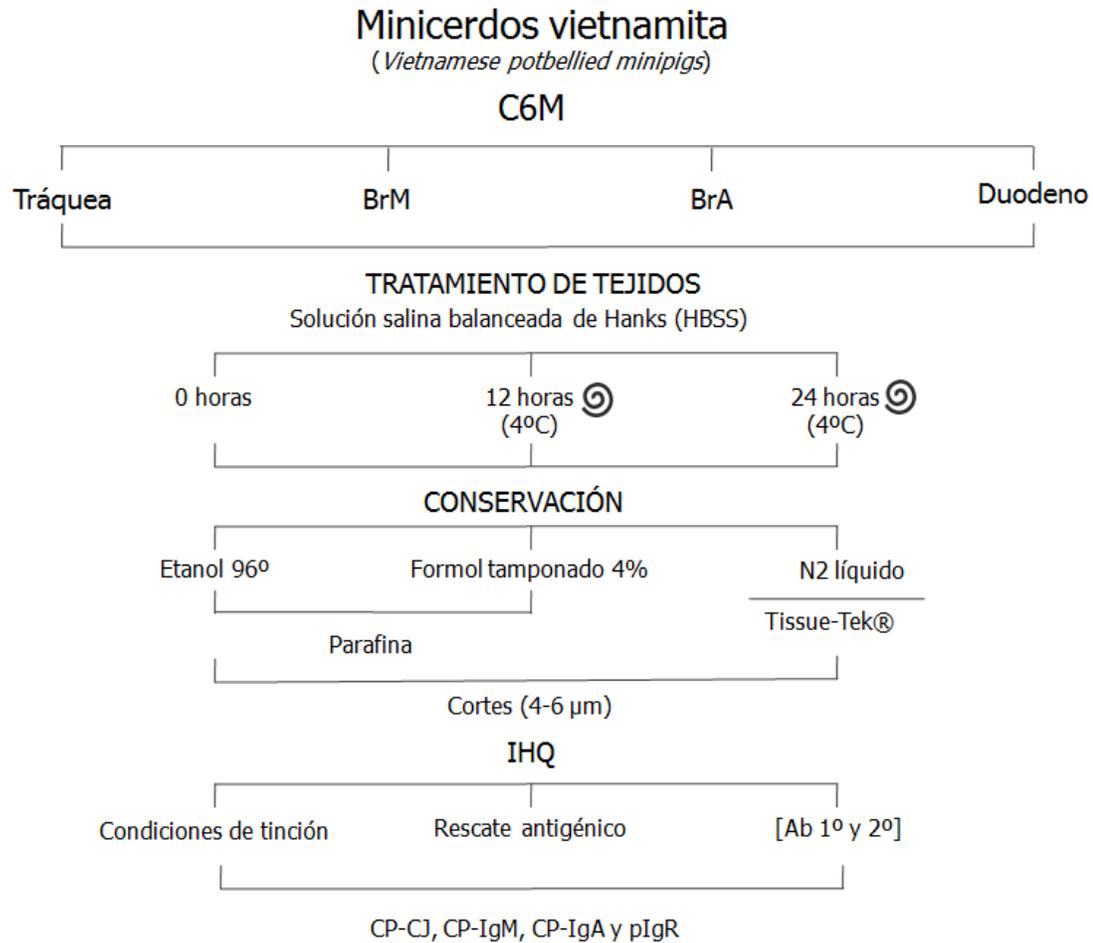


Figura 12. Estandarización de la tinción inmunohistoquímica para el SISIP porcino. Tejidos de cerdos de 6 meses de edad fueron lavados con HBSS por diferentes tiempos y conservados en etanol, formaldehído o Tissue-Tek®. Posteriormente fueron embebidos en parafina o congelados en N₂ líquido. Cortes no seriados de cada tejido fueron teñidos por IHQ, en los cuales se ensayaron diferentes condiciones de recuperación antigénica, bloqueo de la peroxidasa endógena, bloqueo de las uniones inespecíficas y anticuerpos primarios y secundarios para cada molécula de interés. Abreviaturas: C6M: Cerdos de 6 meses de edad, BrM: Bronquios mayores, BrA: Bronquios accesorios, HBSS: Solución salina balanceada de Hanks, IHQ: Inmunohistoquímica, CP-CJ, -IgM e -IgA: Células productoras de cadena J, IgM e IgA, Ab: Anticuerpo, pIgR: Receptor de Inmunoglobulinas poliméricas, ⊙: agitación constante.

6.3 Eutanasia

Los protocolos de eutanasia fueron aprobados por el Comité Interno para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (CICUAL), con apego a la Norma Oficial Mexicana: NOM-062-ZOO-1999. Brevemente, todos los animales fueron sedados con *Sural*®: azaperona (Productos Farmacéuticos S.A de C.V., México) a una dosis de 1 mL/20 kg de peso por vía intramuscular. Después se anestesiaron con Zoletil 50®: clorhidrato de tiletamina y clorhidrato de zolazepam (Virbac S.A., México) a una dosis de 5 mg/kg de peso por vía endovenosa. Posteriormente, los animales fueron exanguinados y se obtuvieron muestras de secreciones del árbol traqueobronquial y de tejidos (Figura 13).

6.4 Obtención de muestras:

6.4.1 Tejidos

Para nombrar al árbol traqueobronquial porcino, se utilizó la nomenclatura propuesta por Judge *et al.*, (2014) (Figura 13C-D). Una vez que se obtuvieron la tráquea y los pulmones (Figura 11), ambos fueron examinados macro y microscópicamente en búsqueda de señales inflamatorias o de daño causados por el protocolo de eutanasia (Figura 13A).

A) Tráquea

Los anillos centrales de la tráquea fueron cortados en segmentos menores a 5 mm de diámetro y procesados como se describe adelante en la sección: Conservación de los tejidos (Figura 12).

B) Bronquios mayores y accesorios porcinos

El árbol bronquial porcino se extrajo por un procedimiento estandarizado en el laboratorio (Figura 12). Brevemente, previo al LBA, la sangre intravascular fue removida del pulmón, introduciendo solución salina fría a través de la vena pulmonar y colectándola de una incisión practicada en el ventrículo izquierdo del corazón. Cuando el fluido aparecía claro, se daba por terminado el lavado. Los pulmones se mantuvieron en solución salina fría y el parénquima pulmonar fue disgregado cuidadosamente con unas pinzas de disección hasta observar macroscópicamente

los bronquios y bronquiolos (Figura 13A-B). Siguiendo las características establecidas por Judge *et al.*, (2014), se establecieron los grupos de bronquios mayores (BrM) y accesorios (BrA). Los BrM comprendieron al bronquio lobular craneal izquierdo (LB1, del inglés: *left cranial lobe bronchus*), bronquio lobular caudal izquierdo (LB2 del inglés: *left caudal lobe bronchus*), RB1; bronquio lobular craneal derecho (RB1 del inglés: *right cranial lobe bronchus*), bronquio lobular medio derecho (RB2 del inglés: *right middle lobe bronchus*), bronquio lobular accesorio derecho (RB3 del inglés: *right accessory lobe bronchus*) y bronquio lobular caudal derecho (RB4 del inglés: *right caudal lobe bronchus*) (Figura 14A). El grupo de los BrA se formó utilizando las ramificaciones continuas a LB1, RB2 y RB3 (Figura 14B) (Figura 14).

C) Duodeno

La región descendente del duodeno fue segmentada en porciones de 5-7 mm y procesada como se describe en la sección: Conservación de los tejidos (Figura 12).

D) Conservación de los tejidos

Para estandarizar las condiciones de tinción, los tejidos de los C6M fueron lavados con solución salina balanceada de Hanks (HBSS), mantenidos a 20 rpm en un agitador de plataforma Rocker 25 (Labnet, EE.UU.), durante 12 o 24 h a 4°C. Posteriormente, los tejidos fueron fijados con etanol 96° (Baker, México) por 24-32 horas, según Korsrud y Brandtzaeg (1980), o formaldehído al 4% (Baker, México) en PBS, por 24-48 h. Las muestras de los grupos experimentales restantes fueron utilizadas sin lavar y se fijaron con formaldehído al 4%. Tráquea, BrM, BrA y duodeno se deshidrataron con concentraciones crecientes de etanol (70%, 80%, 90% y 100%) y finalmente con xileno (Baker, México), 5 min por paso. Todos los tejidos fueron embebidos en parafina (Paraplast®, EE.UU.) y almacenados a 4°C hasta su uso. Adicionalmente, muestras de todos los tejidos fueron embebidos en Tissue Tek ® (EE.UU.), congelados en nitrógeno líquido y almacenados a -70 °C hasta su uso (Figura 12).

6.4.2 Secreciones mucosas

A) Lavado traqueal

El lavado traqueal (LT) se obtuvo ligando el órgano por debajo de la laringe y por arriba del RB1. Dado que el tamaño de la tráquea cambia con la edad del animal, se utilizaron diferentes volúmenes de PBS frío para realizar los lavados: C0D (500 µL), C2D (500 µL), C1.5M (2 mL), C3M (5 mL) y C6M (5 mL), procurando recuperar más del 85% del volumen introducido. El LT fue centrifugado a 400 g x 10 min a 4°C y el sobrenadante procesado con inhibidores de proteasas, como se describe en secreción nasal (Figura 11).

B) Lavado bronquioalveolar

El lavado bronquioalveolar (LBA) se realizó introduciendo un catéter intravenoso (Punzocat®, México) por debajo del RB1 y utilizando diferentes volúmenes de PBS frío según la edad; C0D (10 mL), C2D (10 mL), C1.5M (40 mL), C3M (50 mL) y C6M (50 mL); en todos los casos se procuró recuperar al menos el 50% del volumen introducido. El LBA fue procesado y conservado igual que el LT (Figura 11).

C) Secreción nasal y saliva

La secreción nasal y la saliva se obtuvieron sujetando firmemente el cuerpo, cabeza y hocico de los animales. Para la secreción nasal, hisopos nasales (Sorina®, China) fueron introducidos en la cavidad nasal, evitando irritar, o sangrar la mucosa ni tener contacto con el hocico del lechón. En el caso de la saliva se introdujo el hisopo entre las encías y el carrillo de la cavidad bucal, procurando recorrer la mayor superficie posible con movimientos giratorios. Durante la recolección de muestra, los hisopos fueron mantenidos en frío e inmediatamente centrifugados a 5000 g x 5 min a 4°C. Los sobrenadantes fueron mezclados con un coctel de inhibidores de proteasas (concentración final de TPCK -*Tosyl phenylalanyl chloromethyl ketone*-: 50 µg/mL, TLCK -*Tosyl-L-lysyl-chloromethane hydrochloride*-: 25 µg/mL y PMSF -*Phenyl-methyl-sulfonyl fluoride*-: 174 µg/mL), en proporción 1:20 (1 µL de coctel de inhibidores: 19 µL de muestra de mucosa) y almacenados a -70 °C hasta su análisis. Durante la toma de muestra no se utilizaron agentes químicos para estimular la producción de ambas secreciones (Figura 11).

6.4.3 Suero

Previo a la eutanasia de los cerdos, las venas yugulares fueron puncionadas para la obtención de sangre. En los C0D y C2D se utilizaron jeringas de 5 mL (PLASTIPAK®, México) y para los grupos restantes el sistema Vacutainer®. La sangre se incubó por 1 h a 37 °C y se centrifugó a 300 g x 5 min a 4 °C; posteriormente, el suero se recolectó y se almacenó a -20°C hasta su uso (Figura 11).

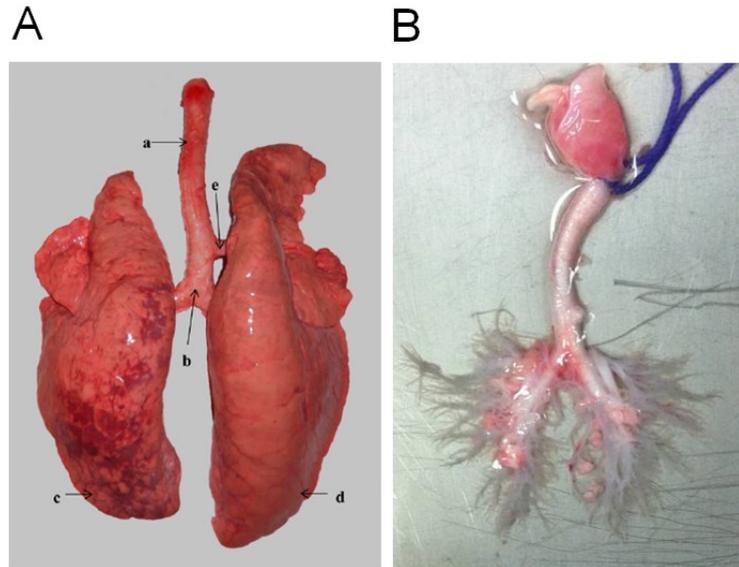


Figura 13. Obtención de la tráquea y bronquios porcinos. Pulmones porcinos de diferentes edades fueron obtenidos posteutanasia (A), y se obtuvo la tráquea y árbol bronquial porcino (B). a: Tráquea; b: Bifurcación principal; c: Pulmón izquierdo; d: Pulmón derecho; e: Bronquio lobular craneal derecho.

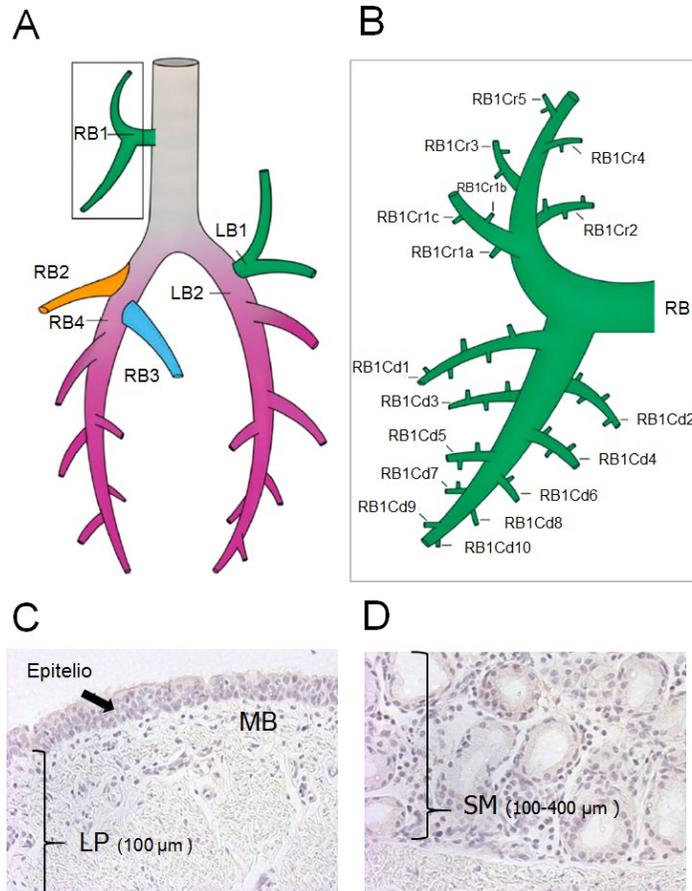


Figura 14. Zonas de estudio en tráquea, bronquios mayores (BrM) y accesorios (BrA) porcinos. Los BrM (A) comprenden al bronquio lobular craneal izquierdo (LB1, del inglés: *left cranial lobe bronchus*), bronquio lobular caudal izquierdo (LB2 del inglés: *left caudal lobe bronchus*), RB1; bronquio lobular craneal derecho (RB1 del inglés: *right cranial lobe bronchus*), bronquio lobular medio derecho (RB2 del inglés: *right middle lobe bronchus*), bronquio lobular accesorio derecho (RB3 del inglés: *right accessory lobe bronchus*) y bronquio lobular caudal derecho (RB4 del inglés: *right caudal lobe bronchus*). El grupo de los BrA (B) se formó utilizando las ramificaciones continuas a LB1, RB2 y RB3. Fuente: Judge *et al.*, 2014. Los compartimentos de la tráquea, BrM y BrA se clasificaron con los criterios descritos por Tschering *et al.*, (2001); epitelio respiratorio, lámina propia; 100 μm desde la MB (C), y submucosa; 100-400 a partir de la MB (D). MB; membrana basal, LP: Lámina propia, SM: submucosa.

6.5. Inmunohistoquímica (IHQ)

A partir de los tejidos embebidos en parafina se obtuvieron cortes de 5 µm de espesor, los cuales se recolectaron en portaobjetos recubiertos con 3-aminopropiltrimetoxisilano (Sigma Aldrich, Alemania) y, posteriormente, se desparafinizaron con xileno y se hidrataron en un gradiente de alcohol (100%, 90%, 80%, 70% y PBS) por 5 min en cada paso (Figura 12).

El rescate antigénico de los tejidos fijados con formol se realizó por métodos físicos (microondas y calor), químicos (amortiguador de citratos y urea) y enzimáticos (tripsina). A continuación se describen las condiciones técnicas finales. Para la identificación de las células productoras de IgM, IgA y el SC, se empleó un método enzimático, el cual consistió en incubar los tejidos con tripsina 0.1% (Gibco, Canadá) preparada en una solución amortiguadora, pH=7.0, Tris 200 mM (Invitrogen, EE.UU.) y CaCl₂ 4mM (Sigma, Japón), por 15 min a 37 °C. Para las CP-CJ, se utilizó urea 6M (Sigma, Alemania), por 30 min a temperatura ambiente, siguiendo las recomendaciones de Korsrud *et al.*, (1980). La actividad endógena de la peroxidasa se bloqueó utilizando H₂O₂ al 6% (Alta Pureza, México) en metanol (Baker, EE.UU.). Las uniones inespecíficas a los receptores Fc se bloquearon con suero normal de cabra al 10%; ambas incubaciones se realizaron por 60 min a temperatura ambiente en cámara húmeda. Los anticuerpos primarios utilizados se describen en la Tabla 2, todos ellos incubados durante toda la noche a 4 °C.

Tabla 2. Anticuerpos primarios empleados en las IHQs del SISIP

| Molécula | Origen | Detección | Clona | Dilución | Compañía |
|----------|--------------|-----------|---------------|----------|-------------------|
| SC | Ratón (IgG1) | Cerdo | K60 1F14 | 1/400 | Serotec, EE. UU. |
| IgM | Cabra | Cerdo | Kit: E100-100 | 1/600 | Bethyl, EE.UU. |
| IgA | Ratón (IgG1) | Cerdo | F9 | 1/25 | U. Bristol, RU |
| Cadena J | Conejo | Humano | Antisuero | 1/2000 | InvivoGen, EE.UU. |

Abreviaturas: IHQs: Inmunohistoquímicas, SISIP: Sistema inmune secretor de inmunoglobulinas poliméricas, SC: del inglés secretory component.

Posteriormente, los tejidos se lavaron con PBS y se incubaron con los anticuerpos secundarios respectivos por 60 min, a temperatura ambiente, en cámara húmeda. Para la cadena J se utilizó un anticuerpo biotinilado anti-conejo IgG (H+L) hecho en cabra, dilución: 1/300, catálogo: B2770 (Invitrogen, EE.UU.) y para el caso del SC e

IgA un anticuerpo biotinilado anti-ratón IgG (H+L) hecho en cabra, dilución: 1/2000, catálogo: B2763 (Invitrogen, EE.UU.). El complejo avidina-biotina se formó incubando estreptavidina-HRP, 1/500 (Zymed, EE.UU.) por 60 min a temperatura ambiente. Entre cada incubación las laminillas se lavaron 3 veces con PBS, además, los anticuerpos y enzimas se diluyeron en PBS con 1% de suero normal de cabra. Finalmente, la reacción se reveló usando 3-3 diaminobencidina (DAB, Sigma, EE.UU.) por 5 min. En los controles de isotipo de las IHQs, los anticuerpos primarios se sustituyeron por una IgG purificada de conejo (ChromPure), dilución: 1/10000, catálogo: 011-000-003 (Jackson ImmunoResearch, EE.UU.) o una IgG de ratón no relacionada, catálogo: 08-6599 (Invitrogen, EE.UU.). Las secciones fueron contrateñidas con hematoxina, luego deshidratadas en alcoholes y xileno y finalmente conservadas con una resina sintética (Permout®), EE.UU.). Todas se almacenaron a temperatura ambiente hasta su evaluación microscópica.

6.6 Cuantificación de las poblaciones celulares

Se analizó el epitelio, la LP y la SM de la tráquea, BrM y BrA de los diferentes grupos de minicerdos vietnamita, adaptando los criterios propuestos por Tschernig *et al.*, (2006) para el humano:

- 1) Epitelio respiratorio. El epitelio simple pseudoestratificado se localiza revistiendo el lumen de la tráquea y bronquios (Figura 14C).
- 2) Lamina propia. Superficie que inicia a partir de la membrana basal hasta 100 μm de profundidad de la mucosa (Figura 14C).
- 3) Submucosa. Glándulas que se localizan entre las 100-400 μm de profundidad a partir de la membrana basal (Figura 14D).

Las células positivas a CJ, IgM e IgA se identificaron con un microscopio de campo claro (Eclipse E4000, Nikon, Japón). Las imágenes se capturaron digitalmente a 200X y se analizaron con el software Image-Pro Plus 7.0 (Media Cybernetics, EE.UU.). La densidad celular se calculó como el número de células positivas por milímetro cuadrado de LP (células/ mm^2), para ello, fueron cuantificados de 10 a 15 campos de cada animal, lo cual se hizo por compartimento y molécula. El área de las glándulas y de los espacios intercartilago fue excluida, para reducir la variabilidad en los conteos (Figura 15).

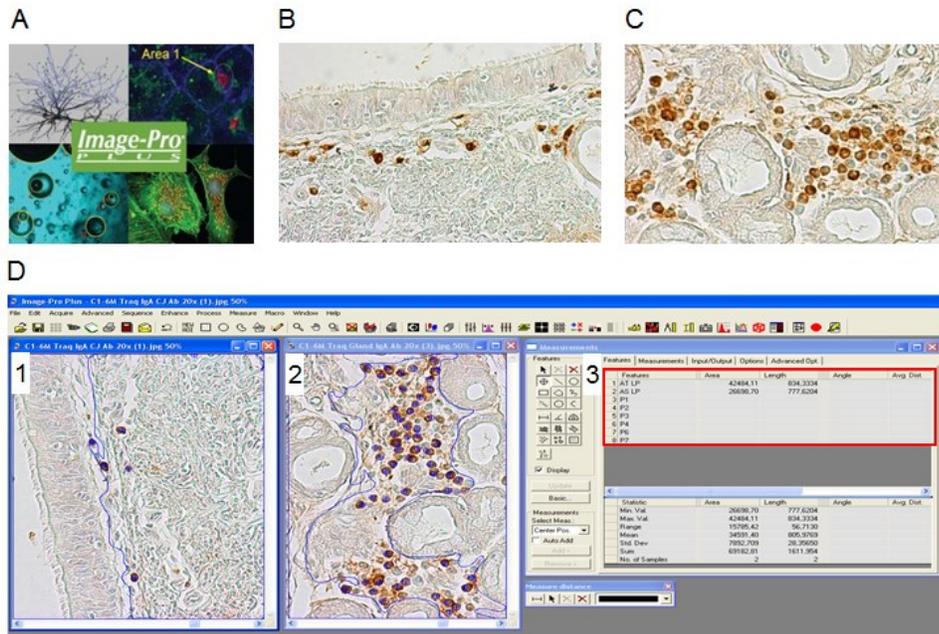


Figura 15. Cuantificación celular en tráquea y bronquios porcinos. Las tinciones inmunohistoquímicas se analizaron con un microscopio de campo claro y las imágenes se capturaron con un analizador de imágenes por computadora (A). Los conteos celulares se realizaron en la lámina propia (B) y la submucosa (C) de la tráquea y bronquios mayores y accesorios. Las zonas de glándulas y las áreas intercartilago fueron excluidas para la cuantificación de entre 10 y 15 campos ópticos por molécula de cada animal (D1-2). La densidad celular se representa calculando el número de células positivas por milímetro cuadrado (células/mm²) de tejido (D3).

6.7 ELISA cuantitativa

Las cuantificaciones de anticuerpos se realizaron con ELISAs cuantitativas comerciales o adaptadas en el laboratorio. Los niveles de IgM e IgG se obtuvieron con los kits comerciales: E100-100 y E-100-104, respectivamente (Bethyl, EE.UU.). Las diluciones de las muestras se optimizaron, iniciando con 1/1500 para suero y 1/5 para las secreciones mucosas. La cuantificación de IgA total se realizó con un kit para identificar a la IgA monomérica (mIgA), dimérica (dIgA) y secretoria (SIgA), utilizando un anticuerpo comercial anti-IgA porcino hecho en cabra (Bethyl, EE.UU.). Por otro lado, la concentración de SIgA se obtuvo a través de la modificación de un ELISA sándwich, reportado por Jaffar *et al.*, (2009). Ambas determinaciones se realizaron simultáneamente, además de contar con los respectivos controles intra e

interplaca. A continuación se describe la estrategia utilizada para la determinación de IgA total y SIgA. Para la primera, las placas se sensibilizaron con anti-IgA total porcino hecho en cabra, E100-102 (Bethyl, EE.UU.) por 60 min, a temperatura ambiente; y para la SIgA, las placas de ELISA (Costar®, EE.UU.) de 96 pozos, se sensibilizaron con 100 µL/pozo de anti-SC porcino, hecho en ratón, clona: K60 1F14, dilución: 1/20,000 (Serotec, EE.UU.) en amortiguador de carbonatos, pH = 9.6, 0.5 M Na₂CO₃ (Baker, México), 0.5 M NaHCO₃ (Baker, México), toda la noche a 4 °C. Ambas placas se lavaron y se bloquearon con PBS-Tween 20 al 0.05% (PBS-T) (Sigma, EE.UU.) por 60 min a temperatura ambiente. Se añadieron 100 µL de las muestras, a la dilución apropiada (generalmente 1/1500 -IgA total- o 1/100 -SIgA- para suero y 1/100 -IgA total- o 1/5 -SIgA- para las secreciones mucosas) y se hicieron diluciones triples (mucosas) y quintuples (suero) seriadas. Posteriormente, las muestras se lavaron con PBS-T y se incubaron con anti-IgA porcino hecho en ratón, clona: MCA638, dilución: 1/250 (Serotec, EE.UU.) por 60 min a 37 °C. Nuevamente se lavaron las placas y se añadieron 100 µL de anti-IgG (H+L) de ratón acoplado a biotina hecho en cabra, dilución: 1/2500, catálogo: B2763 (Invitrogen, EE.UU.), por 60 min a 37 °C. Después de lavar las placas, se añadieron 100 µL de estreptavidina-AP, dilución: 1/500 (Zymed, EE.UU.) por 60 min a 37 °C. Finalmente, las placas se lavaron y se les añadió p-nitrofenol fosfato (Sigma, EE.UU.) en solución amortiguadora, pH=9.8, dietanolamina 1 mM (Sigma, EE.UU.) y CaCl₂ 0.5 mM (Sigma, EE.UU.). Los pozos se leyeron a 492 y 405 nm en un lector de placas de ELISA (Thermo Scientific Multiskan EX, China).

Cada placa contó con triplicados de los blancos de los anticuerpos de captura y conjugados. Los resultados se expresaron como densidades ópticas (DO) en cada dilución predefinida. El valor de corte, para considerar a las muestras positivas, se obtuvo del promedio de la DO de los blancos más tres desviaciones estándar. Cada placa contaba con una curva estándar para la cuantificación de IgA, usando suero de referencia comercial (Bethyl®, EE.UU.), en la cual se interpolaron las DO de las muestras positivas para obtener los valores cuantitativos de IgA total y SIgA, como lo indica el fabricante.

6.8 Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos se realizaron con el programa GraphPad Prism 5.02 (California, EE.UU.). La distribución normal de los datos se evaluó por la prueba de normalidad de Kolmogorov Smirnov, el de D'Agostino & Pearson y por Shapiro-Will. Para evaluar el efecto de la lactación en la secreción de inmunoglobulinas entre los C0D y C2D, se realizó una prueba t no pareada, a un intervalo de confianza del 95%. Para evaluar el desarrollo de cada elemento del SISIP en cada tejido, se empleó un análisis de varianza (ANOVA) unifactorial y una prueba de comparación de medias: Student-Newman-Keuls (SNK). Cuando se compararon más de dos factores por grupo, se usó un ANOVA bifactorial y una prueba de Bonferroni. Para evaluar la relación entre la concentración de inmunoglobulinas en el lumen mucosal y la densidad total de células productoras de anticuerpos, se empleó el coeficiente de correlación de Pearson (producto-momento), obteniendo el valor de P, r^2 y los intervalos de confianza al 95%. Las diferencias entre grupos se consideraron estadísticamente significantes cuando $P < 0.05$.

VII. RESULTADOS

7.1 Estandarización de técnicas de tinción del SISIP en el tracto respiratorio porcino

La tráquea y el pulmón fueron obtenidos y se verificó que no tuvieran consolidaciones, coágulos o daño superficial, para ser utilizados para la caracterización del SISIP porcino (Figura 11-13). La estandarización de los métodos se realizó en los C6M, considerando los siguientes aspectos: tiempo de lavado previo del tejido para reducir la cantidad de inmunoglobulinas en los compartimentos mucosales, fijación de los tejidos, rescate antigénico y anticuerpos. Primero, los tejidos se lavaron con HBSS por 12 y 24 h, sin embargo, dicho tratamiento dañó la morfología de los compartimentos mucosales, por lo que se decidió usar a los tejidos sin lavar para los siguientes experimentos. El protocolo utilizado para fijar las muestras con etanol deshidrató considerablemente al cartílago traqueal y bronquial, en comparación con el uso de formol, donde fue posible recuperar cortes seriados y no seriados de 3-5 μm de grosor. El rescate antigénico de las CP-CJ se evaluó bajo diferentes concentraciones de urea (1M, 3M, 6M, 8M), tiempos de incubación (15, 30, 45 y 60 min) y temperatura (ambiente y 37 °C), según lo reportado para

glándulas salivales por Korsrud *et al.*, (1980); a partir de dichas condiciones se decidió trabajar con la urea 6M incubada por 30 min a temperatura ambiente, debido a que la nitidez y definición de las células teñidas permitía realizar la cuantificación celular. Por otro lado, el rescate antigénico de las CP-IgA, -IgM y pIgR se determinó utilizando diferentes concentraciones de tripsina (0.05%, 0.1%, 0.25% y 0.5%) y tiempos de incubación (5, 15, 30, 45 y 60 min) a 37 °C, conjuntamente la incubación (2 h a 37 °C o toda la noche) de diversos lotes de anticuerpos policlonales y monoclonales de cerdo; estos últimos fueron donados por el Dr. M. Bailey (Universidad de Bristol, Reino Unido); también se evaluaron anticuerpos dirigidos a humano y ratón. Las condiciones finales de tinción se describen en Materiales y Métodos. La estandarización de las condiciones de tinción para las IHQs permitió obtener los valores basales del SISIP en la tráquea y bronquios de los C6M (Figura 12).

7.2 Identificación de células productoras de cadena J, IgM e IgA

Las CP-CJ, CP-IgM y CP-IgA fueron identificadas en la LP y SM de la tráquea, BrM y BrA porcinos (Figura 16). En general, las células poseían una morfología muy similar a lo reportado para las células plasmáticas inmaduras o maduras (Soutar *et al.*, 1976; Burnett *et al.*, 1987), las primeras con un núcleo grande y excéntrico y las segundas con núcleo pequeño y abundante citoplasma. Ambas poblaciones fueron contempladas para la obtención de los valores basales. Las CP-CJ (Figura 16A-C), CP-IgM (Figura 16D-F) y CP-IgA (Figura 16G-I), se localizaron de forma regular por debajo de la membrana basal y cercanas a los vasos sanguíneos de la LP, observándose a partir de los C1.5M. Las IHQs, con los anticuerpos anti-IgM (Figura 16E, F) y anti-IgA (Figura 16H-I) porcinos tiñeron ligeramente algunas células del epitelio respiratorio, el citoplasma de las células glandulares de la SM y la luz mucosal, lo cual fue más evidente para IgA. En los controles de isotipo no se observó dicha tinción (Figura 16A, D, G). Al analizar la SM, las tres poblaciones se localizaron rodeando las glándulas submucosales o aledañas a los espacios interglándula serosas y mucosas. Con la identificación y localización de las CP-CJ, CP-IgM y CP-IgA entre la LP y SM, de los diferentes lechones y grupos, se obtuvieron los valores basales para cada población celular.

7.3 Cuantificación de CP-CJ, -IgM e -IgA en la tráquea y bronquios porcinos

La densidad celular (células/mm²) de las CP-CJ, -IgM e -IgA, se obtuvo en la tráquea y bronquios (BrM y BrA) porcinos según lo descrito en Materiales y Métodos (Figura 17). Los valores absolutos y relativos de ambos tejidos se describen para los C2D, C1.5M, C3M y C6M, a excepción de los C0D donde no se realizó dicho análisis.

En la LP traqueal, la densidad celular de las tres poblaciones evaluadas fue escasa o nula en los C2D. Respecto a las CP-CJ, su expresión aumentó paulatinamente en los C2D, C1.5M, C3M y C6M [C2D < C1.5M (P<0.05) < C3M (P<0.001) < C6M (P<0.001)] (Figura 17A). En las CP-IgM, la densidad aumentó drásticamente en los C1.5M, manteniéndose en los C3M y disminuyendo en los C6M [C2D < C1.5M (P<0.001) = C3M (NS) > C6M (P<0.001)]. Por último, la densidad de CP-IgA incrementó progresivamente hasta los C3M [C2D < C1.5M (P<0.001) < C3M (P<0.001) = C6M (NS)].

Por otro lado, la SM de la tráquea tuvo un perfil muy parecido al de la LP, pero su densidad celular fue aproximadamente 20 veces mayor que en la LP en las tres poblaciones celulares (Figura 18A). En la SM traqueal (Figura 17B), en los C2D, las CP-CJ, -IgM e IgA también fueron muy bajas o nulas. La densidad de CP-CJ aumentó entre cada grupo de animales [C2D < C1.5M (P<0.001) < C3M (P<0.001) < C6M (P<0.001)]. Las CP-IgM alcanzaron su máximo valor en los C1.5M y disminuyeron en los C3M y C6M [C2D < C1.5M (P<0.001) > C3M (P<0.001) > C6M (P<0.01)]. Las CP-IgA incrementaron gradualmente con la edad [C2D < C1.5M (P<0.001) < C3M (P<0.001) < C6M (P<0.001)].

La densidad de CP-CJ en la LP (Figura 19A) y SM (Figura 19B) se mantuvo con la misma tendencia en los bronquios mayores (BrM) y los bronquios accesorios (BrA), por lo que solo se describe en detalle la de los BrM. En la LP de los C2D, la densidad de CP-CJ, -IgM e -IgA fue muy baja (Figura 17C). En contraste, las CP-CJ incrementaron a partir de los C1.5M hasta los C6M [C2D < C1.5M (P<0.001) < C3M (P<0.05) < C6M (P<0.001)]. Para las CP-IgM, su valor máximo fue en los C1.5M, el cual disminuyó en los C3M y C6M [C2D < C1.5M (P<0.001) > C3M (P<0.05) = C6M

(NS)]. Por otro lado, la densidad de CP-IgA se mantuvo sin cambios en los C1.5M y C3M, repuntando en los C6M [C2D < C1.5M (P<0.001) = C3M (NS) < C6M (P<0.001)]. Al comparar las zonas de localización de las tres subpoblaciones celulares se observó que en la SM hubo aproximadamente 10 veces más células que en la LP (Figura 18B). En la SM bronquial (Figura 17D) nuevamente fue evidente la ausencia de CP-CJ, -IgM e -IgA en los C2D. Por el contrario, las CP-CJ aumentaron progresivamente con la edad [C2D < C1.5M (P<0.001) < C3M (P<0.001) < C6M (P<0.001)]. La densidad de CP-IgM fue mayor en los C1.5M y disminuyó en los C3M y C6M [C2D < C1.5M (P<0.001) > C3M (P<0.001) = C6M]. Por último, las CP-IgA aumentaron gradualmente con la edad [C2D < C1.5M (P<0.001) < C3M (P<0.001) < C6M (P<0.001)].

Los valores absolutos de la tráquea y los bronquios porcinos fueron utilizados para obtener los valores relativos de CP-CJ, -IgM e -IgA (Figura 20). En general, el patrón de desarrollo entre LP y SM de la traqueal (Figura 20A, C, respectivamente) y los BrM (Figura 20B, D, respectivamente) fue muy parecido: los animales recién nacidos fueron deficientes de las tres poblaciones celulares; al destete, las CP-IgM predominaron sobre las CP-CJ e -IgA, sin embargo, dicha proporción disminuyó en los animales jóvenes, en tanto que incrementó la de las CP-IgA. Es hasta en los animales adultos donde se observó un predominio de las CP-IgA sobre las otras células. Además, los valores de CP-CJ se mantuvieron constantes con la edad.

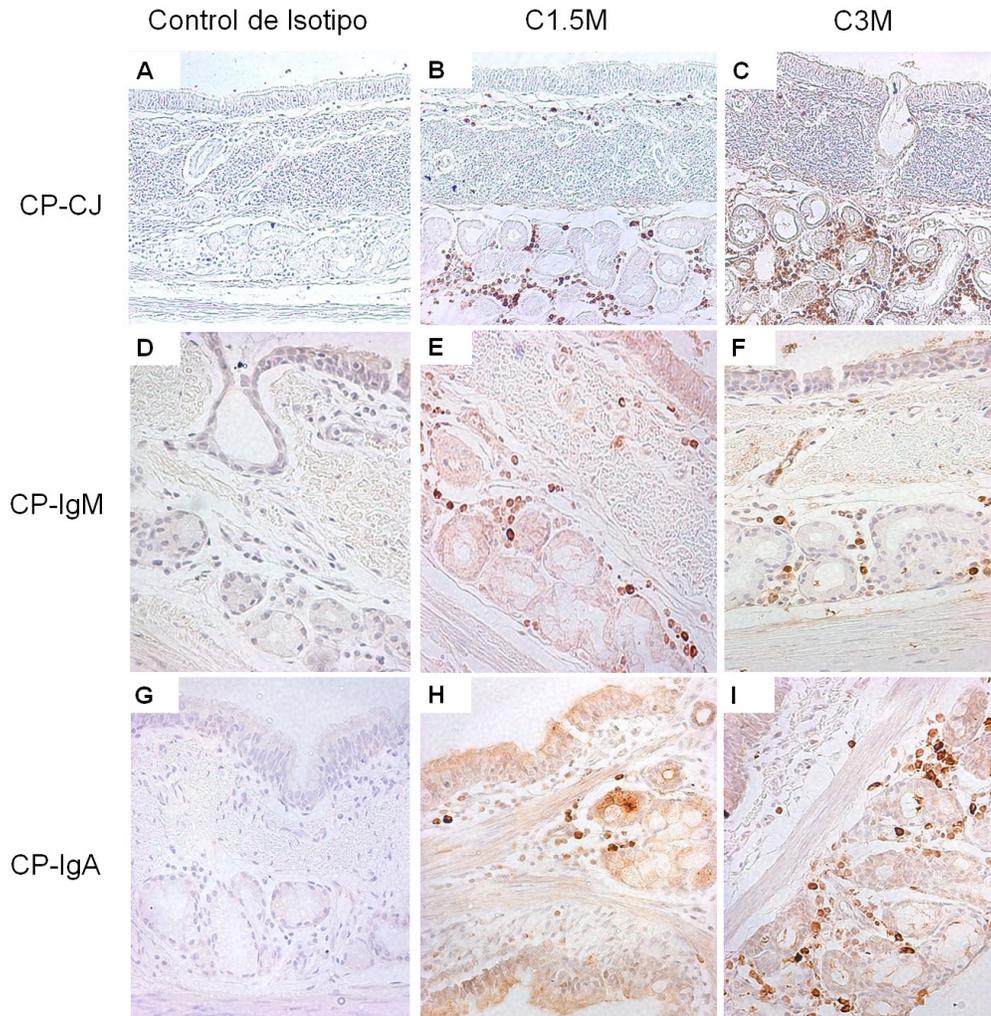


Figura 16. Identificación y localización de células productoras de cadena J (A-C), IgM (D-F) e IgA (G-I). Las células positivas se localizaron por debajo del epitelio respiratorio y alrededor de las glándulas mucosales. La inmunotinción también se observó en las células epiteliales de la lámina propia y en los acinos y ductos de las glándulas submucosales. Se usaron controles de isotipo para cada molécula en el experimento (A, D, G). En el panel se observan imágenes representativas de los C1.5M (A-B, D-E, G-H) y los C3M (C, F, I). Aumento para A-C (100X) y D-I (200X). CP-CJ, -IgM e -IgA: Células productoras de cadena J, IgM e IgA respectivamente.

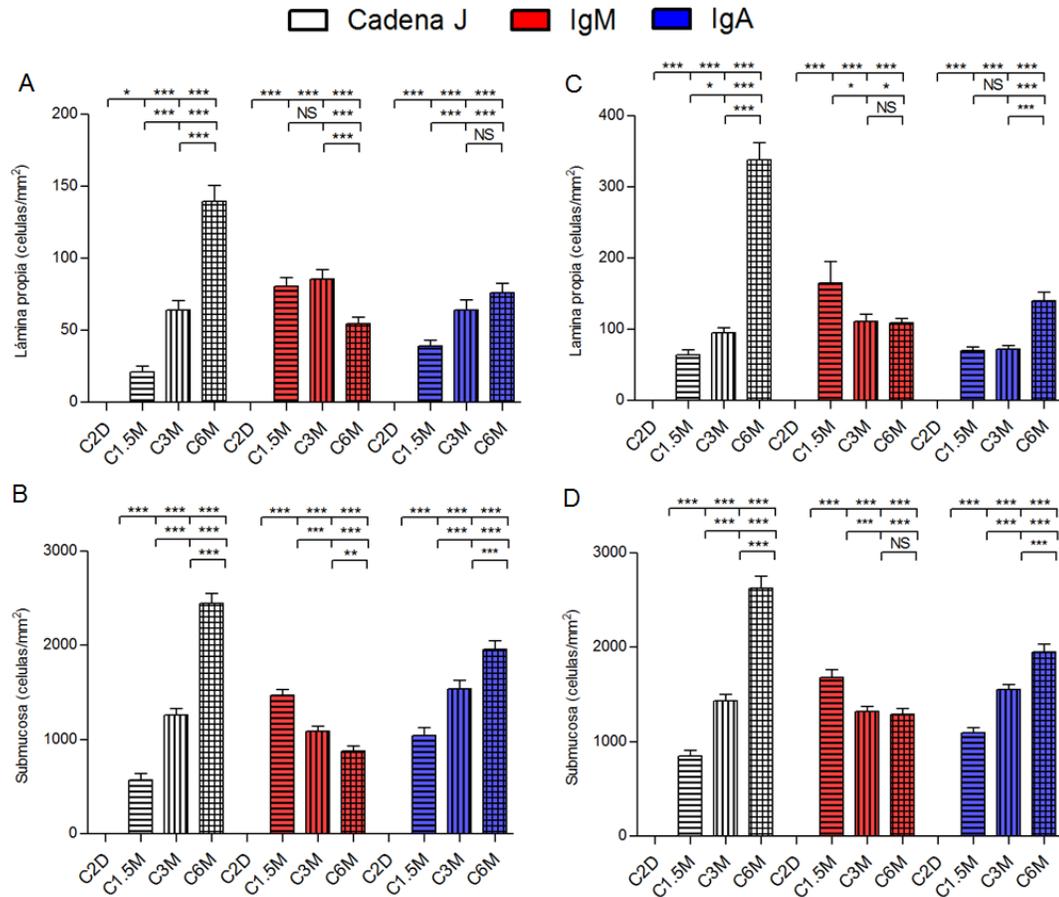


Figura 17. Densidad de células productoras de cadena J, IgM e IgA en la lámina propia (A, C) y submucosa (B, D) de la tráquea (A-B) y bronquios mayores (C-D) porcinos. La densidad de cadena J (blanco), IgM (rojo) e IgA (azul) (células/mm²) se obtuvo analizando 50-80 campos ópticos por grupo de edad, C2D (n=8), C1.5M: barras con líneas horizontales (n=8), C3M: barras con líneas verticales (n=7) y C6M: barras con cuadros (n=5). Los C0D fueron excluidos de este análisis. El promedio y el error estándar de la media se representa en cada barra. Las diferencias estadísticas fueron evaluadas por ANOVA de una vía y SKN (post-hoc). Los asteriscos indican el valor de P al comparar las diferentes edades, *: P < 0.05, **: P < 0.01, ***: P < 0.001 y NS: No significativo. Las escalas de las gráficas son diferentes.

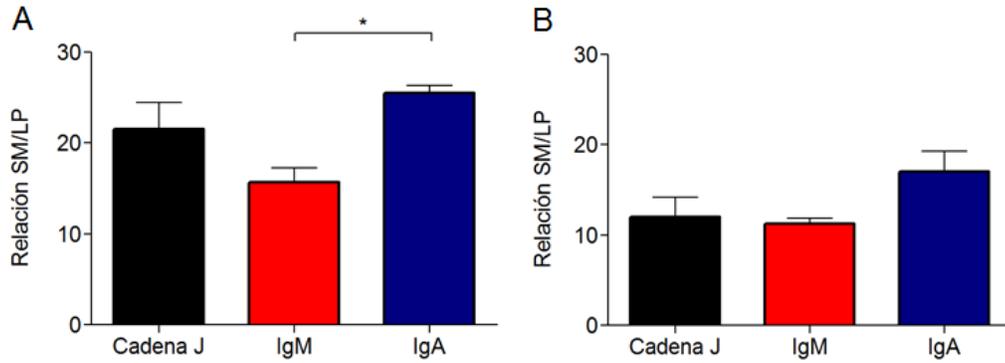


Figura 18. Relación de células positivas en la submucosa (SM)/ lámina propia (LP) de tráquea (A) y bronquios mayores porcinos (B). El índice de incremento entre LP/SM se obtuvo a partir de los valores absolutos de cadena J (negro), IgM (rojo) e IgA (azul) en cada compartimento y grupo (Figura 6).

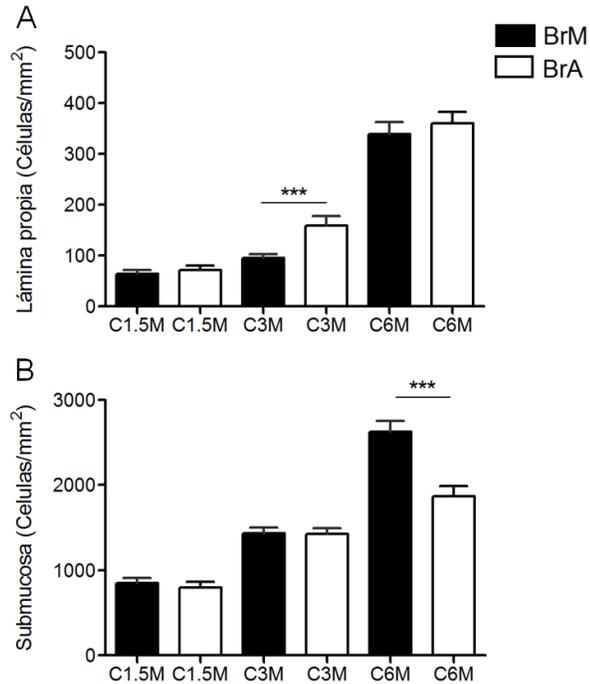


Figura 19. Comparativo de la densidad de CP-CJ entre BrM y BrA. Cada barra representa la densidad de CP-CJ en BrM y BrA en diferentes edades en la LP (A) y la SM (B). C1.5M (n=8), C3M (n=7) y C6M (n=5). Los C0D fueron excluidos de este análisis y los C2D no se grafican por la nula o escasa cantidad de células en ambos tejidos. El promedio y el error estándar de la media se representa en cada barra. Las diferencias estadísticas fueron evaluadas por t-Student no pareada y los asteriscos indican el valor de P al comparar las diferentes edades; ***, P < 0.001. Las escalas de las gráficas son diferentes.

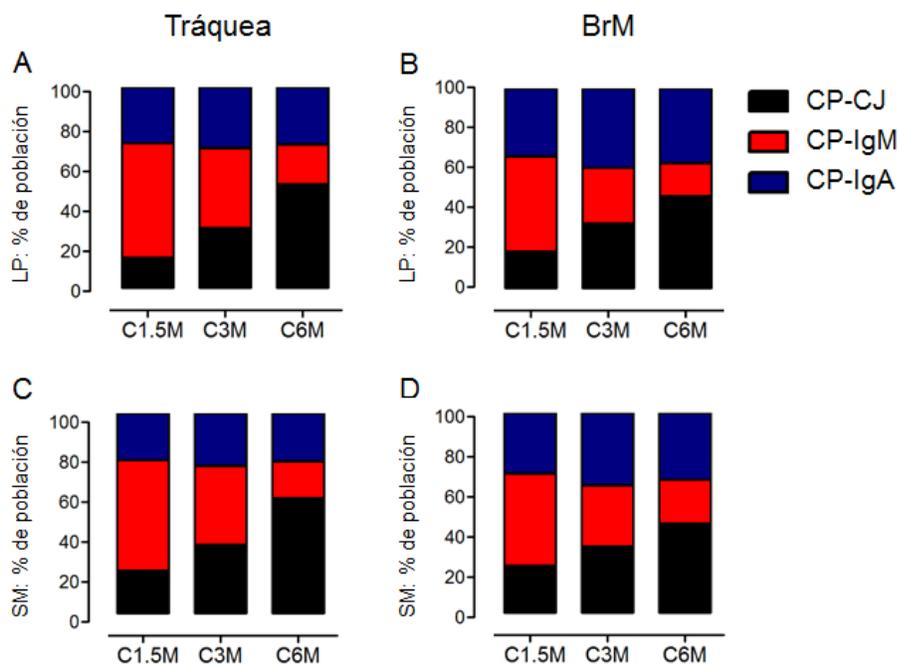


Figura 20. Cambios en los valores relativos de células positivas en la lámina propia (A-B) y submucosa (C-D) traqueal (A-C) y bronquial (B-D). Los valores absolutos (Figura 6) de las CP-CJ (negro), -IgM (rojo) e -IgA (azul) fueron transformados a porcentaje equivalente por edad: C2D (n=8), C1.5M (n=8), C3M (n=7) y C6M (n=5). Los C0D y C2D fueron excluidos de este análisis por la ausencia de células.

7.4 Expresión del SC en tráquea y bronquios porcinos

El componente secretor (SC) fue evaluado en la tráquea (Figura 21), BrM (Figura 22) y BrA de los C0D, C2D, C1.5M, C3M y C6M. En todos ellos, el patrón de expresión en la LP y la SM fue muy similar, por lo que solo se describe el de la tráquea. La tinción positiva del SC se observó en las células glandulares de la SM traqueal y muy escasamente en las células del epitelio respiratorio de los C0D (Figura 21A) -control de isotipo en Figura 21B- y C2D (Figura 21C) -control de isotipo en Figura 21D-. En los C1.5M, se detectó tinción para el SC en el epitelio respiratorio (Figura 21E), lo cual contrasta con la tinción uniforme de las glándulas de la SM (Figura 21F); posteriormente, la marca de ambos compartimentos se intensificó en los C3M (Figura 21G) y C6M (Figura 21H). Las limitantes técnicas de la IHQ impidieron realizar un estudio cuantitativo de la intensidad de mancha entre las diferentes edades.

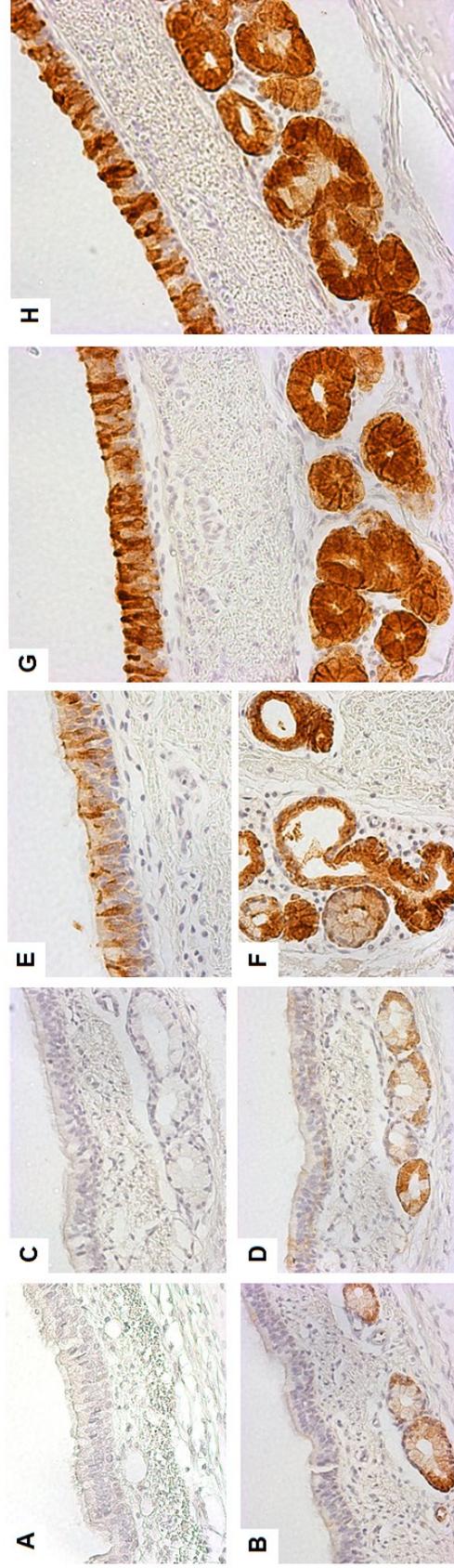


Figura 21. Desarrollo de la expresión del componente secretor (SC) porcino en tráquea. Tinciones inmunohistoquímicas de los C0D (A, B), C2D (C, D), C1.5M (E, F), C3M (G) y C6M (H). Imágenes representativas de los controles de isotipo de los C0D (A) y C2D (C). Aumento de todas las imágenes: 200X.

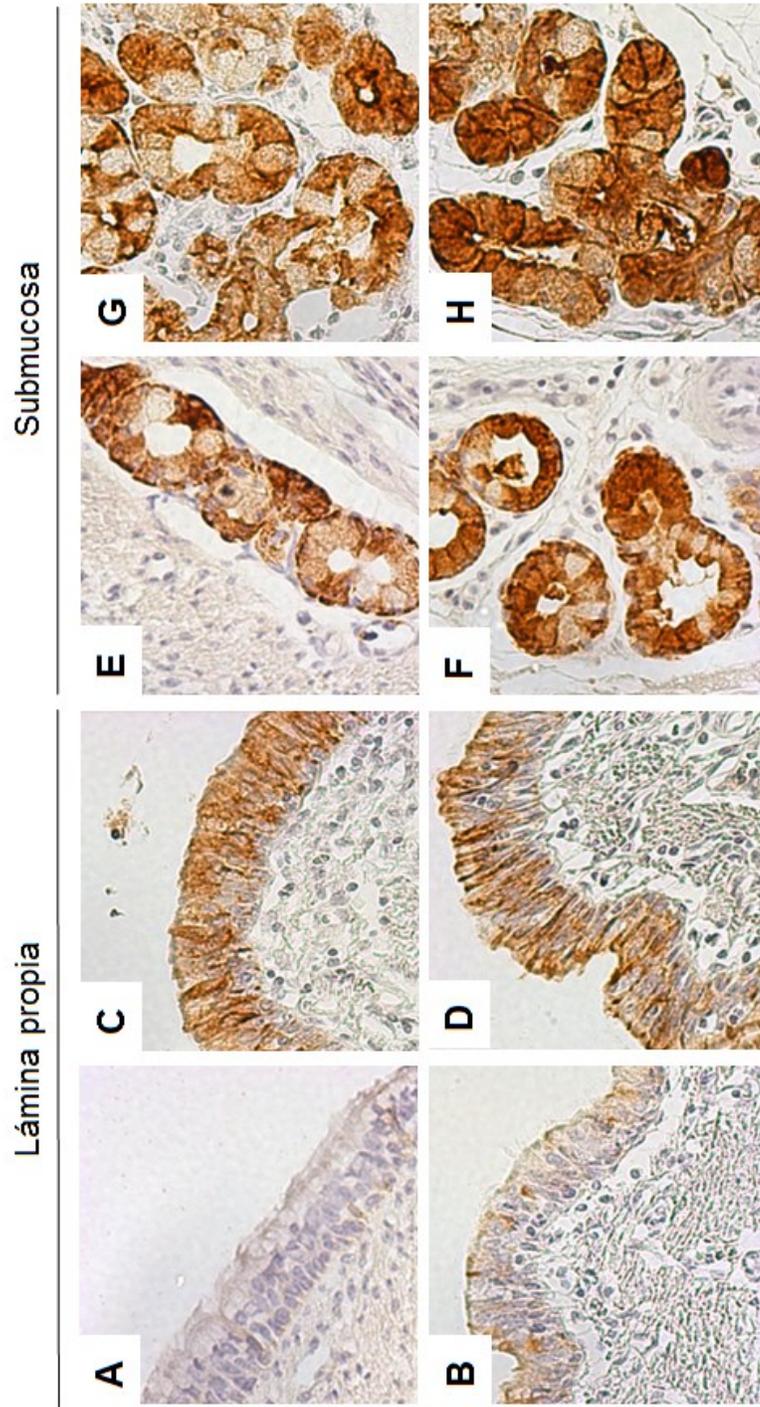


Figura 22. Desarrollo de la expresión del componente secretor (SC) porcino en bronquios mayores. Tinciones inmunohistoquímicas de lámina propia en los C2D (A), C1.5M (B), C3M (C) y C6M (D); y en la submucosa C2D (E), C1.5M (F), C3M (G) y C6M (H). Aumento de todas las imágenes: 200X.

7.5 Cuantificación de IgM sérica y en secreciones respiratorias

Los niveles de IgM sérica, traqueal, bronquial, nasal y salival fueron obtenidos de los diferentes grupos de minicerdos vietnamita. Las diferencias estadísticas (t de Student) entre los C0D y C2D se muestran en la Tabla 3 y las obtenidas de la comparación de medias (ANOVA-SNK), entre todos los grupos, en las Figura 23. En el suero porcino (Figura 23A), los niveles de IgM fueron cercanos a los 45 µg/mL en los C0D e incrementaron en los C2D (Tabla 3: P <0.05) y C1.5M (P<0.01), para posteriormente mantenerse sin cambios en los C3M y C6M. La concentración de IgM traqueal (Figura 23B) fue nula o muy baja en los C0D y C2D, aumentando ligeramente en los grupos restantes sin alcanzar significancia estadística. Respecto a la IgM bronquial, los niveles fueron muy bajos en los C0D, aumentando en los C2D (Tabla 3: P <0.05) a niveles de 1000 ng/mL, hasta prácticamente duplicar su concentración en los C3M (Figura 23C). En general, la IgM nasal (Figura 23D) y salival (Figura 23E) tuvieron un perfil muy parecido, en ambas secreciones la concentración de IgM fue muy baja en los C0D respecto a los C2D (Tabla 3: P <0.05), alcanzando su valor máximo en los C1.5M y sin diferencias estadísticas entre los C3M y C6M.

Tabla 3. Análisis estadístico entre los niveles de inmunoglobulinas de los C0D y los C2D

| Muestra | IgM | IgA Total | SIgA | IgG |
|-----------------|------------|------------------|-------------|------------|
| Suero | 0.0005 | <0.0001 | 0.0065 | <0.0001 |
| LT | 0.0062 | 0.0068 | 0.0081 | 0.0046 |
| LBA | 0.0107* | 0.0046 | 0.0025 | 0.0002 |
| Secreción nasal | 0.0049 | 0.0024 | 0.7424* | 0.0016 |
| Saliva | 0.0432 | 0.0221 | 0.3402 | <0.0001 |

Valor de P usando t-Student no pareado con corrección de Welch (*: sin corrección de Welch). C0D: Cerdos recién nacidos, n=6, C2D: Cerdos lactados dos días, n=8, LT: Lavado de tráquea, LBA: Lavado bronquioalveolar,

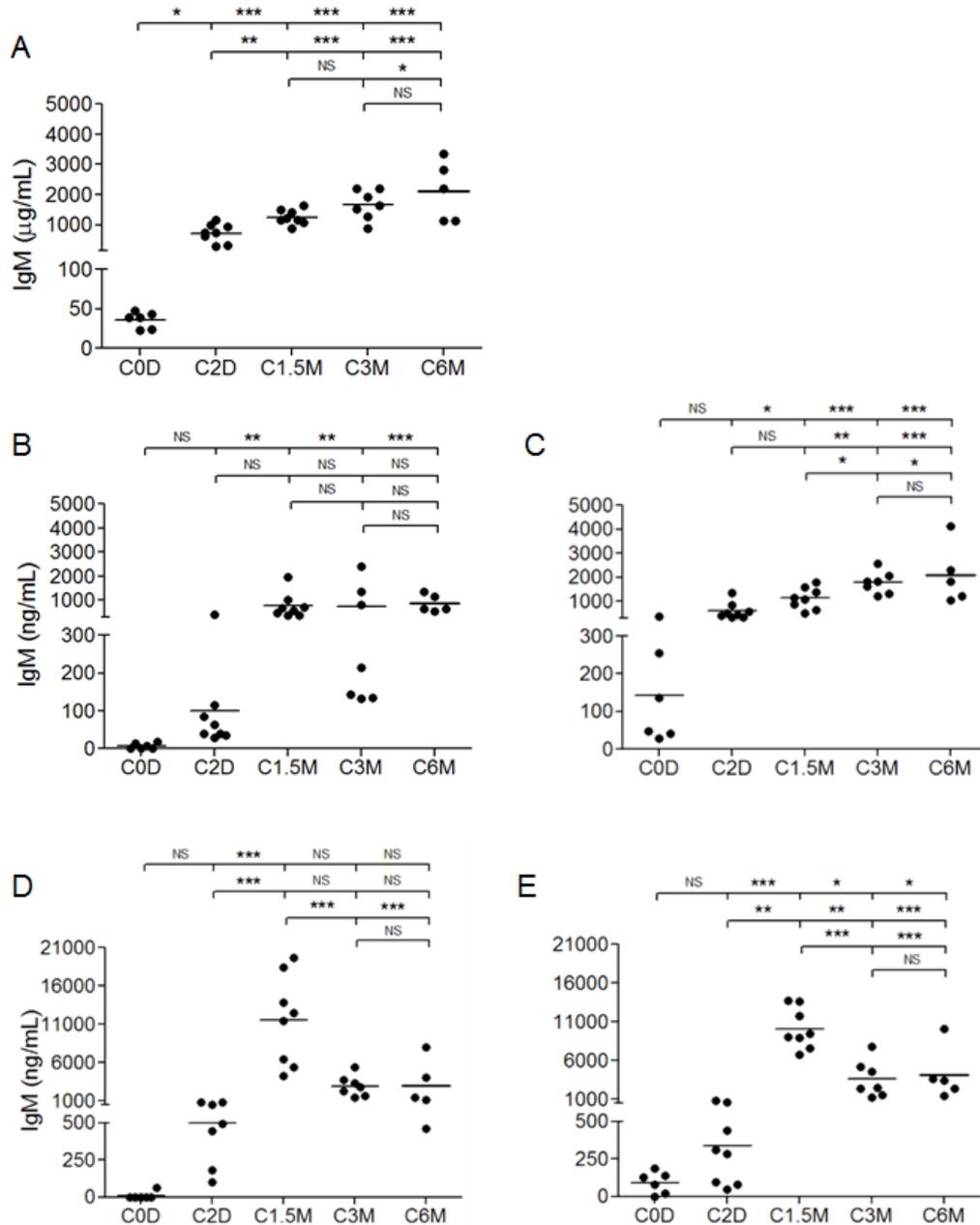


Figura 23. Concentración de IgM sérica y en el tracto respiratorio porcino. Cada punto representa la concentración individual de inmunoglobulinas en suero ($\mu\text{g/mL}$) (A), lavado de tráquea (B), lavado bronquioalveolar (C), secreción nasal (D) y saliva (ng/mL) (E), de los C0D (n=6), C2D (n=8), C1.5M (n=8), C3M (n=7) y C6M (n=5), detectada por ELISA. Las barras horizontales representan la media por grupo. Las diferencias estadísticas fueron evaluadas por ANOVA de una vía y SKN (*post-hoc*). Los asteriscos indican el valor de P al comparar las diferentes edades, *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$ y NS: No significativo. Las escalas de las gráficas son diferentes.

7.6 Cuantificación de IgA sérica y en secreciones respiratorias

Los niveles de IgA porcina fueron establecidos en términos de IgA total (IgA monomérica, dimérica y secretoria) y SIgA (IgA secretoria). Las diferencias estadísticas se muestran en la Tabla 3 (grupos neonatos) y la Figura 24 (todos los grupos). En el suero, la concentración de IgA total (Figura 24A) fue de 0.75 µg/mL en los C0D e incrementó a 200 µg/mL en los C2D y C1.5M, alcanzando su máximo valor en los C3M y C6M. En términos de SIgA, solo los C2D tuvieron una concentración elevada ($P < 0.001$) (Figura 24B). En la superficie traqueal, la IgA total (Figura 24C) y SIgA (Figura 24D) aumentaron con la edad, sin embargo, sus niveles fueron heterogéneos en los C1.5M, C3M y C6M. En el LBA, la concentración de IgA total fue baja en los C0D y en los C2D superó los 20,000 ng/mL (Tabla 3: $P < 0.001$), dicho valor se mantuvo sin cambios en los C1.5M y C3M; llegando a los 80,000 ng/mL en los C6M ($P < 0.001$) (Figura 24E). Por otra parte, la concentración de SIgA nuevamente alcanzó su nivel máximo en los C6M (Figura 24F). Por último, la tendencia de IgA fue similar en las secreciones del tracto respiratorio craneal. En secreción nasal, los niveles de IgA total rondaron los 50 ng/mL en los C0D y cerca de los 18,000 ng/mL en los C2D (Figura 25A), manteniéndose sin cambios hasta los C3M y llegando hasta los 70,000 ng/mL en los C6M. Lo anterior contrasta con la muy baja concentración de SIgA en todas las edades. En saliva (Figura 25B), la concentración de IgA fue prácticamente el doble respecto a la secreción nasal. Para IgA total (Figura 25 C), nuevamente los C2D presentaron mayores niveles respecto a los C0D (Tabla 3: $P < 0.001$) y sin cambios hasta los C1.5M. Por último, los niveles de SIgA (Figura 25D) repuntaron en los C1.5M, C3M y C6M.

7.7 Cuantificación de IgG sérica y de secreciones respiratorias

La concentración de IgG se obtuvo en suero, LT, LBA, secreción nasal y saliva. La IgG sérica (Figura 26A) fue cercana a los 2 µg/mL para los C0D y mayor a los 20,000 µg/mL en los C2D (Tabla 3: $P < 0.001$). Posteriormente, dicha concentración se mantuvo entre los 1,000-2,000 µg/mL en los C1.5M y C3M ($P < 0.001$) e incrementó 10 veces para los C6M ($P < 0.001$). En términos generales, el desarrollo de la IgG fue muy similar en las secreciones del tracto respiratorio (Figura 26B-E). La concentración de IgG incrementó significativamente en los C2D respecto a los C0D (Tabla 3: $P < 0.001$) y se mantuvo constante en el LT (Figura 26B), LBA (Figura

26C) y secreción nasal (Figura 26D) de los C1.5M, C3M, C6M, a excepción de saliva donde se observó un aumento en los C6M (Figura 26E).

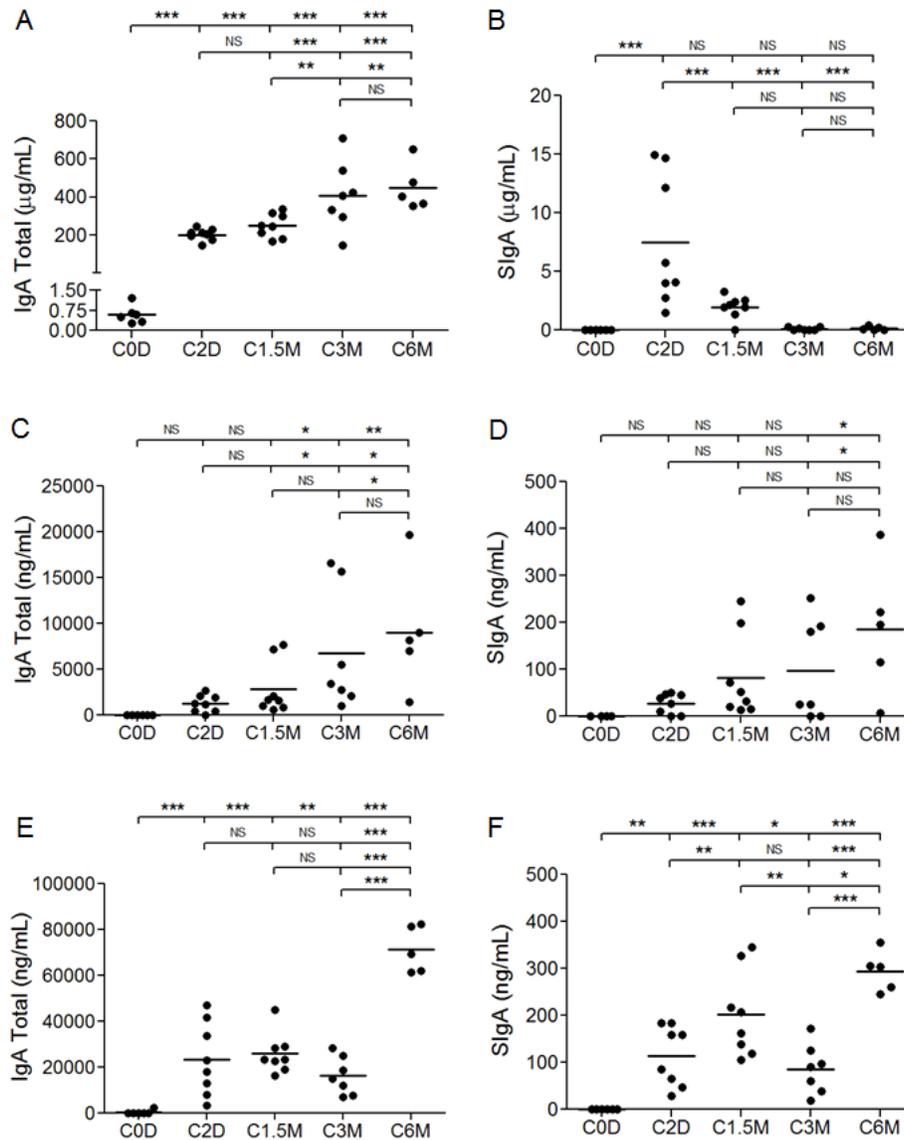


Figura 24. Concentración de IgA porcina y en el tracto respiratorio caudal. Cada punto representa la concentración individual de IgA total (A, C, E) o SIgA (B, D, F), en suero (µg/mL) (A-B), lavado de tráquea (ng/mL) (C-D) y lavado bronquioalveolar (ng/mL) (E-F), de los C0D (n=6), C2D (n=8), C1.5M (n=8), C3M (n=7) y C6M (n=5), detectada por ELISA. Las barras horizontales representan la media del grupo. Las diferencias estadísticas fueron evaluadas por ANOVA de una vía y SKN (*post-hoc*). Los asteriscos indican el valor de P al comparar las diferentes edades, *: P < 0.05, **: P < 0.01, ***: P < 0.001 y NS: No significativo. Las escalas de las gráficas son diferentes.

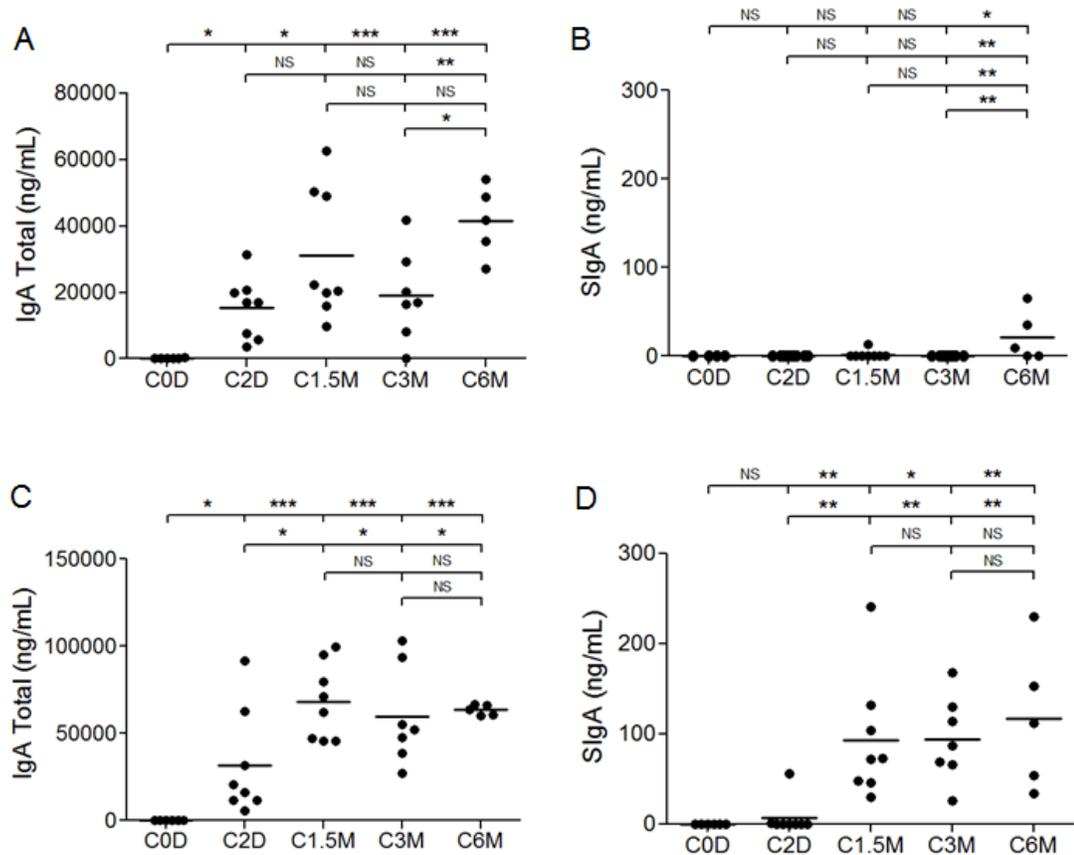


Figura 25. Concentración de IgA en el tracto respiratorio craneal. Cada punto representa la concentración individual de IgA total (A y C) o SIgA (B y D), en secreción nasal (ng/mL) (A-B) y saliva (ng/mL) (C-D), de los C0D (n=6), C2D (n=8), C1.5M (n=8), C3M (n=7) y C6M (n=5), detectada por ELISA. Las barras horizontales representan la media del grupo. Las diferencias estadísticas fueron evaluadas por ANOVA de una vía y SKN (*post-hoc*). Los asteriscos indican el valor de P al comparar las diferentes edades, *: P < 0.05, **: P < 0.01, ***: P < 0.001 y NS: No significativo. Las escalas de las gráficas son diferentes.

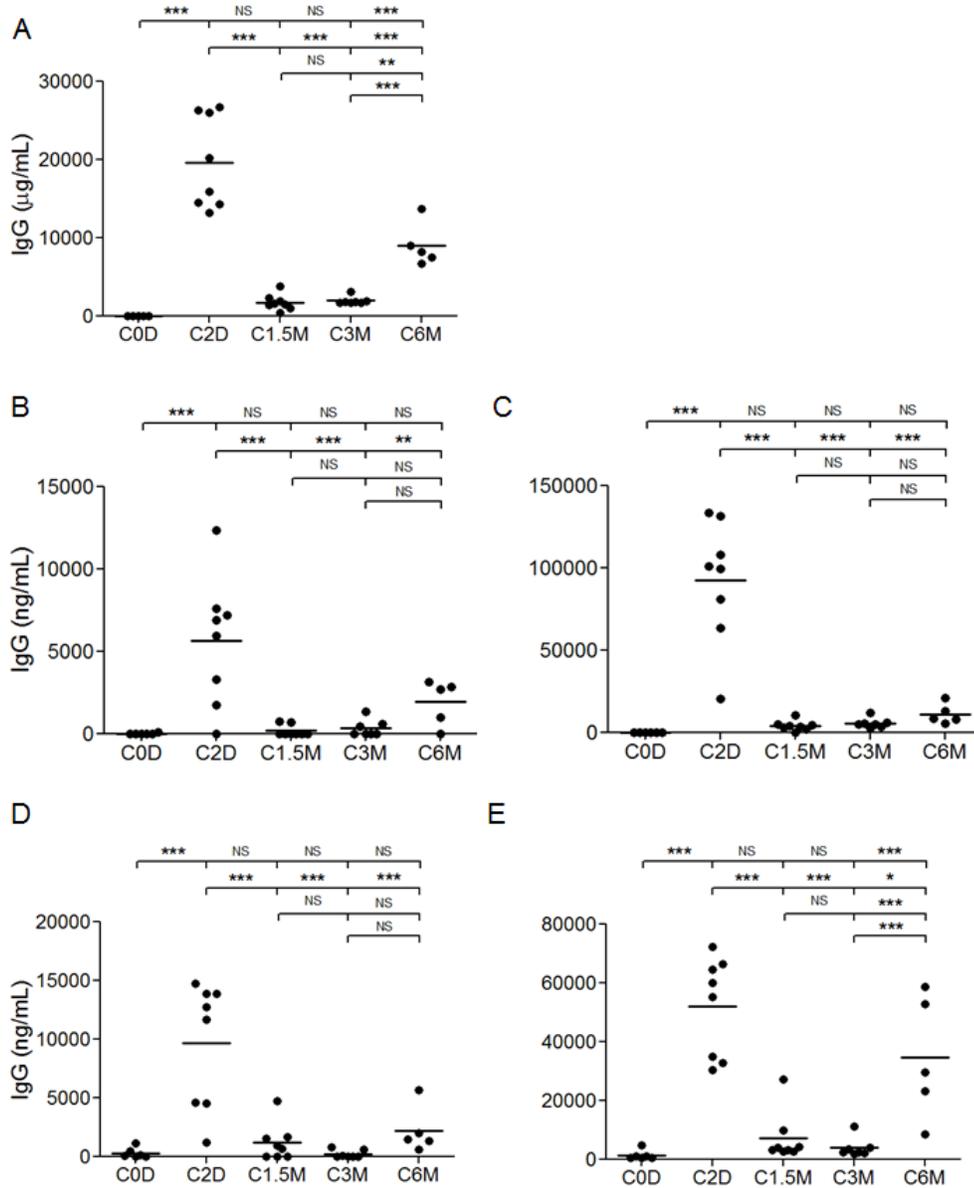


Figura 26. Concentración de IgG en suero y en el tracto respiratorio. Cada punto representa la concentración individual de IgG en suero ($\mu\text{g/mL}$) (A), lavado de tráquea (B), lavado bronquioalveolar (C), secreción nasal (D) y saliva (ng/mL) (E), de los C0D (n=6), C2D (n=8), C1.5M (n=8), C3M (n=7) y C6M (n=5), detectada por ELISA. Las barras horizontales representan la media por grupo. Las diferencias estadísticas fueron evaluadas por ANOVA de una vía y SKN (*post-hoc*). Los asteriscos indican el valor de P al comparar las diferentes edades, *: $P < 0.05$ **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$ y NS: No significativo. Las escalas de las gráficas son diferentes.

7.8 Cantidad y proporción de inmunoglobulinas en el tracto respiratorio

Se compararon las concentraciones de IgM, IgA total e IgG en el suero y las secreciones del tracto respiratorio. En los C0D, los niveles de IgA total e IgG fueron muy bajos en el LT (Figura 27A), LBA (Figura 27B), secreción nasal (Figura 27C) y saliva (Figura 27D). En los C2D, la concentración de IgG fue mayor que la de IgA total en el LBA. En general, la concentración de IgA total predominó sobre la de IgG en los C1.5, C3M y C6M, sin embargo, en algunas edades y muestras la concentración fue similar entre ambas inmunoglobulinas, por ejemplo: en los C1.5M del LT, C3M del BAL y en los C6M de la saliva. Para conocer la relación entre las tres inmunoglobulinas, se compararon los valores absolutos y relativos descritos anteriormente (Figura 28). En suero, la IgG fue preponderante sobre la IgM e IgA durante prácticamente todo el desarrollo porcino (Figura 28A-B), a excepción de los C0D, donde la IgM fue mayor en términos relativos. En la tráquea, la concentración de IgG fue mayor durante los primeros dos días de edad, sin embargo, la IgA total aumentó paulatinamente desde los C1.5M (Figura 28C), lo cual fue muy similar en los valores relativos (Figura 28D). En el LBA, la concentración de IgG fue alta en los C2D, en tanto que la de IgA total se mantuvo constante durante los primeros tres meses, repuntando en los C6M (Figura 28E), los valores relativos muestran el predominio de la IgA total a partir de los C1.5M (Figura 28F). En la secreción nasal, la IgA total predominó en términos absolutos (Figura 28G) y relativos (Figura 28H) en todas las edades. Finalmente, en saliva, la concentración de IgG fue mayor en términos absolutos (Figura 28I) y relativos (Figura 28J) en los C2D y posteriormente la de IgA total.

7.9 Correlación entre las células productoras de inmunoglobulinas y la secreción de inmunoglobulinas en el tracto respiratorio caudal

En los C2D, C1.5M, C3M y C6M se evaluó la correlación entre los niveles de IgM e IgA total con la densidad total (LP+SM) de CP-IgM y CP-IgA (Figura 29). En tráquea, el coeficiente de correlación de Pearson fue de 0.5510 para IgM (Figura 29A) y de 0.5340 para IgA (Figura 29B). En los bronquios, dicho coeficiente fue de 0.4217 para IgM (Figura 29C) y de 0.4416 en IgA (Figura 29D).

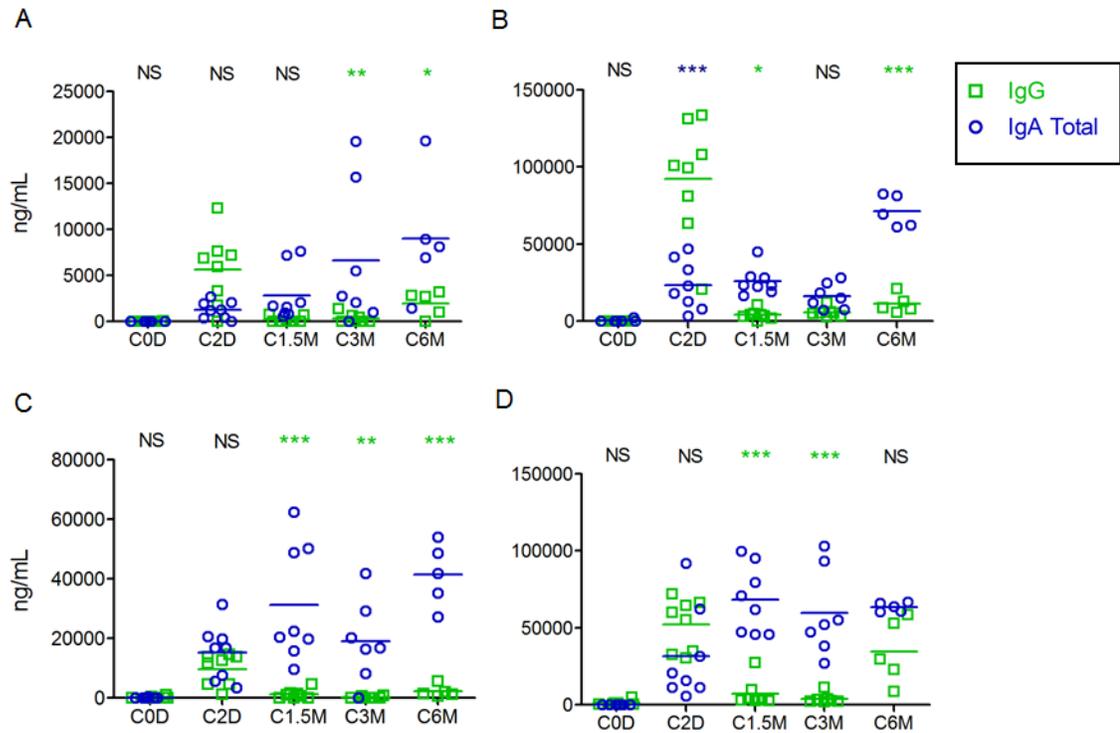


Figura 27. Concentración de IgG e IgA total en el tracto respiratorio porcino. Cada punto representa la concentración individual de IgG (verde) e IgA total (azul) (ng/mL) en lavado de tráquea (A), lavado bronquioalveolar (B), secreción nasal (C) y saliva (D), de los C0D (n=6), C2D (n=8), C1.5M (n=8), C3M (n=7) y C6M (n=5), detectada por ELISA. Las barras horizontales representan la media del grupo. Las diferencias estadísticas fueron evaluadas por ANOVA de dos vías y Bonferroni (*post-hoc*). Los asteriscos indican el valor de P al comparar la concentración entre inmunoglobulinas para cada edad, *: P < 0.05, **: P < 0.01, ***: P < 0.001 y NS: No significativo. Las escalas de las gráficas son diferentes.

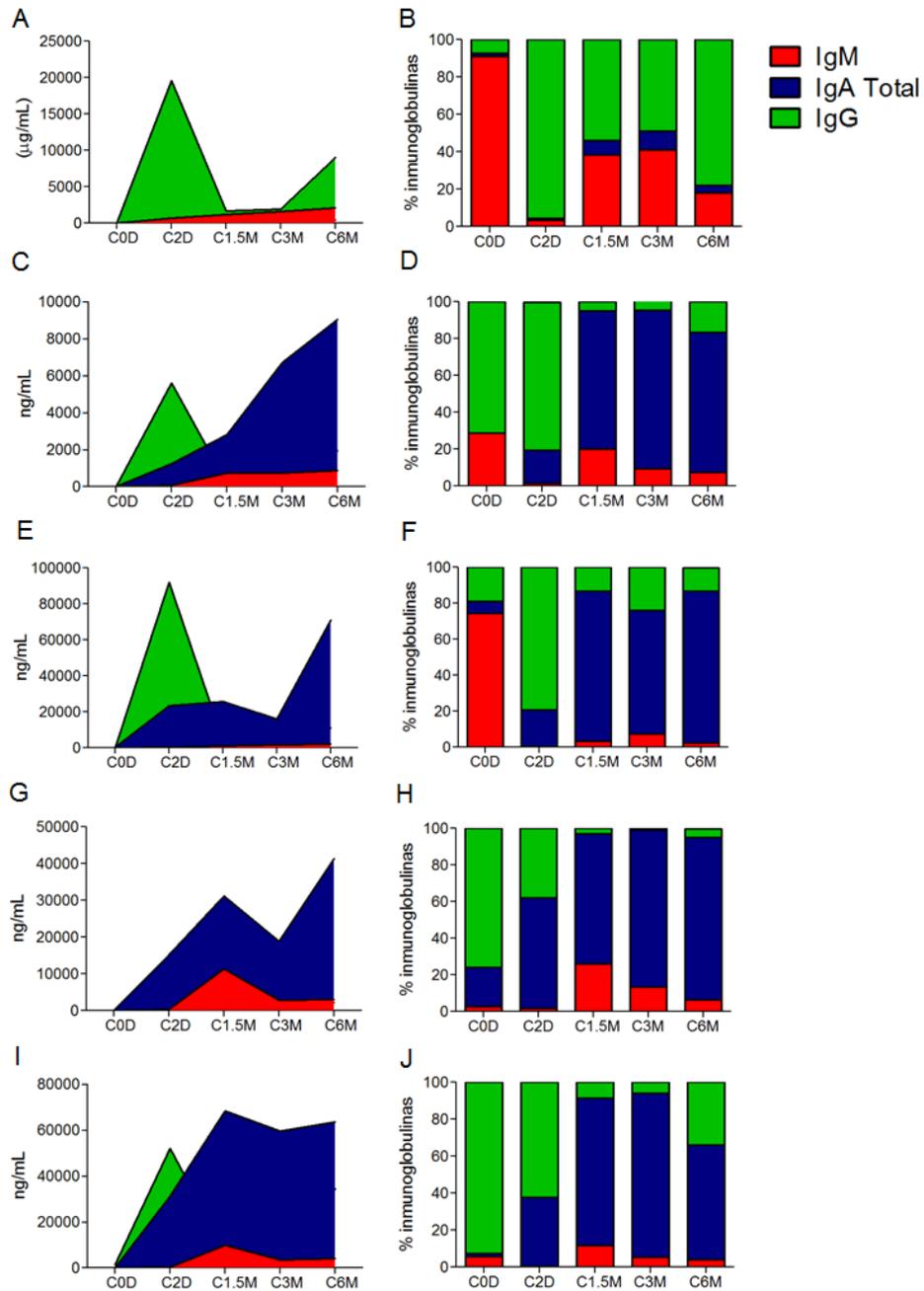
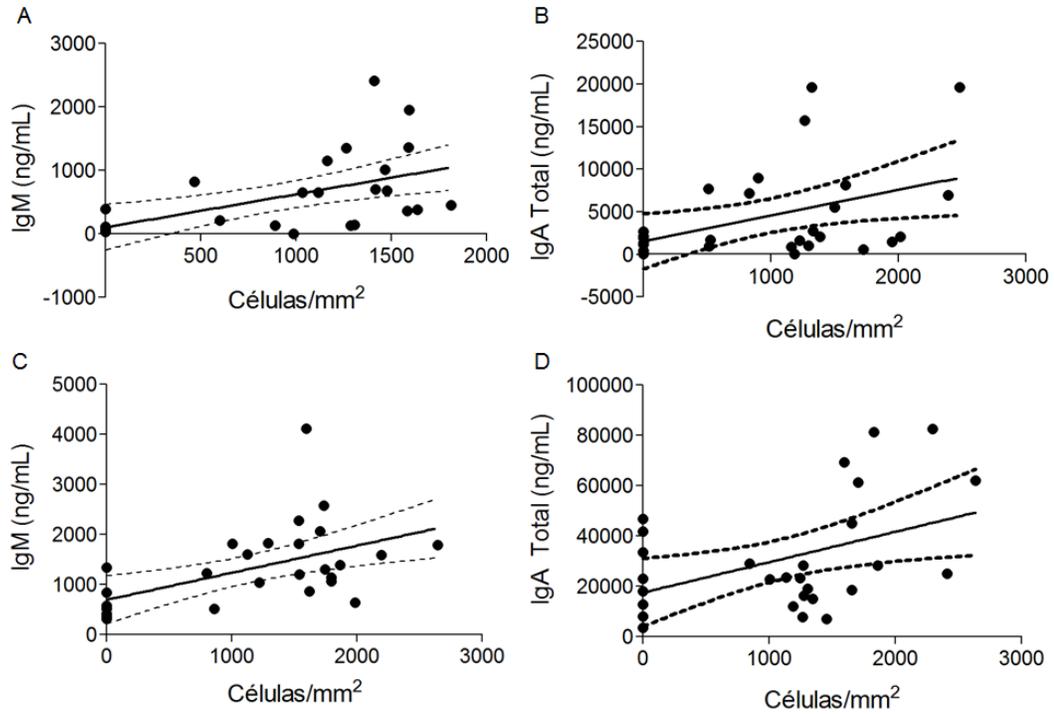


Figura 28. Valores absolutos y relativos de IgM, IgA total e IgG en suero y en el tracto respiratorio porcino. Las concentraciones de IgM (rojo), IgA total (azul) e IgG (verde) se graficaron en términos absolutos (A, C, E, G, I) y porcentuales (B, D, F, H, J), para suero ($\mu\text{g/mL}$) (A-B), lavado de tráquea (C-D), lavado bronquioalveolar (E-F), secreción nasal (G-H) y saliva (ng/mL) (I-J) de los C0D (n=6), C2D (n=8), C1.5M (n=8), C3M (n=7) y C6M (n=5). Las escalas de las gráficas son diferentes.



| Figura | Tejido | Inmunoglobulina | Pearson's r | Valor de P | r ² | 95% CI |
|--------|-------------|-----------------|-------------|------------|----------------|------------------|
| A | Tráquea | IgM | 0.5510 | 0.0029 | 0.3036 | 0.2162 to 0.7699 |
| B | Tráquea | IgA Total | 0.4217 | 0.0254 | 0.1779 | 0.0576 to 0.6868 |
| C | Bronquios A | IgM | 0.5340 | 0.0034 | 0.2851 | 0.2008 to 0.7564 |
| D | Bronquios A | IgA Total | 0.4416 | 0.0186 | 0.1950 | 0.0820 to 0.6995 |

Figura 29. Correlación entre la densidad celular y las inmunoglobulinas secretadas en la tráquea y bronquios porcinos. El coeficiente de Pearson (coeficiente de correlación del producto-momento) fue obtenido usando la concentración de IgM (A y C) e IgA total (ng/mL) (B y D) y la densidad celular total para cada inmunoglobulina (lámina propia + submucosa; células/mm²) en la tráquea y bronquios mayores. Cada punto representa un valor individual de los diferentes grupos de edad, C2D (n=8), C1.5M (n=8), C3M (n=7) y C6M (n=5). Los C0D fueron excluidos de este análisis. Las líneas sólidas representan la regresión lineal y las líneas punteadas su error estándar. Las escalas de las gráficas son diferentes. En el panel inferior se muestra la r de Pearson, el valor de P (dos colas), r² y los intervalos de confianza al 95%.

VIII. DISCUSIÓN

8.1 El SISIP en la tráquea y bronquios porcinos

El SISIP participa en la protección de las superficies mucosas del tracto respiratorio de los mamíferos, los elementos que lo conforman son: células plasmáticas, el pIgR e inmunoglobulinas secretorias, sin embargo, su estudio no ha sido abordado de manera integral, por lo que aún no es del todo claro su desarrollo y dinámica celular (Reynolds, 1991; Strugnell y Wijburg, 2010; Kato *et al.*, 2013). Este proyecto aporta información sobre el desarrollo del SISIP en el tracto caudal porcino; tráquea y bronquios. La detección de MatAb en la mucosa respiratoria, durante las etapas tempranas de la vida, demuestra el papel de la inmunidad natural pasiva en las mucosas. La identificación del SC en los neonatos sugiere que podría participar como un mecanismo de inmunidad innata y en el transporte de los MatAb. En términos estructurales, el SISIP completo se encontró hasta después del destete, e incrementó paulatinamente en los animales jóvenes y adultos, correlacionando positivamente con la liberación de inmunoglobulinas secretorias. Por otro lado, también se identificaron altas concentraciones de inmunoglobulinas monoméricas en los neonatos, incluso por arriba de las inmunoglobulinas poliméricas, lo que representa una nueva área de estudio sobre su transporte, función, relación con otras inmunoglobulinas, papel durante la inflamación y relevancia según la edad. Los resultados obtenidos confirman el uso del cerdo como modelo de investigación en medicina traslacional respiratoria, lo cual podría ayudar a la generación de nuevas estrategias de vacunación mucosal en medicina humana y veterinaria.

8.2 Densidad celular en submucosa y lámina de la mucosa respiratoria

El análisis de la distribución y densidad de las células plasmáticas mucosales ayuda a entender su función y posibles interacciones con las poblaciones inmunes residentes (Brandtzaeg y Johansen, 2005; Metzger, 2007). En los cerdos neonatos la densidad de células de CP-CJ, -IgA e IgM fue muy baja o nula (Figura 16-17), lo cual demuestra la incompleta estructuración del SISIP en dicha edad, y sugiere un sistema inmune “inmaduro”. Sin embargo, estudios recientes han desarrollado estrategias de modulación –formación de iBALT- (Rangel-Moreno *et al.*, 2011) e

inducción -respuesta de anticuerpos (IgA e IgG)- (Guzmán *et al.*, 2014), equiparable a la respuesta de animales jóvenes o adultos.

Después del destete, las CP-CJ, -IgA e -IgM incrementaron significativamente en comparación con los neonatos, probablemente como resultado de los estímulos proporcionados por los antígenos inhalados y la microbiota, como se ha descrito en humanos (Soutar, 1976; Kaissouni *et al.*, 1998; Wijtten *et al.*, 2011) y el intestino del cerdo (Vega-López *et al.*, 1993). En contraste, las CP-IgM disminuyeron con la edad (Figura 16-17), quizá como resultado del incremento en los otros isotipos mucosales, principalmente del tipo IgA (Capolunghi *et al.*, 2013). Lo anterior sugiere un estado maduro del SISIP después del destete, secretando mayoritariamente IgA sobre IgM. Primero, las CP-IgM (Figura 17) propiciarían las condiciones para establecer una respuesta inmune primaria y posteriormente la generación de memoria inmunológica, previa diferenciación a células plasmáticas IgA+, IgG+ o IgD+ en la mucosa (Brandtzaeg, 2007; Vega-López *et al.*, 1993). Segundo, la expresión del pIgR en el epitelio mucosal y en las glándulas de la submucosa refuerza la secreción de SIgs en la tráquea y bronquios (Figura 21-22). Si bien, la influencia de la microbiota, las citocinas y hormonas se ha demostrado *in vitro* en células epiteliales de intestino, es muy probable que *in vivo* dichos mecanismos sean similares en la mucosa respiratoria, considerando la exposición antigénica y la expresión dirigida por TLRs, receptores de citocinas, factores de crecimiento y hormonas (Johansen y Kaetzel, 2011). Tercero, la liberación de las inmunoglobulinas en el lumen mucosal (Figura 27-28), podría representar una estrategia en el desarrollo de los lechones una vez que la inmunidad maternal disminuye (Salmon *et al.*, 2009). Finalmente, la identificación del SISIP estructurado sugiere que la edad óptima de vacunación mucosal al destete, lo cual justifica y confirma lo ya realizado en el sector agropecuario y que podría servir como referencia para el humano. Sin embargo, la elucidación del papel de las SIgs no ha sido demostrada en dicha edad, aunque algunos estudios han desarrollado estrategias exitosas de protección para virus respiratorios como el virus de la Influenza (Meurens *et al.*, 2012). Por otro lado, existe evidencia clara de que, previo al destete, el lechón es capaz de montar respuesta inmune efectiva, tanto sistémica como local ante la vacunación (Guzmán-Bautista *et al.*, 2014), lo que sugiere que, en ausencia del SISIP, existen otros mecanismos de activación inmune que

permiten la protección adecuada del animal en ese período. Dentro de esos mecanismos podría incluirse la inmunidad pasiva de anticuerpos maternos que se ha demostrado que llegan a la mucosa del lechón (Guzmán-Bautista *et al.*, 2015).

Al igual que en los humanos, la pubertad porcina se caracteriza por el desarrollo de los caracteres sexuales en hembras y machos, por lo que los cambios hormonales desempeñan un papel preponderante durante dicho período. El sistema inmunológico porcino de las hembras puede ser modificado por las hormonas durante la gestación, lactación y etapa reproductiva (Butler *et al.*, 2009b; Salmon *et al.*, 2009), sin embargo, los efectos de la testosterona sobre los machos han sido poco caracterizados durante dicho período (Robic *et al.*, 2014). Los resultados de este trabajo sugieren que los cambios endocrinológicos de los cerdos jóvenes (C3M) podrían disminuir la secreción de SIgs y monoméricas en la mucosa, probablemente modulando la expresión de plgR y FcRn (Rojas y Apodaca, 2002; Butler *et al.*, 2009a; Cerutti *et al.*, 2011), debido a que sus niveles cambian considerablemente entre los animales destetados, jóvenes y adultos.

8.3 El SC se expresa en la tráquea y bronquios de los neonatos

Por cada molécula de SIgs, una molécula de SC es necesaria, por lo que el SC regula la secreción de plgs a las superficies mucosas, sin embargo, estudios sobre su expresión y desarrollo no se habían realizado anteriormente en el tracto respiratorio porcino. En los C0D y los C2D fue posible detectar la expresión del SC (plgR) en la LP y en las glándulas de la SM traqueal y bronquial (Figura 21-22), por lo que este elemento, está presente desde la etapa fetal. Su producción constitutiva sugiere su participación como mecanismo de inmunidad innata, al liberarse al lumen mucosal sin inmunoglobulinas adheridas, donde podría unirse a la microbiota o alérgenos, participando en la exclusión inmune. Además, en ausencia de producción endógena de anticuerpos, el SC podría funcionar como un auxiliar para el transporte de MatAb, por ejemplo la dIgA calostrala (Butler *et al.*, 2009, Meurens *et al.*, 2012). En humanos, se ha reportado que las glándulas salivales neonatales producen el SC en ausencia de células plasmáticas mucosales, lo cual refuerza la hipótesis de que podría funcionar como intermediario entre la inmunidad innata e inducible de las superficies mucosas (Kaetzel, 2014). Por otra parte, el incremento de la expresión del SC en las células epiteliales de los animales destetados sugiere un papel

importante de los estímulos alimentarios, hormonas, microbiota y antígenos inhalados en la maduración de las superficies mucosas. Sin embargo, también se ha reportado que la expresión temprana del SC podría favorecer la entrada del *Streptococcus pneumoniae* en la mucosa nasal, utilizando al pIgR como mecanismo de transporte, aumentando la susceptibilidad a infecciones (Kaetzel, 2005). Lo anterior, podría representar un factor de riesgo durante la etapa perinatal y de senectud, en las que las infecciones por estreptococo son recurrentes en los hospitales. También, la expresión deficiente del SC se ha relacionado con algunas enfermedades inflamatorias en la mucosa respiratoria, como EPOC (Pilette, 2001), lo cual señala la importancia de un SISIP completo y funcional en la regulación de la inmunidad mucosal.

8.4 Los MatAb son secretados en el tracto respiratorio

La concentración de inmunoglobulinas poliméricas y secretorias es diferente entre los compartimentos sistémicos y mucosales de los humanos y animales. El cerdo neonato es un modelo de investigación en el que es posible identificar a los MatAb en ambos compartimentos, debido a que durante el desarrollo fetal no hay paso transplacentario de la IgG materna al feto, por lo que la adquisición de los MatAb se realiza exclusivamente a través del consumo de calostro y leche. Las inmunoglobulinas séricas y mucosales de los COD podrían ser Igs naturales, producidas durante la vida fetal (Figura 23-26) (Butler *et al.*, 2009a, b).

La ingesta de calostro aumentó la concentración de Igs en suero y secreciones mucosas en los C2D (Tabla No.3); donde podrían tener un papel compensatorio en tanto se estructura el SISIP (Crowe, 2001). La presencia de IgM (Figura 23) e IgA (Figura 24-25) en la mucosa de los C2D, podría ser explicada por el transporte paracelular, debido a la apertura de las uniones estrechas por las citocinas proinflamatorias del calostro (Salmon *et al.*, 2009), las cuales, al disminuir su vida media podrían cambiar la permeabilidad mucosal, impidiendo el egreso de más inmunoglobulinas sistémicas. Sin embargo, hay preguntas importantes aún por contestar respecto al transporte de esas SIgs maternas al lechón, dado que para la secreción de la SIgA y SIgM al calostro materno, se requiere del SC (pIgR) unido a plgs, por lo que una ronda de transporte adicional, a través del pgR, sería poco probable en el neonato.

Los MatAb disminuyeron su concentración con el tiempo, como resultado de su distribución en los tejidos y su vida media. Los resultados obtenidos demuestran la secreción de inmunoglobulinas monoméricas en las superficies de la tráquea, secreción nasal y bronquios, comprobando lo que ya se había descrito para el LBA (Salmon *et al.*, 2009; Nechvatalova *et al.*, 2011). La comparación de SIgA e IgA total evidenció altos niveles de IgA no secretoria (sin SC) en los neonatos y cuyo transporte a la superficie mucosal no se ha dilucidado, por lo que deberá estudiarse con mayor detalle durante el desarrollo porcino. Esas Igs probablemente sean degradadas con mayor rapidez que la SIgA, por lo que su detección no había sido reportada anteriormente (Butler *et al.*, 2009a, b) y, en este trabajo, el manejo de las muestras con inhibidores de proteasas permitió su detección.

La alta concentración de IgG en las secreciones respiratorias de los C2D (Figura 26) sugiere que podría participar en la protección local en las etapas tempranas, y su liberación podría ser explicada a través del transporte dependiente de FcRn (Rojas y Apodaca *et al.*, 2002), trasudación del suero, o como parte de los complejos antígeno anticuerpo (pIgA-antígeno) (Kaetzel *et al.*, 1994). Estos resultados demuestran que los MatAb pueden ser liberados en el lumen mucosal del tracto respiratorio de los neonatos y que las Igs monoméricas podrían desempeñar funciones protectoras durante la etapa perinatal, aspecto que deberá estudiarse más a fondo.

8.5 Inmunoglobulinas monoméricas en la mucosa respiratoria

La relación entre las CP-IgA y CP-IgM y la secreción de inmunoglobulinas en la superficie traqueal (Figura 29A, C) y bronquial (Figura 29B, D) sugiere que las inmunoglobulinas secretorias se producen, en su mayoría, localmente, excepto en la etapa neonatal, donde los MatAb aparecen en las mucosas. Diferentes niveles de inmunoglobulinas fueron identificados en el tracto respiratorio craneal (secreción nasal y saliva) y el caudal (LT y LBA) (Figura 28), diferencias probablemente debidas al grado de exposición antigénica de cada compartimento (Gibbs y Holzman, 2012). La cuantificación de IgA total e IgG demostró una alta concentración de Igs monoméricas en las secreciones mucosas del tracto respiratorio (Figura 28). Este es el primer estudio que buscó diferencias entre las SIgA y la IgA monomérica, esto ha sido complicado en otros estudios debido a las

dificultades técnicas para distinguir entre el SC libre del unido a las Igs (Jaffar *et al.*, 2009), no obstante, los resultados indican que la IgA monomérica es secretada al lumen mucosal. Actualmente se sabe que la señalización a través de Fc α R promueve señales inflamatorias, sin embargo, el receptor de transporte aún no ha sido caracterizado en el cerdo.

Las inmunoglobulinas séricas eliminan eficientemente las infecciones sistémicas, sin embargo, su papel sobre las superficies mucosas es limitado, siendo las inmunoglobulinas mucosales las que confieren protección local (Cerutti, 2011; Strugnell y Wijburg, 2010). En los cerdos neonatos se detectaron altos niveles de IgA total e SIgA en suero, debido al consumo de calostro (Salmon *et al.*, 2009). Sin embargo, la cuantificación de IgA total fue baja en las superficies del tracto respiratorio, probablemente como resultado de un SISIP incompleto o escasa liberación paracelular durante dicho período. Por otra parte, la SIgA sérica de los neonatos disminuyó drásticamente con la edad, contrastando con el aumento de la IgA total en dicho compartimento. Además, la IgG sérica mantuvo niveles elevados al nacimiento, lo cual correlacionó con las mucosas (Figura 26), sin embargo, a pesar de que con la edad aumentó dicho nivel en circulación, su secreción fue escasa en las superficies mucosas. Estos resultados refuerzan la presencia de mecanismos de liberación de inmunoglobulinas diferenciales entre los compartimentos sistémicos y mucosales que podrían desarrollarse paulatinamente con la edad.

En general, los resultados demuestran la presencia de MatAb monoméricas y poliméricas en el tracto respiratorio del neonato, en la ausencia de células plasmáticas (Figura 29), lo cual podría compensar la relativa “inmadurez” del sistema inmune del recién nacido. En caso de infección, los neonatos podrían utilizar los elementos individuales del SISIP como un mecanismo innato de protección y transporte de MatAb, como en el caso del SC, en tanto se integra el sistema. Por otro lado, en los humanos adultos mayores se ha reportado la reducción de las poblaciones celulares inmunes en las mucosas (Blomber y Frasca, 2011), acompañado de una disminución en los niveles de protección mediada por anticuerpos (Fujihashi y Kiyono, 2009; Sato y Kiyono 2012), produciendo una inmunodeficiencia relativa. Las altas concentraciones de inmunoglobulinas

monoméricas encontradas en las mucosas de los animales jóvenes plantea la posibilidad de que esa inmunodeficiencia pueda ser compensada utilizando inmunidad pasiva para aumentar la protección mucosal. Eso dependerá de la elucidación de los mecanismos de transporte de Igs monoméricas a las mucosas en la etapa neonatal. Aun es necesario profundizar en el estudio de la organización y mantenimiento del SISIP en el tracto respiratorio, identificando las interacciones entre compartimentos, migración celular o activación en modelos de infección o inflamación.

IX. CONCLUSIONES

- El modelo porcino es una opción viable para el análisis del SISIP en el tracto respiratorio caudal (tráquea y bronquios porcinos) y para estudios traslacionales.
- El desarrollo del SISIP en tráquea y bronquios ocurre en etapas (figura 30):
 1. El pIgR está presente en los neonatos.
 2. Durante los primeros días de edad, los MatAb son secretados en el lumen del tracto respiratorio, donde podrían tener funciones protectoras.
 3. Las CP-CJ e -IgA incrementaron gradualmente en los cerdos con la edad; y, los niveles de las CP-IgM, fueron equiparables, desde el destete, con los de los animales adultos. Por lo que el SISIP completamente estructurado se detectó después del destete, lo que sugiere que podría ser la edad óptima para la vacunación mucosal.
 4. La densidad de CP-CJ, -IgA e IgM en la LP fue casi diez veces menor a la de la SM, sugiriendo una compartimentalización de células semejante a la encontrada en el intestino, por lo que dichos nichos contribuyen con diferentes niveles de SIgs al lumen mucosal.
 5. La IgG y probablemente la IgA monomérica se secretan en el lumen mucosal respiratorio en altos niveles, por lo que su papel en la protección debe ser estudiada más a fondo.

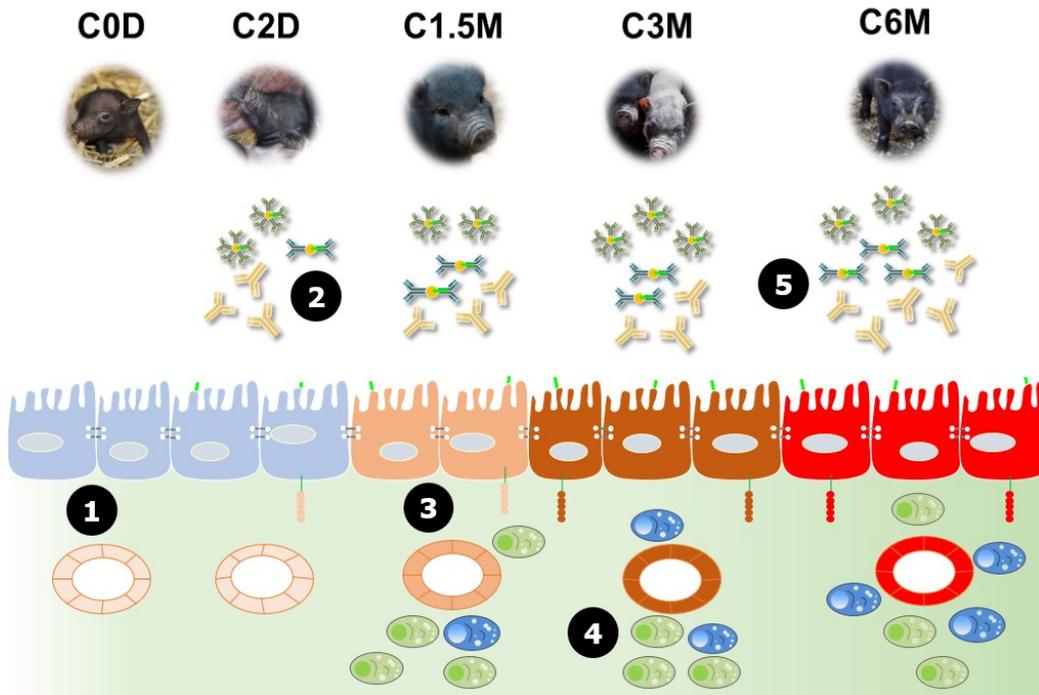


Figura No.30. Modelo del desarrollo del SISIP en la tráquea y bronquios porcinos. La explicación de cada uno de los puntos se indica en las conclusiones. C0D: cerdos recién nacidos, C2D: cerdos neonatos, C1.5M: cerdos destetados, C3M: cerdos jóvenes, C6M: cerdos adultos. Los tonos rojos y cafés sugieren el incremento en la expresión del pIgR.

X. PERSPECTIVAS

Los resultados de este trabajo podrían complementarse:

- Identificando células doble positivas: CP-CJ, CP-IgA, CP-IgM y CP-IgG, con inmunotinciones.
- Caracterizando los mecanismos de transporte (dependiente e independiente de receptor) de las inmunoglobulinas monoméricas y poliméricas en el tracto respiratorio porcino.
- Determinando la participación del pIgR como mecanismo innato en la protección del tracto respiratorio porcino.

- Evaluando los cambios en la inducción y estructuración del SISIP bajo condiciones de infección y protocolos de vacunación en animales neonatos y destetados.
- Comparando los índices de secreción y participación de las inmunoglobulinas poliméricas y monoméricas en la protección mucosal del cerdo.
- Analizando la función de la IgG en la protección/regulación de las mucosas del neonato.
- Evaluando el papel de la inmunidad pasiva en la protección de las mucosas en ausencia o deficiencia del SISIP, tanto en neonatos como en la vejez.

XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amoudruz P, Holmlund U, Malmström V, Trollmo C, Bremme K, Scheynius A and Sverremark-Ekström E (2005). Neonatal immune responses to microbial stimuli: is there an influence of maternal allergy? *J Allergy Clin Immunol* **115**(6):1304-1310.
- Arnaboldi PM, Behr MJ and Metzger DW (2005). Mucosal B cell deficiency in IgA-/- mice abrogates the development of allergic lung inflammation. *J Immunol* **175**(2):1276-1285.
- Arulanandam BP, Raeder RH, Nedrud JG, Bucher DJ, Le J and Metzger DW (2001). IgA immunodeficiency leads to inadequate Th cell priming and increased susceptibility to influenza virus infection. *J Immunol* **166**(1):226-231.
- Balam-May AJ, Ramírez-Estudillo C, Lazo-Vázquez G and Vega-López MA (2004). Postnatal development of lung T lymphocytes in a porcine model. *Lung* **192**(5):793-802.
- Bals R, Welsch U and Bosch TC (1998). Isolation and molecular characterization of serous and mucous gland cells of the porcine airways. *Am J Respir Cell Mol Biol* **18**(4):548-553.
- Bienenstock J, Johnston N and Perey DY (1973). Bronchial lymphoid tissue. I. Morphologic characteristics. *Lab Invest* **28**(6): 686–692.
- Blomberg BB and Frasca D (2011). Quantity, not quality, of antibody response decreased in the elderly. *J Clin Invest* **121**(8):2981–2983.
- Blumer N, Pfefferle PI and Renz H (2007). Development of mucosal immune function in the intrauterine and early postnatal environment. *Curr Opin Gastroenterol* **23**(6):655–660.

- Bradley PA, Bourne FJ and Brown PJ (1976a). The respiratory tract immune system in the pigs. I. Distribution of immunoglobulin-containing cells in the respiratory tract mucosa. *Veterinary Pathology* **13**(2), 81–89.
- Bradley PA, Bourne FJ and Brown PJ (1976b). The respiratory tract immune system in the pigs. II. Associated lymphoid tissue. *Veterinary Pathology* **13**(2), 90–97.
- Brandtzaeg P, Farstad IN, Johansen FE, Morton HC, Norderhaug IN and Yamanaka T (1999). The B-cell system of human mucosae and exocrine glands. *Immunol Rev*, **171**: 45–87.
- Brandtzaeg P and Pabst R (2004). Let's go mucosal: communication on slippery ground. *Trends Immunol* **25**(11):570-577.
- Brandtzaeg P and Johansen FE (2005). Mucosal B cells: phenotypic characteristics, transcriptional regulation, and homing properties. *Immunol Rev* **206**:32-63.
- Brandtzaeg P (2007). Induction of secretory immunity and memory at mucosal surface. *Vaccine* **25**(30):5467-5484.
- Brandtzaeg P, Kiyono H, Pabst R and Russell MW (2008). Terminology: nomenclature of mucosa-associated lymphoid tissue. *Mucosal Immunol* **1**(1):31–37.
- Brandtzaeg P (2009). Mucosal immunity: induction, dissemination, and effector functions. *Scand J Immunol* **70**(6):505–515.
- Brandtzaeg P (2013). Secretory IgA: designed for anti-microbial defense. *Front Immunol* **4**:222. doi: 10.3389/fimmu.2013.00222
- Broadbent AJ and Subbarao K (2011). Influenza virus vaccines: lessons from the 2009 H1N1 pandemic. *Curr Opin Virol* **1**(4):254–262.
- Buckley RH (2004). Pulmonary complications of primary immunodeficiencies. *Paediatr Respir Rev* **5**(suppl A):S225–S233.
- Burnett D, Crocker J and Stockley RA (1987). Cells containing IgA subclasses in bronchi of subjects with and without chronic obstructive lung disease. *J Clin Pathol* **40**(10):1217-1220.
- Butler JE, Zhao Y, Sinkora M, Wertz N and Kacs Kovics I (2009a). Immunoglobulins, antibody repertoire and B cell development. *Dev Comp Immunol* **33**(3):321-333.
- Butler JE, Lager KM, Splichal I, Francis D, Kacs Kovics I, Sinkora M, Wertz N, Sun J, Zhao Y, Brown WR, DeWald R, Dierks S, Muyldermans S, Lunney JK, McCray PB, Rogers CS, Welsh MJ, Navarro P, Klobasa F, Habe F and Ramsoondar J (2009b). The piglet as a model for B cell and immune system development. *Vet Immunol Immunopathol* **128**(1-3):147-170.
- Capolunghi F, Rosado MM, Sinibaldi M, Aranburu A and Carsetti R (2013). Why do we need IgM memory B cells? *Immunol Lett* **152**(2):114-120.

- Cerutti A (2008). The regulation of IgA class switching. *Nat Rev Immunol* **8**(6):421–434.
- Cerutti A, Cols M, Gentile M, Cassis L, Barra CM, He B, Puga I and Chen K (2011). Regulation of mucosal IgA responses: lessons from primary immunodeficiencies. *Ann N Y Acad Sci* **1238**:132-144.
- Cerutti A, Chen K and Chorny A (2011). Immunoglobulin responses at the mucosal interface. *Annu Rev Immunol* **29**:273–293
- Charley B and Corthier G (1977). Local immunity in the respiratory tract. II. Relationship of serum and local antibodies. *Annales de Microbiologie* **128B**(1):109–119.
- Chen K, Xu W, Wilson M, He B, Miller NW, Bengtén E, Edholm ES, Santini PA, Rath P, Chiu A, Cattalini M, Litzman J, B Busse J, Huang B, Meini A, Riesbeck K, Cunningham-Rundles C, Plebani A and Cerutti A (2009). Immunoglobulin D enhances immune surveillance by activating antimicrobial, proinflammatory and B cell-stimulating programs in basophils. *Nat Immunol* **10** (8):889–898.
- Chvatchko Y, Kosco-Vilbois MH, Herren S, Lefort J and Bonnefoy JY (1996). Germinal center formation and local immunoglobulin E (IgE) production in the lung after an airway antigenic challenge. *J Exp Med* **184**(6):2353–2360.
- Conley ME, Dobbs AK, Farmer DM, Kilic S, Paris K, Grigoriadou S, Coustan-Smith E, Howard V and Campana D (2009). Primary B cell immunodeficiencies: comparisons and contrasts. *Annu Rev Immunol* **27**:199-227.
- Corbett NP, Blimkie D, Ho KC, Cai B, Sutherland DP, Kallos A, Crabtree J, Rein-Weston A, Lavoie PM, Turvey SE, Hawkins NR, Self SG, Wilson CB, Hajjar AM, Fortuno ES 3rd and Kollmann TR (2010). Ontogeny of Toll-like receptor mediated cytokine responses of human blood mononuclear cells. *PLoS ONE* **5**(11):e15041.
- Corthesy B (2010). Role of secretory immunoglobulin A and secretory component in the protection of mucosal surfaces. *Future Microbiol* **5**(5):817–829
- Crago SS, Prince SJ, Kulhavy R and Mestecky J (1978). Molecular-cellular interactions in the secretory IgA system. *Adv Exp Med Biol* **107**:209–217.
- Crowe JE Jr (2001). Influence of maternal antibodies on neonatal immunization against respiratory viruses. *Clin Infect Dis* **33**(10):1720-1727.
- Cunningham-Rundles C and Ponda CC (2005). Molecular defects in T- and B-cell primary immunodeficiency diseases. *Nat Rev Immunol* **5**(11):880–892.
- Cunningham-Rundles C (2008). Autoimmune manifestations in common variable immunodeficiency. *J Clin Immunol* **28**(suppl 1):S42–S45
- Cunningham-Rundles C (2009). Lung disease, antibodies and other unresolved issues in immune globulin therapy for antibody deficiency. *Clin Exp Immunol* **157**(suppl 1):12–16.
- Cyster JG (2003). Homing of antibody secreting cells. *Immunol Rev* **194**:48–60.

- Czerkinsky C, Prince SJ, Michalek SM, Jackson S, Russell MW, Moldoveanu Z, McGhee JR and Mestecky J (1987). IgA antibody-producing cells in peripheral blood after antigen ingestion: evidence for a common mucosal immune system in humans. *Proc Natl Acad Sci USA* **84**(8):2449–2453.
- Daniele RP (1990). Immunoglobulin secretion in the airways. *Annu Rev Physiol* **52**:177-195.
- Delventhal S, Hensel A, Petzoldt K and Pabst R (1992). Effects of microbial stimulation on the number, size and activity of bronchus-associated lymphoid tissue (BALT) structures in the pig. *Int J Exp Pathol* **73**(3):351–357.
- Dowling SJ and Levy (2014). Ontogeny of early life immunity. *Trends Immunol* **35**(7):299–310.
- Ehrenstein MR and Notley CA (2010). The importance of natural IgM: scavenger, protector and regulator. *Nat Rev Immunol* **10**(11):778-786.
- Evans CM, Koo JS (2009). Airway mucus: the good, the bad, the sticky. *Pharmacol Ther* **121** (3):332–348
- Fagarasan S and Honjo T (2003). Intestinal IgA synthesis: regulation of front-line body defences. *Nat Rev Immunol* **3**(1):63–72.
- Fernandez MI, Pedron T, Tournebize R, Olivo-Marin JC, Sansonetti PJ and Phalipon A (2003). Anti-inflammatory role for intracellular dimeric immunoglobulin A by neutralization of lipopolysaccharide in epithelial cells. *Immunity* **18**(6):739–749.
- Fujihashi K and Kiyono H (2009). Mucosal immunosenescence: new developments and vaccines to control infectious diseases. *Trends Immunol* **30**(7):334-343.
- Fukuyama S, Hiroi T, Yokota Y, Rennert PD, Yanagita M, Kinoshita N, Terawaki S, Shikina T, Yamamoto M, Kurono Y and Kiyono H (2002). Initiation of NALT organogenesis is independent of the IL-7R, LT β R, and NIK signaling pathways but requires the Id2 gene and CD3⁺CD4⁺CD45⁺ cells. *Immunity* **17**(1):31–40.
- Gereke M, Jung S, Buer J and Bruder D (2009). Alveolar type II epithelial cells present antigen to CD4⁺ T cells and induce Foxp3⁺ regulatory T cells. *Am J Respir Crit Care Med* **179**(5):344-355.
- GeurtsvanKessel CH, Willart MA, Bergen IM, van Rijt LS, Muskens F, Elewaut D, Osterhaus AD, Hendriks R, Rimmelzwaan GF and Lambrecht BN (2009). Dendritic cells are crucial for maintenance of tertiary lymphoid structures in the lung of influenza virus-infected mice. *J Exp Med* **206**(11):2339–2349.
- Gibbs K and Holzman IR (2012). Endotracheal tube: friend or foe? Bacteria, the endotracheal tube, and the impact of colonization and infection. *Semin Perinatol* **36**(6):454-461.

- Gollwitzer ES and Marsland BJ (2015). Impact of early-life exposures on immune maturation and susceptibility to disease. *Trends in Immunology* **36**(11):684–696.
- Gosman MM, Willemse BW, Jansen DF, Lapperre TS, van Schadewijk A, Hiemstra PS, Postma DS, Timens W and Kerstjens HA (2006). Increased number of B-cells in bronchial biopsies in COPD. *Eur Respir J* **27**(1):60-64.
- Guzman-Bautista ER, Garcia-Ruiz CE, Gama-Espinosa AI, Ramirez-Estudillo C, Rojas-Gomez OI, Vega-Lopez MA (2014). Effect of age and maternal antibodies on the systemic and mucosal immune response after neonatal immunization in a porcine model. *Immunology* **141**(4):609-616.
- Guzman-Bautista ER, Ramirez-Estudillo MC, Rojas-Gomez OI, Vega-Lopez MA (2015). Tracheal and bronchial polymeric immunoglobulin secretory immune system (PISIS) development in a porcine model. *Dev Comp Immunol* **53**(2):271-282.
- Hadfield TL, McEvoy P, Polotsky Y, Tzinslering VA and Yakovlev AA (2000). The pathology of diphtheria. *J Infect Dis* **181**(suppl 1):S116–S120.
- Hameleers DM, van der Ende M, Biewenga J and Sminia T (1989). An immunohistochemical study on the postnatal development of rat nasal-associated lymphoid tissue (NALT). *Cell Tissue Res* **256**(2):431–438.
- Harju K, Glumoff V and Hallman M (2001). Ontogeny of Toll-like receptors TLR2 and TLR4 in mice. *Pediatr Res* **49**(1):81–83.
- Harmsen A, Kusser K, Hartson L, Tighe M, Sunshine MJ, Sedgwick JD, Choi Y, Littman DR and Randall TD (2002). Organogenesis of nasal-associated lymphoid tissue (NALT) occurs independently of lymphotoxin- α (LT α) and retinoic acid receptor-related orphan receptor- γ , but the organization of NALT is LT α dependent. *J Immunol* **168**(3): 986–990.
- Heier I, Malmström K, Sajantila A, Lohi J, Mäkelä M and Jahnsen FL (2011). Characterisation of bronchus-associated lymphoid tissue and antigen-presenting cells in central airway mucosa of children. *Thorax* **66**(2):151-156.
- Hiemstra PS (2007). The role of epithelial β -defensins and cathelicidins in host defense of the lung. *Exp. Lung Res* **33**(10):537–542.
- Hilty M, Burke C, Pedro H, Cardenas P, Bush A, Bossley C, Davies J, Ervine A, Poulter L, Pachter L, Moffatt MF and Cookson WO (2010). Disordered microbial communities in asthmatic airways. *PLoS One* **5**(1):e8578.
- Holmgren N (1973). Immunoglobulins in normal porcine tracheobronchial secretions. *Acta Veterinaria Scandinavica* **14**(3): 366–380.
- Holt PG, Batty JE and Turner KJ (1981). Inhibition of specific IgE responses in mice by pre-exposure to inhaled antigen. *Immunology* **42**(3):409–417.

- Holt PG, Strickland DH, Wikström ME and Jahnsen FL (2008). Regulation of immunological homeostasis in the respiratory tract. *Nat Rev Immunol* **8**(2):142-152.
- Horton RE and Vidarsson G (2013). Antibodies and their receptors: different potential roles in mucosal defense. *Front Immunol* **4**:1-12.
- Huang YT, Chu RM, Liu RS and Weng CN (1990). Morphologic studies of intrapulmonary airway mucosa-associated lymphoid tissues in swine. *Vet Immunol Immunopathol* **25**(1):13-22.
- Huang YJ, Nelson CE, Brodie EL, Desantis TZ, Baek MS, Liu J, Woyke T, Allgaier M, Bristow J, Wiener-Kronish JP, Sutherland ER, King TS, Icitovic N, Martin RJ, Calhoun WJ, Castro M, Denlinger LC, Dimango E, Kraft M, Peters SP, Wasserman SI, Wechsler ME, Boushey HA, Lynch SV; National Heart, Lung, and Blood Institute's Asthma Clinical Research Network (2011). Airway microbiota and bronchial hyperresponsiveness in patients with suboptimally controlled asthma. *J Allergy Clin Immunol* **127**(2):372-381.
- Jaffar Z, Ferrini ME, Herritt LA and Roberts K (2009). Cutting edge: lung mucosal Th17-mediated responses induce polymeric Ig receptor expression by the airway epithelium and elevate secretory IgA levels. *J Immunol* **182**(8):4507-4511.
- Jahnsen FL, Moloney ED, Hogan T, Upham JW, Burke CM and Holt PG (2001). Rapid dendritic cell recruitment to the bronchial mucosa of patients with atopic asthma in response to local allergen challenge. *Thorax* **56**(11): 823–826.
- Jahnsen FL, Strickland DH, Thomas JA, Tobagus IT, Napoli S, Zosky GR, Turner DJ, Sly PD, Stumbles PA and Holt PG (2006). Accelerated antigen sampling and transport by airway mucosal dendritic cells following inhalation of a bacterial stimulus. *J Immunol* **177**(9):5861–5867.
- Jesus AA, Duarte AJ and Oliveira JB (2008). Autoimmunity in hyper-IgM syndrome. *J Clin Immunol* **28**(suppl 1): S62–S66.
- Johansen FE, Braathen R, Brandtzaeg P (2000). Role of J chain in secretory immunoglobulin formation. *Scand J Immunol* **52**(3):240-248.
- Johansen FE, Braathen R and Brandtzaeg P (2001). The J Chain Is Essential for Polymeric Ig Receptor-Mediated Epithelial Transport of IgA. *J Immunol* **167**(9):5185-5192.
- Johansen FE and Kaetzel CS (2011). Regulation of the polymeric immunoglobulin receptor and IgA transport: new advances in environmental factors that stimulate pIgR expression and its role in mucosal immunity. *Mucosal Immunology* **4**(6): 598–602.
- Judge EP, Hughes JM, Egan JJ, Maguire M, Molloy EL and O'Dea S (2014). Anatomy and bronchoscopy of the porcine lung. A model for translational respiratory medicine. *Am J Respir Cell Mol Biol* **51**(3):334-343.

- Kadaoui KA and Corthesy B (2007). Secretory IgA mediates bacterial translocation to dendritic cells in mouse Peyer's patches with restriction to mucosal compartment. *J Immunol* **179**(11):7751–7757.
- Kaetzel CS, Robinson JK, Chintalacharuvu KR, Vaerman JP and Lamm ME (1991). The polymeric immunoglobulin receptor (secretory component) mediates transport of immune complexes across epithelial cells: a local defense function for IgA. *Proc Natl Acad Sci USA*, **88**(19):8796–8800.
- Kaetzel CS, Robinson JK and Lamm ME (1994). Epithelial transcytosis of monomeric IgA and IgG cross-linked through antigen to polymeric IgA. A role for monomeric antibodies in the mucosal immune system. *J Immunol* **152**(1):72-76.
- Kaetzel CS (2005). The polymeric immunoglobulin receptor: bridging innate and adaptive immune responses at mucosal surfaces. *Immunol Rev* **206**:83-99.
- Kaetzel CS (2014). Coevolution of mucosal immunoglobulins and the polymeric immunoglobulin receptor: Evidence that the commensal microbiota provided the driving force. *ISRN Immunology ID 541537*: 1-20.
- Kaissouni JE, Bene MC, Thionnois S, Monin P, Vidailhet M and Faure GC (1998). Maturation of B cells in the lamina propria of human gut and bronchi in the first months of human life. *Dev Immunol* **5**(3):153-159.
- Karlsson MR, Johansen FE, Kahu H, Macpherson A and Brandtzaeg P (2010). Hypersensitivity and oral tolerance in the absence of a secretory immune system. *Allergy* **65**(5):561-570.
- Kato A, Hulse KE, Tan BK and Schleimer RP (2013). B-lymphocyte lineage cells and the respiratory system. *J Allergy Clin Immunol* **131**(4):933-957.
- Kiyono H and Fukuyama S (2004). NALT- versus Peyer's-patch-mediated mucosal immunity. *Nat Rev Immunol* **4**(9):699-710.
- Korsrud FR and Brandtzaeg P (1980). Quantitative immunohistochemistry of immunoglobulin- and J-chain-producing cells in human parotid and submandibular salivary glands. *Immunology* **39**(2):129-140.
- Krejci J, Nechvatalova K, Blahutkova M and Faldyna M (2013). The respiratory tract in pigs and its immune system: a review. *Veterinarni Medicina* **58**(4):206–220.
- Kunkel EJ, Kim CH, Lazarus NH, Vierra MA, Soler D, Bowman PM and Butcher EC (2003). CCR10 expression is a common feature of circulating and mucosal epithelial tissue IgA Ab-secreting cells. *J Clin Invest* **111**(7):1001–1010.
- Levy O (2007). Innate immunity of the newborn: basic mechanisms and clinical correlates. *Nat Rev Immunol* **7**(5):379-390.

- Liebler-Tenorio EM and Pabst R (2006): MALT structure and function in farm animals. *Veterinary Research* **37**(3): 257–280.
- Lund FE, Hollifield M, Schuer K, Lines JL, Randall TD and Garvy BA (2006). B cells are required for generation of protective effector and memory CD4 cells in response to pneumocystis lung infection. *J Immunol* **176**(10):6147–6154.
- Macpherson AJ, McCoy KD, Johansen FE and Brandtzaeg P (2008). The immune geography of IgA induction and function. *Mucosal Immunology* **1**(1):11–22.
- Mantis NJ, Cheung MC, Chintalacheruvu KR, Rey J, Corthesy B and Neutra MR (2002). Selective adherence of IgA to murine Peyer's patch M cells: evidence for a novel IgA receptor. *J Immunol* **169**(4):1844–1851.
- Matzinger P (2002). The danger model: a renewed sense of self. *Science* **296**(5566):301–305.
- Marsland BJ and Gollwitzer ES (2014). Host–microorganism interactions in lung diseases. *Nat Rev Immunol* **14**:827–835.
- Mensik J, Franz J, Pospisil Z and Krejci J (1971). The local transport of antibodies in the protection of calves and piglets against viral respiratory infection. *Acta Veterinaria Brno* **2**:75–81.
- Mestecky J and McGhee JR (1987). Immunoglobulin A (IgA): molecular and cellular interactions involved in IgA biosynthesis and immune response. *Adv Immunol* **40**:153–245.
- Metzger D (2007). Chapter 11. IgA and respiratory immunity. *En Mucosal Immune Defense: Immunoglobulin A*. Kaetzel CS Ed. Springer US. Pp. 269–290.
- Meurens F, Summerfield A, Nauwynck H, Saif L and Gerds V (2012). The pig: a model for human infectious diseases. *Trends Microbiol* **20**(1):50–57.
- Morgan KL, Hussein AM, Newby TJ and Bourne FJ (1980). Quantification and origin of the immunoglobulins in porcine respiratory tract secretions. *Immunology* **41**(3):729–736.
- Moyron-Quiroz JE, Rangel-Moreno J, Kusser K, Hartson L, Sprague F, Goodrich S, Woodland DL, Lund FE and Randall TD (2004). Role of inducible bronchus associated lymphoid tissue (iBALT) in respiratory immunity. *Nature Med* **10**(9):927–934.
- Moyron-Quiroz JE, Rangel-Moreno J, Hartson L, Kusser K, Tighe MP, Klonowski KD, Lefrançois L, Cauley LS, Harmsen AG, Lund FE and Randall TD (2006). Persistence and responsiveness of immunologic memory in the absence of secondary lymphoid organs. *Immunity* **25**(4): 643–654.
- Murphy TF, Bakaletz LO and Smeesters PR (2009). Microbial interactions in the respiratory tract. *Pediatr Infect Dis J* **28**(suppl 10):S121–S126.

- Nechvatalova K, Kudlackova H, Leva L, Babickova K and Faldyna M (2011). Transfer of humoral and cell-mediated immunity via colostrum in pigs. *Veterinary Immunology and Immunopathology* **142**(1-2):95–100.
- Nelson DJ, McMenamin C, McWilliam AS, Brenan M and Holt PG (1994). Development of the airway intraepithelial dendritic cell network in the rat from class II major histocompatibility (Ia)-negative precursors: differential regulation of Ia expression at different levels of the respiratory tract. *J Exp Med* **179**(1):203–212.
- Obata T, Goto Y, Kunisawa J, Sato S, Sakamoto M, Setoyama H, Matsuki T, Nonaka K, Shibata N, Gohda M, Kagiyama Y, Nochi T, Yuki Y, Fukuyama Y, Mukai A, Shinzaki S, Fujihashi K, Sasakawa C, Iijima H, Goto M, Umesaki Y, Benno Y and Kiyono H (2010). Indigenous opportunistic bacteria inhabit mammalian gut-associated lymphoid tissues and share a mucosal antibody-mediated symbiosis. *Proc Natl Acad Sci USA* **107**(16):7419–7424.
- Ogra PL (1971). Effect of tonsillectomy and adenoidectomy on nasopharyngeal antibody response to poliovirus. *N Engl J Med* **284**(2):59–64.
- Pasquier B, Launay P, Kanamaru Y, Moura IC, Pfirsch S, Ruffié C, Hénin D, Benhamou M, Pretolani M, Blank U, Monteiro RC (2005). Identification of Fc α RI as an inhibitory receptor that controls inflammation: dual role of FcR γ ITAM. *Immunity* **22**(1):31–42.
- Peterson DA, McNulty NP, Guruge JL and Gordon JI (2007). IgA response to symbiotic bacteria as a mediator of gut homeostasis. Shows that IgA enhances intestinal homeostasis by modulating gene expression in commensal bacteria. *Cell Host Microbe* **2**(5):328–339.
- Petrikin JE, Gaedigk R, Leeder JS and Truog WE (2010). Selective Toll-like receptor expression in human fetal lung. *Pediatr Res* **68**(4):335–338.
- Phalipon A and Corthesy B (2003). Novel functions of the polymeric Ig receptor: well beyond transport of immunoglobulins. *Trends Immunol* **24**(2):55–58.
- Pilette C, Ouadrhiri Y, Godding V, Vaerman JP and Sibille Y (2001). Lung mucosal immunity: immunoglobulin-A revisited. *Eur Respir J* **18**(3):571-588.
- Pilette C, Youssef Ouadrhiri, Françoise Dimanche, Jean-Pierre Vaerman, and Yves Sibille (2003). Secretory component is cleaved by neutrophil serine proteinases but its epithelial production is increased by neutrophils through NF- κ B- and p38 mitogen-activated protein kinase-dependent mechanisms. *Am J Respir Cell Mol Biol* **28**(4):485-498.
- Polte T, Hennig C and Hansen G (2008). Allergy prevention starts before conception: maternofetal transfer of tolerance protects against the development of asthma. *J Allergy Clin Immunol* **122**(5):1022–1030.

- Porgador A, Staats HF, Itoh Y and Kelsall BL (1998). Intranasal immunization with cytotoxic T-lymphocyte epitope peptide and mucosal adjuvant cholera toxin: selective augmentation of peptide-presenting dendritic cells in nasal mucosa-associated lymphoid tissue. *Infect Immun* **66**(12):5876–5881.
- Quiding-Järbrink M, Granström G, Nordström I, Holmgren J and Czerkinsky C (1995). Induction of compartmentalized B-cell responses in human tonsils. *Infect Immun* **63**(4):853–857.
- Racz P, Tenner-Racz K, Myrvik QN and Fainter LK (1977). Functional architecture of bronchial associated lymphoid tissue and lymphoepithelium in pulmonary cell-mediated reactions in the rabbit. *J Reticuloendothel Soc* **22**(1):59–83.
- Rangel-Moreno J, Moyron-Quiroz JE, Hartson L, Kusser K and Randall TD (2007). Pulmonary expression of CXC chemokine ligand 13, CC chemokine ligand 19, and CC chemokine ligand 21 is essential for local immunity to influenza. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**(25):10577–10582.
- Rangel-Moreno J, Carragher DM, de la Luz Garcia-Hernandez M, Hwang JY, Kusser K, Hartson L, Kolls JK, Khader SA and Randall TD (2011). The development of inducible bronchus-associated lymphoid tissue depends on IL-17. *Nat Immunol* **12**(7):639-646.
- Ratajczak C, Guisset A, Detry B, Sibille Y and Pilette C (2010). Dual Effect of Neutrophils on plgR/Secretory Component in Human Bronchial Epithelial Cells: Role of TGF- β . *J Biomed Biotechnol* **2010**(ID: 428618).
- Renz H, Brandtzaeg P and Hornef M (2011). The impact of perinatal immune development on mucosal homeostasis and chronic inflammation. *Nat Rev Immunol* **12**(1):9-23.
- Rescigno M, Urbano M, Valzasina B, Francolini M, Rotta G, Bonasio R, Granucci F, Kraehenbuhl JP and Ricciardi-Castagnoli P (2001). Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nat Immunol* **2**(4):361–367.
- Reynolds HY and Merrill WW (1981). Airway changes in young smokers that may antedate chronic obstructive lung disease. *Med Clin North Am* **65**(3):667-689.
- Reynolds HY (1991). Immunologic system in the respiratory tract. *Physiol Rev* **71**(4):1117-1133.
- Rojas R and Apodaca G (2002). Immunoglobulin transport across polarized epithelial cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**(12):944-955.
- Robic A, Faraut T and Prunier A (2014). Pathways and genes involved in steroid hormone metabolism in male pigs: A review and update. *J Steroid Biochem Mol Biol* **140**:44-55.

- Salmon H, Berri M, Gerdt V and Meurens F (2009). Humoral and cellular factors of maternal immunity in swine. *Dev Comp Immunol* **33**(3):384-393.
- Sato S and Kiyono H (2012). The mucosal immune system of the respiratory tract. *Curr Opin Virol* **2**(3):225-232.
- Sosa GA, Quiroga MF and Roux ME (2009). Flow cytometric analysis of T-lymphocytes from nasopharynx-associated lymphoid tissue (NALT) in a model of secondary immunodeficiency in Wistar rats. *Immunobiology* **214**(5):384-391.
- Soutar CA (1976). Distribution of plasma cells and other cells containing immunoglobulin in the respiratory tract of normal man and class of immunoglobulin contained therein. *Thorax* **31**(2):158-166.
- Strickland D, Kees UR and Holt PG (1996). Regulation of T-cell activation in the lung: isolated lung T-cells exhibit surface phenotypic characteristics of recent activation including downmodulated TcR, but are locked into G₀/G₁ phase of the cell cycle. *Immunology* **87**(2):242–249.
- Strugnell RA and Wijburg OL (2010). The role of secretory antibodies in infection immunity. *Nat Rev Microbiol* **8**(9):656-667.
- Stumbles PA, Thomas JA, Pimm CL, Lee PT, Venaille TJ, Proksch S and Holt PG (1998). Resting respiratory tract dendritic cells preferentially stimulate T helper cell type 2 (Th2) responses and require obligatory cytokine signals for induction of Th1 immunity. *J Exp Med* **188**(11):2019–2031.
- Sun K, Johansen FE, Eckmann L and Metzger DW (2004). An important role for polymeric Ig receptor-mediated transport of IgA in protection against *Streptococcus pneumoniae* nasopharyngeal carriage. *J Immunol* **173**(7):4576–4581.
- Suzuki K, Meek B, Doi Y, Muramatsu M, Chiba T, Honjo T and Fagarasan S (2004). Aberrant expansion of segmented filamentous bacteria in IgA-deficient gut. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**(7):1981–1986.
- Takeuchi O and Akira S (2009). Innate immunity to virus infection. *Immunol Rev* **227**(1):75-86.
- Teitelbaum R, Schubert W, Gunther L, Kress Y, Macaluso F, Pollard JW, McMurray DN and Bloom BR (1999). The M cell as a portal of entry to the lung for the bacterial pathogen *Mycobacterium tuberculosis*. *Immunity* **10**(6):641-650.
- Thornton DJ, Rousseau K and McGuckin MA (2008). Structure and function of the polymeric mucins in airways mucus. *Annu Rev Physiol* **70**:459–486.
- Tjärnlund A, Rodríguez A, Cardona PJ, Guirado E, Ivanyi J, Singh M, Troye-Blomberg M, Fernández C (2006). Polymeric IgR knockout mice are more susceptible to mycobacterial infections in the respiratory tract than wild-type mice. *Int Immunol* **18**(5):807–816.

- Tomasi Jr TB, Tan EM, Solomon A and Prendergast RA (1965). Characteristics of an immune system common to certain external secretions. *J Exp Med* **121**:101–124.
- Tschernig T and Pabst R (2000). Bronchus-associated lymphoid tissue (BALT) is not present in the normal adult lung but in different diseases. *Pathobiology* **68**(1):1–8.
- Tschernig T, Debertin AS, Paulsen F, Kleemann WJ and Pabst R (2001). Dendritic cells in the mucosa of the human trachea are not regularly found in the first year of life. *Thorax* **56**(6):427-431.
- Tschernig T, de Vries VC, Debertin AS, Braun A, Walles T, Traub F and Pabst R (2006). Density of dendritic cells in the human tracheal mucosa is age dependent and site specific. *Thorax* **61**(11):986-991.
- Tsukita S, Yamazaki Y, Katsuno T, Tamura A and Tsukita S (2008). Tight junction-based epithelial microenvironment and cell proliferation. *Oncogene* **27**(55):6930–6938.
- Tulic MK, Hodder M, Forsberg A, McCarthy S, Richman T, D'Vaz N, van den Biggelaar AH, Thornton CA and Prescott SL (2011). Differences in innate immune function between allergic and nonallergic children: new insights into immune ontogeny. *J Allergy Clin Immunol* **127**(2):470–478.
- Turner T and Jones CE (2009). Regulation of mucin expression in respiratory diseases. *Biochem Soc Trans* **37**(4):877–881.
- Uthoff H, Spenner A, Reckelkamm W, Ahrens B, Wölk G, Hackler R, Hardung F, Schaefer J, Scheffold A, Renz H, Herz U (2003). Critical role of preconceptional immunization for protective and nonpathological specific immunity in murine neonates. *J Immunol* **171**(7):3485–3492.
- Vance GH, Lewis SA, Grimshaw KE, Wood PJ, Briggs RA, Thornton CA and Warner JO (2005). Exposure of the fetus and infant to hens' egg ovalbumin via the placenta and breast milk in relation to maternal intake of dietary egg. *Clin Exp Allergy* **35**(10):1318–1326.
- Vega-López MA, Telemo E, Bailey M, Stevens K and Stokes CR (1993). Immune cell distribution in the small intestine of the pig: immunohistological evidence for an organized compartmentalization in the lamina propria. *Vet Immunol Immunopathol* **37**(1):49-60.
- Verhasselt V, Milcent V, Cazareth J, Kanda A, Fleury S, Dombrowicz D, Glaichenhaus N, Julia V (2008). Breast milk-mediated transfer of an antigen induces tolerance and protection from allergic asthma. *Nature Med* **14**(2):170–175.
- Wijtten PJ, van der Meulen J and Verstegen MW (2011). Intestinal barrier function and absorption in pigs after weaning: a review. *Br J Nutr* **105**(7):967-981.
- Woof JM and Russell MW (2011). Structure and function relationships in IgA. *Mucosal Immunology* **4**:590-597.

- Yerkovich ST, Wikström ME, Suriyaarachchi D, Prescott SL, Upham JW and Holt PG (2007). Postnatal development of monocyte cytokine responses to bacterial lipopolysaccharide. *Pediatr Res* **62**(5):547–552.
- Yokota Y, Mansouri A, Mori S, Sugawara S, Adachi S, Nishikawa S and Gruss P (1999). Development of peripheral lymphoid organs and natural killer cells depends on the helix-loop-helix inhibitor Id2. *Nature* **397**(6721):702–706.
- Yonemura S (2011). Cadherin–actin interactions at adherens junctions. *Curr Opin Cell Biol* **23**(5):515–522.
- Zhu M and Fu Y (2012). Proinflammatory IL-17 induces iBALT development. *Cell Mol Immunol* **9**(2):101-102.

XII. ANEXOS

Durante los estudios de doctorado, 2011-2015, se publicaron los siguientes artículos:

- Guzman-Bautista ER, Ramirez-Estudillo MC, Rojas-Gomez OI and Vega-Lopez MA (2015). Tracheal and bronchial polymeric immunoglobulin secretory immune system (PISIS) development in a porcine model. *Dev Comp Immunol* **53**(2):271-282. (Tesis de Doctorado).
- Guzman-Bautista ER, Garcia-Ruiz CE, Gama-Espinosa AI, Ramirez-Estudillo C, Rojas-Gomez OI and Vega-Lopez MA (2014). Effect of age and maternal antibodies on the systemic and mucosal immune response after neonatal immunization in a porcine model. *Immunology* **141**(4):609-16. (Tesis de Maestría).