

23  
2ej



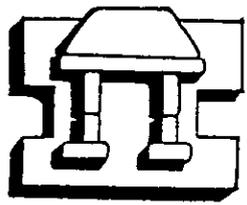
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES IZTACALA

"EFECTO DE LA COADMINISTRACION DE LA PROTOXINA CRY 1AC Y LA TOXINA DE COLERA POR LAS VIAS INTRANASAL Y RECTAL EN LA RESPUESTA INMUNE MUCOSA Y SISTEMICA ANTI-BSA Y ANTI-HBsAg EN RATONES BALB/C"

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
B I O L O G O  
P R E S E N T A :  
MARIA RITA ESQUIVEL PEREZ

DIRECTORA DE TESIS: DRA. LETICIA MORENO FIERROS



IZTACALA LOS REYES IZTACALA, EDO. DE MEXICO

1999

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

276877



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

**U N A M**  
**ENEP IZTACALA**

EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL LABORATORIO DE BIOLOGÍA DEL DESARROLLO DE LA UNIDAD DE MORFOLOGÍA Y FUNCIÓN DE LA ENEP IZTACALA, BAJO LA DIRECCIÓN DE LA DRA. EN CIENCIAS LETICIA MORENO FIERROS, DURANTE PARTE DE LA REALIZACIÓN DE ESTE TRABAJO LA AUTORA FUE BECARIA DE LA FUNDACIÓN UNAM.

AGRADEZCO AL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA (CONACyT), POR SU APOYO FINANCIERO A TRAVÉS DEL PROYECTO N° 0797-3453 PN, ASÍ COMO TAMBIÉN A PAPIIT-DGAPA A TRAVÉS DEL PROYECTO IN 209198.

## **AGRADECIMIENTOS**

**A LA DRA. LETICIA MORENO FIERROS CON CARÍÑO Y AFECTO POR HABERME APOYADO Y BRINDADO SUS CONOCIMIENTOS, TIEMPO Y PACIENCIA PARA LA ELABORACIÓN DEL PRESENTE TRABAJO.**

**A MIS SINODALES POR SUS EXCELENTES SUGERENCIAS Y COMENTARIOS DR. LUIS ARTURO BAIZA GUTMAN, A LA M. EN C. MARTHA O. SALCEDO ÁLVAREZ, AL M. EN C. RAFAEL JIMENEZ FLORES Y AL BIOL. DAVID GONZÁLEZ PANTALEON.**

**A MIS COMPAÑEROS DE LABORATORIO: MONICA, INÉZ, IVÁN, ALDO Y ANGÉLICA POR SU AYUDA Y AMISTAD DURANTE LA REALIZACIÓN DE ESTA TESIS.**

**Y A TODAS LAS PERSONAS QUE DE ALGUNA MANERA HAN CONTRIBUIDO A LA REALIZACIÓN DEL PRESENTE TRABAJO Y QUE ME HAN APOYADO PARA SEGUIR ADELANTE.**

## DEDICATORIAS

A mis padres: Emma y Ramón por la comprensión, el esfuerzo y el apoyo que durante todos estos años me demostraron, porque aún sin tener obligación continuaron trabajando para sustentar mi carrera.

A mis hermanas: Elvia, Maricela, Alma y Vero con cariño, pero principalmente gracias a Alma por la ayuda que me brindó en la elaboración de mis tareas al principio de mi carrera.

A mis hijas: Rosalía y Evelin con amor y ternura; gracias por haberme ayudado en mis tareas, espero que este esfuerzo que hice por superarme (aunque un poco tarde) les sirva como ejemplo para que ustedes también terminen su carrera profesional

A mis sobrinos: Yostal, Daniela, Jeremy, Emma y Laura, por que los quiero mucho y les deseo lo mejor.

## Contenido

Abreviaturas.....	1
Tablas y figuras.....	2
<b>I. RESUMEN.....</b>	<b>3</b>
<b>II. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>5</b>
<b>A. ASPECTOS GENERALES.....</b>	<b>5</b>
1.- Protoxina Cry 1Ac de <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	7
2.- El antígeno de superficie de la hepatitis B.....	9
<b>B. ANTECEDENTES.....</b>	<b>12</b>
<b>C. JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>15</b>
<b>III. OBJETIVOS.....</b>	<b>16</b>
1.- OBJETIVO GENERAL.....	16
2.- OBJETIVOS PARTICULARES.....	16
<b>IV. METODOLOGÍA.....</b>	<b>17</b>
1.- OBTENCIÓN DE MUESTRAS.....	19
A.- SUERO.....	19
B.- FLUIDO TRAQUEOPULMONAR.....	19
C.- LÍQUIDOS INTESTINALES.....	19
D.- FLUIDOS VAGINALES.....	19
2.- ENZAYO INMUNOENZIMÁTICO.....	20
3.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	21

<b>V. RESULTADOS.....</b>	<b>24</b>
<b>FIG. 4 RESPUESTA DE Ab ANTI BSA EN SUERO.....</b>	<b>29</b>
<b>FIG. 5 RESPUESTA DE Ab ANTI BSA EN FLUIDO</b>	
<b>TRAQUEOPULMONAR.....</b>	<b>30</b>
<b>FIG. 6 RESPUESTA DE Ab ANTI BSA EN LÍQUIDO</b>	
<b>DE INTESTINO DELGADO.....</b>	<b>31</b>
<b>FIG. 7 RESPUESTA DE AB ANTI BSA EN LÍQUIDO</b>	
<b>DE INTESTINO GRUESO.....</b>	<b>32</b>
<b>FIG. 8 RESPUESTA DE Ab ANTI BSA EN FLUIDOS</b>	
<b>VAGINALES.....</b>	<b>33</b>
<b>FIG. 9 RESPUESTA DE Ab ANTI HBs EN SUERO.....</b>	<b>34</b>
<b>FIG. 10 RESPUESTA DE Ab ANTI HBs EN FLUIDO</b>	
<b>TRAQUEOPULMONAR.....</b>	<b>35</b>
<b>FIG. 11 RESPUESTA DE Ab ANTI HBs EN LÍQUIDO</b>	
<b>DE INTESTINO DELGADO.....</b>	<b>36</b>
<b>FIG. 12 RESPUESTA DE Ab ANTI HBs EN LÍQUIDO</b>	
<b>DE INTESTINO GRUESO.....</b>	<b>37</b>
<b>VI. DISCUSIÓN.....</b>	<b>38</b>
<b>VII. CONCLUSIONES.....</b>	<b>54</b>
<b>VIII. APÉNDICE.....</b>	<b>55</b>
<b>IX. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>59</b>

## ABREVIATURAS

Igs	inmunoglobulinas
IgA	inmunoglobulina A
IgG	inmunoglobulina G
IgM	inmunoglobulina M
Ag	antígeno
Ab	anticuerpo
B.t	<i>Bacillus thuringiensis</i>
Cry	protoxina Cry 1Ac
HBsAg	antígeno de superficie de la hepatitis B
CT	toxina del cólera
BSA	albúmina sérica bovina
I.N.	intranasal
R.	rectal
I.P.	intraperitoneal
I.G.	intragástrico
HBV	virus de la hepatitis B
HIV	virus de inmunodeficiencia humana
HBc	núcleo de la hepatitis B
I.D.	intestino delgado
I.G.	intestino grueso
IL	interleucina
MHC	complejo mayor de histocompatibilidad
MALT	tejido linfoide asociado a la mucosa
GALT	tejido linfoide asociado al intestino
BALT	tejido linfoide asociado a los bronquios
NALT	tejido linfoide asociado a la mucosa nasal
PBS	solución salina amortiguadora con fosfatos
PBS-T	solución salina amortiguadora con fosfatos y tween
ELISA	ensayo inmunoenzimático

## TABLAS Y FIGURAS

FIG. 1.-Esquema de la estructura del virus de la hepatitis B.....	11
FIG. 2.-Método de ELISA para la determinación de los anticuerpos anti-BSA y anti- HBs.....	22
FIG. 3.-Estrategia metodológica.....	23
FIG. 4 a 12.- gráficas de resultados.....	29 a 37
TABLA 1.- Tratamientos utilizados para cada grupo.....	18

## I. RESUMEN

La mayoría de los agentes infecciosos virales, bacterianos o protozoarios que penetran al organismo lo hacen a través de las superficies de los tractos gastrointestinal urogenital y respiratorio, para lograr protección contra estos patógenos se requiere desarrollar estrategias de vacunación para estimular la respuesta inmune mucosa y sistémica; una de las estrategias es el uso de adyuvantes, por lo que en el presente trabajo se utilizó la protoxina Cry de *Bacillus thuringiensis*, ya que recientemente encontramos que es un potente inmunógeno sistémico y mucoso (intestinal) cuando se administra por las vías intragástrica e intraperitoneal, sin embargo faltaba estudiar si por otras rutas mucosas es inmunógeno, o si puede utilizarse como adyuvante para potenciar la respuesta de anticuerpos inducida en diferentes secreciones mucosas.

En el presente trabajo evaluamos la coadministración de Cry con la albúmina sérica bovina (BSA), Cry con el antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg), así como también la toxina del cólera (CT) con BSA y CT con HBsAg; administradas por las rutas intranasal y rectal. La toxina del cólera se utilizó para comparar ya que es hasta ahora el mejor inmunógeno y adyuvante mucoso, pero tiene la desventaja de ser tóxico para humanos.

En este trabajo analizamos la respuesta de anticuerpos anti BSA y anti HBs, en el suero, los fluidos traqueopulmonar y vaginal y el líquido intestinal. Cry y la toxina del cólera presentaron efectos adyuvantes variables significativos ( $p < 0.05$ ) en las respuestas de anticuerpos anti BSA y anti HBsAg, sin embargo Cry inhibió la respuesta en suero de IgA e IgG anti HBs por la ruta intranasal y la de IgG por la

vía rectal. En cuanto a las rutas de inmunización las respuestas de anticuerpos anti BSA, las dos vías utilizadas se comportaron de manera similar ya que con las dos se obtuvieron resultados positivos, mientras que en la respuesta anti HBs la ruta de inmunización intranasal presentó mejores resultados que la vía rectal. Por lo tanto concluimos que Cry es un adyuvante mucoso similar a la toxina del cólera y que la respuesta de anticuerpos varía según el antígeno coadministrado, la ruta de inmunización, el isotipo analizado y la secreción estudiada; sin embargo para poder utilizar a la protoxina Cry como adyuvante mucoso o como acarreador vacunal es necesario probarlo en humanos dados sus efectos variables.

## II. INTRODUCCIÓN

### A) ASPECTOS GENERALES

Las enfermedades infecciosas continúan siendo una de las principales causas de morbilidad y mortalidad a nivel mundial. Además, aún existen enfermedades importantes para las cuales no se cuenta con vacunas como las causadas por los virus de la inmunodeficiencia y del papiloma humanos (Chin, 1991) o infecciones (como la hepatitis, el cólera, el neumococo), y las que hay disponibles son parcialmente efectivas por su grado y tiempo de protección, o que tienen inconvenientes que limitan su aplicación masiva (altos costos, toxicidad, inestabilidad) (Heather, 1993).

La mayoría de agentes infecciosos virales, bacterianos o protozoarios, penetran al organismo a través de las superficies mucosas. Para lograr protección efectiva contra estos agentes patógenos, se requiere desarrollar estrategias de vacunación capaces de estimular la respuesta inmune en los sitios mucosos adecuados (Mestecky 1987, Eldridge y col. 1989, 1991), además la inmunización a través de la mucosa tiene varias ventajas; ya que confiere inmunidad sistémica y mucosa.

La inmunidad mucosa es la responsable de proteger las superficies mucosas del hospedero contra el ataque de los patógenos y toxinas a través de la producción de IgA secretora (Mestecky y col. 1994). La IgA es transportada a través de las células epiteliales hacia los fluidos por medio del componente secretor que es una glicoproteína sintetizada por los tejidos epiteliales (Acosta y Cruz, 1992). La mayoría de las vacunas son de aplicación parenteral, sin embargo las rutas parenterales normalmente no son capaces de estimular las respuestas inmunes en las mucosas (Tomasi, 1980). La ruta oral es la que más se ha empleado para

estimular este tipo de respuesta, sin embargo, por esta ruta la mayoría de los antígenos son pobremente inmunogénicos o inducen tolerancia (Mowat, 1994). Las estrategias desarrolladas de vacunación oral capaces de estimular las respuestas inmunes en mucosas incluyen, la incorporación de antígenos a liposomas (Michalek y col. 1989 y 1994), la microencapsulación (Gallichan y Rosenthal, 1995), y el uso de virus o bacterias atenuados recombinantes que expresan algún antígeno (Hopkins y col. 1995). Estas estrategias tienen algunos inconvenientes como son la falta de reproducibilidad, la inestabilidad de la vacuna y la toxicidad potencial del vector (Eldridge y col. 1989). La ruta de inmunización se considera importante para la generación de la inmunidad en las mucosas (Klavinskis y col. 1996).

Otra de las estrategias para estimular las respuestas inmunes en las mucosas es el uso de adyuvantes. Sin embargo a pesar de su importancia, se conocen muy pocos agentes con esta propiedad en ellas (Elson y Dertzbaugh, 1994). La toxina del cólera (Elson y Ealding, 1984) y la toxina termolábil de *E. Coli* (Clements y col. 1988), tienen fuertes efectos adyuvantes cuando se conjugan o se mezclan y se coadministran por la vía oral con inmunógenos pobres como lo son la mayoría de las proteínas solubles (Spangler, 1992). Sin embargo estas sustancias no se pueden aplicar para vacunas en humanos debido a que son tóxicas y sus costos de producción son elevados. La producción masiva de las mutantes no tóxicas de toxina del cólera y de la toxina termolábil de *E. coli* que mantienen parcialmente sus propiedades adyuvantes también sería demasiado costosa (Spangler 1992, Dickinson & Clements, 1995).

Para desarrollar estrategias de vacunación capaces de estimular la respuesta inmunes en las mucosas, en los sitios deseados, a bajos costos y sin efectos colaterales, se requiere de sustancias no tóxicas, y poco costosas que tengan propiedades adyuvantes en las mucosas.

Los virus de la hepatitis B, del papiloma humano, *candida*, *clamidia* y el virus de la inmunodeficiencia humano afectan a la mujer a través del tracto genital, y además el virus de Inmunodeficiencia humano por la mucosa rectal por lo que sería útil inducir IgA en las secreciones de los tractos genital y rectal (Nordelli y col. 1996). Debido a que una enorme superficie en las membranas mucosas está protegida principalmente por IgA, la cual es producida localmente por un gran número de células plasmáticas distribuidas en los espacios subepiteliales de las membranas mucosas y en el estroma de las glándulas secretoras, Mestecky (1992) sugiere que las mucosas asociadas a los tractos respiratorio, genital y al recto pueden también funcionar como inductoras de células linfoides para inducir anticuerpos IgA en secreciones externas.

### **1.- Protoxina Cry 1Ac de *Bacillus thuringiensis***

*Bacillus thuringiensis* es un bacilo esporulado Gram(+). (Knowles, 1994), está formado por flagelos peritricos. Durante la esporulación (al terminar el crecimiento vegetativo) estas bacterias sintetizan cuerpos de inclusión paraesporales formados por una o más delta endotoxinas conocidas como proteínas Cry las cuales tienen un peso molecular que se encuentra en un rango de 130-140 kDa (Feitelson y col. 1992),

El *Bacillus thuringiensis* es común en el medio ambiente, ha sido usada como bioinsecticida desde hace más de 50 años (Stewart y col. 1996) y es considerada como la principal especie bacteriana utilizada en la agricultura moderna como bioinsecticida. Este microorganismo se caracteriza por producir 7 diferentes toxinas, estas toxinas activas contra larvas de invertebrados como algunos insectos, nemátodos y protozoarios (Feitelson y col. 1992). La habilidad insecticida de esta bacteria es atribuida a sus proteínas cristalinas, también conocidas como proteínas Cry o como delta-endotoxinas (Ge y col. 1990), cuyos cristales se disuelven en el intestino medio del insecto, se activan por enzimas proteolíticas, generando poros en la membrana celular de la cubierta intestinal ocasionando desbalance osmótico y provocando la lisis celular (Feitelson y col. 1992). Las toxinas Cry se ligan especialmente al borde en cepillo de las membranas de las células columnares del intestino medio de los insectos (Knowles, 1994). La protoxina de *Bacillus thuringiensis* ha sido estudiada para determinar sus mecanismos bioinsecticidas (Knowles, 1994). Los genes de Cry 1Ac han sido clonados y transferidos a bacterias y plantas para generar autopesticidas (Herrera y col. 1994 y Perlak y col. 1990). Sin embargo hay pocos trabajos en los que se han estudiado los efectos fisiológicos o inmunológicos de la familia de las proteínas Cry en los vertebrados (Watson y col. 1988),

En trabajos de nuestro laboratorio, se encontró que la protoxina Cry1Ac es un potente inmunógeno sistémico y mucoso (intestinal) cuando se administra por la vías intragástrica e intraperitoneal, pero falta explorar si por otras rutas mucosas es inmunógeno o si puede usarse como adyuvante para potenciar la respuesta de anticuerpos contra el virus de la hepatitis B o la albúmina sérica bovina en varios

sitios mucosos por lo tanto, en este trabajo, se evaluaron dos rutas mucosas, la intranasal y la rectal, para determinar si por estas, la protoxina Cry 1Ac de *Bacillus thuringiensis* tiene efectos adyuvantes sobre la respuesta de anticuerpos inducida en diferentes secreciones mucosas.

## **2.- El antígeno de superficie de la hepatitis B.**

El antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg) es un complejo macromolecular formado por proteínas, carbohidratos y lípidos. Durante la infección con el virus de la hepatitis B, los hepatocitos sintetizan y secretan al HBsAg en exceso (Gómez, et al 1994). El virus de la hepatitis B es una partícula compleja de forma esférica de 42 nm de diámetro, integrada por un núcleo central de 27 nm y una cubierta exterior en la que se encuentra el antígeno de superficie o HBsAg (Lissen, 1993). En este virus se reconocen tres tipos de partículas: pequeñas esferas de 20 nm, túbulos de 20 nm de diámetro y 100 nm de largo, y partículas de Dane más complejas de 42 nm. La partícula de Dane corresponde al virus de la hepatitis B completo, mientras que las pequeñas esferas y túbulos son el exceso de proteína viral (Fig.1) (Sherlock, 1991).

La hepatitis viral es una enfermedad transmisible, aguda y crónica que ha adquirido gran importancia en todo el mundo, hay aproximadamente 300 millones de personas con este padecimiento. Los recién nacidos y los niños infectados con el virus de la hepatitis B pueden presentar cirrosis y carcinoma hepatocelular probablemente del 80 al 90 %, mientras que en los adultos el porcentaje oscila entre el 5 y 15 % (Heather, 1993). La vacuna disponible comercialmente de HBV es segura y efectiva en un 90-95% en individuos jóvenes y sanos, utilizando 3

inmunizaciones, sin embargo la persistencia de anticuerpos anti HBs declina rápidamente después de la tercera inmunización (Mintai y col. 1993) por lo que estas vacunas no son confiables para la población en general; ya que existen personas con inmunosupresión como las afectadas con HIV, ó los individuos con transplante renal, o aquellas a quienes se les practico hemodiálisis que tienen alto riesgo de adquirir el HBV y a personas mayores de 40 años que tienen menor respuesta de anticuerpos anti-HBs y los títulos anti-HBs continúan disminuyendo con cada década de vida (Traquina y col. 1996). Otro problema es que más del 90% de los portadores se localiza en regiones en vías de desarrollo, donde el acceso a servicios de salud y recursos financieros son limitados (Zárate y col. 1997).

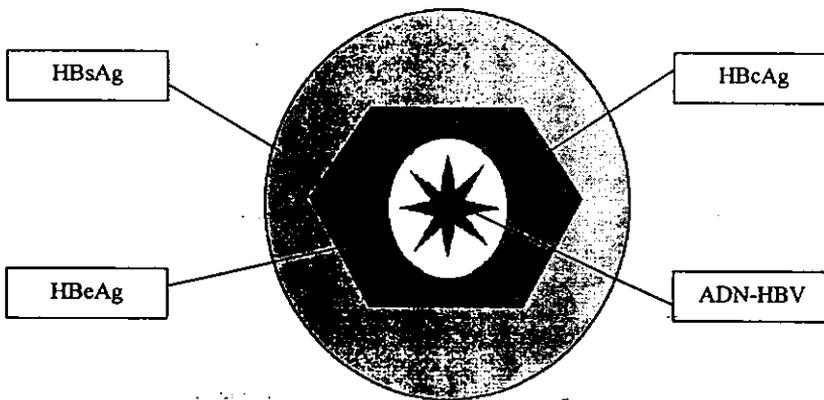


Figura 1.- Estructura del virus de la hepatitis B. En el se presenta el antígeno de superficie (HBsAg), el antígeno del núcleo (HBcAg), el antígeno exterior del núcleo central (HBeAs) y el ácido desoxirribonucleico (ADN-HBV) (tomado de Lissen, 1993).

La hepatitis B se transmite por dos vías bien definidas. La primera es a través del contacto con la sangre de la persona infectada, la segunda es la sexual. Este virus está presente en el semen y las secreciones vaginales de las personas infectadas, y a través de ellas se puede infectar a otros (Lissen, 1993). En 1987 se comenzó a utilizar la segunda generación de vacunas contra el virus de la hepatitis B basada en tecnología recombinante. Estas vacunas que contienen el antígeno de superficie de la hepatitis B de 24 kDa purificado de levaduras son altamente inmunogénicas. La función biológica del antígeno de superficie del virus de la hepatitis B es la de permitir el anclamiento del virus en la superficie de los

hepatocitos para así poder iniciar el proceso de infección, por lo que la inducción de anticuerpos contra esta proteína protege al individuo contra la infección al evitar que las células requeridas por el virus de manera indispensable para su reproducción sean invadidas (Zárate y col. 1997).

## **B) ANTECEDENTES**

Las superficies mucosas son los sitios donde más frecuentemente ocurre el primer contacto entre el huésped y los agentes patógenos, por lo que se requieren estudios que conduzcan a plantear estrategias de vacunación en las mucosas, capaces de inducir respuestas inmunes específicas en los sitios deseados. Es sorprendente la capacidad del sistema inmunitario asociado a mucosas, para discernir el tipo de respuesta inmunitaria más adecuada para la sobrevivencia del organismo con respuestas locales y generales contra agentes patógenos (Acosta y Cruz, 1992). La protección de la superficie mucosa contra la re-infección con patógenos es principalmente dependiente de IgA secretora, específicamente de IgA dimérica originada principalmente en células plasmáticas localizadas en la lámina propia, en roedores también se encuentra la IgA dimérica en la circulación la cual es transportada a través del epitelio por el componente secretor (Gallichan y col. 1993). Se han probado numerosas estrategias para lograr la estimulación de la respuesta inmune en las mucosas (Mestecky, 1987), la mayoría de los estudios se han enfocado a la vacunación oral (Mestecky y col. 1994). Sin embargo esta forma de administración generalmente induce respuestas pobres o de corta duración (Mowat, 1994). También se ha demostrado que la vacunación sistémica generalmente no induce respuesta protectora en las mucosas (Torres, 1997), por

lo que es importante definir la ruta óptima de vacunación para lograr una respuesta local protectora en el sitio de infección. Los niveles de respuesta de anticuerpos específicos inducidos en las superficies mucosas de los tractos gastrointestinal y genital dependen de la ruta de inmunización, cuando es rectal es más efectiva para inducir inmunidad local en el colon y el recto, sin embargo ha recibido poca atención. (Hananberg, 1994). La mucosa rectal presenta la población más densa de folículos linfoides intraepiteliales que ninguna otra parte del colon (Forrest, 1990). Hopkins y colaboradores (1995) obtuvieron una buena respuesta de anticuerpos IgG anti HBc cuando utilizaron la vía intranasal, pero no se ha analizado la respuesta de anticuerpos anti HBs a nivel de mucosas. Existen pocos adyuvantes capaces de aumentar la respuesta inmune en las mucosas (Elson y Dertzbaugh, 1994). Los adyuvantes son agentes que elevan la respuesta inmune estimulando la formación de anticuerpos, también puede acrecentar el desarrollo de inmunidad mediada por células CD4 y la respuesta de linfocitos citotóxicos mediados por células CD8. El mecanismo de acción de los adyuvantes es el de prolongar la liberación de antígenos por semanas y meses, generar el mecanismo de inflamación por la activación de los macrófagos, localizar selectivamente a los antígenos en áreas dependientes del timo, presentar al antígeno por células accesorias, modificar el procesamiento de antígenos de clase I y clase II, estimular las células T cooperadoras, th1 o th2, estimular el aumento de la producción de citocinas, estimular el switch de isotipo, la proliferación y diferenciación de células B, aumentar la maduración de las células precursoras B y T y por último eliminar a las células supresoras (Elson y Dertzbaugh, 1994). La toxina del cólera es especialmente efectiva como inmunógeno entérico (Wu y

Russell, 1993), ésta es una enterotoxina ADP-ribosilada producida por *Vibrio cholerae*, una característica particular de la CT es su función adyuvante en las superficies mucosas, por ello puede ser utilizada para el entendimiento de la adyuvancia eficiente en las mucosas (Lycke, 1997). Los mecanismos de la acción adyuvante de la toxina del cólera envuelven múltiples aspectos de inducción inmune en las mucosas; como el aumento de antígenos, la producción de interleucina 1 por las células presentadoras de antígenos las cuales alteran la regulación de las células "T", especialmente la inhibición de células CD8, estimulan el switch de los isotipos IgA e IgG y posiblemente el aumento de la expansión clonal de células B (Elson y Detzbaugh, 1994), así como la estimulación de lipoproteínas de membrana en células B del isotipo IgM, también afecta la diferenciación de los isotipos de células B en los estadios anteriores a la recombinación de genes, y por último la toxina de cólera aumenta la cadena pesada de las inmunoglobulinas (Lycke, 1997). La toxina del cólera tiene efectos adyuvantes en las respuestas mucosas cuando se co-administra o se conjuga con proteínas solubles que no son inmunogénicas en las mucosas (Spangler, 1992). La habilidad de la toxina del cólera para actuar como adyuvante mucoso sugiere que ésta altera el tejido linfoide mucoso de una manera que favorece la respuesta de antígenos, pero el sitio exacto donde actúa es desconocido (Elson y Detzbaugh, 1994). Basándonos en las características de las proteínas Cry de *Bacillus thuringiensis* que son: alta resistencia a la proteólisis, estabilidad a pH alcalino, su inocuidad a vertebrados y su bajo costo de producción (Vázquez, 1997), pensamos que podría ser un buen candidato para utilizarse como adyuvante y poder lograr una mayor respuesta de anticuerpos, ya que en nuestro

laboratorio encontramos que la protoxina Cry 1Ac de *Bacillus thuringiensis* es un potente inmunógeno sistémico y mucoso (intestinal) cuando se administra por las vías intragástrica e intraperitoneal, además cuando Cry es coadministrada por estas mismas rutas actúa como un adyuvante del antígeno de superficie de la hepatitis B y la albúmina sérica bovina para inducir anticuerpos en el suero y en el líquido intestinal, sin embargo por la vía intragástrica se encontró que la coadministración de Cry o de la toxina del cólera aumenta la respuesta de anticuerpos séricos anti HBs pero no a nivel intestinal, y por la ruta intraperitoneal la respuesta de Cry anti HBs también aumenta la respuesta de IgG en el intestino, finalmente encontramos que por las rutas intranasal y rectal es posible estimular la respuesta de anticuerpos en varios sitios mucosos (tracto respiratorio, intestinos delgado y grueso y vagina). Nuestros resultados en conjunto indican que que Cry es un potente inmunógeno y además parece tener efectos adyuvantes.

En el presente trabajo se evaluó el efecto adyuvante de la protoxina Cry 1Ac cuando se coadministró con dos proteínas, una de importancia vacunal como es el antígeno de superficie de la hepatitis B y otra (testigo) solamente para comparar como es la albúmina sérica bovina.

### **C) JUSTIFICACIÓN**

La toxina de cólera es hasta ahora el mejor inmunógeno y adyuvante para inducir la respuesta inmune en las mucosas utilizado en la experimentación con animales, sin embargo su aplicación en humanos no es factible dada su toxicidad y alto costo de producción. Debido a la necesidad de encontrar adyuvantes buenos y seguros para coadministrarlos con las vacunas que tienen alto costo de

producción, o inmunidad poco prolongada, este trabajo puede determinar si utilizando la protoxina Cry 1Ac de *Bacillus thuringiensis* se puede lograr una mayor producción de anticuerpos en las mucosas además de definir la ruta óptima de vacunación para lograr una respuesta local protectora en el sitio de infección, por lo que en el presente trabajo se ensayaron las vías intranasal y rectal; ya que por estas rutas es posible estimular la respuesta de anticuerpos anti Cry en varios sitios mucosos

### **III. OBJETIVOS**

#### **1.-OBJETIVO GENERAL**

Determinar el efecto de la co-administración de la protoxina Cry con la albúmina sérica bovina, y con el antígeno de superficie de la hepatitis B por las vías intranasal y rectal en la respuesta inmune mucosa y sistémica anti BSA y anti HBs.

#### **2.-OBJETIVOS PARTICULARES**

\*Evaluar el efecto de la coadministración de la protoxina Cry con la BSA y con el HBsAg.

\*Evaluar el efecto de la coadministración de la toxina del cólera con la BSA y con el HBsAg.

\*Analizar la respuesta inmune mucosa y sistémica de los anticuerpos IgA, IgG e IgM anti BSA y anti HBsAg en diferentes secreciones mucosas.

\*Analizar el efecto de la inmunización por las vías intranasal y rectal.

#### **IV. METODOLOGÍA**

Se utilizaron 70 ratones; 35 hembras y 35 machos de 10 semanas de edad de la cepa Balb/c, los cuales se dividieron en 12 grupos experimentales y dos control (Tabla 1), cada uno formado por 5 individuos, los animales permanecieron con agua y alimento *ad libitum*.

La inmunización se hizo una vez por semana, durante 3 semanas, y los individuos se sacrificaron 8 días después de la última inmunización. Los inmunógenos utilizados fueron los siguientes: la protoxina Cry 1Ac (Cry), el antígeno de superficie de hepatitis B (HBsAg), la toxina del cólera (CT) y la albúmina sérica bovina (BSA) que se administraron acorde a la tabla 1.

Tabla 1. TRATAMIENTOS UTILIZADOS PARA CADA GRUPO

GRUPOS	Nº DE INDIVIDUOS	DOSIS	INMUNÓGENOS	VÍA DE INMUNIZACIÓN
1°	5 hembras	10µg	BSA	intranasal
2°	5 hembras	10µg	BSA	rectal
3°	5 hembras	10µg+50µg	BSA+Cry	intranasal
4°	5 hembras	10µg+50µg	BSA+Cry	rectal
5°	5 hembras	10µg+10µg	BSA+CT	intranasal
6°	5 hembras	10µg+10µg	BSA+CT	rectal
7°	5 machos	10µg	HBsAg	intranasal
8°	5 machos	10µg	HBsAg	rectal
9°	5 machos	10µg+50µg	HBsAg+Cry	intranasal
10°	5 machos	10µg+50µg	HBsAg+Cry	rectal
11°	5 machos	10µg+10µg	HBsAg+CT	intranasal
12°	5 machos	10µg+10µg	HBsAg+CT	rectal
13°	5 hembras	NINGUNA	NINGUNO	CONTROL
14°	5 machos	NINGUNA	NINGUNO	CONTROL

## **1.-OBTENCIÓN DE MUESTRAS**

### **A) SUERO**

Los sueros se obtuvieron por centrifugación (8000 rpm durante 10 minutos) a partir de sangre extraída mediante punción cardiaca.

### **B) FLUIDO TRAQUEOPULMONAR**

Se disectó la tráquea con los pulmones y se lavó mediante una cánula (de 10 centímetros de largo por 2 milímetros de grosor) con 1 ml de medio RPMI más gentamicina (40mg/ml) posteriormente el líquido obtenido se centrifugó a 8000 rpm durante 10 minutos para obtener el sobrenadante.

### **C) LIQUIDOS INTESTINALES**

Se disectaron los intestinos delgado y grueso, se separaron y lavaron internamente mediante una cánula (de 10 centímetros de largo por 3 milímetros de grosor) con medio RPMI más gentamicina (40mg/ml), para el intestino delgado se usaron 5 ml y 3 ml para el intestino grueso el medio contenía un inhibidor de proteasas (ácido P-hidroximercuribenzoico 0.036g/ml + trisma base 0.018g/ml, pH 8.0), posteriormente el líquido obtenido se centrifugó a 8000 rpm durante 10 minutos para obtener el sobrenadante.

### **D) FLUIDOS VAGINALES**

Antes del sacrificio de las hembras se procedió a hacer 5 lavados vaginales con medio RPMI más gentamicina (40mg/ml) resuspendiendo 3 veces el medio

intravaginalmente, posteriormente el fluido obtenido se centrifugó a 8000 rpm durante 10 minutos para obtener el sobrenadante.

Todas las muestras se mantuvieron a  $-20$  grados centígrados hasta su utilización (aproximadamente 1 mes).

### **Evaluación de anticuerpos anti-BSA y anti-HBs**

La evaluación de la respuesta de anticuerpos IgA, IgG e IgM anti BSA y anti HBs se realizó mediante la técnica de ELISA como se describe a continuación:

### **2.- ENZAYO INMUNOENZIMÁTICO**

Se utilizaron placas de 96 pozos (Metrix) donde se inmovilizó 1  $\mu\text{g}$  de antígeno (BSA ó HBsAg ) en amortiguador de carbonatos (0.1 M pH 9.6), en un volumen final de 100  $\mu\text{l}$  por pozo, las placas se incubaron a 4 grados centígrados durante 24 horas, posteriormente se lavaron tres veces con solución salina amortiguada con fosfatos (PBS) y Tween 20 al 0.05 % (PBS-T). El bloqueo de los sitios reactivos se realizó con 100  $\mu\text{l}$  de leche descremada (Sveltys) al 6 % en PBS-T durante 2 horas, posteriormente se lavaron 3 veces con PBS-T. Los sueros se diluyeron en una proporción 1:50 con leche descremada al 1% con PBS-T, los líquidos intestinales se diluyeron con leche descremada al 30% con PBS-T quedando una dilución 1:50, los líquidos de tracto respiratorio se colocaron directamente en los pozos de las placas, y los fluidos vaginales se diluyeron con leche descremada al 1% quedando una dilución de 1:2, se tomaron 100  $\mu\text{l}$  del volumen total y se depositaron en cada pozo. (Todas las muestras se trabajaron

por duplicado). Las placas se incubaron durante toda la noche a 4 grados centígrados, posteriormente se lavaron 3 veces con PBS-T para colocarles el conjugado anti-inmunoglobulina de ratón marcado con peroxidasa IgA, IgG e IgM y dejarlos incubar durante 2 horas los anticuerpos se diluyeron con PBS-leche descremada al 1% (IgG 1:12800, IgM 1:4800 e IgA 1:500), después las placas se lavaron 3 veces con PBS-T, se incubaron con el medio de reacción (100  $\mu$ l por pozo) que contenía 0.5  $\mu$ g/ml de o-fenilendiamina, 0.01 % de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en amortiguador de citratos (0.05 M pH 5.2), durante 30 minutos. Transcurrido el tiempo se detuvo la reacción con 50  $\mu$ l por pozo de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1.5 M), y se procedió a registrar la absorvancia de las muestras a 492 nm en un lector de ELISA Biorad (Thompson, 1981) Fig.2

### **3.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Despues de haver obtenido las absorvancias de las muestras se procedió a calcular las medias geométricas y las desviaciones estandar para posteriormente graficarlas. También se realizó una prueba de análisis de varianza (ANOVA) para probar si las diferencias encontradas entre las medias de los diferentes tratamientos experimentales eran o no estadísticamente significativas, y posteriormente se realizó la prueba de tukey de comparación múltiple de medias para determinar cual o cuales medias son las que difieren significativamente.

**Fig. 2 MÉTODO DE ELISA PARA LA DETERMINACIÓN DE LOS ANTICUERPOS ANTI- BSA Y ANTI- HBsAg**

-Inmovilización del antígeno (BSA ó HBsAg) en las placas de polipropileno durante 24 horas a 4 grados centígrados.

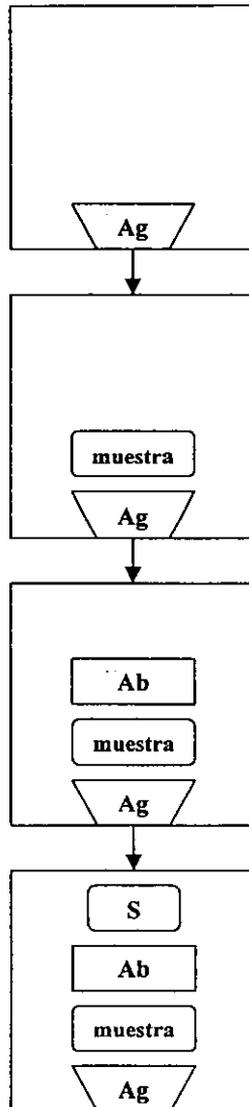
-las placas se lavan con PBS-Tween y se bloquean con leche descremada al 6% con PBS-Tween durante 2 horas.

-las muestras se diluyen con leche descremada (según sea el caso) se colocan en las placas y se incuban a 4 grados centígrados durante toda la noche.

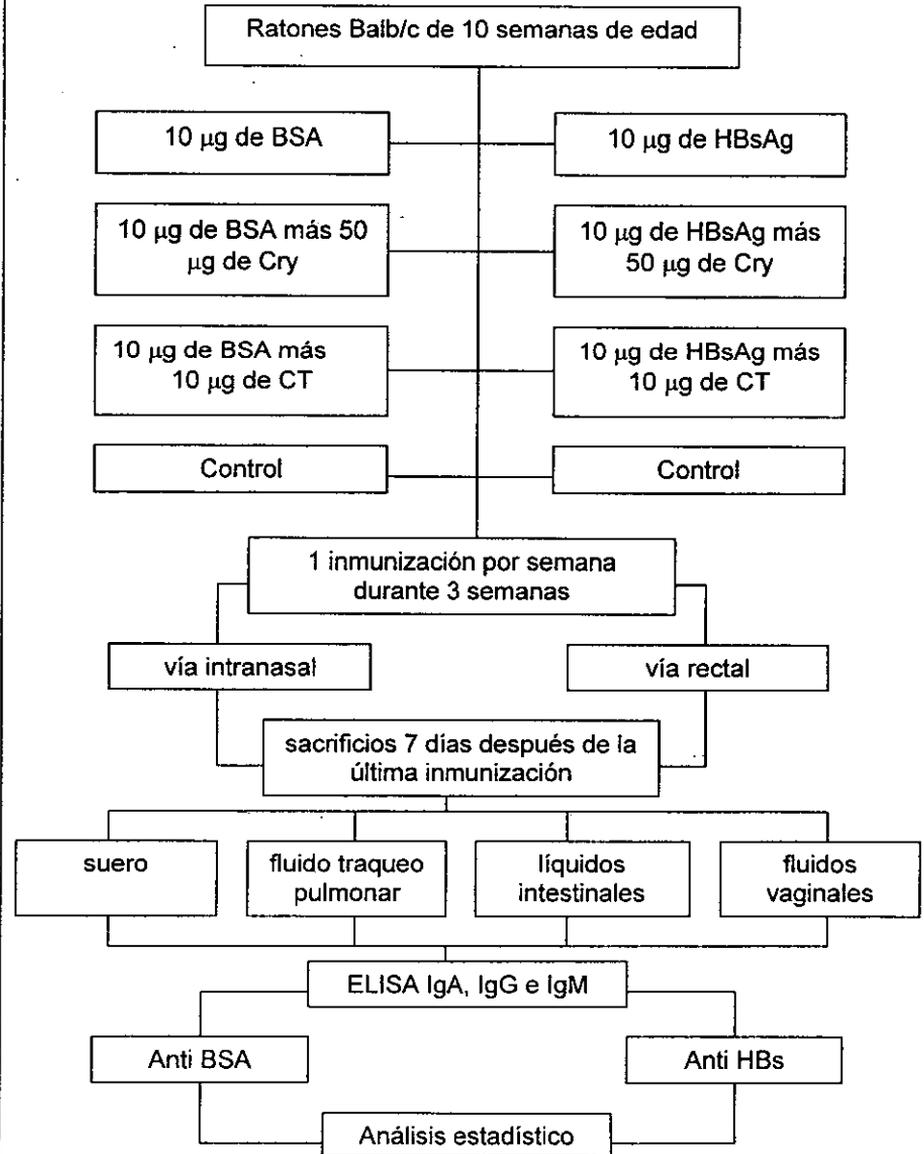
-Las placas se lavan con PBS-Tween y se incuban con el conjugado anti-inmunoglobulina de ratón marcado con peroxidasa (IgA, IgG e IgM) durante 2 horas.

-Las placas se lavan con PBS-Tween y se les adiciona el sustrato (O-fenilendiamina/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) incubandolas durante 30 minutos.

-La reacción se detiene con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, el registro de la absorbancia se realiza en un lector de ELISA a 492 nm.



**Fig.3.- ESTRATEGIA METODOLÓGICA**



## V. RESULTADOS

### Efecto de la coadministración de BSA con Cry1Ac o con TC

Las inmunizaciones intranasal y rectal de BSA indujeron respuestas séricas moderadas de IgA e IgM mayores a las observadas en los grupos controles no inmunizados ( $p < 0.05$ ), Cry potenció la respuesta de anticuerpos IgA anti BSA por las rutas intranasal y rectal ( $p < 0.05$ ), aunque el efecto de la toxina del cólera fue mayor (fig.4). La inmunización intranasal y rectal de BSA indujo nulas respuestas de IgA IgG e IgM ( $p > 0.05$ ) en el líquido del tracto respiratorio. Por la vía intranasal se observó un aumento significativo ( $p < 0.05$ ) en la respuesta de IgM y nulo de IgA e IgG con Cry, en cuanto a la toxina del cólera no se observó algún cambio en la respuesta de los tres isotipos (fig. 5). En el líquido del intestino delgado se observó que la inmunización con BSA por la vía intranasal indujo respuestas moderadas de IgA ( $p > 0.05$ ) y nulas de IgG e IgM, y por la vía rectal se indujeron altas respuestas de IgA ( $p < 0.05$ ), y sin efecto de IgG e IgM ( $p > 0.05$ ). Por la ruta intranasal Cry y CT incrementaron la respuesta de IgA con respecto a los grupos BSA y control ( $p < 0.05$ ) pero no presentaron cambio en las respuestas de IgG e IgM ( $p > 0.05$ ). En cuanto a la vía rectal Cry y CT indujeron una alta respuesta de IgA aunque menor a BSA, las respuestas de IgG e IgM no presentaron alguna alteración en ninguno de los grupos inmunizados (fig.6). La inmunización intranasal de BSA sola indujo una moderada respuestas del isotipo IgA ( $p < 0.05$ ) y sin alteración las de IgG e IgM en el intestino grueso, mientras que Cry y la toxina de cólera inhibieron la respuesta de IgA, y no se alteraron las respuestas de IgG e IgM ( $p > 0.05$ ). Por la vía rectal Cry y CT aumentaron la respuesta de IgA anti BSA

y sin modificación IgG e IgM ( $p>0.05$ ) (fig.7). En los fluidos vaginales la coadministración intranasal y rectal de Cry o de la toxina del cólera con BSA no presentaron alguna diferencia significativa ( $p>0.05$ ) con respecto al grupo control (fig.8).

#### **Efecto de la coadministración de HBsAg con Cry o con TC:**

En el suero la inmunización intranasal con HBsAg sola indujo altas respuestas de IgG seguida de IgM e IgA ( $p<0.05$ ), sin embargo la coadministración de Cry inhibió la respuesta de IgG e incrementó significativamente ( $p<0.05$ ) la de IgM con respecto a los grupos inmunizados y al control, La toxina del cólera presentó una alta respuesta de IgG en comparación con Cry y el grupo control, por otro lado Cry y la toxina del cólera no presentaron cambio con respecto al isotipo IgA ( $p>0.05$ ). La inmunización rectal de HBsAg indujo respuestas séricas de IgG, menores a las inducidas por la ruta intranasal. El efecto de la coadministración de Cry o la toxina de cólera con HBsAg por la vía rectal fue contrastante ya que Cry inhibió la respuesta de IgG anti HBs, mientras que la toxina del cólera la incrementó, sin embargo las respuestas de IgM de los tres grupos inmunizados no presentaron alguna alteración con respecto al grupo control ( $p>0.05$ ), en cuanto a las respuestas de IgA estas no se modificaron con ninguno de los grupos de ratones inmunizados (fig.9). En el líquido de tracto respiratorio, la inmunización intranasal de HBsAg indujo respuestas de IgG e IgM por ambas rutas, también por ambas rutas se obtuvieron altas respuestas de IgG en cualquiera de los grupos inmunizados, solamente la toxina del cólera por la ruta rectal causó un aumento

significativo ( $p < 0.05$ ) en el isotipo IgG con respecto a HBsAg sola y a Cry. Por la ruta intranasal Cry aumentó la respuesta de IgM, el efecto de la toxina del cólera también varió dependiendo de la ruta de inmunización; ya que por la vía rectal incrementó la respuesta de IgG anti HBs, por otro lado la respuesta de IgA de los grupos inmunizados por la vía rectal no presentó diferencia en cuanto al grupo control (fig.10). En el líquido del intestino delgado, las inmunizaciones intranasal y rectal de HBsAg no presentaron algún cambio significativo con respecto al grupo control ( $p > 0.05$ ). Por la vía intranasal Cry no presentó diferencia en la respuesta de anticuerpos de los tres isotipos con respecto al grupo control. Sin embargo la toxina del cólera incrementó la respuesta de IgG, mientras que IgA e IgM tampoco presentaron diferencia en cuanto al grupo control, por la vía rectal Cry aumentó la respuesta de IgA obteniendo una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) con respecto a los otros grupos incluyendo al grupo control (fig.11). En el líquido del intestino grueso, tanto la inmunización intranasal como la rectal de HBsAg no indujeron respuestas de anticuerpos IgA e IgM y solamente bajo de IgG, sin embargo Cry y la toxina del cólera potenciaron una buena respuesta de IgG por la vía intranasal, aunque la respuesta con la toxina del cólera fue mayor, en cuanto a la ruta rectal solamente la toxina del cólera provocó una mayor respuesta de IgG, mientras que con Cry no se observó algún cambio en la respuesta de ninguno de los isotipos (fig.11).

## **Respuesta de anticuerpos (IgA, IgG e IgM) anti BSA con respecto a las rutas de inmunización (IN y R).**

En el presente trabajo observamos que la respuesta de anticuerpos varía según la ruta de inmunización, el antígeno coadministrado, el isotipo estudiado y la región evaluada. En los grupos inmunizados con Cry y la toxina del cólera la respuesta anti BSA en suero por las dos rutas de inmunización fue mejor el isotipo IgA. Y en cuanto a las rutas de inmunización las dos presentaron un efecto similar ya que no hubo diferencia significativa ( $p > 0.05$ ) entre ellas (fig.4). Mientras que en los resultados del líquido de tracto respiratorio no se presentó respuesta significativa ( $p < 0.05$ ) de ninguno de los tres isotipos y tampoco hubo efecto de alguna de las vías utilizadas (fig.5). Cuando nos referimos a la respuesta de anticuerpos del líquido de intestino delgado observamos que el mejor resultado se presentó en el isotipo IgA por las dos rutas, sin embargo se encontró una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) en cuanto a las dos vías de inmunización, resultando con mejor respuesta la rectal (fig.6). En el líquido del intestino grueso el isotipo IgG fue el que presentó mayor respuesta por ambas rutas, sin embargo no se observó buena respuesta de ninguna de las dos vías, (fig.7). Por último en los resultados de los fluidos vaginales tampoco hubo diferencia en cuanto a las dos vías utilizadas, ya que en esta secreción casi no se presentó respuesta de anticuerpos y por ende tampoco observamos dominancia de alguno de los isotipos estudiados (IgA, IgG e IgM) (fig.8).

### **Respuesta de anticuerpos (IgA, IgG e IgM) anti HBs con respecto a las rutas de inmunización (IN y R).**

En la figura 9 se presenta la respuesta de anticuerpos anti HBs en el suero donde observamos que el isotipo IgG es el que presentó mejor respuesta por las dos vías de inmunización, mientras que en lo que se refiere a las rutas, la intranasal es la que dio mejores resultados. En cuanto al líquido del tracto respiratorio también se observó la mejor respuesta en IgG en las dos vías de inmunización y con respecto a la diferencia en las rutas, la que presentó un mejor resultado fue la intranasal (fig. 10). En la figura 11 presentamos los resultados de la respuesta de anticuerpos anti HBs del líquido del intestino delgado, donde observamos que el isotipo IgG respondió de mejor manera que los otros dos isotipos por las dos vías, y la ruta intranasal según el análisis estadístico presentó mejor respuesta. En cuanto a los resultados sobre el líquido del intestino grueso, fue el isotipo IgG el que predominó en ambas rutas, mientras que la ruta intranasal presentó un mejor resultado (fig. 12).

IN

R

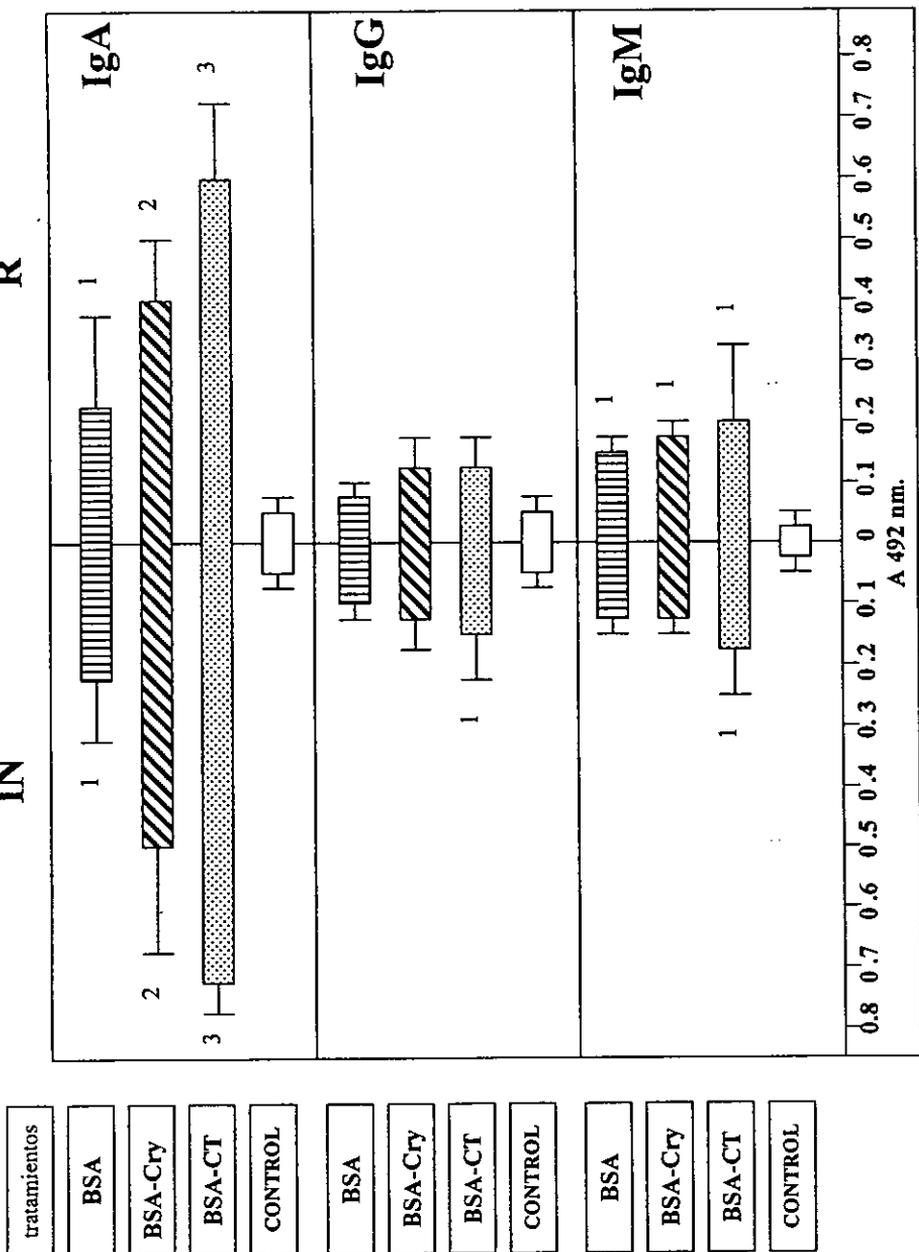


Fig. 4.-Respuesta de anticuerpos anti BSA en el suero de ratones inmunizados con BSA, BSA-Cry y BSA-CT por las vías intranasal y rectal. Los resultados muestran la  $\bar{X}$ +SD de  $n = 5$ ; 1 es diferente al control, 2 es diferente a BSA y 3 es diferente a Cry, todas con una  $p < 0.05$ .

IN

R

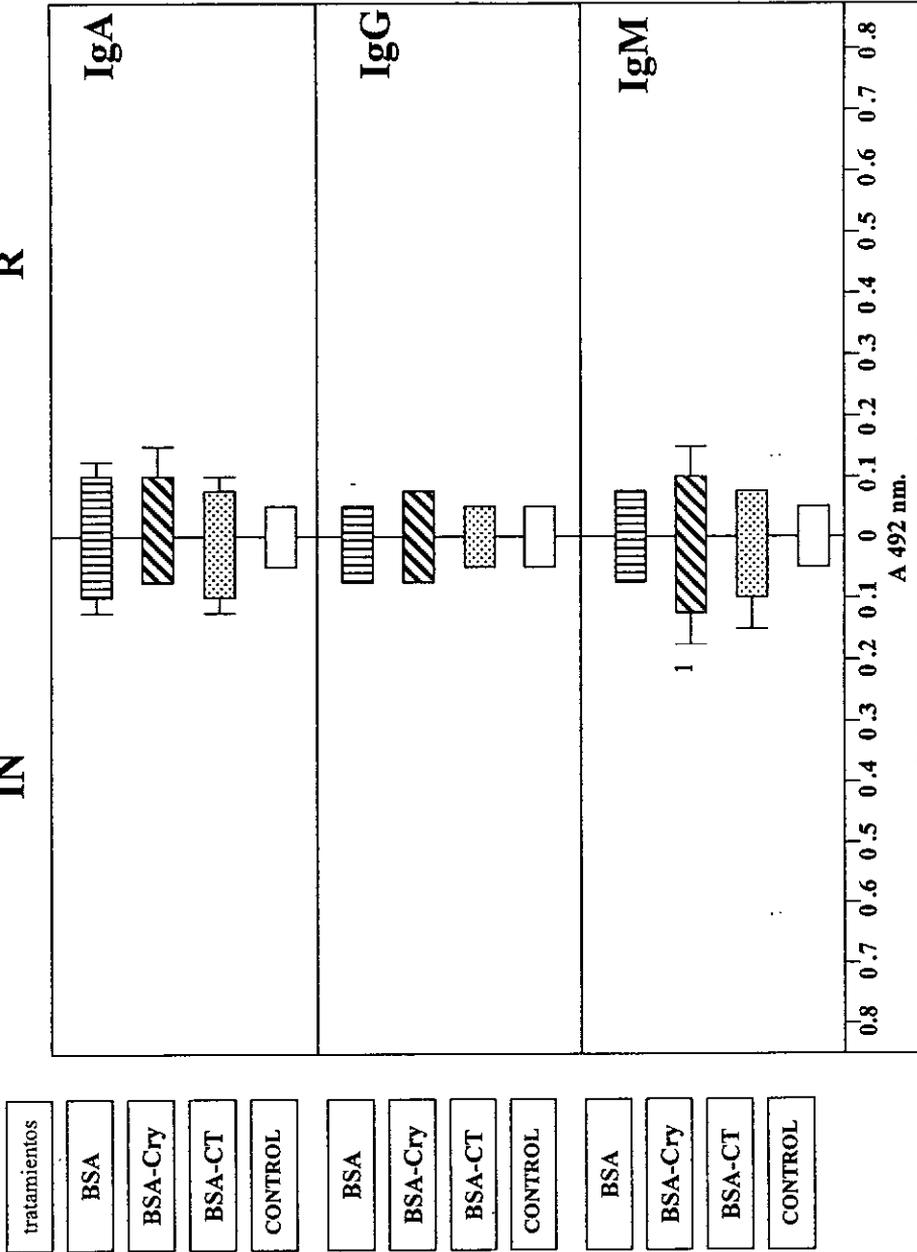


Fig. 5.- Respuesta de anticuerpos anti BSA en fluido traqueopulmonar de ratones inmunizados con BSA, BSA-Cry y BSA-CT por las vías intra nasal y rectal. Los resultados muestran la  $\bar{x} \pm SD$  de  $n = 5$ ; 1 es diferente al control con una  $p < 0.05$ , las barras que no muestran SD es porque es menor a 0.020.

IN

R

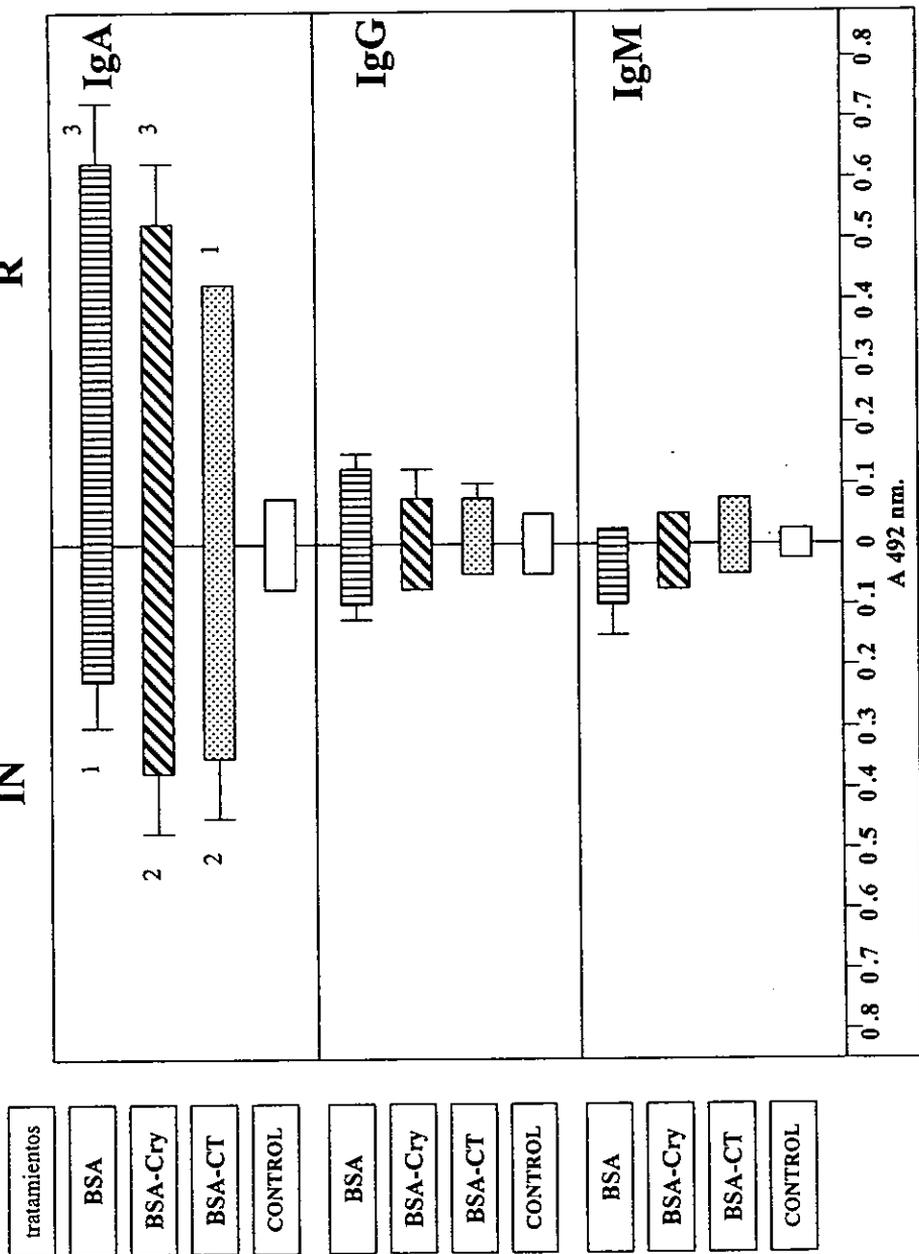


Fig. 6.-Respuesta de anticuerpos anti BSA en líquido de intestino delgado de ratones inmunizados con BSA, BSA-Cry y BSA-CT por las vías intranasal y rectal. Los resultados muestran la  $\bar{x} \pm SD$  de  $n = 5$ ; 1 es diferente al control, 2 es diferente a BSA y 3 es diferente a TC; todas con una  $p < 0.05$ . Las barras que no muestran SD es porque es menor a 0.020.

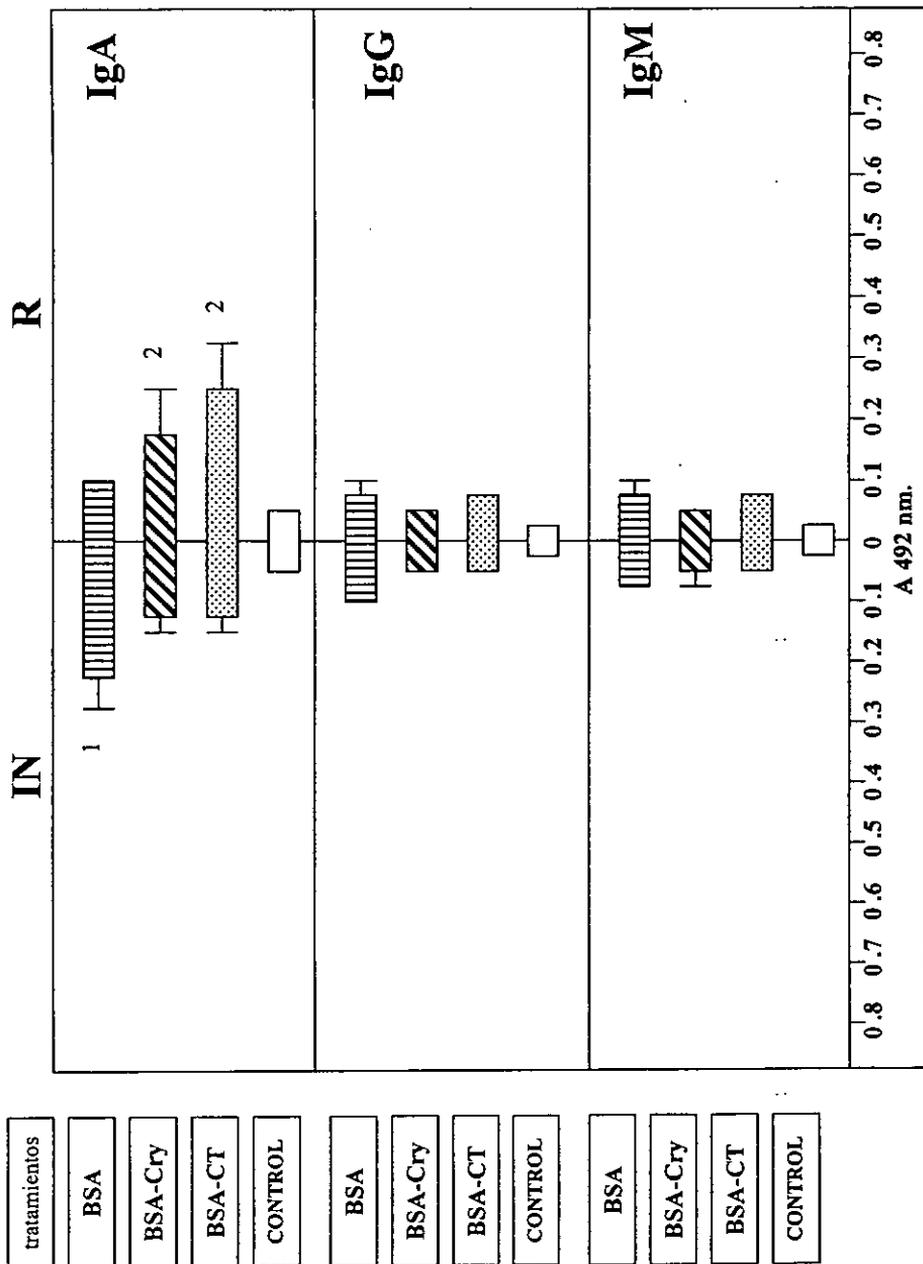


Fig. 7.-Respuesta de anticuerpos anti BSA en líquido de intestino grueso de ratones inmunizados con BSA, BSA-Cry y BSA-CT por las vías intranasal y rectal. Los resultados muestran la  $\bar{x} \pm SD$  de  $n = 5$ ; 1 es diferente a Cry y CT y 2 es diferente a BSA y el control, todas con una  $p < 0.05$ . Las barras que no muestran SD es porque es menor a 0.020.

IN

R

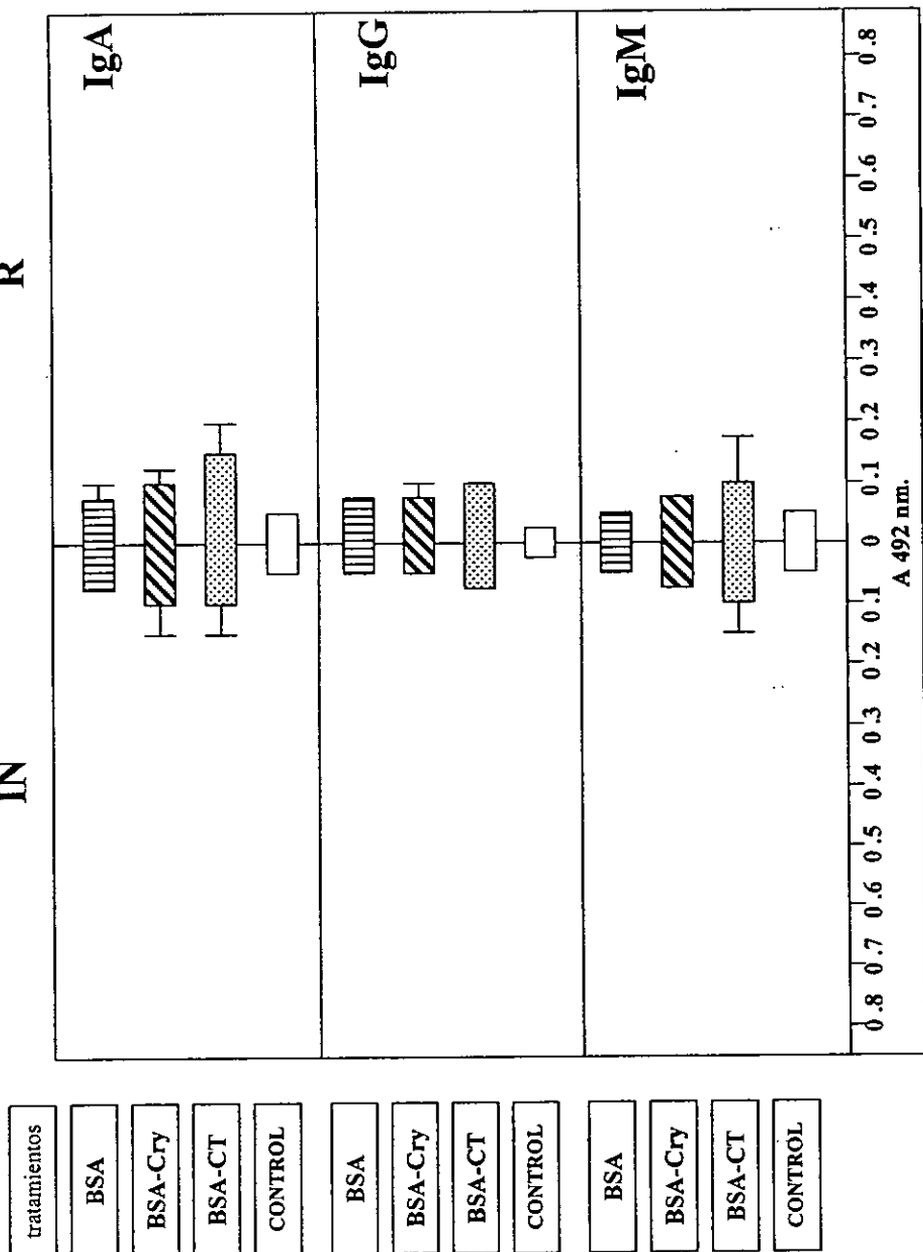


Fig. 8.- Respuesta de anticuerpos anti BSA en fluidos vaginales de ratones inmunizados con BSA, BSA-Cry y BSA-CT por las vías intranasal y rectal. Los resultados muestran la  $\bar{x} \pm SD$  de  $n = 5$ ; en ningún grupo se presentó diferencia significativa ( $p > 0.05$ ) con respecto a los grupos control. Las barras que no muestran SD es porque es menor a 0.020.

IN

R

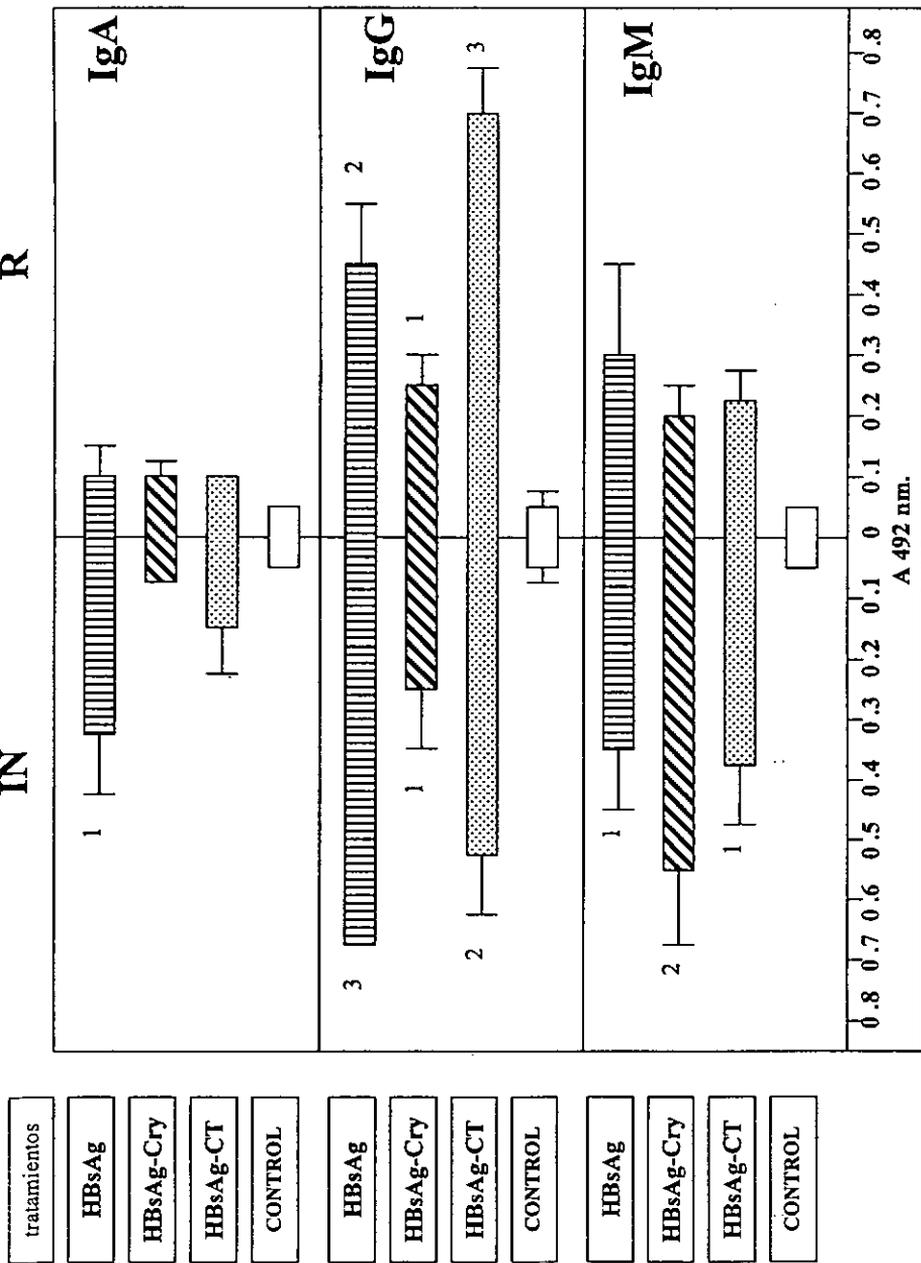


Fig. 9.- Respuesta de anticuerpos anti HBs en suero de ratones inmunizados con HBsAg, HBsAg-Cry y HBsAg-CT por las vías intranasal y rectal. Los resultados muestran la  $\bar{x} \pm SD$  de  $n = 5$ ; 1 es diferente al control, 2 es diferente a 1 y 3 es diferente a 2, todas con una  $p < 0.05$ , las barras que no muestran SD es porque es menor a 0.020.

IN

R

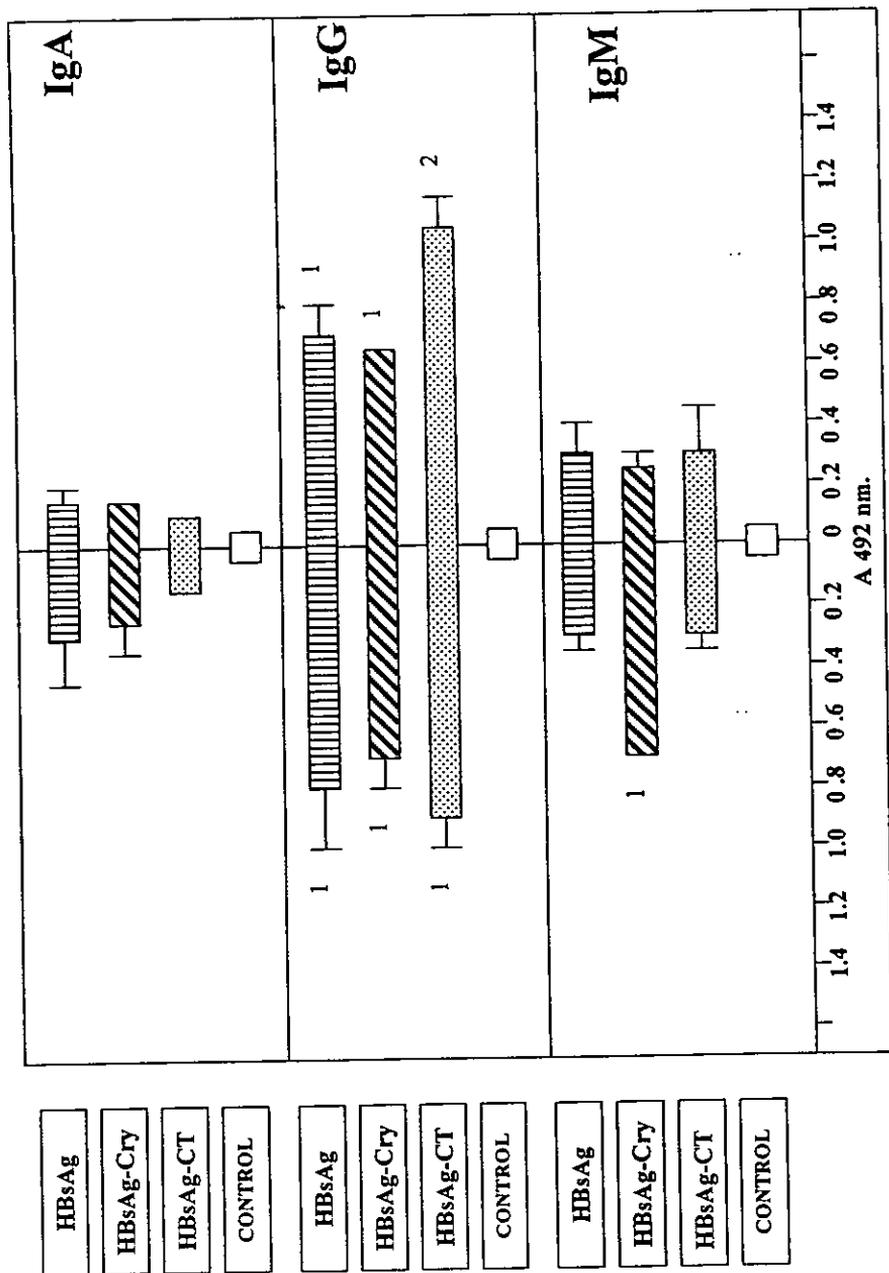


Fig. 10.- Respuesta de anticuerpos anti HBs en fluido traqueopulmonar de ratones inmunizados con HBsAg, HBsAg-Cry y HBsAg-CT por las vías intranasal y rectal. Los resultados muestran la  $\bar{x} \pm SD$  de  $n = 5$ ; 1 es diferente al control y 2 es diferente a 1, todas con una  $p < 0.05$ , las barras que no muestran SD es porque es menor a 0.020.

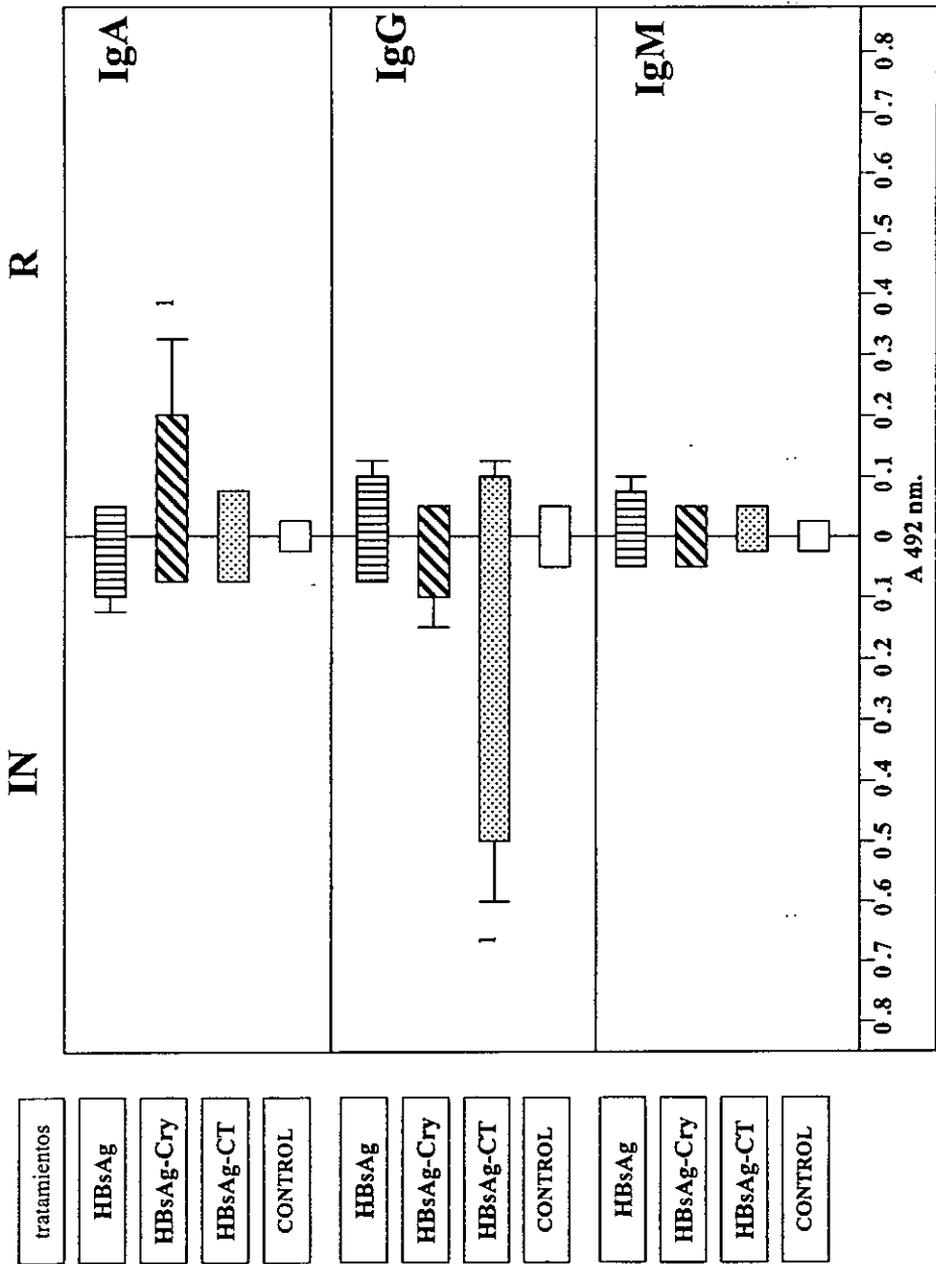


Fig. 11.- Respuesta de anticuerpos anti HBs en liquido de intestino delgado en ratones inmunizados con HBsAg, HBsAg-Cry y HBsAg-CT por las vías intranasal y rectal. Los resultados muestran la  $\bar{x} \pm SD$  de  $n = 5$ ; 1 es diferente del control con una  $p < 0.05$ , las barras que no muestran SD es porque es menor a 0.020.

IN

R

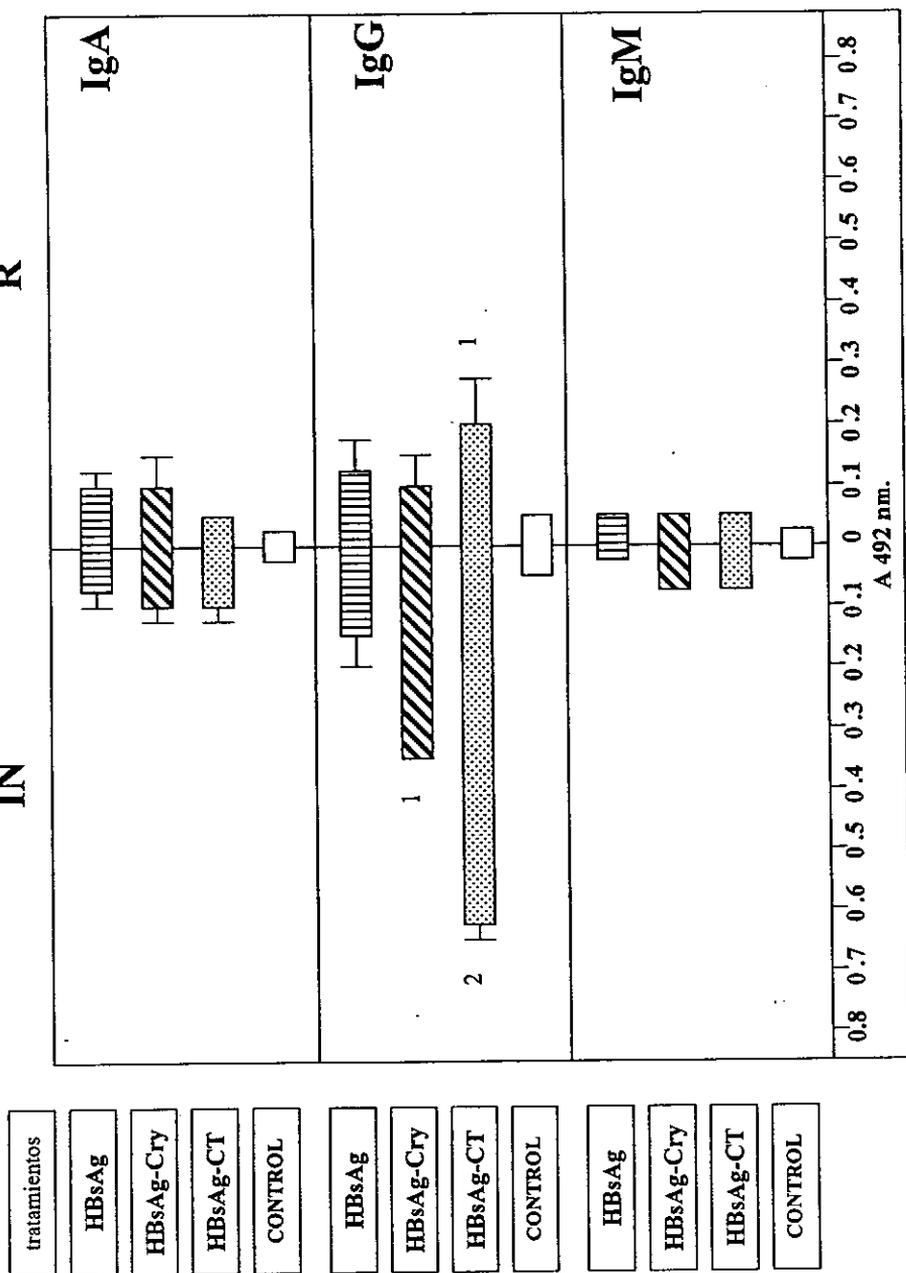


Fig. 12.- Respuesta de anticuerpos anti HBs en líquido de intestino grueso en ratones inmunizados con HBsAg, HBsAg-Cry y HBsAg-CT por las vías intranasal y rectal. Los resultados muestran la  $\bar{x} \pm SD$  de  $n = 5$ ; 1 es diferente al control y 2 es diferente a 1 con una  $p < 0.05$ , las barras que no muestran SD es porque es menor a 0.020.

## VI. DISCUSIÓN

En el presente trabajo encontramos que Cry presentó un efecto adyuvante similar al presentado por la toxina de cólera, sin embargo el efecto adyuvante de ambas proteínas varía según el antígeno coadministrado, la ruta de inmunización, el isotipo analizado y la secreción estudiada.

**Respuesta de anticuerpos en el suero:** Cry aumentó la respuesta de anticuerpos IgA anti BSA por ambas rutas (IN y R) aunque el efecto de la toxina de cólera fue mayor (fig. 4), se debería haber presentado una mejor respuesta de IgG en cualquiera de los grupos ya que la respuesta es en el suero, sin embargo esto no ocurrió dado que el isotipo mayoritario fue IgA, una de las causas por las que el isotipo IgG debe tener mejor respuesta es porque es el principal anticuerpo sistémico, ya que este es secretado mínimamente por las células plasmáticas de la mucosa (Lamm,1997). Cuando Hanenberg y colaboradores (1994) inmunizaron ratones con la toxina del cólera por las rutas oral, intragástrica, rectal y vaginal y cuantificaron IgA e IgG anti CT en el suero, en la saliva, en el líquido intestinal y los fluidos rectal y vaginal, por la ruta rectal también demostraron una alta respuesta del isotipo IgA seguida de IgG en el suero. Por otro lado en nuestro trabajo el isotipo IgM presentó un aumento significativo ( $p < 0.05$ ) con Cry por la ruta rectal (fig.4). Moldoveano y colaboradores (1995) inmunizaron a varias personas por las vías intranasal e intramuscular con una cepa atenuada de *influenza* y cuantificaron IgA, IgG e IgM en el suero, la saliva y los lavados nasales, en el suero indujeron por la ruta intranasal respuesta alta de IgG seguida

de IgA, y baja de IgM. En otro estudio (Forrest, 1990) inmunizaron a personas con *Salmonella typhi* rectalmente y analizaron la respuesta de anticuerpos en el suero la saliva y el líquido intestinal, y obtuvieron en el suero respuestas de los tres isotipos aunque la IgG fue significativamente más elevada, sin embargo la IgM se presentó en 6 de 7 personas mientras que la IgG solo en 3 de 7 personas. Tochikubo y colaboradores (1998) examinaron la actividad inmunoadyuvante sistémica y mucosa de la subunidad B de la toxina del cólera recombinante (rCTB) (10 µg) coadministrada con BSA (50 µg) por las rutas oral e intranasal en ratones, y analizaron la respuesta de anticuerpos en el suero, en lavados nasales y pulmonares, en fluidos vaginales y en líquidos intestinales y la compararon con la que obtuvieron con la BSA sola. La coadministración intranasal de BSA con rCTB estimuló altas respuestas de IgG anti BSA en el suero y de IgA en los lavados nasales y pulmonares pero no en muestras vaginales ni intestinales, y la coadministración oral solo indujo respuestas moderadas de IgG anti BSA en 2 de 4 ratones inmunizados con 50 µg de rCTB en el suero, pero no indujo respuesta alguna en los inmunizados con 10 µg de rCTB. En resumen ellos no detectaron respuesta anti BSA en los ratones inmunizados oral o intranasalmente con 50 µg de BSA sola, en contraste nosotros sí detectamos respuestas de anticuerpos anti BSA en suero y en varias de las muestras mucosas de los animales inmunizados con BSA (10 µg) sola por las vías intranasal y rectal, inclusive en algunos casos (fig. 4) la respuesta anti BSA fue mayor en los animales que recibieron BSA conjuntamente con la toxina del cólera o con Cry 1Ac.

En cuanto a la respuesta anti HBs en el suero los resultados fueron contrastantes ya que en la mayoría de los grupos la IgA no presentó diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) con respecto al grupo control por ambas rutas, dado que el isotipo IgG fue el que presentó mejor respuesta. Por otro lado Cry causó solamente un aumento en el isotipo IgM por la vía intranasal, ya que por la ruta rectal no indujo aumento de ninguno de los 3 isotipos, en contraste con la toxina de cólera la cual aumentó la respuesta de IgG por ambas rutas, Cry inhibió la respuesta de IgA e IgG por la ruta intranasal y la de IgG por la vía rectal (fig. 9). Hopkins y colaboradores (1995) inmunizaron ratones con una cepa atenuada de *Salmonella typhimurium* recombinante expresando el núcleo del virus de la hepatitis B (HBc) por las rutas oral, intranasal, rectal y vaginal anti lipopolisacáridos (LPS) y anti HBc, cuantificaron la IgA en el suero, la saliva, las heces y las secreciones genitales, bronquiales e intestinales cuando analizaron la respuesta de IgG anti HBc en el suero encontraron que la respuesta de anticuerpos por la vía intranasal fue mejor, pero la ruta rectal también tuvo una buena respuesta de anticuerpos aunque menor que la intranasal, en nuestros resultados también se observó una alta respuesta en IgG anti HBs en suero por ambas rutas pero cuando se administró el HBsAg solo (fig. 9). Filion y colaboradores (1988) administraron intramuscularmente 3 dosis de HBsAg a humanos sanos los días 0, 28 y 180 y estudiaron la respuesta humoral de IgG anti HBs en el suero, en la primera prueba hecha el día 28 no observaron respuesta de IgG, sino hasta después de la segunda inmunización que fue cuando alcanzó una respuesta de 0.7 (densidad óptica), este resultado fue similar al de nosotros cuando administramos HBsAg

sola por la vía intranasal, sin embargo en nuestro resultado también se presentó una buena respuesta de IgA e IgM, además de que cuando coadministramos el antígeno de superficie de la hepatitis B con Cry la respuesta de IgM todavía aumentó más (fig.9) por lo que sería factible administrar el antígeno de superficie de hepatitis B coadministrado con Cry por la ruta IN para evitar las dosis intramusculares.

**Respuesta de anticuerpos en el líquido de tracto respiratorio:** Ni la coadministración de la toxina del cólera ni la de Cry modificaron la respuesta anti BSA en lavados traqueopulmonares, solamente hubo un aumento de IgM con Cry por la vía intranasal (fig. 5), sin embargo la IgM puede sustituir a la IgA en la defensa de la mucosa (Lamm, 1997), por el contrario Tochikubo y col. (1998) observaron que la coadministración intranasal de rCTB con BSA provocó un incremento en la respuesta de IgA en lavados pulmonares, una respuesta similar encontraron Hopkins y col. (1995) quienes obtuvieron alta respuesta de IgA anti HBc en la saliva y en los lavados pulmonares por la ruta intranasal, por otro lado la inmunización rectal no causó cambios significativos ( $p>0.05$ ) en ningún grupo (fig. 5), esta ineficiencia de la ruta de inmunización en la respuesta de anticuerpos en líquido de tracto respiratorio puede ser debido a la diferencia en la presentación de antígenos (Klavinskis y col. 1996).

Resultados muy diferentes se encontraron en la respuesta anti HBs ya que por ambas rutas se obtuvieron altas respuestas del isotipo IgG con Cry, con toxina de cólera como también con el HBsAg inmunizado solo, comparados con el grupo

control, además Cry provocó una alta respuesta de anticuerpos IgM anti HBs por la ruta intranasal (fig. 10), aunque algunos investigadores sugieren que la IgM se encuentra en concentraciones relativamente bajas en las secreciones respiratorias, ya que la IgA es la que predomina en las secreciones respiratorias por arriba de la laringe mientras que la IgG es la que se encuentra generalmente en los alveolos (Acosta y Cruz, 1992), además la IgG se presenta normalmente en menor proporción en secreciones humanas pero en forma abundante en secreciones de tracto respiratorio, esto se debe probablemente a que se transportan a través del plasma (Kilian y Russell, 1994) En otros estudios (Moldoveanu y col.1995) administraron a humanos por la ruta intranasal una cepa atenuada de *influenza*, y cuantificaron la respuesta de anticuerpos en lavados nasales ellos observaron un incremento en IgG seguido por IgA, y sugieren que estas diferencias se deben a las rutas de inmunización. Se ha reportado (Murphy y Clements, 1989) que las inmunoglobulinas G en la saliva y las secreciones nasales son derivadas de la circulación. La inmunización de ratones intranasalmente con *B. neisseria meningitidis* presentó altos niveles de IgA, IgG e IgM en lavados pulmonares (Van De Verg y col, 1996). El aumento de anticuerpos en el líquido pulmonar puede hacer más eficiente la resistencia a las infecciones como la neumonía la cual tiene que ver con la superficie mucosa (Abraham E, 1992).

**Respuesta de anticuerpos en el líquido de intestino delgado:** Cry y la toxina de cólera aumentaron la respuesta del isotipo IgA anti BSA por la ruta intranasal, mientras que por la ruta rectal la respuesta de BSA fue mayor a Cry y CT y éstas

fueron mayores al grupo control, sin embargo en los isotipos IgA e IgM no se presentó algún cambio significativo ( $p > 0.05$ ) con respecto al grupo control por ambas vías (fig.6). Esto indica que efectivamente en las secreciones mucosas del líquido de intestino delgado el isotipo IgA es el que predomina en secreciones mucosas de humanos y otros mamíferos (Kilian y Russell, 1994) ya que el intestino es el tejido linfoide del cuerpo con mayor número de linfocitos, por lo que puede generar una compleja y única respuesta inmune en las células de la lámina propia produciendo una gran cantidad de inmunoglobulinas del tipo A (Kelsall y Strober, 1997). Hanenberg y col. (1994) también lograron inducir IgA por la vía rectal. Tochikubo y col. (1998) no encontraron respuestas anti BSA en intestino delgado cuando coadministraron BSA con rCTB. Hopkins y col. (1995) indujeron respuesta de anticuerpos anti HBc y anti LPS en secreciones rectales y en heces cuando inmunizaron por la vía rectal. La inducción de IgA específicamente en secreciones intestinales y genitales es importante para la protección contra patógenos transmitidos sexualmente como el virus de la inmunodeficiencia humana (Forrest, 1992), el papiloma virus, y el virus de la hepatitis B, mientras que la IgA específica del pulmón provee protección contra infecciones respiratorias (Hopkins y col. 1995), por lo que Cry 1Ac podría ser útil para el diseño de vacunas ya que es capaz de estimular la respuesta inmune en el intestino y en otras secreciones corporales.

En cuanto a la respuesta anti HBs solamente se presentó incremento en el isotipo IgG con la toxina del cólera por la ruta intranasal y una respuesta moderada de IgA con Cry por la ruta rectal (fig.11), la posible causa de la diferencia en las

respuestas anti HBs puede ser multifactorial incluyendo falla específica en la presentación de antígenos, en la activación de células Th o en ambas (Hsu y col. 1996). Nordelli y col. (1996) demostraron que aparentemente la ruta rectal no induce buena respuesta de anticuerpos en secreciones intestinales, sin embargo Forrest y col. (1990) cuando administraron rectalmente *Salmonella typhi* indujeron una respuesta significativa de IgA en el líquido del intestino delgado. Algunos investigadores (Abreu y Targan, 1996) han demostrado que en células epiteliales intestinales de ratones y de humanos se expresan moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II y pueden presentar antígenos específicos y respuesta de células T in vitro, hasta ahora no hay evidencia de este mecanismo in vivo.

**Respuesta de anticuerpos en el líquido del intestino grueso:** En donde se indujo una respuesta moderada de anticuerpos IgA anti BSA con Cry y toxina de cólera por ambas rutas, también se observó que tanto Cry como la toxina de cólera inhibieron la respuesta de anticuerpos del isotipo IgA anti BSA por la vía intranasal; al contrario de la vía rectal (fig.7).

En la respuesta anti HBs por la vía intranasal se observó un aumento en el isotipo IgG con Cry y un poco más alta con toxina de cólera, mientras que por la ruta rectal solo se incrementó IgG con toxina de cólera (fig.12), según Berneman y colaboradores (1998) el alto porcentaje de IgG en secreciones mucosas es de origen local y la IgG sérica es transportada a través de la mucosa correspondiente, además probablemente la respuesta de IgG local es mayormente asociada con la penetración del antígeno por la ruta mucosa. La presencia de

inmunoglobulinas en los líquidos intestinales nos dice que un proceso de activación inmune a nivel de mucosas está ocurriendo cuando se pone en contacto la protoxina Cry con el sistema inmune intestinal o sistémico, la naturaleza de este proceso, los mecanismos de activación y la propagación de la respuesta aún están por ser estudiados.

**Respuesta de anticuerpos en los fluidos vaginales:** En el presente trabajo la coadministración de Cry o de la toxina del cólera con BSA no incrementó la respuesta de anticuerpos anti BSA por ninguna de las dos rutas de inmunización (fig.8), este resultado fue similar al de Hanenberg y col. (1994) ellos administraron la toxina del cólera rectalmente e indujeron altos niveles de IgA anti CT en secreciones mucosas del colon y del recto pero baja respuesta en fluidos vaginales. Aunque el tracto genital de las hembras contiene tejido linfoide asociado a mucosas es diferente de la mucosa intestinal (Kozlowski y col. 1997), hay que considerar que cada superficie mucosa tiene diferentes microambientes por lo que los adyuvantes mucosos pueden tener efectos diferentes en cada sitio mucoso (Lycke, 1997), por otra parte hay algunas diferencias entre los sistemas mucosos del tracto genital y del intestinal. Los nódulos linfoides no han sido detectados en el tracto genital de ratón, y no hay células M similares a las encontradas en el intestino, por lo tanto la IgG es la inmunoglobulina predominante en el fluido cervicovaginal, en contraste con el intestino donde la IgA secretora es el isotipo más abundante (Johansson y col. 1998), en el presente trabajo no se presentó la IgG como predominante en el fluido vaginal ya que no se tuvo respuesta significativa de ninguno de los tres isotipos (IgA, IgG e IgM)

aunque nosotros no medimos niveles totales de inmunoglobulinas sino respuesta específica. Kozlowski y col (1997) administraron la toxina del cólera en mujeres por las rutas oral, rectal y vaginal, la inmunización rectal fue la que indujo altos niveles de IgA e IgG en las secreciones rectales en comparación con las otras dos rutas, sin embargo en el tracto genital fue menos efectiva la producción de anticuerpos. Sttats y col. (1997) inmunizaron ratones con HIV coadministrado con la toxina del cólera por las rutas IN, IN-vaginal, IN-intragástrica e IN-rectal y cuantificaron IgA e IgG anti HIV en suero y en fluidos vaginales, y obtuvieron un alto título en la respuesta de IgG seguida de IgA en lavados vaginales por la ruta intranasal. Otros estudios han reportado que la inmunización intranasal es superior a la inmunización vaginal para la inducción de antígenos específicos vaginales en la respuesta de IgA (McLean y col. 1996). Hordnes y col. (1997) inmunizaron ratones por las vías intranasal y rectal con *B streptococos* (GBS) solo o con toxina del cólera como adyuvante y cuantificaron IgA e IgG anti GBS en suero y en secreciones servicio vaginales, ambas rutas de inmunización presentaron altos niveles de IgA en secreciones vaginales cuando se administró solamente GBS, mientras que no se detectó respuesta de IgA en ninguno de los otros grupos, la CT no presentó efecto adyuvante. Aunque en el presente trabajo la respuesta de anticuerpos no tuvo un aumento significativo en los fluidos vaginales, las rutas intranasal y rectal fueron capaces de inducir anticuerpos en sitios distales.

**Efecto adyuvante de Cry1Ac:** Cry tuvo efectos adyuvantes significativos ( $p < 0.05$ ) variables en las respuestas de anticuerpos anti BSA y anti HBs. En el suero

el efecto adyuvante se presentó en IgA anti BSA por ambas rutas (fig.4) y en IgM anti HBs por la ruta intranasal (fig.9), en el líquido del tracto respiratorio el efecto adyuvante se presentó en IgM anti BSA y anti HBs ambas por la ruta intranasal (figs. 5 y 10). En cuanto al líquido del intestino delgado Cry presentó un efecto adyuvante en el isotipo IgA anti BSA por la ruta intranasal y en IgA anti HBs por la ruta rectal. En el intestino grueso el efecto adyuvante de Cry se presentó en IgA anti BSA por la ruta rectal, y en IgG anti HBs por la ruta intranasal, en los fluidos vaginales no hubo efecto adyuvante. Sin embargo Cry también presentó un efecto inhibitorio en la respuesta de anticuerpos (fig.9) El mecanismo por el cual Cry1Ac actúa como un adyuvante cuando se administra intranasal y rectalmente es desconocido, así como la función o estructura similar entre Cry y la toxina de cólera. La toxicidad y elevado costo de producción de la toxina de cólera limita su aplicación como vacuna en humanos (Elson y Detzbaugh, 1994 y Elson y col. 1990) en contraste con la delta endotoxina Cry de *B. thuringiensis* que no presenta alguna toxicidad para mamíferos (McClintock y col. 1995) y la producción a larga escala de la proteína recombinante de Cry 1Ac es de bajo costo (Hofte y Whiteley, 1989 y Ge y col. 1990).

**Efecto adyuvante de la toxina de cólera.** La toxina del cólera presentó un efecto adyuvante en el suero en el isotipo IgA anti BSA por ambas rutas, mientras que en la respuesta anti HBs el efecto se presentó solamente en IgG por la vía rectal. En cuanto al líquido del tracto respiratorio la CT también presentó un efecto adyuvante en IgG anti HBs por la vía rectal, en el intestino delgado la adyuvancia se presentó en el isotipo IgA anti BSA y en IgG anti HBs ambas

por la ruta intranasal, en cuanto al intestino grueso este efecto se presentó en IgA anti Bsa por la vía rectal y en IgG anti HBs por ambas rutas de inmunización. La toxina del cólera no presentó efecto adyuvante en el isotipo IgM de ninguna de las muestras estudiadas, ni efecto en ninguno de los tres isotipos en fluidos vaginales. En un estudio llevado a cabo por Wilson y col. (1989) en donde examinaron el efecto de la administración oral de la toxina del cólera en varias cepas de ratones, coadministraron la toxina del cólera con hemocianina (KLH) o con ovoalbúmina (OVA) y analizaron la respuesta en el suero, en la coadministración de la CT con KLH la IgG tuvo mejor respuesta seguida por la IgA anti KLH, y en la coadministración de la CT con OVA tanto IgG como IgA anti OVA tuvieron una alta respuesta, en nuestros resultados en suero, la IgA anti BSA presentó una alta respuesta por ambas rutas, mientras que en la respuesta anti HBs la mejor respuesta se presentó en el isotipo IgG seguido de IgM por ambas rutas. Wilson y colaboradores (1989) también analizaron sobrenadantes de cultivos celulares intestinales, cuando coadministraron la CT con KLH obtuvieron mayor respuesta de IgA anti KLH, y cuando coadministraron la CT con OVA obtuvieron mayor respuesta de IgG anti OVA, en nuestros resultados de líquidos intestinales se observó una alta respuesta de IgA anti BSA por ambas rutas, y de IgG anti HBs por la ruta intranasal. La habilidad de la toxina del cólera de actuar como un adyuvante mucoso ha sido confirmado por muchos investigadores con una gran variedad de antígenos sin embargo el mecanismo preciso de las propiedades adyuvantes de la toxina del cólera es hasta ahora indefinida (Marinero y col. 1995), algunos estudios han demostrado que la toxina del cólera puede tener directamente efectos sobre las células linfocíticas (Bromander y

col. 1991). La toxina de cólera induce la producción de células asociadas que secretan IL-1 para aumentar la producción de antígenos sobre la luz del intestino y puede aumentar la expresión de moléculas MHC clase II, así como la presentación de péptidos (Lycke y col. 1989), además la toxina del cólera facilita el switch en las células B para la producción de IgA, incrementa los efectos de IL-4 e IL-5 sobre la síntesis de IgG e IgA anti lipopolisacáridos dirigidas hacia las células B (Lycke y Strober, 1989) y el switch de isotipo en las células B para IgM y con interleucinas, la interacción de la toxina de cólera con las interleucinas sobre células B del tejido linfoide asociado al intestino in vivo debe ser explorado para entender el proceso que determina a la célula B predominantemente en la expresión del isotipo IgA (Eelson y col. 1990). La toxina de cólera se conoce como un potente adyuvante mucoso que actúa en el sistema inmune para aumentar la respuesta de anticuerpos en el intestino (Lycke y col. 1991), estimulando la actividad de las células presentadoras de antígenos (Bromander y col. 1991).

**Análisis de los isotipos IgA, IgG e IgM.** En cuanto a las respuestas anti BSA los análisis estadísticos demostraron que en todas las muestras estudiadas con los diferentes antígenos el isotipo que mayor respuesta presentó fue IgA, y en las respuestas anti HBs también en todas las muestras estudiadas fue el isotipo IgG.

**Análisis de las rutas de inmunización:** En cuanto a las rutas de inmunización utilizadas, en el presente trabajo podemos decir que para las respuestas anti BSA no hubo diferencia significativa ( $p > 0.05$ ) ya que las dos vía la intranasal y la rectal

actuaron de forma similar, solamente se presentó diferencia en el líquido del intestino delgado ya que la mejor respuesta se presentó por la vía rectal, mientras que en las respuestas anti HBs la ruta rectal fue la que mejores resultados presentó, por lo que se sugiere que tanto la albúmina sérica bovina como el antígeno de superficie de la hepatitis B son diferentes en cuanto a su estructura. En estudios con roedores la inmunización intranasal presenta una respuesta de anticuerpos por que se activan las células B en los nódulos cervicales linfáticos posteriores y una similar situación ocurre en los humanos (Waldo y col. 1994) Hasta ahora parece ser que la inmunización intranasal es una eficiente ruta de inmunización para futuras vacunas ya que se sugiere que el paso por el tracto respiratorio a los pulmones es el responsable de efectuar la respuesta de anticuerpos (Johansson y col. 1998), y además es efectiva porque el inmunógeno no tiene considerable exposición en el sitio de inmunización ni pasa por condiciones adversas como pH bajo o la abundancia de enzimas proteolíticas las cuales prevalecen en el estómago y en el intestino, la administración intranasal distribuye el inmunógeno más directamente en el sitio de aplicación y por lo tanto induce la respuesta inmune en el tejido linfoide nasal (NALT), mientras que para distribuirse al tejido linfoide asociado a intestino (GALT), semejante a las placas de Peyer tarda más tiempo en distribuirse a lo largo del intestino delgado por lo tanto el inmunógeno queda muy distribuido. Sin embargo esto no es claro en cuanto a la diferencia entre el NALT y el GALT cuando se administra toxina de cólera como adyuvante (Mestecky y col. 1997). Según Hopkins y colaboradores (1995) la diferencia en los resultados sugiere que mecanismos separados son los que controlan la respuesta inmune en la inmunización de dos antígenos diferentes

inducidos por sitios diferentes, la ruta nasal es la más efectiva para inducir respuesta inmune en mucosas. La inmunización intranasal es más efectiva que la inmunización intragástrica ya que genera una pronta y alta respuesta inmune mucosa, por que el tejido linfoide nasal (NALT) y sus nódulos linfoides pueden retener una memoria inmune, el switch de isotipo IgA y la diferenciación y maduración de IgA secretora puede ocurrir antes de la migración de células en el NALT mientras que las respuestas de células IgG requieren de pasar a través de las células conductoras del NALT (Wu y Russell, 1997).

Cuando se inmuniza rectalmente se pueden secretar anticuerpos en sitios distales del sistema inmune común, en humanos por ejemplo la administración rectal de la vacuna de la tifoidea induce células B en la circulación e IgA en la saliva, la ruta rectal presenta una efectiva distribución de medicamentos debido a su gran área de absorción (Forrest y col. 1990). Según Haneberg y colaboradores (1994) la inmunización rectal en ratones con la toxina del cólera genera IgA en la vagina, mientras que en la inmunización vaginal no.

En nuestro laboratorio se encontró que la protoxina Cry 1Ac induce respuesta de anticuerpos anti Cry en líquidos intestinales cuando se administra por las intragástrica (IG) e intraperitoneal (IP), también produce altos títulos de anticuerpos (IgA, IgG e IgM) en suero cuando Cry se coadministró con la toxina del cólera. También se coadministró HBsAg con Cry o con toxina de cólera y BSA con Cry o con toxina de cólera por las rutas intragástrica e intraperitoneal donde se observó que Cry incrementó la respuesta de IgG anti HBs en el suero, y la toxina del cólera aumentó los isotipos IgA e IgM también en el suero por la ruta

intraperitoneal, mientras que en el presente trabajo Cry aumentó la respuesta de IgM anti HBs por la ruta intranasal, y la toxina del cólera aumentó IgM por la misma ruta e IgG anti Hbs por la ruta rectal. Por otro lado Cry incrementó la respuesta de IgG anti HBs en líquidos de intestinos delgado y grueso por la ruta intraperitoneal y CT aumentó IgA e IgG también en intestinos delgado y grueso e IgM en el intestino grueso por la misma ruta, sin embargo en el presente trabajo se presentó un incremento de IgA anti HBs en el intestino delgado por la ruta rectal y de IgG en el intestino grueso intranasalmente y con la toxina del cólera aumentó la respuesta de IgG en el líquido del intestino delgado por la ruta intranasal y IgG en el intestino grueso por ambas rutas de inmunización. Cuando se coadministró BSA+Cry aumentó la respuesta de IgA e IgM anti BSA en el suero y la toxina del cólera aumentó IgG ambas por las rutas I.P. e I.G. y también aumentó IgA por la ruta intragástrica. En el presente trabajo Cry y CT aumentaron IgA por las rutas intranasal y rectal, Cry y CT aumentaron la respuesta de IgG anti BSA en el intestino grueso intraperitonealmente y en el presente estudio Cry y CT aumentaron IgA en el intestino grueso por la vía rectal.

Los valores obtenidos en la densidad óptica se presentaron en general por debajo de 0.800, para poder obtener un valor mayor sería factible cambiar la concentración del antígeno o cambiar la dilución en las diferentes secreciones estudiadas.

La generación de anticuerpos con la protoxina Cry en diferentes secreciones mucosas por ambas vías convierte a esta protoxina de fácil producción en una molécula de interés farmacéutico y biotecnológico. La alta resistencia a proteasas y solubilidad a pH extremo unido a una buena respuesta de anticuerpos pudieran

servir como premisas para investigar los posibles usos de esta familia de proteínas como vehículos de epítopes vacunales de interés, los cuales pudieran ser insertados en la estructura primaria de la proteína o ser acoplados por métodos químicos. Cry puede ser útil como adyuvante mucoso o como acarreador vacunal, aunque es importante tener en consideración que los efectos adyuvantes de Cry y de la toxina del cólera son variables dependiendo de la ruta de inmunización, del antígeno coadministrado, del isotipo analizado y de la secreción mucosa estudiada.

## VII. CONCLUSIONES

El efecto adyuvante de Cry y de la toxina del cólera varía según el antígeno coadministrado, la ruta de inmunización, el isotipo analizado y la secreción estudiada.

Cry1Ac puede ser útil como adyuvante mucoso o como acarreador vacunal.

Los altos niveles de IgA e IgG inducidos por Cry pueden aumentar la resistencia a infecciones producidas por patógenos mucosos.

Cry inhibió la respuesta de anticuerpos en suero de IgA e IgG anti HBs por la ruta intranasal y la de IgG por la ruta rectal.

Dados los efectos variables de Cry sería factible probarla en humanos.

Ambas rutas de inmunización intranasal y rectal confieren inmunidad sistémica y mucosa.

Las rutas intranasal y rectal no inducen respuestas de anticuerpos anti BSA en fluidos vaginales cuando se utiliza Cry o la toxina del cólera.

La vacuna contra el virus de la hepatitis B puede administrarse intranasalmente.

### V III. APÉNDICE

#### A) MATERIALES

Lector de ELISA Biorad, centrifuga refrigerada Hettich, balanza semianalítica Scientech, congelador Revco de -30°C, vortex thermolyne, refrigerador, micropipetas, multipipetas, tubos ependorf, placas de ELISA de 96 pozos, cánulas y jeringas.

#### B) MÉTODOS

##### 1) Sustancias

Fracción V de la albúmina sérica bovina

Antígeno de superficie de la hepatitis B

Toxina del cólera de *Vibrio cholerae*

Protoxina Cry 1Ac de *B. thuringiensis*

Anticuerpos peroxidados anti inmunoglobulina de ratón IgG (anti cadena Fc $\chi$ )

(Pierce), IgM (anti cadena  $\mu$ ) (Pierce) e IgA (anti cadena  $\alpha$ ) (sigma)

Leche descremada Svelty

Ácido sulfúrico (1.5 M)

##### 1) Composición y preparación de reactivos para ELISA

###### Solución amortiguadora de recubrimiento

##### a) Composición:

sustancias	cantidad
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1.59 g.
NaHCO <sub>3</sub>	2.93 g.
H <sub>2</sub> O	1 l.

b) Preparación:

Se disolvieron las sustancias indicadas y se ajustó el pH a 9.6 con NaOH 1M. y se aforó a un litro con agua destilada, se almacenó a 4° C. por no más de 2 semanas.

Solución salina amortiguadora con fosfatos tween

a) Composición:

sustancias	cantidad
NaCL	8 g.
KCL	0.2 g.
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.2 g.
Tween 20	0.5 g.
H <sub>2</sub> O	1 l.

b) Preparación:

Se disolvieron todas las sustancias, excepto el tween 20 en 900 ml. de agua destilada, agitando hasta su disolución, se aforó al volumen final (1 litro) y se agregó el tween 20, agitando hasta su disolución.

Sustrato para ELISA

a) Composición:

Solución amortiguadora de fosfatos:

sustancias	cantidad
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0.1 M.	28.4 g.
H <sub>2</sub> O	1 l.

Solución amortiguadora de citratos:

sustancias	cantidad
ácido cítrico	19.2 g.

H<sub>2</sub>O

1 l.

El amortiguador de fosfato-citratos debe permanecer a un pH de 4.2.

Sustrato final

a) Composición:

sustancias	cantidad
amortiguador de fosfatos	25.7 ml.
amortiguador de citratos	24.3 ml.
orthopenylendiamina	.040 g.
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> al 30%	40 ml.
H <sub>2</sub> O	100 ml.

b) Preparación:

Se mezclaron todas las sustancias y se aforaron a 100 ml. con agua destilada, este sustrato se preparó al momento de utilizarse.

Inhibidor de proteasas

a) Composición:

sustancias	cantidad
Trisma base	1.8 g.
ácido p-hidroxymercuribenzoico	.3607 g.

b) Preparación:

Se disuelve trisma-base en 100 ml. de agua destilada quedando a 150 milimolar, de esta solución se toman 10 ml. y se le disuelve el ácido p-hidroxymercuribenzoico, finalmente se separa en alícuotas de 1 ml.

### Medio RPMI

#### a) Composición:

sustancias	cantidad
Medio RPMI	.98 g.
Gentamicina	125 $\mu$ l. (40mg/ml)
H <sub>2</sub> O	100 ml.

#### b) Preparación

Se toman 50 ml. de agua destilada y se le ponen el medio y la gentamicina en agitación vigorosa para finalmente aforarlo a 100 ml. de agua destilada.

## IX.- BIBLIOGRAFIA

1. Acosta, A. G. y Cruz, L. M. 1992. *Inmunología de las mucosas*, México., p.217.
2. Abraham, E. 1992. Intranasal immunization with bacterial polysaccharide containing liposomes enhances antigenspecific pulmonary secretory antibody response. *Vaccine*. 10(7):461-468.
3. Avreu-Martin, M. T. y Targan, S. R. 1996. regulation of immune responses of the intestinal mucosa. *Critical Reviews in Immunology*. 16:277-309.
4. Berneman, A., Belec, L., Fischetti, V. y Bouvet, J. 1998. The specificity patterns of human immunoglobulin G antibodies in serum differ from those in autologous secretions. *Infect. and Immun.* 66(9):4163-4168
5. Bromander, A., Holmgren, J y Lykle. 1991. Cholera toxin stimulates IL-1 production and enhanced antigen presentation by macrophages in vitro. *J. Immunol* 146:2908.
6. Clements, J. D., Hartzog, N. M. y Lyon, F. L. 1988. Adjuvant activiti of *Escherichia coli* heat labile enterotoxin and effect on the induction of oral tolerance in mice to unrelated protein antigens. *Vaccine* 6:229.

7. Chin J.(1991). Global estimates of AIDS cases and HIV infection. AIDS 5 (suppl. 2):557.
8. Dickinson, B. and Clements, J. 1995. Dissociation of Escherichia coli heat-labile enterotoxin adjuvant activity from ADP-Ribosyltransferase activity. Infect. Immun. 63:1617.
9. Eldridge, J., Gilley, R., Staas, J., Moldoveanu, Z., Meulbroek, J. And Tice, T. 1989 Biodegradable Microspheres: Vaccine Delivery system for oral Immunization. Current Topics in Microbiology and Immunology. 146:59-66.
10. Eldridge, J., Staas, J., Meulbroek, J., McGhee, J., Tice, T., & Gilley, R., 1991. Biodegradable Microspheres as vaccine delivery system. Mol. Immunol. 28:287-294.
11. Elson, C. & Ealding, W. 1984 Cholera Toxin feeding did not induce oral tolerance to unrelated protein antigen. J. Immunol. 133:2892-2887.
12. Elson, C. O., Holland, S. y Woogen. S. 1990. Preferential inhibition of the CD+ T cell subset by cholera toxin (CT) and its B subunit (CT-B). FASEB J. 4:A1864.
13. Elson, C. O. & Detzbaugh, M. T. 1994. Mucosal Adjuvants. In Handbook of Mucosal Immunology (PL Ogra, W Strober, J. Mestecky, ME Lamm, JR McGhee, J, Bienestock. Ed), pp. 391-401. Academic Press Inc, USA.

14. Feitelson, J. S., Payne, J., & Kim, L. 1992. *Bacillus thuringiensis*: insect and beyond. *Biotechnology*, 10:271-275.
15. Filion, L. G., Saginur, R. y Szczerbak, N. 1988. Humoral and cellular immune responses by normal individuals to hepatitis B surface antigen vaccination. *Clin. Exp. Immunol.* 71,405-409.
16. Forrest, B. D., Shearman, J. C. y LaBrooy, J. T. 1990. Specific immune response in humans following rectal delivery of live typhoid vaccine. *Vaccine.* 8:209-212.
17. Forrest, B. D. 1992. The need for consideration of mucosal immunity in vaccine approaches to AIDS. *Vaccine Res.* 1:137-142.
18. Gallichan, W. & Rosenthal, L. 1995. Specific secretory immune responses in the female genital tract following intranasal immunization with a recombinant adenovirus expressing glycoprotein B of herpes simplex virus. *Vaccine.* 13:1589-1595.
19. Gallichan, W. S., Johnson, D. C., Graham, F. L. y Rosenthal, K. L. 1993. Mucosal immunity and protection after intranasal immunization with recombinant adenovirus expressing herpes simplex virus glycoprotein B. *J. Infect. Dis.* 168:622-629.

20. Ge, A., Pfister, R. and Dean, D. 1990. Hyperexpression of a *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin-encoding gene in *Escherichia coli*; properties of the product. *Gene* 93:49-54.
21. Gómez, G., Rodríguez, C., Peterson, D. Y Gavilanes, F. 1994. Antigenicity of hepatitis B surface antigen proteins reconstituted with phospholipids. *Bioch. Et Biophys. Acta* 1233:205-212.
22. Haneberg, B., Kendall, D., Amerongen, H. M., Apter, F. M., Kraehenbuhl, J. P., & M. R., neutra. 1994. Induction of specific immunoglobulin A in the small intestine colon-rectum, and vagina measured by a new method for collection of secretions from local mucosal surfaces. *Infect. Immun.* 62 (1):15-23.
23. Heater, L. Michel, M. y Whalen, G. 1993 " DNA-based immunization induces continuous secretion of hepatitis B surface antigen and high levels of circulating antibody " *Human molecular Genetics.* 2(11):1847-1851.
24. Herrera, G., Snyman, S. J. y Thompson, J. A. 1994. Construction of a bioinsecticidal strain of *Pseudomonas fluorescens* active against the sugarcane borer, *Eldana saccharina*. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:682-690.
25. Höfte, H., and Whiteley, H. 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol. Rev.* 53:242-255.

26. Hopkins, S, Kraehenbuhl, J. P., Schodel, F., Potts, A., Peterson, D., De Grandi, P., & Nardelli-Haeffliger. 1995 "A recombinant *Salmonella Typhimurium* Vaccine Induces Local immunity by Four diferent Routes of Immunizati6n " Infection and Immunits. 63:3279-3289.
27. Hordnes, K., Tynning, T., Brown, T., Haneberg, B. y Jonsson, R. 1997. Nasal immunization with group B streptococci can induce high levels of specific IgA antibodies in cervicovaginal secretions of mice. Vaccine 15(11):1244-1251.
28. Hsu, H.Y., Chang, M.H., Hsieh, R.P., Ni, Y.H. y Chi, W.K. 1996. Humoral and cellular immune responses to hepatitis B vaccination in hepatitis B surface antigen-carrier children who cleared serum-hepatitis B surface antigen.hepatology 24:1355-1360.
29. Johansson, E. L., Rask, C.,Fredriksson, M., Eriksson, K., Czerkinsky, C. y Holmgren, J. 1998. Antibodies and antibody-secreting cells in the female genital tract after vaginal or intranasal immunization with cholera toxin B subunit or conjugates. Infection and Immunity 60(2):514-520.
30. kelsal, B.L. y Strober, W.1997. Peyers patch dendritic cells and the induction of mucosal immune responses. Res Immunol. 148(8-9):490-498.

31. Kilian, M. y Russell, M.W. 1994. Function of mucosal immunoglobulins. In: Handbook of Mucosal Immunology. (P.L. Ogra, W. Strober, J. Mestecky, M.E. Lamm, J.R. McGhee, J. Bienstock.) p. 127 Academic Press Inc, USA.
32. Klavinskis, L. S., Bergmeier, L. A., Gao, L., Mitchell, E., Ward, R. G., Layton, G., Brookes, R., Meyers, N. J. y Lehner, T. 1996. Mucosal or targeted lymph node immunization of macaques with a particulate SIVp27 protein elicits virus-specific CTL in the genito-rectal mucosa and draining Lymph nodes. The Journal of Immunology. 157:2521-2527.
33. Knowles, B.H. 1994. Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* Insecticidal  $\delta$ -endotoxins. Adv. In Insect. Physiology. 24:275-307.
34. Kozlowski, P.A., Cu-Uvin, S., Neutra, M.R. y Flanigan, T.P. 1997. Comparison of the oral, rectal, and vaginal immunization routes for induction of antibodies in rectal and genital tract secretions of women. Infect. Immun. Apr;65(4):1387-1394.
35. Lamm, M.E. 1997. Interacción of antigens and antibodies at mucosal surfaces. Annu. Rev. Microbiol. 51:311-340.
36. Lissen, E. 1993. Hepatitis B. Editorial Diana, primera edición, México. p. 51-55.

37. Lycke, N. y Strober, W. 1989. Cholera toxin promotes B cell isotype differentiation. *J. Immunol.* 142:3781-3787.
38. Lycke, N., and Karlss, A., Sjolander, A. y Magnusson, K. E. 1991. The adjuvant action of cholera toxin is associated with an increased intestinal permeability for luminal antigens. *Scand. J. immunol* 33:691.
39. Lycke, N. 1997. The mechanism of cholera toxin adyuvanticity. *Research in Immunology.* 148(8-9):504-519.
40. Marinaro, M., Staats, H.F., Hiroi, T., Jackson, R.J., Coste, M., Boyaka, P.N. Okahashi, N., Yamamoto, M., Kiyono, H., Bluethmann, H., Fujihashi, K. y McGhee, J.r. 1995. Mucosal Adjuvant Effect of Cholera Toxin in Mice Results from Induction of T Helper 2 (Th2) Cell and IL-4. *The Journal of Immunology.* 155:4621-4629.
41. McClintock, J. T., Schaffer, C. R. y Sjobland, R. D. 1995. A comparative review of the mammalian toxicity of *Bacillus thuringiensis*-based pesticides. *Pestic. Sci.* 45:95-105.
42. McLean, C.S., Challanain, D.N., Duncan, I., Bournnell, Meg., Jennings, R. e Inglis, S.C. 1996. Induction the protective immune response by mucosa vaccination with DISC HSV-1 vaccine. *Vaccine* 14:987-992.

43. Mestecky, J., 1987. The Common Mucosal Immune System & Current Strategies for induction of Immune Responses in External Secretions. *J. Clin. Immunol.* 7:265-276.
44. Mestecky, J., y McGhee, J. R. 1992. Prospects for human mucosal vaccines. *Adv. Exp. Med. Biol.* 327:13-23.
45. Mestecky, J., Abraham, R. & Ogra, P. L. 1994 Common Mucosal Immune System and Strategies for Development of Vaccine at the Mucosal Surfaces. In *Handbook of Mucosal Immunology* (PL Ogra, W. Strober, J. Mestecky, ME Iamm, JR McGhee, J. Bienestock. Ed), p. 357-371. Academic Press Inc, USA.
46. Mestecky, J., Michalek, S.M., Moldoveanu, Z. y Russell, M.W. 1997. Routes of immunization and antigen delivery systems for optimal mucosal immune responses in humans. *Behring Inst. Mitt.* 98:33-43.
47. Michalek, S., Childers, N., Katz, J., Denys, F., Berry, A., Eldridge, H., McGhee, J. & Curtis, R. 1989. Liposomes as oral adjuvants. *Current Topics in Microbiology and Immunology.* 146:51-58.
48. Michalek, S., Eldridge, J., Curtiss, R. & Rosenthal, K. 1994. Antigen delivery systems: new approaches to mucosal immunization. In *Handbook of mucosal Immunology.* (PL Ogra, W. Strober, J. Mestecky, ME Iamm, JR McGhee, J. Bienestock. Ed) p. 373-390. Academic Press Inc, USA

49. Mintai, Z., Keshou, L., Lieming, D., y Smego, R.A. 1993. Duration and efficacy of immune response to hepatitis b vaccine in high-risk Chinese adolescents. *Clin. Infect. Dis.* 16:165-167.
50. Moldoveanu, Z., Clements, M., Prince, S., Murphy B. y Mestecki, J., 1995. Human immune responses to influenza virus vaccines administered by systemic or mucosal routes. *Vaccine* 13(11):1006-1012.
51. Mowat, A.M. 1994. Oral tolerance and Regulation of Immunity to Dietary Antigens. In *Handbook of Mucosal immunology* (PL Ogra, W., Strober, J., Mestecky, M.E., Lamm, JR McGhee, J, Bienestock. Ed). pp. 185-197. Academic Press Inc, USA.
52. Murphy, B.R. y Clements, M.L. 1989. The systemic and mucosal immune response of humans to influenza virus. *Curr. Topics. Microbiol. Immun.* 146, 107-116.
53. Nordelli, H. D., Kraehenbuhl, J. P., Curtiss, R. 3<sup>rd</sup>., Schodel, F., Potts, A., Kelly, S. y Grandi, P. 1996. Oral and rectal Immunization of adult female volunteers with a recombinant attenuated *Salminella typhi* vaccine strain. *Infection and Immunity* 64(12):5219-5224.

54. Perlak F. J., Deaton, R. W., Armstrong, T. A., Fuch, R. T., Sims, S. R., Greenplate, J. T. and Fischhoff. D. A. 1990. Insect resistant cotton plants *Bio/Technology*. 8:939-943.
55. Sherlock, S, 1991. Enfermedades del hígado y vías biliares Ed. Ateneo. México. Capítulo 16 pp. 243-245.
56. Spangler, BD. 1992. Structure and Function of Cholera Toxin and the Related *Echerichia coli* Heat-labile Enterotoxin. 56:622-647.
57. Staats, H. F., Montgomery, S.P. y Palker, T. J. 1997. Intranasal Immunization Is to Vaginal, Gastric, or Rectal Immunization for the Induction of Systemic and Mucosal anti-HIV Antibody Responses. *Aids Research Human Retroviruses* 13(11):945-952.
58. Stewart, C., Adang, M., All, J., Boerma, H., Cardineau, G., Tucker, D. And Pariolt, W. 1996. Genetic Transformation, Recovery, and characterization of Fertile Soybean Transgenic for a Synthetic *Bacillus thuringiensis* Cry 1Ac Gene. *Plant Physiol*. 112:121-129.
59. Thompson, R. 1981. Techniques in clinical immunology. Segunda Edición. Editorial Blackwell Scientific publications. USA. p157-162.

60. Tochikubo, K., Isaka, M., Yasuda, Y., Kozuka, S., Matano, K., Miura, Y. y Taniguchi, T. 1998-Recombinant cholera toxin B subunit acts as an adjuvant for the mucosal and systemic responses of mice to mucosally co-administered bovine serum albumin. *Vaccine* 16(2-3):150-155.
61. Tomasi, T. 1980. Oral tolerance. *Transplantation* 29:357-356.
62. Torres, L. 1997 Importancia de las rutas de inmunización en la eficacia de vacunas para infecciones en mucosas. 2º Congreso Nacional de Vacunología. Colegio Nacional México. p.1.
63. Traquina, P., Morandi, M, Contorni, M. and Nest, G. 1996. MF59 Adjuvant Enhances The antibody Response to Recombinant Hepatitis B Surface Antigen Vaccine in primates. *Journal of Infec. Diseases*. 174;1168-75:
64. Van De Verg, LL., Hartman, A.B., Bhattacharjee, A.K., Tall, B.D., Yuan, L., Sasala, K., Hadfield, T.L., Zollinger, W.D., Hoover, D.L. y Warren, R.L. 1996. outer membrane protein of *Neisseria meningitidis* as a mucosal adjuvant for lipopolysaccharide of *Brucella melitensis* in mouse and guinea pig intranasal immunization models. *Infection and immun.* 64(12):5263-5268.
65. Vázquez-Padrón R.I., Moreno-Fierros, L., Neri-Bazán, L., De la Riva, G.A. & López-Revilla, R. Intragastric and intraoeritoneal administration of Cry1Ac

**ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

protoxin from *BacillusThuringiensis* induce systemic and mucosal antibody response in mice. Enviado 12-1997 a Infect. And Immunity.

66. Waldo, F.B., Van Den, W.B., Mestecky, J. y Husby, S. 1994. Suppression Response by Nasal Immunization. *Clinical Immunology and Immunopathology*. 72(1):30-34.

67. Watson, G.M.F., & N.H. Mann. 1988. Protein Phosphorilation in *Bacillus thuringiensis* during growth and endotoxin production. *J. Gen. Microb.* 134:2559-2565.

68. Wilson, A.D., Stokes, C.R. y Bourne, F.J. 1989. Adjuvant Effect of Cholera Toxin on the Mucosal Immune Response to Soluble Proteins. *Scand. J. Immunol.* 29:739-745.

69. Wu, H.Y. y Russell, M. 1993. Induction of mucosal immunity by intranasal application of a Streptococcal surface Protein Antigen with the Cholera Toxin B subunit. *Infection and Immunity*. 61 (1);314-322.

70. Wu, H.Y. y Russell, M. 1997. Nasal limphoid tissue, intranasal immunization and compartementalization of the common mucosal immune system. *Immunol. Res.* 16(2):187-201.

71. Zárate, A., Trujillo, J., González, A., Coreño, M. y Ontiveros, M. 1997  
Inmunogenicidad y reactogenicidad de la vacuna anti hepatitis B, en  
adolescentes de Mexicali Baja California. 2° Congreso Nacional de  
Vacunología. Colegio Nacional. México. p. 18 y 17.