



51  
20/1  
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

ESTUDIO SOBRE LA ACTIVIDAD DE UN  
ANTIGENO DE ENTEROBACTERIAS COMO  
ESTIMULANTE DE LA RESPUESTA DE  
ANTICUERPOS

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
QUÍMICO FARMACEÚTICO BIÓLOGO  
P R E S E N T A :  
RICARDO GARDUÑO DAMIAN

1991



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

# TESIS CON FALLA DE ORIGEN

II	OBJETIVOS E HIPOTESIS.....	31
III	DISEÑO EXPERIMENTAL	
	3.1. Material.....	32
	3.2. Metodología.....	34
	1. Selección del tiempo para administrar el adyuvante.....	34
	2. Selección de la dosis óptima del adyuvante.....	35
	3. Cuenta del número de CFA.....	36
	4. Prueba del <i>Limulus</i> .....	38
	5. Análisis estadístico de los resultados.....	38
IV	RESULTADOS.....	40
V	DISCUSION DE LOS RESULTADOS.....	49
VI	CONCLUSIONES.....	56
	BIBLIOGRAFIA.....	57
	ANEXO.....	66

## ABREVIATURAS

ACF	ADYUVANTE COMPLETO DE FREUND
BSA	ALBUMINA SERICA BOVINA
BSS	SOLUCION SALINA BALANCEADA
CFa	CELULA FORMADORA DE ANTICUERPOS
DTH	HIPERSENSIBILIDAD TIPO TARDIA
ECA	ANTIGENO COMUN DE LAS ENTEROBACTERIAS
EU	UNIDADES DE ENDOTOXINA
5-Fu	5-FLUOROURACILO
GRC	GLOBULOS ROJOS DE CARNERO
IL-1	INTERLEUCINA-1
IL-2	INTERLEUCINA-2
IL-6	INTERLEUCINA-6
IP	INTRAPERITONEAL
LPS	LIPOPOLISACARIDO
MDP	MURAMIL DIPEPTIDO.
SSI	SOLUCION SALINA ISOTONICA
Th	LINFOCITO T COOPERADOR
TNF	FACTOR DE NECROSIS TUMORAL

## INTRODUCCION

---

Las personas y animales de laboratorio pueden presentar diferentes tipos de inmunodeficiencias. Dentro de estas se pueden considerar dos grandes grupos. Una es la llamada primaria o congénita, que se presenta desde el nacimiento y la otra es la secundaria, que se puede adquirir en cualquier momento a lo largo de la vida y que puede ser transitoria o definitiva.

En los últimos años se ha observado un aumento muy grande en el número de pacientes con inmunodeficiencias secundarias. Estas personas pueden presentar diversos grados de inmunodepresión a causa de varios factores etiológicos entre los cuales se pueden citar las infecciones por virus o bacterias, el cáncer, la desnutrición, la edad avanzada, la contaminación ambiental, la drogadicción, la administración de ciertos antibióticos y esteroides, la exposición a radiaciones, las intervenciones quirúrgicas, etc.. Como una consecuencia estas personas presentan infecciones sobreagregadas, que complican la evolución de la enfermedad primaria y aumentan la tasa de mortalidad de las mismas. Por esta razón, en los últimos años han aumentado los esfuerzos de los investigadores por prevenir las infecciones de las personas inmunocomprometidas preparando nuevas vacunas por ejemplo contra *Streptococcus beta hemolítico del grupo A* o *Plasmodium falciparum* y además adyuvantes más potentes.

Sin embargo, en estos casos se presenta el problema de que las vacunas no estimulan una buena protección, por lo que es necesario aplicar refuerzos o administrar el inmunógeno junto con adyuvantes. Desde hace años existe un gran interés por descubrir y conocer las características inmunopotenciadoras de nuevas sustancias que puedan servir como adyuvantes. (67).

En la naturaleza existen una gran variedad de sustancias que pueden suprimir o potenciar la respuesta inmunológica. Algunas de las más estudiadas son los componentes superficiales de las bacterias gramnegativas, como los lipopolisacáridos (LPS) o endotoxinas, los cuales normalmente mantienen diversas interacciones con las células del sistema inmunológico. Aunque éstos componentes bacterianos presentan la característica de ser adyuvantes potentes, tienen la desventaja de presentar reacciones secundarias adversas tanto en modelos "in vitro" como "in vivo".

En el presente trabajo se estudian los posibles efectos inmunomoduladores de un componente bacteriano que se encuentra asociado a la mayoría de los LPS de las bacterias gramnegativas. Este hapteno es un trisacárido que ha sido denominado "Antígeno Común de las Enterobacterias" o ECA . La hipótesis del trabajo propone que este hapteno puede estimular o potenciar la respuesta anti-glóbulos rojos de canero al ser inyectado intraperitonealmente horas después del antígeno y

a largo plazo espera que el ECA pueda ser utilizado como un potenciador de la respuesta inmunológica a causa de su aparente inocuidad.

Nuestro estudio fue diseñado sobre un modelo "in vivo" y los resultados mostraron que a ciertas dosis y a condiciones de inoculación dadas, el ECA puede potenciar la respuesta inmune humoral de anticuerpos anti-glóbulos rojos de carnero.

## CAPITULO I

### ANTECEDENTES

---

#### 1.1. CLASIFICACION DE ADYUVANTES

Un inmunoadyuvante es una sustancia biológica o no biológica que influye directamente sobre la función inmune específica, modificando uno o más componentes de la red inmunorreguladora para aumentar o potenciar la respuesta inmune (1). Existe un enorme número de compuestos que han sido descritos como inmunoadyuvantes y que son notablemente diversos, tanto en su composición como en su origen y mecanismos de acción. Debido a esta gran diversidad se han presentado dificultades en su clasificación.

Para tratar de agruparlos en forma general, se ha propuesto su clasificación de acuerdo a su origen, el cual puede ser: mineral, sintético, químico, bacteriano y autólogo.

##### 1.1.1 Adyuvantes de Origen Mineral

Compuestos de aluminio. La primera vez que se utilizaron compuestos de aluminio como adyuvantes fue en el año de 1926.

Desde entonces los antígenos precipitados, mezclados o adsorbidos con los compuestos de aluminio han sido usados ampliamente para incrementar la respuesta inmune tanto en animales como en humanos.

Estos componentes y otros muy similares se consideran muy importantes por tener las siguientes características:

- 1.-Retardan la eliminación del antígeno
- 2.-Hacen más efectiva la presentación del antígeno al servir como depósito del mismo. Algunos trabajos han demostrado (2) que las geles de aluminio aparecen en nódulos linfáticos de conejos varios días después de su administración junto con el antígeno.

Varios estudios han confirmado que la respuesta inmune humoral aumenta cuando los antígenos se administran con geles de aluminio. En cambio esos mismos adyuvantes solo aumentan moderadamente la inmunidad celular (3), así como las reacciones de hipersensibilidad tipo tardío.

El hidróxido y fosfato de aluminio son los geles más utilizados en humanos. Generalmente los pacientes no tienden a presentar reacciones de hipersensibilidad después de su administración. Estos estudios se corroboraron con experimentos en ratones de los cuales se obtuvieron cortes histológicos que se examinaron microscópicamente (4) después de haber sido administrado el gel del compuesto de aluminio.

Uno de los principales inconvenientes que tienen estos compuestos es su presentación en forma de gel y debido a esto no se pueden liofilizar, aunque el inmunógeno se encuentre liofilizado por separado es necesario mantenerlos a bajas temperaturas. Su principal desventaja es que no son capaces de potenciar la respuesta inmune celular, por lo que solo han sido utilizados para incrementar la respuesta de anticuerpos y obtener un mejor grado de protección contra ciertos patógenos.

### 1.1.2 Liposomas

Los liposomas son esferas formadas por una bicapa de fosfolípidos, y un compartimiento acuoso central, en donde la fase acuosa que contiene a los antígenos queda atrapada. La membrana de los liposomas puede estar compuesta de lecitina, colesterol y estearilamina en proporciones de 7:2:1. Estos componentes proporcionan una carga (+), pero si la estearilamina es sustituida por el ácido fosfatídico o acetil-fosfato tiende a presentar una carga (-). Los liposomas fueron utilizados por primera vez en 1974 para aumentar la respuesta primaria de anticuerpos en contra del toxoide diftérico, comparándolo con la inoculación del toxoide fluido. Los resultados revelaron que cuando el toxoide se inyectó en liposomas cargados negativamente se presentó una respuesta de anticuerpos más alta que cuando el toxoide se inyectó solo (5).

Existe controversia respecto al modo de acción de los liposomas. Se considera que el antígeno dentro del liposoma facilita su ingestión por los macrófagos y provoca una presentación más eficiente del antígeno.

Diversos trabajos han comprobado que la potencia de los liposomas para incrementar la respuesta humoral y celular puede ser mayor aún si se le adiciona LPS, lípido A o muramil dipeptido (6,7,8).

### 1.1.3 Adyuvantes Sintéticos

Se han utilizado numerosos compuestos sintéticos con la finalidad de estimular la respuesta del sistema inmunitario. La mayor parte de ellos están formados por copolímeros. Algunos de ellos de naturaleza hidrofílica como el polioxietileno y otros son de naturaleza hidrofóbica como el polioxipropileno. Administrándolos en diferentes proporciones se ha podido comprobar la relevancia que tiene la presentación fisicoquímica de un antígeno mezclado en pequeñas cantidades de diferentes aceites. En un estudio se ha encontrado que los polímeros relativamente hidrofóbicos promueven la retención de albúmina sérica bovina sobre el aceite y por lo tanto inducen una alta respuesta de anticuerpos anti-BSA, en comparación con los copolímeros hidrofílicos (9). Por manipulación de las cantidades de copolímeros tanto hidrofóbicos como hidrofílicos con el

antígeno, se puede obtener una respuesta más efectiva de anticuerpos sin la formación de granuloma e inflamación (10).

#### 1.1.4 Adyuvantes Químicos

La potenciación general de la respuesta inmunitaria también la pueden llevar a cabo diferentes sustancias químicas y bioquímicas como por ejemplo polinucleótidos sintéticos, nucleótidos cíclicos, medicamentos y hormonas.

El mecanismo de acción de tales sustancias se explica porque modifican el metabolismo de las células presentadoras de antígeno y de los linfocitos. La respuesta de las células inmunocompetentes estimuladas por el antígeno implica un metabolismo muy activo, de modo que al añadirles algún inhibidor o estimulador se puede obtener la consiguiente disminución o aumento de dicho metabolismo.

Los linfocitos T son altamente sensibles a una modificación en la concentración de varias hormonas. Se conoce que las aminos biógenas, los agentes colinérgicos, la hormona del crecimiento, la insulina, los corticosteroides, prostaglandinas, la progesterona, la testosterona y las hormonas de la pituitaria actúan directamente sobre varias subpoblaciones de linfocitos T (11).

Muchas de las hormonas, medicamentos y particularmente las aminas biógenas, los agentes colinérgicos y las prostaglandinas provocan cambios del metabolismo de los nucleótidos cíclicos de los linfocitos. Así por ejemplo, se conoce que el GMP cíclico está involucrado en el estímulo de la proliferación de los linfocitos mediante mitógenos y antígenos. Parece que éste es el principal mecanismo de inmunopotenciación que se obtiene cuando se administran sustancias que modifican la concentración intracelular de los nucleótidos cíclicos.

En relación al uso de medicamentos como inmunoestimulantes, se puede mencionar al levamisol que es un derivado sintético del tetramisol, un medicamento antiparasitario de gran utilidad en veterinaria, algunos autores han encontrado que el levamisol puede aumentar la resistencia del huésped contra las células tumorales. Esto ha ocurrido bajo ciertas condiciones, como al administrarlo conjuntamente con otros medicamentos que puedan reducir la carga tumoral.

Actualmente se conoce que el levamisol administrado junto con el 5-fluorouracilo (5-Fu) a personas con cáncer, induce resultados bastante satisfactorios en el proceso de recuperación del paciente en comparación a los resultados obtenidos en pacientes a los cuales solo se les administra el 5-Fu. (12).

Se conoce que este compuesto tiene efecto sobre los

macrófagos y linfocitos T, aumentando la quimiotaxis y la fagocitosis, así como también intensificando la respuesta de los linfocitos inducida por mitógenos.

#### 1.1.5 Moduladores Naturales de la Respuesta Inmune

Entre los inmunoadyuvantes se pueden considerar productos que normalmente son liberados por los macrófagos y los linfocitos de animales vertebrados. Varios de éstos factores solubles entre los cuales se encuentra la IL-1 y la IL-2 ya han sido aislados por medio de técnicas de DNA recombinante y propuestos como adyuvantes de la respuesta inmunitaria.

La IL-1 estimula la proliferación de los linfocitos T y por consiguiente, existe la posibilidad que pueda ser utilizado como un adyuvante. Esto ha sido propuesto y demostrado en un estudio en el cual se incrementa la respuesta de IgG para la BSA cuando la IL-1 se administra de 1-2 h después de la primera dosis del antígeno, sin embargo la citocina tiene otros efectos biológicos tales como provocar fiebre y producir una fase reactiva aguda. Ahora ya es posible que estas propiedades puedan ser eliminadas obteniendo el derivado no pirogénico que conserve la capacidad de estimular la proliferación de los linfocitos T (13). Se conoce que las dos clases de IL-1, alfa y beta, presentan la misma actividad.

Entre las múltiples actividades, "in vivo" e "in vitro" de la IL-2, se encuentran: 1) la de actuar como un factor estimulador de la proliferación de los linfocitos T, 2) La liberación de la IL-2 por células Th<sub>1</sub> modula la citotoxicidad mediada por células. Por tal característica ha sido propuesto que dicha interleucina puede ser usada como un agente anti-tumoral o para mejorar la inmunidad en pacientes con inmunodeficiencia (14).

#### 1.1.6 Sustancias de Origen Bacteriano

Muchas moléculas que se encuentran distribuidas en la superficie celular de las bacterias pueden actuar como moduladores del sistema inmunológico. Estos componentes superficiales que pueden tener una actividad estimulante o supresora de la inmunidad han sido encontrados tanto en bacterias grampositivas como en las gramnegativas y las micobacterias.

#### I Adyuvantes Derivados de Bacterias Grampositivas

Las sustancias que tienen un efecto inmunomodulador y están presentes en las bacterias grampositivas, consisten de grandes complejos covalentes como por ejemplo, los peptidoglicanos y algunos polímeros del ácido teicoico y del ácido teicurónico.

#### A) Peptidoglicanos

Dentro de los componentes de las bacterias grampositivas

algunos de ellos han sido muy estudiados, como es el caso de los péptidoglicanos, que presentan ciertas características biológicas (15) y se enumeran a continuación:

- 1.-Inducción de formación de anticuerpos
- 2.-Propiedades de endotoxina
- 3.-Activación de complemento
- 4.-Activador policlonal para células B
- 5.-Efecto sobre macrófagos (aumenta fagocitosis y quimiotaxis)
- 6.-Efecto sobre granulocitos (aumenta fagocitosis y quimiotaxis)
- 7.-Estimula la liberación de mediadores ( histamina, prostaglandinas)
- 8.-Incrementa la actividad tumoricida.
- 9.-Induce inflamación.

La actividad inmunológica de más interés de los péptidoglicanos es su efecto inmunopotenciador, el cual ha sido demostrado en algunos experimentos realizados en animales y humanos. Dos péptidoglicanos de S.aureus tienen acción mitogénica sobre las células humanas (16). En ratones se ha observado tanto el efecto mitogénico como la estimulación de la producción de anticuerpos, provocados por el mismo componente bacteriano (17,18,19).

En otros estudios con preparados de la pared celular de varios microorganismos grampositivos se pudo observar que

los peptidoglicanos de: Proteus vulgaris, Moraxella glucidolytica, Neisseria perflava, Micobacterium bovis, Staphylococcus aureus, Micrococcus luteus, Lactobacillus plantarum, Nocardia asteroides, Bacillus megaterium y Clostridium botulinum, son buenos estimulantes de la respuesta del sistema inmunitario.

Desafortunadamente los péptidoglicanos tienen la gran desventaja de ser insolubles en agua. Para poder administrarlos con el antígeno, estos deben ser solubilizados en un aceite mineral, pero debido a que este aceite no es metabolizable en el organismo causa reacciones que son indeseables para los pacientes.

Después de numerosos trabajos para conocer cuál era la estructura química responsable de la actividad biológica de los péptidoglicanos, los investigadores concentraron sus estudios en el muramil dipéptido (MDP), una subunidad muy pequeña de los péptidoglicanos que resultó ser la responsable de la actividad inmunoestimulante de los mismos (20).

#### B) Acido teicoico

Sobre la superficie celular se encuentran otros componentes, como el ácido teicoico, que también tiene ciertas características inmunomoduladoras.

Su actividad inmunomoduladora se demostró inicialmente "in

vivo" en diferentes cepas de ratones y posteriormente el efecto fue confirmado en cultivos de células esplénicas de ratones C3H/HeJ y BDF1. A partir de estos hallazgos se comprobó la influencia de la dosis en la inmunomodulación. A dosis bajas de 0.1-2.0 ug, el ácido teicoico incrementa la respuesta de células formadoras de placas y a dosis altas de 6.0-10 ug suprime la respuesta (21).

Existen otros estudios que confirman la actividad inmunomoduladora de este componente bacteriano. En ratas se ha provocado una supresión en la respuesta de células formadoras de anticuerpos y una disminución de los títulos de anticuerpos séricos contra glóbulos rojos de carnero (GRC), cuando se administraron junto con anticuerpos anti-ácido teicoico. Cuando las ratas no recibían o no formaban anticuerpos anti-ácido teicoico entonces no se obtenía la supresión de la respuesta humoral (15).

En cultivos de células esplénicas de ratones C57BL/6 se observó que la proliferación inducida por la concanavalina A para células T fue suprimida por el ácido teicoico, mientras que la proliferación inducida por el LPS a las células B fue incrementada (22). Es posible que la activación policlonal de los linfocitos B por el ácido teicoico contribuya a una respuesta no específica de defensa frente a la infección y lo mismo se podría decir de la estimulación de otras células como los macrófagos.

Los efectos benéficos de la inmunomodulación con el ácido teicoico son discutibles actualmente (23), pero es posible que más adelante el ácido teicoico se pueda utilizar para suprimir o potenciar la respuesta inmune en pacientes que así lo requieran. Sin embargo todavía se necesitan más experimentos para confirmar la utilidad de este producto bacteriano. Además no se conoce lo suficiente acerca de los efectos indeseables que se puedan presentar " in vivo ".

## II Adyuvantes Derivados de Bacterias Gramnegativas

EL citoplasma de las bacterias gramnegativas se encuentra envuelto por dos membranas, la interna y la externa, separados entre sí por un espacio periplásmico. De la membrana externa de las bacterias gramnegativas se han obtenido diferentes moléculas, tales como el LPS, el lípido A, varias proteínas y oligosacáridos como el antígeno común de las enterobacterias (ECA). Todas las moléculas tienen diferentes actividades biológicas, tanto inmunoestimulantes como inmunosupresoras.

### A) Lipopolisacárido

El componente superficial de las bacterias gram (-) más estudiado es el LPS. Ha sido extraído y purificado por diferentes procedimientos y durante varios años se le consideró el factor bacteriano tóxico responsable de las diversas actividades

biológicas atribuidas a las endotoxinas:

- 1.-Pirogenicidad
- 2.-Activación del sistema complemento
- 3.-Agregación plaquetaria
- 4.-Coagulación intravascular
- 5.-Aumento de la fagocitosis
- 6.-Estimulación inespecífica de los linfocitos B
- 7.-Shock y muerte

Otra actividad biológica, más bien benéfica, del LPS es su efecto adyuvante, el cual ha sido observado tanto "in vivo" como "in vitro" (24).

Cuando el LPS se inocula a conejos se ha podido observar que, bajo ciertas condiciones de administración, la respuesta de anticuerpos aumenta significativamente. Se han utilizado diferentes parámetros para la administración: 1) inocular al mismo tiempo el LPS con el antígeno 2) a diferentes tiempos y 3) inyectarlos por vía diferente.

El efecto adyuvante se observó cuando el LPS fue administrado horas después del desafío con el antígeno como era a las +6, +12, +24 y +48 h, pero no se presentó efecto inmunopotenciador a las -24, -12, -6, +72 y +96 h de la administración del antígeno (25,26).

En otros experimentos también se observó como afecta la cantidad inoculada de LPS (27) comprobándose que la máxima cantidad de LPS que estimulaba la producción de anticuerpos era de 10 µg/ratón y que si disminuía la dosis hasta 1.0 µg o aumentaba hasta 100 µg, la respuesta inmunológica humoral disminuía.

El LPS es una macromolécula cuya estructura química ha sido dividida en tres regiones con diferentes propiedades químicas y biológicas. La región I, "antígeno O", está constituida por una larga cadena de polisacárido y forma los antígenos específicos que proporcionan las principales características serológicas de la bacteria. Esta además se encuentra unida a un "núcleo" o "core" común a todos los LPS y que, a su vez, está unido a un 2-ceto-3-desoxioctonato-trisacárido (KDO), formando así las dos porciones la región II, la cual está ligada a un componente lipídico (región III) llamado lípido A. (24) Varios estudios demostraron que el lípido A era la parte biológicamente activa del LPS.

Respecto a los mecanismos por los cuales los LPS modifican la respuesta inmunitaria, se han propuesto los siguientes:

1.-Acción directa sobre células B.

2.-Acción directa sobre macrófagos (incrementa la actividad enzimática intracelular e induce la secreción de IL-1 y TNF)

3.-Induce la producción de citocinas, las cuales influyen en la función de las células T.

Cuando la respuesta de anticuerpos aumenta en presencia del LPS, tal respuesta probablemente sea la suma de los efectos de todos los mecanismos. Si se incuban macrófagos con LPS, éstos secretan una serie de mediadores que pueden tener influencia sobre células y tejidos cercanos. Muchos de los mediadores pueden también ser producidos por otras células estimuladas tales como linfocitos, fibroblastos o células epiteliales. Entre los factores liberados por los macrófagos se encuentra la IL-1, FNT, IL-6, colagenasa, elastasa, componentes C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>, y factor B, prostaglandinas, y leucotrienos.

Los hallazgos más importantes que se pueden mencionar en relación a los linfocitos son los siguientes:

a) El LPS provoca una respuesta proliferativa de los linfocitos B y una ulterior secreción de anticuerpos. Estos resultados se pueden lograr tanto en animales de laboratorio como en cultivos celulares. Un aspecto importante de la interacción LPS-linfocito B es el fenómeno de activación policlonal en el cual el LPS inicia una síntesis y secreción de inmunoglobulinas en linfocitos inmunocompetentes sin la presencia de la respuesta anamnésica inespecífica.

b) El LPS no inicia una respuesta proliferativa de los linfocitos T directamente, sin embargo hay evidencia experimental de que probablemente, las interacciones citocinas-linfocito T pueden estar involucradas en su respuesta.

Todos los estudios anteriores se han concentrado en observar las actividades biológicas de algunos componentes superficiales de las bacterias, pero quedan por explorar muchas otras moléculas de las bacterias gramnegativas y algunos investigadores aún esperan obtener con ellas mejores resultados en el estudio de las sustancias inmunomoduladoras.

Algunos estudios han investigado también las actividades biológicas de una proteína asociada al lípido A y demostraron que era un potente mitógeno pero que sus efectos dependían de su dosis ya que a concentraciones altas mostró ser muy tóxica.

Otra sustancia a la que se le hicieron estudios de función y estructura fue un glucolípido sintético similar a la región lipídica del LPS y fue descrito como un potente mitógeno para células B. Estos glucolípidos tuvieron un efecto comparable o superior al del LPS, cuando la respuesta inmunitaria fue medida por medio de la técnica de células formadoras de anticuerpos. Sin embargo, en ensayos de protección se observó que el LPS daba una protección del 80% mientras que el glucolípido

sintético sólo de un 40% (28).

Junto con todos estos componentes también se ha investigado una lipoproteína de la membrana externa de E.coli, demostrando su capacidad como mitógeno para los linfocitos B (29,30).

### III Adyuvantes Derivados de Micobacterias

#### A) Adyuvante de Freund

La mezcla de un aceite mineral y micobacterias muertas (adyuvante completo de Freund) es uno de los adyuvantes conocidos más potentes para estimular la respuesta celular y humoral. Sin embargo la emulsión presenta las siguientes desventajas: el aceite mineral no es metabolizable en los organismos vertebrados y, las micobacterias provocan graves reacciones granulomatosas. Existe otra formulación diferente en el adyuvante de Freund en donde se emplea lanolina pero presenta las siguientes desventajas: no se puede esterilizar en autoclave porque origina productos de descomposición con efectos indeseables en el organismo además con el tiempo tiende a solidificarse y es muy difícil hacer la mezcla con el inmunógeno.

Varios estudios realizados en humanos han revelado que al

vacunar personas con los antígenos del virus de la influenza junto con el adyuvante incompleto de Freund se presentaron tumores y enfermedades autoinmunes que fueron atribuidas al aceite mineral (31). Además se pudo observar que el adyuvante incompleto de Freund no incrementaba suficientemente la inmunidad celular, Sin embargo se emplea mucho en caballos para la obtención de sueros hiperinmunes porque aumenta considerablemente la respuesta humoral.

Se han utilizado otras emulsiones con lípidos metabolizables formadas a base de glicerol, lecitina, escualeno y aceite de sésamo, con la esperanza de que la emulsión sea degradable, estable, efectiva y no carcinogénica, pero los resultados obtenidos han mostrado que las mezclas tienen una menor eficiencia (32).

#### B) Muramil Dipéptido

El muramil dipéptido (MDP) ha sido identificado como el componente activo responsable de las actividades inmunoestimulantes del ACF, se le hicieron gran cantidad de estudios, correlacionando sus actividades con las ya existentes en los péptidoglicanos. Todos los estudios revelaron resultados muy similares en la mayoría de las actividades, tales como: efecto adyuvante, estimulación del sistema retículo endotelial y activación de linfocitos.

Una vez conocidas las actividades biológicas del MDP los trabajos siguientes condujeron a la síntesis de un compuesto que presenta las mismas actividades inmunopotenciadoras descritas anteriormente. En la actualidad grandes compañías han originado un potente mercado para el inmunomodulador sintético.

Las graves reacciones producidas tanto en el sitio de inoculación como en los nódulos linfáticos por el MDP al ser inyectado acompañado de aceite mineral, ha llevado a los investigadores a sintetizar varios derivados del MDP que sí han sido capaces de inducir una hipersensibilidad tipo tardío en cobayos cuando el producto es administrado en liposomas o en solución amortiguadora de fosfatos. Los derivados del MDP han probado ser útiles para incrementar la producción de anticuerpos contra antígenos protéicos. Ellos han dado buenos resultados y su actividad es comparable a la del adyuvante incompleto de Freud, al adyuvante completo o bien al MDP en emulsión (33,34).

Las desventajas que se le han encontrado al MDP y sus derivados han sido estudiadas al inducir encefalomiелitis alérgica experimental en cobayos (35). Otros investigadores han inducido poliartritis con reacciones inflamatorias agudas en ratas inmunodeficientes o pneumonitis granulomatosa crónica en conejos, en los dos casos las lesiones aparecen como una consecuencia de la inoculación del MDP (36,37). Entre otros

efectos indeseables se encuentra también la pirogenicidad.

## 1.2 ANTIGENO COMÚN DE LAS ENTEROBACTERIAS

Con el interés por encontrar nuevos componentes celulares y caracterizarlos tanto química como biológicamente han surgido varios trabajos en los cuales se estudia un componente de superficie de las bacterias gramnegativas que ha sido denominado antígeno común de las enterobacterias (ECA). Este hapteno ha sido considerado importante por muchos investigadores debido a que se encuentra presente en la membrana externa de la pared celular de todas las enterobacterias. Su estudio ha tenido diferentes objetivos, entre los cuales destacan su utilidad como vacuna y el uso de su actividad inmunomoduladora, esta última ha sido muy poco estudiada.

Antes de referir los estudios realizados sobre la actividad inmunomoduladora del ECA conviene mencionar primero algunas de sus características químicas y biológicas.

Este antígeno se encuentra en todos los miembros de la familia Enterobacteriaceae y los primeros en detectarlo fueron Kunin y sus colaboradores (38).

### 1.2.1 Distribución y Localización

El antígeno común de las enterobacterias es un polímero que

consta de dos porciones, una hidrofóbica y otra hidrofílica, la porción hidrofílica está constituida de unidades repetidas de N-acetil-D-glucosamina, ácido N-acetil-D-manosaminurónico y 4-acetamido-4,6-didesoxi-D-galactosa, mientras que la porción hidrofóbica es debida a la presencia de ácido L-glicerofosfatídico. Los aminoazúcares representan alrededor del 65-70% de toda la molécula (39).

El ECA puede existir en dos formas diferentes, la primera es la forma de hapteno o también conocida como forma libre y la segunda es la forma inmunogénica del ECA, ligado a los LPS de la membrana externa, la cual está restringida a unas pocas mutantes R con un código genético definido (40,41).

Trabajos posteriores indicaron (40) que el ECA inmunogénico de las mutantes R se encuentra unido al "núcleo" o "core" del LPS. Estas bacterias mutantes no poseen el antígeno "O" específico y como una consecuencia de esta unión, el ECA adquiere inmunogenicidad. La forma libre del ECA no se encuentra asociada al LPS. Además existen otras mutantes que no contienen ECA. En el caso de las bacterias ECA negativas, la mutación está ligada a los genes (*rfe*, *rff*).

Posterior al conocimiento de algunas cepas mutantes ECA-negativas de Salmonella y E. coli se realizaron otros trabajos donde utilizaron estas cepas para obtener un suero inmune

específico absorbido únicamente anti-ECA. Cuando los anticuerpos de los sueros absorbidos fueron conjugados a ferritina y fluoresceína, para poder observar así la presencia y distribución del ECA en la superficie bacteriana, Mayer y colaboradores, pudieron observar que las cepas inmunogénicas poseían una mayor cantidad de ECA que las cepas no inmunogénicas. Además, estas últimas poseían una distribución polar de la fluorescencia, la cual probablemente indica una movilidad lateral del ECA haptónico en la membrana externa, parecido al fenómeno de "patching" (40). Estos estudios demostraron la existencia del ECA en la membrana externa y no permitieron comprobar su presencia en otra región de la célula. En trabajos realizados con formas L de Proteus mirabilis (42) también demostraron que el ECA estaba restringido a la membrana externa de las enterobacterias.

### 1.2.2. Propiedades Fisicoquímicas del ECA

Las propiedades fisicoquímicas del ECA se investigaron a partir de sus extractos utilizando dos métodos: 1) fenol/agua y 2) fenol/cloroformo/éter de petróleo. En algunos casos, los productos extraídos fueron posteriormente purificados por cromatografía de intercambio iónico (43,44).

El ECA purificado es parcialmente soluble en agua (soluble en porciones menores al 0.3%). Contiene una carga negativa

muy alta. Sus aminoazúcares forman una cadena unida con enlaces 1,4 que debido a la reducción terminal de uno de ellos, se encuentran unidos alternadamente formando un polímero.

La esterificación parcial del ECA con los ácidos L-glicero fosfatídico y palmítico puede, en parte, ser la responsable del carácter hidrofóbico de la molécula y además de su incorporación a la membrana externa de las enterobacterias. Su baja solubilidad en agua después de romper los enlaces éster de los ácidos grasos sugiere la presencia de otros componentes lipídicos ; algunos investigadores reportan la presencia de cefalina al realizar estudios con fosfolipasa A 2 y al analizar su espectro de masa (45).

El ECA tiene la capacidad para adsorberse a la superficie de los eritrocitos (46). Probablemente la capacidad de unirse a las membranas puede estar relacionada con algún efecto inmunomodulador. Se sabe que la mayoría de los inmunopotenciadores son anfipáticos, como es el caso de los peptidoglucolípidos de micobacterias, ácido teicoico y LPS. Todas estas moléculas poseen una alta afinidad para unirse a membranas de eritrocitos (47,48,49) y otras células.

### 1.2.3 Propiedades Inmunológicas y Serológicas del ECA

Existen varias observaciones acerca de la inmunogenicidad

del ECA. Cuando se aisló la forma libre presentó muy poca inmunogenicidad al ser inoculada por vía intravenosa a conejos (50). Otros grupos de investigadores (51,52,53) demostraron una alta inmunogenicidad de las fracciones que contenían ECA obtenido por calentamiento de cultivos bacterianos y haciendo la extracción del LPS por precipitación con etanol. Varias observaciones indicaron que el ECA únicamente era inmunogénico cuando estaba ligado o asociado a un acarreador, tal como ocurría en las cepas inmunogénicas en las cuales el ECA estaba ligado covalentemente al LPS (53).

Pero existen otro tipo de uniones que interfieren con ella, como son por ejemplo las que se realizan con algunos lípidos. En varios experimentos el ECA perdió completamente su inmunogenicidad cuando era coagregado con estas sustancias. A este fenómeno se le llamó inmunosupresión antígeno-asociada, siendo muy clara cuando el ECA era mezclado con LPS, lípido A o la cardiolipina. Es posible que las sustancias impidan la asociación del ECA con su acarreador (54).

Dentro de los métodos serológicos empleados en la determinación del ECA se encuentran la hemaglutinación, la inhibición de la inmunohemólisis, inhibición de la hemaglutinación y la inmunoprecipitación (55).

#### 1.2.4 Efecto Inmunomodulador del ECA

Las actividades inmunomoduladoras del ECA han sido poco estudiadas, pero existen algunos experimentos que han investigado su efecto inmunomodulador en comparación con el de los LPS (56).

En todos los estudios se ha tratado de observar la capacidad para inducir reacciones de hipersensibilidad tipo tardío (DTH) y/o provocar una reacción de Arthus.

Los resultados han demostrado que el LPS es capaz de provocar una reacción DTH, al igual que el ECA tiene la capacidad de producirla. Respecto a la reacción de Arthus, ésta no puede ser provocada con el ECA. Otros resultados obtenidos "in vitro", también demostraron que el ECA era mitógeno, además de activador policlonal de linfocitos B en ratones CBA/J y C3H/HeJ (57).

Los experimentos "in vivo" de las actividades biológicas del ECA resultan de gran interés, porque aportan datos más completos respecto a lo que ocurre en todo el organismo. Por tanto cualquier sustancia así mismo, debe ser estudiada sobre animales de laboratorio que puedan proporcionar resultados más reales y aplicables a un individuo, en comparación con los resultados que se obtienen "in vitro", los cuales no se pueden extrapolar completamente a un ser vivo.

Al inocular el ECA en animales de laboratorio se ha observado que es totalmente inocuo hasta dosis de 1 mg por animal adulto. Al mismo tiempo se ha encontrado que no proporciona resistencia a las infecciones por gramnegativos patógenos por lo que no se han obtenido resultados satisfactorios cuando se ha empleado como vacuna (58,59,60).

### 1.3 APLICACIONES DE LOS ADYUVANTES

En los últimos diez años ha existido un aumento dramático en el número de pacientes inmunocomprometidos los cuales requieren de una protección efectiva frente a varios patógenos que tienden a provocarles infecciones frecuentes. Todos los pacientes no incluyen solamente a los del síndrome de inmunodeficiencia adquirida, sino también a pacientes con cáncer los cuales están bajo quimioterapia, niños desnutridos, ancianos, personas urémicas, pacientes intervenidos quirúrgicamente y personas que han recibido un trasplante y se mantienen bajo terapia inmunosupresora por largo tiempo.

En la actualidad es de muy alta prioridad tratar de prevenir la mayor parte de las infecciones, que en un momento dado causan una mortalidad más elevada que la misma enfermedad primaria. Esto ha sido resuelto en parte con los grandes adelantos científicos en la tecnología de la biosíntesis con el DNA recombinante y la

elaboración de péptidos sintéticos para producir vacunas contra infecciones como las producidas por el Streptococcus beta hemolítico del grupo A o Plasmodium falciparum.

Sin embargo se ha encontrado que estos antígenos purificados son poco inmunogénicos (61,62) por lo que es necesario aplicarlos junto con adyuvantes o administrar varios refuerzos.

En estudios en los que se ha observado la respuesta a la vacuna de la influenza y la hepatitis B en tres grupos de pacientes: 1) con cáncer y quimioterapia, 2) en personas sometidas a trasplantes y 3) en pacientes con diálisis; la respuesta a la vacuna de la influenza en los pacientes con cáncer fue muy variada dependiendo de la intensidad y la frecuencia de la quimioterapia (63). La respuesta a la vacuna de la hepatitis B fue muy baja en pacientes con trasplante (64), pero alrededor del 88% de personas con diálisis mostraron una respuesta alta para la misma vacuna, sin embargo el periodo de duración fue muy corto. (65,66).

Con los datos anteriores se ve en necesidad de buscar una estrategia efectiva para potenciar la respuesta inmune (67) obtenida con las vacunas, ya sea por medio de inmunógenos más potentes o encontrando inmunopotenciadores que junto con las vacunas ya existentes, logren aumentar la respuesta inmune profiláctica.

Para tratar de resolver el problema, en estudios experimentales "in vitro" es necesario contar con sustancias inmunomoduladoras que no sean demasiado tóxicas para las células para que permitan evaluar sus efectos inmunológicos, con base en lo anterior se ve en necesidad de buscar sustancias nuevas que tengan efecto inmunopotenciador y presenten mínima toxicidad.

## CAPITULO II

### OBJETIVOS E HIPOTESIS

---

---

El objetivo del presente trabajo es:

Conocer si la respuesta inmunológica contra los eritrocitos de carnero se modifica al inocular el antígeno común de las enterobacterias varias horas más tarde de haber inmunizado ratones adultos.

Con esta finalidad se determinará:

- 1) el tiempo óptimo que debe transcurrir entre la administración de los GRC y el ECA, para observar un efecto inmunoestimulante.
- 2) la dosis de ECA con la cual se puede observar un efecto inmunomodulador óptimo.

Con base en el conocimiento de las propiedades "in vitro" del ECA como mitógeno y activador policlonal, la hipótesis del trabajo propone que este hapteno puede estimular o potenciar la respuesta de anticuerpos anti-glóbulos rojos de carnero al ser inyectado intraperitonealmente poco tiempo después de haber sido administrado el antígeno.

## CAPITULO III

### DISEÑO EXPERIMENTAL

---

#### 3.1 MATERIAL

##### Animales

Se utilizaron 112 ratones hembra CD-1 de 1 1/2 a 2 meses de edad, los cuales fueron conservados desde el momento de su nacimiento en el Bioterio de la Facultad de Química y alimentados *ad libitum* con purina y agua.

##### Reactivos biológicos

a) Antígeno común de las enterobacterias (ECA) proveniente de una cepa de E. coli O 14, obtenido por el método de Suzuki et al (38), en concentraciones de 10, 25, 50, 100 y 500 µg de ECA/ml.

b) Glóbulos rojos de carnero, en suspensiones de 15% y 8%.

c) Suero fresco de cobayo como fuente de complemento.

d) Solución salina isotónica estéril y libre de pirógenos (Abbott Laboratories).

e) Lisado de amebocitos de *Limulus* liofilizado "Pirogent" (Whittaker M.A. Bioproducts) Cat No. N 183, N 184.

f) Endotoxina de E. coli 055:B5 (Whittaker M.A. Bioproducts) Cat No. N 183, N 184 a una concentración de 50 µg/ml

### 3.1.1. Obtención del ECA

#### a) Cultivo Bacteriano

Para llevar a cabo la obtención del ECA, se empleó una cepa de Escherichia coli O 14 proporcionada por el cepario de la Facultad de Química, tipificada tanto bioquímica como serológicamente, la cual fue cultivada en tripticase soya agar durante 18 horas a una temperatura de 37 C.

#### b) Extracción del ECA

La extracción del ECA se llevó a cabo de una suspensión de las bacterias en agua destilada la cual se calentó a 100 C durante 2 horas. Posteriormente la suspensión se centrifugó a 5000 rpm durante 30 minutos con la finalidad de eliminar los restos celulares. El sobrenadante fue separado y guardado en refrigeración.

La fracción sobrenadante se mezcló con etanol al 95% hasta que el alcohol tuviera una concentración final de 85%. Esta mezcla se mantuvo en reposo por 18 horas a temperatura ambiente,

posteriormente se centrifugó a 2500 rpm durante 30 minutos con la finalidad de separar la fracción insoluble. La fracción soluble se deshidrató en un cristalizador a 60 C y el material obtenido se pesó y se disolvió en agua desionizada a una concentración de 1 mg/ml.

Finalmente la solución de ECA obtenida se filtró por membrana de nitrocelulosa poro 0.22  $\mu$ m y se realizó un ensayo de inhibición de inmunohemólisis cuantitativo para observar su antigenicidad y la prueba de gelación del *Limulus* para determinar si estaba o no contaminada con LPS.

### 3.2 METODOLOGIA

Con base en los estudios de otros investigadores sobre el efecto adyuvante del LPS, el diseño experimental contempla dos experimentos sucesivos. En el primero se estudia el efecto que puede tener el ECA sobre la respuesta de anticuerpos anti-glóbulos rojos de carnero al inyectar una sola dosis del mismo en diferentes periodos de tiempo después del antígeno. En el segundo experimento se determina la dosis de ECA que estimule la mejor respuesta de anticuerpos anti-glóbulos rojos de carnero en un tiempo óptimo después del desafío con el antígeno.

#### 1) Selección del Tiempo para Administrar el Adyuvante

Los 34 ratones hembra CD1 de este experimento fueron

separados en tres grupos con la finalidad de observar a qué tiempo después de administrar los GRC se debe de inyectar una dosis única de ECA para observar un efecto estimulador en la respuesta de anticuerpos. Los tiempos evaluados fueron 6h, 12h y 24h y la dosis de ECA administrada IP fue de 10 µg/ratón.

A continuación se enlistan a que grupo corresponden:

Grupo No.1 : 6 horas	ECA 10 µg/ratón
Grupo No.2 : 12 horas	ECA 10 µg/ratón
Grupo No.3 : 24 horas	ECA 10 µg/ratón

Después de cinco días de haber inyectado los eritrocitos todos los animales fueron sacrificados para obtener una suspensión de células de bazo y determinar el número de CFA por la técnica de Cunningham.

## 2) Selección de la Dosis Óptima del Adyuvante

Una vez determinado el tiempo adecuado para administrar el ECA y obtener el máximo efecto inmunopotenciador sobre la respuesta de anticuerpos, el trabajo se continuó con los animales del segundo experimento.

En este segundo experimento se utilizaron 78 ratones hembra CD-1 que fueron divididos en ocho grupos. A los animales

de los cinco primeros grupos les correspondió una dosis diferente de ECA, la cual se preparó solubilizándolo en solución salina isotónica a concentraciones de 10, 25, 50, 100 y 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

Todos los animales recibieron la dosis correspondiente de ECA 24 horas después de la inoculación con los eritrocitos al 15%, de acuerdo al tiempo óptimo encontrado en el primer experimento.

Cada animal recibió una sola dosis de ECA intraperitonealmente en un volumen de 0.1 ml por lo que las dosis efectivas por animal de cada grupo fueron de :

Grupo No.1: 1.0  $\mu\text{g}$  ECA/ratón

Grupo No.2: 2.5  $\mu\text{g}$  ECA/ratón

Grupo No.3: 5.0  $\mu\text{g}$  ECA/ratón

Grupo No.4: 10.0  $\mu\text{g}$  ECA/ratón

Grupo No.5: 50.0  $\mu\text{g}$  ECA/ratón

En este experimento se utilizaron tres grupos de animales controles, que fueron inoculados con SSI estéril, con LPS comercial o no recibieron tratamiento. Las dosis efectivas para cada animal fueron las siguientes:

Grupo No.6: 0.1 ml de SSI estéril/ratón

Grupo No.7: 5.0  $\mu\text{g}$  de LPS/ratón

Grupo No.8: sin tratamiento

En los grupos control 6 y 7 el tiempo transcurrido entre la primera y segunda inyección fue igual al de los primeros cinco grupos.

Todos los animales fueron sacrificados cinco días después de la administración del antígeno, por dislocación cervical y se determinó el número de CFA por la técnica de Cunningham.

### 3) Cuenta del Número de Células Formadoras de Anticuerpos

En este trabajo se emplea una modificación a la técnica de Jerne según el método de Cunningham, en el cual, tanto los linfocitos como los GRC. y el complemento quedan suspendidos en medio de cultivo. La mezcla de células se coloca en una pequeña cámara con el propósito de formar una capa delgada de células y las células formadoras de anticuerpos (CFA), se detectan macroscópicamente como placas de lisis.

La metodología para esta técnica se describe a continuación:

1. Después de sacrificar al ratón por dislocación cervical y de extraer el bazo, el tejido esplénico se disgrega en solución salina balanceada (BSS) y la suspensión de células obtenidas se lava tres veces con la misma solución (anexo, 1).

2. Una alícuota de la suspensión de células esplénicas se diluye 1:20 con una solución 1:10 de azul tripano al 0.4% y el porcentaje de viabilidad se obtiene al contar el número de células en una cámara de Neubauer. Finalmente la concentración de las células esplénicas viables se ajusta a  $5 \times 10^6$  células/ml.

3. La suspensión celular que se introduce dentro de la cámara contiene:

a) 400  $\mu$ l de la suspensión de células esplénicas ajustadas a  $5 \times 10^6$  células/ml.

b) 200  $\mu$ l de una suspensión de G.R.C.al 8%

c) 400  $\mu$ l de complemento diluido 1:10

4. De la mezcla anterior se miden 200  $\mu$ l y se colocan dentro de la cámara, cada muestra por duplicado. Posteriormente cada uno de los extremos de la cámara se sellan con parafina y se incuban durante 1 h a 37 C.

5. Después del tiempo de incubación se determina el número de placas de hemólisis formadas, se obtiene el valor promedio de cada muestra para después calcular el número de CFA/ $10^6$  células de bazo.

#### 4) Prueba del Limulus

1. De una solución de ECA que contenía 50.0  $\mu$ g/ml se realizaron una serie de diluciones (1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256, 1:512).

2. Posteriormente se depositaron 0.1 ml de cada dilución en tubos que ya contenían 0.1 ml de Limulus, se rotaron suavemente.

3. Como control positivo se colocó 0.1 ml de endotoxina de E. coli 055:B5 (Whittaker M.A. Bioproducts) en un tubo con 0.1 ml

de *Límulus*. El control negativo fue 0.1 ml de agua estéril libre de pirógenos añadidos a un tubo con 0.1 ml de *Límulus*. Ambos controles, al igual que las diluciones de ECA se incubaron en baño de agua a 37 C por una hora.

4. Después de la incubación y en presencia de endotoxina se observó la gelación del *Límulus*. El punto final se determinó con la máxima dilución en la cual se producía gelación.

#### 5) Análisis Estadístico de los Resultados

Como medida de la tendencia central se utilizó la media aritmética. El grado de significancia de las diferencias entre los grupos estudiados se calculó por un análisis de varianza.

## CAPITULO IV

### RESULTADOS

---

En este trabajo se realizaron dos experimentos. En el primero de ellos se mantuvo constante la concentración de ECA administrada a cada ratón y se varió el tiempo al cual se administraba el ECA después de la inmunización con eritrocitos. En el segundo experimento se mantuvo constante el tiempo de administración entre cada inyección y se varió la concentración del ECA, para determinar la dosis a la cual el adyuvante estimulaba la mejor respuesta de anticuerpos. Los resultados fueron los siguientes:

#### 1.-SELECCION DEL TIEMPO PARA ADMINISTRAR EL ADYUVANTE

A cada ratón se le inyectó una dosis única de 10.0  $\mu\text{g}$  de ECA/ratón por vía intraperitoneal mientras se variaba el tiempo entre la primera inyección de los eritrocitos y la segunda con ECA, (Tiempos: 6, 12 y 24 horas) (Tabla No. 1).

Los animales del grupo No. 1 recibieron la dosis única de ECA, 6 h después del desafío con los eritrocitos y en ellos se observó una disminución en el número de CFA con respecto a los grupos de 12 y 24 horas. (Gráfica No. 1).

En los ratones del grupo No. 2 que recibieron la dosis única de ECA 12 horas después de inyectados los glóbulos rojos de carnero se muestra un aumento en el número de CFA con respecto al grupo de 6 horas. (Gráfica No. 1).

En el grupo No. 3 de ratones que recibieron los 10.0  $\mu\text{g}$  de ECA/ratón a las 24 horas después de la inmunización con los eritrocitos mostraron un aumento en la respuesta de CFA ( $x = 511.38$ ) respecto a los grupos 1 y 2 ( $x = 267.7$  y  $x = 324.7$ ) (Gráfica No. 1).

Al valorar las diferencias entre los tres grupos tratados con ECA, se muestra significancia estadística entre los grupos de tiempo 6h y 24 h ( $p < 0.01$ ), pero no entre 12 y 24 horas ( $p > 0.05$ ). Por los datos anteriores y dado que a las 24 horas se observa un aumento en la respuesta de CFA anti-GRC se consideró este tiempo para estudiar la dosis óptima del adyuvante. (Tabla No. 1).

## 2.-SELECCION DE LA DOSIS OPTIMA DEL ADYUVANTE

En el segundo experimento se estudió si 24 horas después de inmunizar los ratones con eritrocitos de carnero la administración de diferentes cantidades de ECA modificaba la respuesta de anticuerpos anti-GRC.

Las dosis del adyuvante fueron 1.0, 2.5, 5.0, 10.0 y 50.0  $\mu\text{g}$  de ECA/ratón, administrados intraperitonealmente.

Los resultados se presentan en la tabla No. 2 y en la Figura 2.

Se puede observar que la administración del ECA si logró aumentar la respuesta de células formadoras de placas hemolíticas anti-GRC. Este aumento fue evidente en los ratones que recibieron 5.0 y 10.0  $\mu\text{g}$  intraperitonealmente de ECA 24 horas después de la inmunización. Sin embargo, los resultados del análisis estadístico revelaron que ese aumento solo fue significativo ( $p < 0.05$ ) en el caso de los ratones inyectados con 5.0  $\mu\text{g}$  de ECA.

El uso de este hapteno como un adyuvante también modificó los límites, es decir el rango, de los valores obtenidos y, al ampliarlo incrementó las desviaciones estándar de los promedios, excepto en los grupos de ratones que recibieron 1.0 y 2.5  $\mu\text{g}$  de ECA. A medida que aumentaron las dosis del adyuvante se obtuvieron límites que fueron progresivamente cada vez más amplios.

Estos resultados revelan que aunque el ECA si potencializó significativamente la respuesta de anticuerpos anti-GRC los aumentos obtenidos fueron variables, probablemente a causa del diferente grado de sensibilización previa de los animales a los antígenos de sus bacterias comensales y a las consiguientes diferencias en el metabolismo del adyuvante utilizado.

La demostración de un incremento significativo en la respuesta de anticuerpos cuando la inmunización de los ratones fue seguida de una inyección con 5.0 µg de ECA, permitió aceptar la hipótesis del trabajo. La potencia del ECA como inmunoestimulante resultó similar a la obtenida después de inyectar 5.0 µg de LPS en ratones que se encontraban en las mismas condiciones experimentales.

Estos últimos resultados refuerzan la importancia del incremento estadísticamente significativo y permiten calificar al ECA como un nuevo adyuvante, cuya capacidad de potenciar la respuesta del sistema inmunitario no había sido informada hasta ahora.

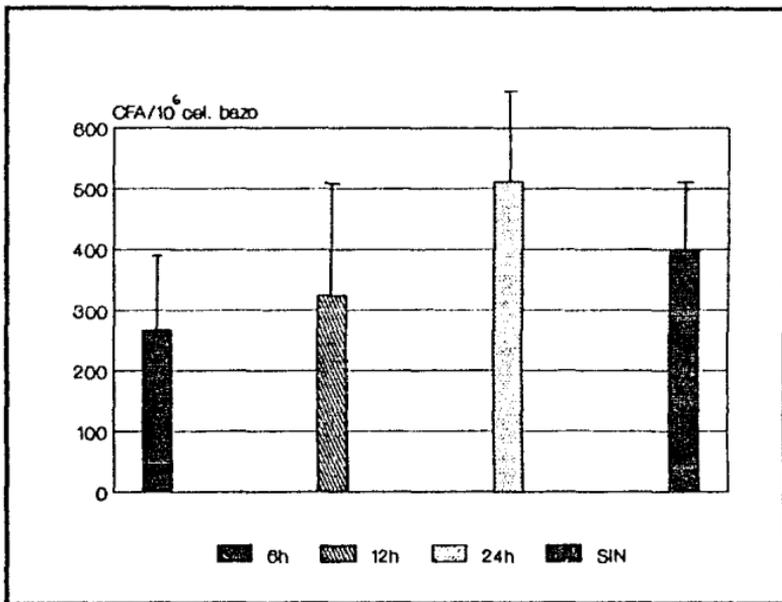
El efecto inmunoestimulante del ECA sobre la respuesta de anticuerpos no fue atribuido a la contaminación del hapteno con residuos de LPS, ya que los resultados de la prueba de *Límulus* mostraron que cada µg de ECA solamente contenía 4 pg de LPS.

Grupos	N	Tiempo	CFA/10 <sup>6</sup> células de bazo		F	P *
			$\bar{x}$	D.S.		
1	8	6 h	267.7	± 128.2	9.2	<0.01
2	9	12 h	324.7	± 189.4	4.17	>0.05
3	8	24 h	511.3	± 186.3		
4	9	-	398.7	± 110.5		

\* Las diferencias fueron calculadas entre los grupos que recibieron tratamiento.

TABLA No. 1

Cantidades de células formadoras de anticuerpos anti-GRC (CFA) obtenidas al inyectar 10 µg ECA/ratón en diferentes periodos de tiempo después de la administración del antígeno.



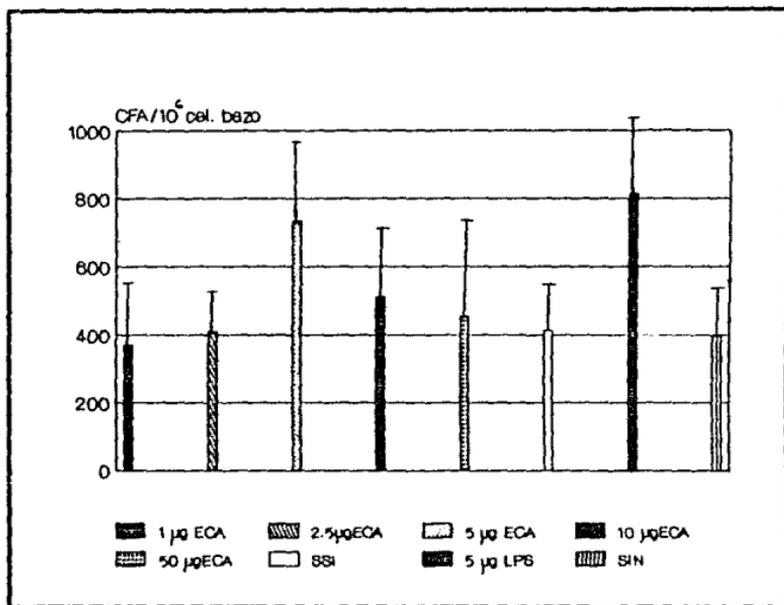
Gráfica No.1

Respuesta de CFA anti-GRC en ratones CD-1 inmunizados por vía intraperitoneal con una suspensión al 15% de glóbulos rojos de carnero y que recibieron una dosis única de ECA/ratón a las 6, 12 y 24 horas.

Grupos		Tratamiento	CFA/10 <sup>6</sup> células de bazo		F	P
N			$\bar{X}$	D.S.		
1	10	1.0 µg ECA/ratón	371.0	+ 149.4	0.52	>0.05
2	10	2.5 µg ECA/ratón	409.4	+ 99.2	0.009	>0.05
3	20	5.0 µg ECA/ratón	733.9	+ 222.2	18.0	<0.01
4	8	10.0 µg ECA/ratón	511.3	+ 186.3	1.85	>0.05
5	10	50.0 µg ECA/ratón	453.7	+ 278.5	0.173	>0.05
6	10	SSI	414.0	+ 115.0		
7	10	5.0 µg LPS/ratón	814.4	+ 222.3	25.5	<0.01
8	9	Sin tratamiento	398.7	+ 110.5	0.08	>0.05

TABLA No.2

Cantidades de células formadoras de anticuerpos anti-GRC (CFA) obtenidas al recibir diferentes cantidades de ECA 24 horas posteriores a la administración de los GRC.



Gráfica No.2

Respuesta de CFA anti-glóbulos rojos de carnero en ratones CD-1 que recibieron diferentes cantidades de ECA o LPS, después de 24 horas de haber sido inmunizados con GRC.

TABLA No.3

Determinación mediante la prueba de gelación de *Limulus* de la cantidad de LPS presente en el ECA.

Dilución punto final	Sensibilidad del reactivo	Concentración de LPS
1:8	0.125	0.99 EU/ml

La cantidad de LPS se calculó aplicando la siguiente fórmula:

Conc.de endotoxina = sensibilidad del *Limulus* x inverso del  
punto final

$$= 0.125 \times 7.999$$

$$= 0.99 \text{ EU/ml}$$

Si una EU = 0.2 ng el resultado equivale a 4.0 pg de endotoxina/ $\mu$ g de ECA.

## CAPITULO VI

### DISCUSION DE LOS RESULTADOS

---

---

Existe una gran cantidad de sustancias biológicas y no biológicas que pueden ser utilizadas para estimular la respuesta del sistema inmunitario. Todas éstas sustancias se conocen con el nombre genérico de adyuvantes y algunos actúan como inmunomoduladores, ya que según la dosis aplicada, pueden tener un efecto tanto inmunoestimulante como inmunosupresor de las principales actividades biológicas de los linfocitos.

Los adyuvantes tienen un origen diverso y pueden ser obtenidos tanto de origen mineral como de microorganismos y plantas o bien ser sintetizados en el laboratorio.

Todas estas sustancias han sido aprovechadas para intentar el tratamiento de numerosas condiciones clínicas en las cuales hace falta suprimir o estimular la competencia del sistema inmunitario así por ejemplo en el caso de pacientes que necesitan un trasplante de órgano o que producen una gran cantidad de autoanticuerpos, es necesario deprimirles su respuesta inmunológica; mientras que, en el caso contrario, existe otro tipo de pacientes que necesitan estimular su respuesta inmunitaria a causa de que tienen cáncer, una edad avanzada o

diferentes enfermedades primarias que se caracterizan por una inmunodeficiencia adquirida.

A medida que han avanzado las investigaciones sobre las actividades biológicas de los anteriores compuestos inmunomoduladores, ha sido necesario descartar un gran número de ellos, debido a los efectos secundarios o consecuencias adversas que puedan provocar en humanos. No obstante estos problemas, muchos investigadores siguen estudiando nuevas sustancias naturales o sintetizadas en el laboratorio para tratar de encontrar algunas que proporcionen buenos resultados clínicos y tengan disminuidos sus efectos secundarios.

El antígeno común de las enterobacterias (ECA) es uno de los productos naturales que tienen una actividad inmunoestimulante y, por consiguiente, también ha sido el objetivo de varios trabajos cuyos autores han estudiado la posibilidad de aplicarlo para el tratamiento y/o prevención de algunas enfermedades humanas.

El conocimiento de la inocuidad del ECA y de sus efectos "in vitro" como mitógeno y activador policlonal, ha permitido proponer la posibilidad de que ésta molécula pueda resultar un inmunoadyuvante ideal sin efectos adversos colaterales.

En el presente trabajo se estudió la acción inmunoestimulante

del ECA cuando se inyectaban ratones adultos jóvenes 24 horas después de haberlos inmunizado con una sola dosis de GRC. Los resultados revelaron que en los animales inyectados intraperitonealmente con 5.0 µg de ECA se observa un aumento significativo ( $p < 0.01$ ). Este aumento fue comparable al observado en el grupo de ratones controles que fueron inyectados con 5.0 µg de LPS. Los resultados son originales porque demuestran "in vivo" una actividad biológica que hasta ahora no había sido informada por la literatura publicada respecto a las actividades inmunomoduladoras del ECA.

El efecto inmunoestimulante parece tener límites muy estrechos ya que la producción de anticuerpos anti-GRC solamente se llevó a cabo significativamente cuando los ratones fueron inyectados con 5.0 µg de ECA. Cuando los animales fueron inyectados con 1.0, 2.5, 10.0 y 50.0 µg de ECA, los aumentos observados en las cuentas de CFA anti-GRC fueron limitados y no resultan estadísticamente significativos.

La prueba del Limulus reveló que el ECA contenía menos de 4.0 µg de LPS/µg de ECA inyectado. Por esta razón no se consideró probable que la cantidad de LPS contenido en la solución de ECA utilizada en nuestro experimento hubiera influido en el efecto inmunoestimulante observado.

Los resultados de este experimento no descartan la

posibilidad de que el ECA tenga efectos indeseables después de administrarlo en animales vivos, para ello deberá hacerse una prueba de seguridad en ratones y cuyos.

En realidad se puede afirmar que no existe un inmunoestimulante que esté libre de riesgos. Casi todos ellos tienen efectos adversos para el organismo que los recibe o si no manifiestan algunas actividades biológicas indeseables como la fiebre o la activación inespecífica de distintas clonas de linfocitos B. Esta última actividad de los inmunoestimulantes ha creado graves problemas a los inmunólogos porque cada dosis de adyuvante representa una posibilidad de estimular clonas autorreactivas e inducir la aparición de enfermedades autoinmunitarias.

En el caso del hapteno utilizado en el presente trabajo (ECA), el riesgo teórico se encuentra magnificado por las observaciones que han realizado otros autores en el sentido de que se trata de un antígeno compartido entre mamíferos y microorganismos gramnegativos (68,69,70.).

En los últimos años han existido pocos trabajos que refieren al ECA como una molécula compartida, más bien existen algunos estudios que, después de haber logrado demostrar los epitopes del ECA en linfocitos esplénicos de ratones y en células de sangre periférica humana, proponen la alternativa de que el hapteno de

las enterobacterias se encuentre presente en células eucariotas porque es adsorbido sobre las membranas de las mismas. Sin embargo, aunque este fuera el caso, existiría el riesgo de estimular una respuesta anti-ECA superior a la fisiológica y provocar lesiones en algunos tejidos. Los primeros experimentos sobre el significado biológico del ECA le adjudicaron a esta molécula una función sumamente importante en la etiología de la colitis ulcerosa autoinmunitaria (71).

Otros trabajos publicados posteriormente demostraron que el ECA se encontraba presente en el intestino de animales gnotobióticos y de fetos mortinatos que habían sido obtenidos bajo condiciones de asepsia (72). Los comentarios anteriores no tienen el propósito de minusvaluar la importancia del ECA como un inmuoestimulante, sino más bien destacar la complejidad de sus interacciones con las células de los animales vertebrados vivos.

Resultó muy interesante que, a diferencia de otros adyuvantes de origen bacteriano, como los LPS, la inyección de cantidades de ECA 20 veces superiores a la dosis efectiva óptima no provocaron una depresión de la respuesta inmunitaria. Aunque se reconoce que hacen falta más experimentos con ratones inyectados con 100, 200 y más  $\mu\text{g}$  de ECA, una y varias veces, de cualquier modo se puede decir que los resultados del presente trabajo son sugestivos de que, al menos en ratones adultos jóvenes, el ECA no ofrece problemas de toxicidad ni de inmunosupresión.

Ya se mencionó en los resultados que la inyección intraperitoneal de ECA no solamente aumentó la intensidad de la respuesta de anticuerpos sino también incrementó los límites de la cuenta de células formadoras de anticuerpos en cada grupo de animales problema. Este aumento de los límites o valores máximo y mínimo obtenidos fue directamente proporcional a la dosis de ECA utilizada y se consideró como sugestivo el que, en cada grupo de ratones, el efecto inmunoestimulante del ECA era cada vez más variable a medida que era mayor la cantidad administrada.

El resultado anterior fue interpretado como una consecuencia del diferente grado de sensibilización al ECA de bacterias gramnegativas comensales en cada animal que formó parte del experimento. Esta suposición solamente podría ser aclarada titulando los anticuerpos séricos anti-ECA antes de la inmunización y demostrando, individualmente que existe una relación inversamente proporcional entre estos títulos y el grado de estimulación de la respuesta de anticuerpos anti-GRC, todo lo cual podría formar parte de un estudio subsecuente sobre el mismo tema.

Finalmente, no puede dejar de mencionarse que los resultados del presente trabajo también nos ha despertado interés por el tema de la reactividad cruzada de los antígenos compartidos, el desequilibrio de la red de idiotipos-antiidiotipos de Jerne y el riesgo de inducir reacciones o fenómenos autoinmunitarios al

inyectar animales de experimentación con antígenos que ya se encuentran presentes sobre la membrana de sus células .

Ningun cuestionamiento relativo a estos problemas puede ser contestada ahora con los resultados del trabajo, porque el diseño de los experimentos tuvo un objetivo diferente. No obstante, a pesar de que los resultados confirmaron la hipótesis propuesta, debe quedar claro que la actividad biológica del ECA y su significado inmunológico en los animales vertebrados vivos continúa representando un capítulo muy poco estudiado, que podría estimular varias investigaciones más y ofrecer en el futuro nuevos resultados positivos relacionados, no solamente con la inmunopotenciación, sino también con varios otros aspectos igualmente interesantes de la Inmunología.

## CAPITULO VIII

### CONCLUSIONES

---

---

Los resultados del trabajo comprueban la hipótesis propuesta. El antígeno común de las enterobacterias (ECA) tiene un efecto inmunomodulador al ser administrado en ratones CD-1 adultos.

El ECA en dosis de 5.0  $\mu\text{g}$ /ratón puede provocar un aumento significativo en la producción de anticuerpos anti-GRC al ser inyectado 24 horas después del antígeno.

La respuesta obtenida al emplear el ECA como adyuvante es comparable a la que se observó con el LPS, un compuesto con el cual en numerosos estudios se ha demostrado su papel adyuvante.

El efecto observado sobre la inmunocompetencia no es debida al LPS contenido en el ECA, puesto que la cantidad de LPS determinada por la prueba del *tímulus* es despreciable con respecto a la cantidad de ECA empleada en el estudio.

## BIBLIOGRAFIA

---

---

- 1.-Paul, W.E., Fathman, C.G., Metzger, H. (1986). Ann. Rev. Immunol. 4:369 "Current status of immunology adjuvants"
- 2.-White R.G., Coons A.H. (1955) "Studies on antibody production the alum granuloma" J.Exp.Med. 102:73.
- 3.-Bomford, R. (1980) "The comparative selectivity of adjuvants for humoral and cell-mediated immunity" Clin. Exp. Immunol. 39:435
- 4.-Goto, N., Akama, K. (1982) "Histopathological studies of reactions in mice injected with aluminum absorbed tetanus toxoid" Microbiol. Immunol. 26:1121.
- 5.-Allison, A.C., Gregoriadis, G. (1974) "Liposomes as immunological adjuvants" Nature 252:252.
- 6.-Desiderio, J.V., Capbell, S.G., (1985) "Immunization against experimental murine salmonellosis with liposome-associated O-antigen" Infect. Immun. 48:658.
- 7.-Alving, C.R., Richardson, E.C., (1984) "Mitogenic activities of lipid A and liposome-associated lipid A: effects of epitope density" Rev. Infect. Dis. 6:493
- 8.-Jolivet, R.M., Sache, E., (1981) "Biological studies of lipophilic MDP derivatives incorporated into liposomes" Immunol. Commun 10:511.

- 9.-Hunter,R.,Strickland,F.,(1981) "The adjuvant activity of non ionic block polymer surfactants,I.The role of hydrophile-lipophile balance."J.Immunol.127:1244
- 10.-Hunter,R.L.,Bennett,B.,(1984) "The adjuvant activity of non ionic block polymer surfactants.II.Antibody formation and inflammation related to the structure of triblock and octablock copolymers." J.Immunol. 133:3167
- 11.-Stites,D.P.,Stobo,J.D.,Fundenberg,H.H.,Wells J.V.  
Inmunología Básica y clínica  
El Manual Moderno  
Sexta edición  
México D.F.(1987)
- 12.-John,A. Laurie et al. (1989) "Surgical adjuvant therapy of large-bowel carcinoma:An evaluation of levamisole and the combination of levamisole and 5-fluorouracil. J. Clin. Oncol. 1:1447
- 13.-Staruch,M.J.,Wood,D.D.(1983) "The adjuvancity of interleukin-1 " in vivo" J.Immunol. 130:2191
- 14.-Merluzzi,U.J.,Last-Barney,K.(1985) "Potencial use of human interleukin-2 as an adjunct for the therapy of neoplasia,immunodeficiency and infectious disease".Int.J.Immunopharmacol 7:3
- 15.-Freer,J.H., Illustrated guide to the anatomy of the bacterial cell envelope in Steward-tull and Davies M. (Eds), Immunology of the Bacterial Cell Envelope John Wiley & Sons Ltd.(1985).

- 16.-Levinson, A. I., Dziarski, A. (1983) "Staphylococcal peptidoglycan: T-cell-dependent mitogen and relatively T-cell-independent polyclonal B-cell activator of human lymphocytes" *Infect. Immun.* 39:290
- 17.-Dziarski, R., (1982) "Studies on the mechanism of peptidoglycan and lipopolysaccharide-induced polyclonal activation" *Infect. Immun.* 35:507
- 18.-Dziarski, R. (1982) "Preferential induction of autoantibody secretion in polyclonal activation by peptidoglycan and lipopolysaccharide I" *J. Immunol.* 128:1018
- 19.-Dziarski, R. (1982) "Preferential induction of autoantibody secretion in polyclonal activation by peptidoglycan and lipopolysaccharide II" *J. Immunol.* 128:1026
- 20.-Ellouz, F. (1982) "Minimal structural requirements for adjuvant activity of bacterial peptidoglycan derivatives" *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 59:1317
- 21.-Lynch, J. J., Chorprenning, F. W. (1978) "Effects of dosage on modulation of sheep red cell responses by teichoic acid" *Fed. Proc.* 37:1489.
- 22.-Bolton, R. W., (1980) "Immunosuppression anti- sheep erythrocyte responses by glycerol teichoic acid immune complexes" *Infect. Immun.* 30:723
- 23.-Bolton, R. W., (1981) "Modulation of murine lymphocyte mitogen responses by glycerol teichoic acid." *Immunol. Commun.* 10:631

- 24.-Andersson, J., Melchers, F. (1973) "The mitogen effect of lipopolysaccharide on bone marrow-derived mouse lymphocytes" J. Exp. Med. 137:943
- 25.-Kind, P., Johnson, A.S. (1959) "Studies of the adjuvant action of bacterial endotoxin on antibody formation I. Time limitation of enhancing effect and restoration of antibody formation in x-irradiated rabbits" J. Immunol. 82:415
- 26.-Behling, U.H., Nowothy, A., (1977) "Immune adjuvancy of lipopolysaccharide and a nontoxic hydrolytic product demonstrating oscillating effect with time." J. Immunol. 118:1905
- 27.-Schmidtke, J.R., Dixon, F.J. (1972) "Immune response to hapten coupled to a non-immunogenic carrier. Influence of lipopolysaccharide" J. Exp. Med. 136:392
- 28.-Behling, U.H., Campbell, B., (1976) "Synthetic glycolipid adjuvants." J. Immunol. 117:B47
- 29.- Melchers, F., Braun, V. (1975) "The lipoprotein of the outer membrane of *Escherichia coli*: a B-lymphocyte mitogen" J. Exp. Med. 142:473
- 30.-Sultzer, B.M., Goodman, G.M., (1976) "Endotoxin protein: a B-cell mitogen and polyclonal activator of C3H/HeJ lymphocytes." J. Exp. Med. 144:821
- 31.-Beebe, G.W., Simon A.H. (1972) "Long-term mortality follow-up of army recruits who received adjuvant influenza virus vaccine in 1951-1953" Am. J. Epidemiol. 95:337.

- 32.-Reynolds, J.A., Herrington, D.G., (1980) "Adjuvant activity of a novel metabolizable lipid emulsion with inactivated viral vaccines" *Infect. Immunol.* 28:937.
- 33.-Parant, M.A., Audibert, F.M. (1980) " Immunostimulant activities of a lipophilic muramyl dipeptide derivative and of desmuramyl peptidolipid analogs" *Infect. Immun* 27:826
- 34.-Jolivet, M., Sache E. (1981) "Biological studies of lipophilic MDP-derivatives incorporated in liposomes" *Immunol. Commun.* 10:511
- 35.-Nagai, Y. Akiyama, K. (1978) "Minimum structural requirements for encephalitogen and for adjuvant in the induction of experimental allergic encephalomyelitis" *Cell. Immunol.* 35:158
- 36.-Kohashi, O., Pearson, C.M., (1981) "Role of thymus for N-acetyl muramyl-L-alanyl-D-isoglutamine-induced polyarthritis and granuloma formation in euthymic and athymic nude rats or in neonatally thymectomized rats." *Infect Immun.* 31:758
- 37.-Richerson, H.B., Svelser, M.T. (1982) "Chronic hypersensitivity pneumonitis produced in the rabbit by the adjuvant effect of inhaled muramyl dipeptide" *Am. J. Pathol.* 106:409
- 38.-Kunin, C.M., Beard, M.V., (1962) "Evidence for a common hapten associated with endotoxin fractions of *E. coli* and other enterobacteriaceae. " *Proc Soc. Exp. Biol. Med.* 111:160

- 39.-Barr,K.,Rick,P.D.,(1987) "Biosynthesis of enterobacterial common antigen in *Escherichia coli*." J. Biol. Chem. 262:7142
- 40.-Rinno,J.,Golecki,J.R.(1980) "Localization of enterobacterial common antigen:immunogenic and non-immunogenic enterobacterial common antigen-containing *Escherichia coli*" J.Bacteriol. 141:814
- 41.-Kiss,P.,Rinno,J.,Schmidt,G.,(1978) "Structural studies on the immunogenic form of the enterobacterial common antigen." Eur.J.Biochem. 88:211
- 42.-Rinno,J.Gmeiner,J.(1980) "Localization of enterobacterial common antigen:*Proteus mirabilis* and its various 1-form " J.Bacteriol. 141:822
- 43.-Mayer,H.,Schmidt,G.,(1979) "Chemistry and biology of the enterobacterial common antigen." Curr.Top.Microbiol. Immunol. 85:99
- 44.-Mannel,D.,Meyer,H.,(1977) " Isolation and chemical characterization of enterobacterial common antigen." Eur. J. Biochem. 86:361
- 45.-Kuhn,H.,Neter,E.(1983) "Modification of the lipid moiety of the enterobacterial common antigen by the *Pseudomonas* factor." Infect.Immun. 40:696
- 46.-Kessel,R.W.I.,Neter,E.,(1966) "Biological activities of the common antigen of enterobacteriaceae." J.Bacteriol. 91:465
- 47.-Davies,M.,Stewart-tull,D.E.S.,(1981) "The affinity of bacterial

polysaccharide-containing fractions for mammalian cell membranes and its relationship to immunopotentiating activity." *Biochem. Biophys.* 643:17

- 48.-Shands, J.W., (1973) "Affinity of endotoxin for membranes" *J. Infect. Dis.* 128:197
- 49.-Symons, D.B.A., Clarkson, C.A., (1979) "The binding of LPS to the lymphocyte surface." *Immunol.* 38:503
- 50.-Mannel, D., Mayer, H. (1978) "Serological and immunological properties of isolated enterobacterial common antigen." *Eur. J. Biochem.* 86:361
- 51.-Lugowsk, C., Romanowska, E. (1978) "Enterobacterial common antigen: isolation from *Shigella sonnei*, purification and immunochemical characterization" *Eur. J. Biochem.* 91:89
- 52.-Suzuki, T., Gorzynski, T.E.A., (1964) "Separation by ethanol of common on an somatic antigen of enterobacteriaceae." *J. Bacteriol.* 88:1240
- 53.-Domingue, G., Johnson, E. (1974) "Isolation of subcellular fractions containing immunogenic enterobacterial common antigen." *J. Immunol.* 148:23
- 54.-Whang, H.Y., and Neter E. (1968) "Effect of cholesterol on immunogenicity of common enterobacterial antigen" *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 128:936
- 55.-Kuhn, H., Basu, S. and Mayer, H. (1987) "Comparison of ECA from different species by serological techniques" *Eur. J. Biochem.* 162:69

- 56.-Kuwajima, S., Kobayashi, K., "Adjuvant activity of lipopolisaccharide and enterobacterial common antigen to induce delayed type hypersensitivity against protein antigen in guinea pig." in Agarwal M. K. (Ed) Bacterial Endotoxin and Host Response, North Holland Biomedical Press, (1980)
- 57.-Gannon, P.L., Jacobs, D.M., (1982) "Immunological activities of purified preparations of enterobacterial common antigen." *Infect. Immun.* 35:193
- 58.-Sakolramrung, R. y Domingue, G.J., (1985) "Cross-reactive immunoprotective antibodies to *Escherichia coli* O111 rough mutant J5." *J. Infect. Dis.* 151:995
- 59.-Gorzynski, E.A., Priore, R.L., (1972) "Effect of immunization with common enterobacterial antigen on experimental *S. typhimurium* infection of mice." *Immunological Communications* 1(2):123
- 60.-McCabe, W.R., Greely, A. (1973) "Common enterobacterial antigen. II effect of immunization on challenge with heterologous bacilli." *Infect. Immun.* 7:386
- 61.-Jolivet, M., Audibert, F. (1983) "Epitope-specific immunity elicited by a synthetic Streptococcal antigen without adjuvant or carrier" *Biochem. Biophys. Res. Com.* 117:359.
- 62.-Ballou, W.R., Rothbard, J. (1985) "Immunogenicity of synthetic peptides from circumsporozoite protein of plasmodium falciparum." *Science* 228:996

- 63.-Gross,P.A.,Gould,L.A. (1985) "Effect of cancer chemotherapy on the immune response to influenza virus vaccine"review of published studies.Rev.Inf.Dis. 7:613
- 64.-Jacobson,I.M.,Jaffers,G. (1985) "Immunogenicity of hepatitis B vaccine in renal transplant recipients." Transplantation. 39:393
- 65.-Steketee,R.W.,Zlarnik,M.E.,(1988) "Seroresponse to hepatitis B vaccine in patients and staff of renal dialysis centers" J.Epidemiol. 127:772
- 66.-Seaworth,B.,Drucker,J.,(1988) "Hepatitis B vaccine in patients with chronic renal failure before dialysis" J.Infect.Dis. 157:332
- 67.-Hibberd,M.D.,Rubin,M.D.,(1989) "Immunization strategies for the immunocompromised host:The need for immunoadjuvants" Ann.Int.Med. 110:995
- 68.-Faure-Fontenla,M.A.,Garcia Tamayo,F.(1988) "Antigeno de enterobacterias y el tejido linfoide de ratas" Bol. Med. Hosp. Infant. Mex. 45:532
- 69.-Gorzynski,E.A.,Krasny,S.A. (1975) "Immunology mimicry between mouse tissue and enterobacterial common antigen" Immunol. Commun. 4:39
- 70.-Morgenstern,M.A.,Gorzynski,E.A.(1977) "Immunogenic cross - reactivity between human tissues and the enterobacterial common antigen" Infect.Imun. 17:36
- 71.-Lagercrantz,R.,Hammarstrom,S.(1968) "Immunological studies in ulcerative colitis IV.Origin of autoantibodies" J.

Exp. Med. 128:1339

- 72.-Gorzynski, E. A., Krasny, S. A. (1975) "Cross-reactivity between organ extracts of gnotobiotic mice and enterobacterial common antigen" J. Reticuloendoth Soc. 17:346

## 1.-B55

## Solución I

D-glucosa	10.00 g
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0.60 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	1.85 g
Rojo de fenol	0.01 g

Se disuelve en agua desionizada y se afora a 1000 ml

## Solución II

$\text{CaCl}_2$ (2 $\text{H}_2\text{O}$ )	1.86 g
KCl	4.00 g
NaCl	80.00 g
$\text{MgCl}_2$ (6 $\text{H}_2\text{O}$ )	2.00 g
$\text{MgSO}_4$ (7 $\text{H}_2\text{O}$ )	2.00 g

Se disuelve en agua desionizada y se afora a 1000 ml

Para preparar la solución de trabajo se mezclan 5 ml de la solución I con 5 ml de la solución II y se llevan a 50 ml con agua desionizada, pH = 7.0 ± 0.2.

2.-SOLUCION DE ALSEVER.

Glucosa	2.05 g
Citrato de sodio	0.80 g
Acido cítrico	0.05 g
NaCl	0.42 g

Se afora con agua destilada a 100 ml, se esteriliza por filtración y se distribuyen 27 ml en matraces Erlenmeyer estériles. La proporción en ml de solución Alsever:sangre de carnero es 27:23.