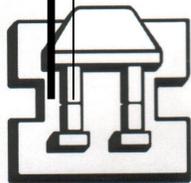




UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

ANÁLISIS DE LA RESPUESTA DE LAS CÉLULAS
PRODUCTORAS DE ANTICUERPO ANTI Cry1Ac EN
LINFOCITOS AISLADOS DE INTESTINO EN RATONES
Balb/c.

T E S I S P R O F E S I O N A L
PARA OBTENER EL TÍTULO DE
B I O L O G O
P R E S E N T A:
JENNIFER SALAS MARTINEZ



IZTACALA

DIRECTORA DE TESIS: DRA. LETICIA MORENO FIERROS

LOS REYES IZTACALA, ESTADO DE MÉXICO.

2003



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.

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Inmunidad en Mucosas de la Unidad de Biotecnología y Prototipos de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala de la U.N.A.M. bajo la tutoría de la Dra. Leticia Moreno Fierros con apoyo de PAPIIT IN207800 y CONACYT 34834-M

"La ignorancia afirma o niega rotundamente;
la ciencia duda."

François Marie Arouet Voltaire

"La ciencia, a pesar de sus progresos increíbles,
no puede ni podrá nunca explicarlo todo.
Cada vez ganará nuevas zonas a lo que hoy parece inexplicable.
Pero las rayas fronterizas del saber,
por muy lejos que se eleven,
tendrán siempre delante un infinito mundo de misterio"

Gregorio Marañón

"Es preferible un año de vida activa y útil
a vivir diez años vegetando"

Manuel Delfín Figueroa

DEDICATORIAS

Dedico esta tesis con todo mi amor a la enorme familia que tengo (Papá, Mamá, Fany, Ely y Miguel), además de ser una bendición en mi vida su cariño, alegría y luz brillan en cada línea de estas páginas.

A mi Papá porque me has creado una mentalidad de superación y no de conformismo que a ayudado a exigirme más de lo que hubiera imaginado, lo cual me ha traído muchas satisfacciones tal como concluir mis estudios profesionales con un merecido segundo lugar de aprovechamiento. Además te dedico esta tesis porque gracias a que me has amado hasta con los huesos, tu amor siempre me ha fortalecido para luchar contra los obstáculos.

A mi Mamá porque gracias a que haces hasta lo imposible por ayudarme eh logrado cuanto me eh propuesto, como cumplir mis estudios profesionales, gracias por apoyarme en todas mis decisiones y por querer lo mejor para mi.

A Fany por ser tan linda hermana, gracias por siempre escucharme, por tus consejos, por ayudarme en mis tareas, a estudiar, por hacerme reír tanto y por los momentos inolvidables, pues sin ti estaría en desequilibrio y me preocuparía por tener una gran amiga como tu, pero como siempre estas conmigo, no invierto energía en buscar alguien que se parezca a ti, lo cual es muy bueno pues solo invierto mi energía en hacer lo que tanto me gusta que es la investigación.

A Ely porque tu confianza en mi, no ha permitido que me derrote al contrario me exijo más para no defraudarte.

Y a Miguel porque piensas en todo y en todos.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Leticia Moreno Fierros por su amplio conocimiento en inmunología de mucosas lo cual fue muy importante para la realización de este trabajo, además gracias por siempre resolver mis dudas con buen humor, pues cualquier inquietud que me surgía con toda confianza se la daba a conocer y usted tan amable me ayudaba a encontrar la solución y muchas de estas soluciones permitieron concluir este trabajo experimental.

A la M. en C. Leticia Verdín Terán por tu enorme apoyo en la realización de este trabajo, gracias por brindarme tu amistad, por los buenos consejos y por tomarme en cuenta para todo.

A la Dra. Martha Martínez porque además de ser mi primer asesora (por lo cual la quiero mucho), me enseñó que cuando se hace investigación se necesita “una buena mano” y un cerebro que funcione, porque con esto los apoyos económicos llegan por sí solos. Además gracias por enseñarme a no ser desperdiciada y a ser sencilla

A mis Amigas de generación Zinaeli, Nazareth, Verónica, Delia, Alejandra, Delfa, Viviana, Rocio, Erandy y Elias, porque aprendí mucho de ustedes y por su amistad incondicional.

A mis Amiguitos Miguel y Wendy porque durante mi estancia en el laboratorio de Bioquímica Molecular hicieron mi vida muy feliz.

A mi gran Amigo Alejandro Ruiz Vera porque nunca permitió que estuviera triste.

A mis Amiguitas Lola y Pilar por siempre estar conmigo en las buenas y en las malas y un merecido agradecimiento a Pilar por meterme la idea de entrar al gym, al cual acudo para desestresarme y gozar de buena salud.

A mis compañeros de Bioquímica Molecular (Lety, Paty y Alejandro) por su amistad.

A mis compañeros de Inmunología en Mucosas (Javier, Miguel, Aldo, Saúl, Marco, Irma, Rita, Gloria y Atzin) por su gran apoyo y amistad, pues me hicieron la vida en el laboratorio bastante agradable.

A mi Abuelita Juana por todas tus bendiciones, pues se que no hubo día que no le pidieras a Dios que me cuidara y me permitiera terminar la carrera.

A mi Abuelito Chuy por ser tan cariñoso y por entender que no te visitaba con frecuencia por la simple y sencilla razón de tener mucha tarea o algún examen.

A mi Tío Guillermo y a mi Tía Norma porque siempre puedo confiar en ustedes.

A mi Tío Nacho y a mi Tía Mague por enseñarme a luchar por mis sueños, por repetirme hasta el cansancio que todo lo que realice lo haga bien y por su cariño.

A mis demás Familiares que de alguna manera me apoyaron para terminar mis estudios profesionales.

A los profesores por su paciencia y empeño en la noble labor que es la educación y que requiere de trabajo, dedicación y mucha paciencia, que ellos han venido demostrando continuamente en su labor dentro y fuera del aula de clases

Finalmente a la Universidad Nacional Autónoma de México por su gran labor educativa y porque siempre esta a la vanguardia en la educación del país

INDICE

DEDICATORIAS	I
AGRADECIMIENTOS	III
INDICE	VI
INDICE DE FIGURAS	VII
ABREVIATURAS	VIII
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
OBJETIVOS	14
MATERIALES Y MÉTODOS	15
RESULTADOS	22
DISCUSIÓN	35
CONCLUSIONES	43
BIBLIOGRAFÍA	44

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama de pasos para la producción y purificación de la pCry1Ac.	16
Figura 2. Estrategia metodologica.	21
Figura 3. Electroforesis de la pCry1Ac purificada.	22
Figura 4. Respuesta de anticuerpos anti Cry1Ac.	24
Figura 5. Inmunoglobulinas totales.	25
Figura 6. Spots de células productoras de anticuerpo anti Cry1Ac.	27
Figura 7. Respuesta de las células productoras de anticuerpo.	28
Figura 8. Efecto de la inmunización con la pCry1Ac en las proporciones de linfocitos B IgA e IgM en intestino delgado.	30
Figura 9. Efecto de la inmunización con la pCry1Ac en las proporciones de linfocitos B IgG en intestino delgado.	31
Figura 10. Efecto de la inmunización con la pCry1Ac en las proporciones de linfocitos B IgE en intestino delgado.	32
Figura 11. Efecto de la inmunización con la pCry1Ac en las proporciones de linfocitos B IgA e IgG en intestino grueso.	33
Figura 12. Efecto de la inmunización con la pCry1Ac en las proporciones de linfocitos B IgM e IgE en intestino grueso.	34

ABREVIATURAS UTILIZADAS EN ESTE TRABAJO

A ₄₉₂	Absorbancia a 492nm
ANOVA	Análisis de varianza
APC	Células productoras de anticuerpo
BALT	Tejido linfoide asociado a bronquios
<i>B. thuriangiensis</i>	<i>Bacillus thuriangiensis</i>
BSA	Albúmina de suero bovino
CT	Toxina de cólera
DAB	Diaminobencidina
EDTA	Ethylenediaminetetraacid
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
GALT	Tejido linfoide asociado a intestinos
HbSAG	Antígeno de membrana del virus de Hepatitis B
HEV	Vénulas con endotelio desarrollado
IFN	Interferón
IgA	Inmunoglobulina A
IgG	Inmunoglobulina G
IgM	Inmunoglobulina M
IgE	Inmunoglobulina E
IL	Interleucina
IPTG	Isopropil β -D-tiogalactopiranósido
LB	Luria-Bertoni
Lc	Linfocitos
LT	Enterotoxina termolábil

MadCAM-1	Molécula de adhesión celular adreína mucosa-1
MALT	Tejido linfoide asociado a mucosas
NALT	Tejido linfoide asociado a nasofaringe
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
PBS-T	Solución amortiguadora de fosfatos con Tween 20 al 0.05%
pCry1Ac	Protoxina Cry1Ac
pIgR	Receptor Ig polimérico
S-IgA	IgA secretora
S-IgM	IgM secretora
SC	Componente secretor
TE	Trizma 50mM pH8, EDTA 10mM

RESUMEN

Las proteínas Cry se han utilizado ampliamente por sus propiedades insecticidas. Recientemente se ha demostrado que la protoxina Cry1Ac (pCry1Ac) es un potente inmunógeno sistémico y mucoso cuando se administra por diferentes vías. Al inmunizar con la pCry1Ac por la ruta intraperitoneal (i.p) en ratones se estimula principalmente la producción de respuestas específicas del isotipo IgG en lavados de intestino delgado y grueso (Moreno *et al.*, 2000). Para determinar si la IgG proviene del suero o si es producido a nivel local por linfocitos intraepiteliales o de lámina propia en este trabajo se analizó la respuesta de las células productoras de anticuerpo (APC) anti-Cry1Ac en linfocitos aislados de intestino en ratones Balb/c inmunizados. Se aplicaron tres dosis de 50µg de la pCry1Ac por la ruta i.p a grupos de cuatro ratones machos, una cada semana. A la cuarta semana se sacrificaron los animales para obtener: a) lavados intestinales, b) aislar los linfocitos intraepiteliales y de lámina propia de ambos intestinos y c) fijar tejido intestinal con paraformaldehído al 4% para realizar las pruebas de ELISA, ELISPOT e inmunohistoquímica respectivamente. En este trabajo encontramos que al inmunizar por la ruta intraperitoneal con la pCry1Ac se inducen respuestas de las células productoras de anticuerpo IgA, IgG, IgM e IgE anti Cry1Ac, en epitelio y lámina propia de intestino delgado y grueso. En general el número de APC anti Cry1Ac de los distintos isotipos fue similar sin embargo los spots de las células productoras de IgG fueron más grandes e intensos que los spots de las APC de los isotipos IgA, IgM e IgE. Los spots de este último isotipo fueron los más tenues y pequeños. En lámina propia de intestino delgado se encontró el mayor número de APC anti Cry1Ac, detectándose altas respuestas del isotipo IgG anti Cry1Ac. Por inmunohistoquímica se demuestra la existencia de células productoras de los cuatro isotipos en epitelio y lámina propia de intestinos. En intestinos de ratones inmunizados se observó un incremento en el número de células B IgG positivas. Además se observó en el tejido intersticial una mayor cantidad del isotipo IgG en comparación a los isotipos IgA, IgM e IgE principalmente en la lámina propia de intestino delgado. La presencia de células plasmáticas en lámina propia está bien establecida, pero la demostración de la existencia de linfocitos B intraepiteliales es un hallazgo novedoso. Usualmente se considera que la presencia de IgG en las secreciones de mucosas en organismos adultos es debida a una “transudación” o a un proceso inflamatorio lo cual descartamos pues encontramos células productoras de IgG en epitelio y lámina propia de ambos intestinos y aunque detectamos altos niveles de IgG anti Cry1Ac no detectamos altos niveles de IgE anti Cry1Ac ni daño en el tejido intestinal.

INTRODUCCIÓN

Las mucosas del tracto gastrointestinal, constituida por varias capas, forma la mayor interfase entre el ambiente externo y el interno del organismo, es en este sitio donde se lleva a cabo la digestión y la absorción de nutrimentos (Kato and Owen, 1994). La mucosa intestinal está expuesta a antígenos muy variados que van desde componentes de los alimentos, microorganismos comensales hasta agentes patógenos como virus, parásitos y bacterias (Fawcett, 1995)

Características histológicas generales del tracto gastrointestinal.

El tubo digestivo está formado por cuatro regiones anatómicas (esófago, estómago, intestino delgado e intestino grueso), todos ellos presentan cuatro capas o túnicas que son semejantes a todo lo largo del tubo digestivo, denominadas: mucosa, submucosa, muscular y serosa o adventicia (Leeson y Leeson, 1990).

Mucosa

Esta formada por un epitelio cilíndrico simple que descansa sobre una lámina basal, una capa subyacente de sostén formada por tejido conjuntivo laxo que se conoce como lámina propia, la cual esta vascularizada, alberga glándulas, vasos linfáticos ocasionales (Gartner y Hiatt, 1997) y una capa externa de músculo liso, denominada *musculares mucosae* (Leeson y Leeson, 1990).

La superficie del intestino delgado posee modificaciones para incrementar su área y realizar eficientemente el proceso de digestión. En la mayor parte de las regiones la mucosa es irregular y presenta prolongaciones digitiformes hacia la luz intestinal, denominadas vellosidades, las cuales aumentan la superficie de contacto (Leeson y Leeson, 1990). Las vellosidades son evaginaciones de la mucosa compuestas por un núcleo de tejido conjuntivo laxo constituido de lámina propia, contiene en su mayoría células del sistema inmune, que se sitúan sobre una delicada trama de fibras elásticas y reticulares (Geneser, 1997), además existe una rica red de capilares, una arteriola, una vénula y un vaso linfático o quelífero central. Este vaso linfático es un delgado vaso que termina en forma de ciega hacia la parte distal de la vellosidad. Los vasos linfáticos son ramas terminales de un plexo ubicado en la submucosa;

además las concentraciones periódicas de la *musculares mucosae* promueven que los vasos linfáticos vacíen su contenido hacia el plexo, desde donde fluye hacia los linfáticos mesentéricos (Fawcett, 1995).

La mucosa intestinal está revestida por un epitelio cilíndrico simple, compuesto por diversos tipos celulares como enterocitos, células calciformes, células enteroendócrinas y células de Paneth.

Enterocitos (células de absorción): son células cilíndricas con núcleo alargado y localizado en la porción basal de la célula. La superficie luminal presenta un prominente borde en cepillo o estriado constituido por microvellosidades, las cuales son proyecciones cilíndricas fijas a la membrana en la superficie apical (luminal) (Gartner y Hiatt, 1997), se disponen radialmente desde las puntas de los enterocitos, mezclándose entre sí formando una cubierta de superficie o glucocáliz (Fawcett, 1995) y representan otro mecanismo para incrementar la superficie del intestino delgado. La función principal de los enterocitos es la digestión terminal y absorción tanto de agua como de nutrientes (Gartner y Hiatt, 1997).

Células calciformes: Aparecen distribuidas de forma difusa entre los enterocitos (Fawcett, 1995). Estas células tienen una base estrecha y un vértice que se expande para darles su forma típica (forma de cáliz) por la acumulación de gránulos de secreción mucosa. Son células productoras de mucígeno, cuya forma hidratada es la mucina, componente del moco que forma una capa protectora que reviste al epitelio (Gartner y Hiatt, 1997). El moco secretado forma una película protectora sobre el glucocáliz (Leeson y Leeson, 1990), la cual protege de la abrasión e impide la adherencia e invasión de algunas bacterias patógenas.

Células enteroendócrinas: Son de tamaño variable, en las criptas tienden a ser ovoides piramidales y en las vellosidades son casi cilíndricas, poseen gránulos de secreción concentrados en la porción basal, su estrecha región apical suele extenderse hacia la luz, donde presentan un borde en cepillo (Geneser, 1997; Fawcett, 1995). Los péptidos que secretan son reguladores activos que participan en la secreción gástrica, la motilidad intestinal, la secreción pancreática y la contracción de la vesícula biliar (Leeson y Leeson, 1990). En general contienen una sola hormona aunque la misma célula puede contener diferentes hormonas como gastrina, somatostatina y secretina (Fawcett, 1995)

Células de Paneth: Estas células son de forma piramidal, con un núcleo rodeado u oval orientado hacia la porción basal. Cuentan con numerosos gránulos de secreción hacia la parte apical de la célula, además muestran gran actividad de síntesis proteica. Estas células no migran ascendentemente en las vellosidades, sino que permanecen en grupos en la base de

las criptas de Lieberkuhn (Fawcett, 1995). Las células de Paneth secretan péptidos microbicidas que forman una barrera contra los microorganismos externos. Estos péptidos se denominan defensinas y contienen gran cantidad de cisternas, funcionando como antibióticos de amplio espectro contra una amplia gama de bacterias y hongos. La síntesis de estos péptidos aumenta en respuesta a citocinas inflamatorias como interleucina 1 (IL, del inglés interleukine) y el factor de necrosis tumoral (TNF, del inglés tumor necrosis factor).

Además el epitelio intestinal que cubre las vellosidades se continúa en glándulas intestinales denominadas criptas de Lieberkuhn, ubicadas en la porción basal de las vellosidades. El epitelio del tracto intestinal se renueva continuamente por la proliferación de células en las criptas de Lieberkuhn, las células aquí originadas migran desde la base hasta la porción apical de las vellosidades, donde se eliminan o exfolian.

Submucosa

La submucosa se extiende entre la mucosa y la lámina muscular externa y consta de tejido conjuntivo fibroblástico denso irregular, con menos células que la lámina propia, a menudo se observan cúmulos de tejido linfoide, contiene también vasos sanguíneos y linfáticos así como un plexo nervioso parasimpático que controla la motilidad de la mucosa y las actividades secretoras de las glándulas (Gartner y Hiatt, 1997).

Muscular externa

Consta por lo menos de dos capas de músculo liso, además de una capa de tejido conjuntivo (Geneser, 1997). El músculo liso se dispone en una capa circular interna y una longitudinal externa. Aunque también existen algunas bandas de fibras musculares que pasan de una a otra capa (Fawcett, 1995). Entre las dos hay un plexo vascular y un plexo nervioso (plexo nervioso mesentérico) con relación a abundantes ganglios linfáticos (Leeson y Leeson, 1990).

Serosa o adventicia

Es la capa más profunda con relación al lumen y esta formada por tejido conjuntivo aerolar relativamente denso y elastico, tiene una cubierta formada por células mesoteliales y esta separada de la capa muscular subyacente por una fina capa de tejido conjuntivo laxo (Fawcett, 1995). Cuando se mezcla con el tejido conjuntivo de las estructuras vecinas recibe el nombre de adventicia, pero en muchas otras regiones está cubierta por el peritoneo y entonces se denomina serosa, contiene vasos sanguíneos y linfáticos (Leeson y Leeson, 1990).

Sistema Inmune de Mucosas

La respuesta inmune adquirida en mucosas es el resultado de la interacción de los antígenos externos con una red de células (epiteliales y linfoides) que se encuentran acumuladas en las mucosas (o transitando entre las mismas) y que se conoce como tejido linfoide asociado a mucosas (MALT) o sistema inmune de mucosas. El MALT esta compuesto por: tejido linfoide asociado a intestinos (gut-associated-lymphoid tissue, GALT); tejido linfoide asociado a bronquios (bronchus-associated lymphoid tissue, BALT) que incluye folículos linfoides de los bronquios y tejido asociado a nasofaringe (nasal-associated lymphoid tissue, NALT). El tejido linfoide asociado a mucosas (MALT) representa un ejemplo de compartimento del sistema inmune que funciona de manera relativamente independiente del sistema inmune sistémico.

El sistema inmune de mucosas se divide funcionalmente en: 1) sitios inductores, donde el antígeno es selectivamente captado para la iniciación de las respuestas inmunes y 2) sitios efectores, que son las regiones donde va a tener lugar la respuesta efectora del sistema inmune adquirido de las mucosas. (McGhee, *et al*, 1999)

1. Sitios inductores de la respuesta inmune en mucosas.

La organización y tipo de células que conforman los sitios inductores mucosos varían con base en la localización anatómica de la mucosa, el epitelio que conforma la misma así como de la especie animal que se trate. No obstante, se puede generalizar que estos sitios se caracterizan porque en ellos existen poblaciones de células capaces de captar, procesar y presentar el antígeno a una serie de células que van a ser las precursoras de la respuesta

inmune mucosa (Czerkinsky, 1999). Al explicar la organización de los sitios inductores, casi siempre los autores acuden a las agrupaciones linfoides presentes en la mucosa del tracto gastrointestinal (placas de Peyer) (Czerkinsky, 1999; Kelsall y Strober, 1999; McGhee y Strober, 1999). En estos casos el sitio inductor se encuentra cubierto por una zona epitelial en la que, además de los enterocitos, existen células M especializadas en la captación y transporte de los particulados. Adyacente al epitelio de estos sitios inductores se extiende una región conocida como domo subepitelial, que es especialmente rico en células dendríticas, pero donde también pueden encontrarse linfocitos T y B, macrófagos y células cebadas. Las placas de Peyer se caracterizan por no poseer vasos linfáticos aferentes.

Un rol fundamental en la captación de antígenos lo juegan las células M, estas células traspasan el antígeno de manera prácticamente intacta hacia la zona subepitelial, donde es fagocitado y procesado por las células presentadoras profesionales allí presentes. En otros sitios inductores las células dendríticas intercaladas entre las células epiteliales capturan el antígeno, sin mediación de las células M, para presentarlo luego a las células B y T precursoras de la respuesta inmune. Otro tipo de células cuya participación en la captura y procesamiento de antígenos no debe ser despreciada lo constituyen las células epiteliales del tracto gastrointestinal. (Schinjs, 2000)

Los linfocitos T o B “naive” que reconocieron el antígeno presentado por las células presentadoras de anticuerpos son activados y migran, vía sangre y vasos linfáticos eferentes, hacia el epitelio o la lámina propia de las mucosas donde se indujo la respuesta o hacia otras mucosas más distantes. En el caso de los linfocitos B, estos tienden a desarrollarse preferentemente como células plasmáticas y en el caso de los linfocitos T, estos pueden migrar no solo a las mucosas, sino que pueden alojarse también en el sistema linfático periférico. El movimiento específicamente dirigido de los linfocitos está mediado por una serie de interacciones que se producen entre las moléculas expresadas en su superficie (integrinas y selectinas) y las adresinas, expresadas en la superficie de las células que conforman el tejido hacia donde van a migrar y el endotelio de las vénulas con endotelio desarrollado (HEV) que irriga a los mismos (Kelsall y Strober, 1999; McGhee y Strober, 1999).

2. Sitios efectores del sistema inmune en mucosas.

Estos sitios comprenden regiones más difusas dentro de la mucosa, y en ellos se encuentran las células efectoras que son: 1) linfocitos T activados, que pueden encontrarse tanto en la lámina propia como intercalados entre las células epiteliales; y 2) linfocitos B activados, distribuidos en la lámina propia de las mucosas, casi siempre diferenciados en células plasmáticas, con capacidad de secretar anticuerpos, entre los cuales destaca por su proporción el isotipo IgA.

En humanos los linfocitos T que se encuentran en la lámina propia presentan receptores $T\alpha\beta$ y pueden ser $CD4+$ o $CD8+$. Casi todas las células T $CD4+$ de la lámina propia presentan un fenotipo maduro o de memoria (receptores $CD44$, $CD45R$) y a diferencia de los linfocitos T periféricos, casi no proliferan al reconocer el antígeno y tienen gran capacidad secretora (expresan espontáneamente $IL-2$, $IL-5$, $IL-4$ e $INF\gamma$ s). Los linfocitos $CD8+$ de lámina propia no se diferencian mucho de su contraparte sistémica, se ha demostrado su función protectora en las mucosas gracias a su actividad citolítica. Los linfocitos intraepiteliales se caracterizan por poseer fenotipos superficiales poco comunes como: a) expresión de la integrina $\alpha_E\beta_7$, lo cual les permite unirse a las células epiteliales; b) expresión del TCR $\gamma\delta$ en un porcentaje baja de ellos; c) la mayor parte son $CD8+$ y de estos, una fracción es doble positiva, o sea, son $CD4+CD8+$; d) la molécula $CD8$ en una buena parte de los linfocitos intraepiteliales con receptor $\alpha\beta$ se encuentra en forma de homodímero α , lo cual contrasta con la molécula convencional $CD8$, que consta de un heterodímero $\alpha\beta$. (Czerkinsky, 1999)

Los linfocitos efectores van a participar en la respuesta inmune de mucosas por medio de tres mecanismos fundamentales: a) Secreción de anticuerpos, b) Desarrollo de respuesta celular citotóxica antígeno-específica y c) Regulación de la respuesta inmune.

Inmunoglobulinas en mucosas

El sistema inmunitario de las mucosas está especializado en la producción de grandes cantidades de IgA. La importancia de IgA en secreciones mucosas está basada en la presencia de una estructura adicional en IgA, que es conocida como componente secretor (SC). Este componente es sintetizado por células epiteliales de la mucosa y se expresa en sus superficies

basal y lateral. Subsecuentemente el SC es reconocido como parte del receptor Ig polimérico (pIgR) que transporta IgA del tejido mucoso a sus secreciones.

Los anticuerpos de la IgA secretora (S-IgA) localmente producidos, son los principales determinantes de la inmunidad humoral en las superficies mucosas. La S-IgA es inducida, transportada y regulada por mecanismos distintos de aquellos involucrados en la inmunidad sistémica (Brantzaeg, 1989). La S-IgA en secreciones externas se encuentra predominantemente en forma dimerica y tetramérica con cuatro y ocho sitios de unión al antígeno, respectivamente y manifiesta mayor avidéz que la inmunoglobulina monomérica. La S-IgA constituye más del 80% de todos los anticuerpos producidos en el tejido asociado a mucosas y no se obtiene usualmente por inmunización parenteral.

Además de la S-IgA existen otros elementos de inmunidad en las secreciones mucosas, esto incluye anticuerpos S-IgM e IgG, linfocitos T y componentes mediadores de inmunidad celular.

La IgM secretora (S-IgM) en secreciones externas, también está asociada con el SC, sin embargo su concentración es menor a la de S-IgA debido a una menor proporción de células productoras de IgM en tejidos mucosos. Así mismo IgM no puede ser tan efectivamente transportada como IgA debido a una restricción en su peso molecular en el transporte dependiente de SC (Mestecky, 1999).

ANTECEDENTES

Desde hace más de 30 años se han desarrollado pesticidas microbianos para evitar la toxicidad de los pesticidas químicos y *Bacillus thuringiensis* (*B. thuringiensis*) es utilizado para este fin. Este organismo es un bacilo gram positivo que se distingue por la presencia de cuerpos paraesporales con cristales de las toxinas Cry, que incluyen también una abundante cantidad de pre- α -endotoxinas. Cada tipo de endotoxina es codificada por un gene diferente de Cry y son sintetizadas y ensambladas durante la esporulación. *Bacillus thuringiensis* variedad *Kurstaki* produce principalmente Cry1Ab y Cry1Ac (Bernestein *et al.*, 1999). Las proteínas Cry1Ac pueden encontrarse en la naturaleza en tres formas: cristalina, como protoxina soluble y como toxina soluble. La protoxina es la subunidad de los cristales, tiene un peso molecular de (\approx 133 kDa) y es soluble a pH alcalino. En contraste, la toxina Cry1Ac es el producto de la proteólisis de la protoxina que tiene un peso molecular de (\approx 70 kDa) es estable a pHs extremos

y resistente a la proteólisis (Knowles, 1994). Los sistemas de producción efectivos para la expresión de los genes Cry en *Escherichia coli* o en otros vectores son de gran ayuda para estudiar los productos del gen, su funcionalidad, rango de hospedero así como su producción industrial, etc. (Turner *et al.*, 1991; Vadlamudi *et al.*, 1995). *Escherichia coli* JM103 (pOS4201) es un buen sistema para la expresión del gen que codifica la proteína Cry1Ac de *Bacillus thuringiensis* variedad Kurstaki HD73, porque la cantidad producida es mayor (284 µg/ml; el 48 % del total de proteínas) que la del hospedero natural (58 µg/ml; el 51% del total de proteínas) (Ge *et al.*, 1990).

Las proteínas Cry1Ac desde hace mucho tiempo se han estudiado ampliamente para evaluar su actividad bioinsecticida y los estudios de seguridad se han enfocado principalmente a la patogenicidad del bacilo y a la toxicidad de las proteínas Cry, pero las propiedades inmunológicas han sido poco estudiadas en vertebrados. Se ha sugerido que los cristales de estas proteínas pudieran tener actividad antitumoral contra el sarcoma Yoshida debido posiblemente a su capacidad de provocar un incremento general de la inmunidad en ratas (Prasad y Shethna, 1975). Recientemente se reportó que la protoxina Cry1Ac (pCry1Ac) recombinante clonada a partir de *Bacillus thuringiensis* es altamente inmunogénica y posee efectos adyuvantes sobre proteínas tanto a nivel sistémico como de mucosas al menos tan potentes como los de la toxina del cólera (Vázquez *et al.*, 1999a y Vázquez *et al.*, 1999b); aunque se desconocen los mecanismos que determinan dichos efectos.

Los estudios toxicológicos usando altas concentraciones de esporas de *B. thuringiensis* y cristales de varias cepas de *B. thuringiensis* han mostrado que estas proteínas no son tóxicas para vertebrados (McClintock *et al.*, 1995). Las proteínas Cry que se producen masivamente a través de fermentación en *B. thuringiensis* o microorganismos transgénicos son considerados como seguros para el ambiente (Ge *et al.*, 1990; Höfte y Whiteley, 1989). Una nueva generación de plantas transgénicas que contienen cantidades considerables de proteínas Cry están siendo comercializadas y utilizadas para producción de alimentos (Shuler *et al.*, 1998). Sin embargo a pesar de que las plantas transgénicas que contienen Cry parecen ser seguras para el consumo humano y animal, la alta inmunogenicidad y los efectos adyuvantes de Cry1Ac que se han descrito, sugieren que debe tenerse precaución en la liberación de estos productos, pues algunas de estas plantas contienen cantidades elevadas de toxinas Cry y se utilizan para producción de alimento (Koziel *et al.*, 1993). Aun más si se considera que se ha reportado que los agricultores expuestos a pesticidas que contenían *Bacillus thuringiensis* variedad Kurstaki

durante tiempos prolongados (2 años) presentaron un incremento en los niveles de inmunoglobulinas séricas, aunque en el seguimiento de estos pacientes se observó la disminución en los títulos de inmunoglobulinas después de un año de suspender el uso de estos bioinsecticidas. (Laferriere, 1987). En un trabajo epidemiológico más reciente se evaluó la respuesta inmune en agricultores antes y después de usar pesticidas comerciales que contienen productos de *B. thuringiensis* var. *Kurstaki* y se detectaron niveles elevados de IgE e IgG séricos además de respuesta alérgica en piel, siendo más altas estas respuestas a mayor cantidad y frecuencia de uso de los bioinsecticidas, sin embargo también se observa baja frecuencia de enfermedades gastrointestinales en todos los sujetos que estuvieron en contacto con dichos productos (Bernestein, 1999).

JUSTIFICACIÓN

Para proveer protección específica contra la gran variedad de patógenos que invaden a través de las superficies mucosas, se requiere diseñar estrategias de vacunación en mucosas capaces de inducir respuestas inmunes específicas en los sitios deseados. Debido a que generalmente la inmunización sistémica es inefectiva para la inducción de respuestas inmunes en mucosas, se han probado numerosas estrategias para lograr la estimulación de la respuesta inmune en estas (Mestecky, 1987, Eldridge *et al.*, 1989, 1991); la mayoría de los esfuerzos se han enfocado al desarrollo de estrategias de vacunación oral (o) (Mestecky y McGhee, 1989; Mestecky *et al.*, 1994; Michalek *et al.*, 1994; Elson y Dertzbaugh, 1994). Sin embargo, aunque podría esperarse que la administración oral de vacunas proteicas indujera respuestas inmunes tanto en el tracto gastrointestinal como en mucosas distantes, en realidad esta forma de administración de antígeno generalmente resulta en respuestas pobres o de corta duración. Además la administración oral de proteínas induce ausencia de respuesta a la inmunización parenteral (tolerancia oral) (Tomasi, 1980; Mowat, 1994).

En años recientes se han ensayado otras rutas diferentes a la oral para inducir respuestas inmunes en mucosas (Hopkins *et al.*, 1995; Moreno-Fierros *et al.*, 1999). La ruta intranasal (i.n) ha resultado ser una de las más efectivas para alcanzar tales respuestas (Staats *et al.*, 1997; Johansson *et al.*, 1998; Gallichan *et al.*, 1995), mientras que las rutas rectal (r) e intraperitoneal (i.p) también son efectivas para inducir respuestas en algunas mucosas (Mbawuiké *et al.*, 1999; Hopkins *et al.*, 1995; Moreno-Fierros *et al.*, 1995). Entre las estrategias exploradas para incrementar las respuestas en mucosas se encuentran la

incorporación de antígeno en liposomas (Michalek *et al.*, 1989, 1994), la inserción de epítopes vacunales en proteínas acarreadoras (Czerkinsky *et al.*, 1989) el uso de vectores vivos avirulentos (Hackett, 1990) como virus (Gallichan y Rosenthal, 1995) o bacterias recombinantes que expresan genes que codifican para antígenos vacunales (Hopkins *et al.*, 1995; Robinson *et al.*, 1997), la microencapsulación de antígeno en microesferas biodegradables que consisten en polímeros de carbohidratos (Eldridge *et al.*, 1989,1991; Michalek *et al.*, 1994), vacunas de DNA (McCluskie y Davis, 1999) y en animales el uso de toxina de cólera como adyuvante o acarreador (Lycke y Holmgren, 1986; Jackson *et al.*, 1993; Elson *et al.*, 1984, 1990, 1994; Wilson *et al.*, 1990; Czerkinsky *et al.*, 1989). Sin embargo diversas consideraciones prácticas hacen a estas estrategias poco apropiadas para su amplia aplicación. Por ejemplo la incorporación de antígeno a liposomas es un proceso laborioso no reproducible y el producto tiene vida limitada. El uso de bacterias y virus recombinantes atenuados esta limitado a una sola aplicación y a los posibles riesgos de toxicidad del acarreador (Eldridge *et al.*, 1989).

Recientemente se demostró que la pCry1Ac recombinante clonada a partir de *Bacillus thuringiensis* es altamente inmunogénica, pues la inmunización intranasal, rectal e intraperitoneal con la pCry1Ac es capaz de inducir respuestas de anticuerpos en mucosas vaginales, intestinales y de tracto respiratorio (Moreno-Fierros *et al.*, 2000). También se ha descubierto que posee efectos adyuvantes tanto a nivel intestinal como sistémico al menos tan potentes como los de la toxina del cólera cuando se coadministra con albúmina de suero de bovino (BSA) y antígeno de membrana del virus de Hepatitis B (HbsAG) en ratones Balb/c por las vías oral e i.p (Vázquez *et al.*, 1999a y Vázquez *et al.*, 1999b) y por las vías intranasal y rectal (Moreno-Fierros y Esquivel datos no publicados). Asimismo recientemente se demostró que la coadministración intranasal e intraperitoneal de la pCry1Ac con extractos de proteínas totales de *Naegleria fowleri* (*N. fowleri*) incrementa la protección en el modelo de Meningoencefalitis amibiana en ratón. (Rojas-Moreno Fierros, datos no publicados).

La coadministración intraperitoneal y oral de la pCry1Ac con BSA y HBsAg aumenta principalmente la respuesta de IgG sérica e intestinal aunque sus efectos dependen de la ruta del antígeno coadministrado y del sitio analizado, ya que se ha observado que la coadministración intranasal y rectal de estos mismos antígenos con la pCry1Ac incrementa la respuesta de IgA anti BSA en secreciones traqueo pulmonares, intestinales y en suero pero cuando se coadministra con HBsAg, únicamente se incrementa por la vía i.n la IgG en intestino grueso y la IgA en suero, mientras que por la vía rectal la pCry1Ac incrementa la IgA en

intestino delgado (Moreno-Fierros-Esquivel, datos no publicados). La coadministración con *N. fowleri*, también aumenta los niveles de IgG intestinales (Rojas-Moreno, datos no publicados). Los efectos adyuvantes de la pCry1Ac se han comparado con los producidos por la toxina de cólera (CT), que es considerada como el más potente inmunógeno y adyuvante de mucosas; se acepta que cuando CT se coadministra con proteínas solubles no inmunogénicas su efecto es incrementar las respuestas de IgA en mucosas y de IgG sistémicas, sin embargo varios reportes apoyan la hipótesis de que los efectos adyuvantes de CT y de la pCry1Ac no son universales ya que las propiedades adyuvantes de ambas proteínas dependen de la ruta de inmunización, del antígeno coadministrado, del isotipo del anticuerpo y del sitio analizado. (Vázquez *et al.*, 1999; Esquivel, 1999; Wilson *et al.*, 1990)

Además se ha encontrado que la inmunización i.p con la pCry1Ac incrementa el porcentaje de linfocitos T que expresan la integrina $\alpha 4\beta 7$ en el intestino delgado y la integrina $\alpha \varepsilon \beta 7$ en el intestino grueso, esto es importante porque es ampliamente aceptado que la migración de linfocitos hacia los distintos sitios intestinales (placas de Peyer, intestino delgado y grueso), está regulada por la interacción entre la integrina $\alpha 4\beta 7$ expresada en linfocitos circulantes con la molécula de adhesión celular adhesina mucosa- 1 (MadCAM-1) expresada en células endoteliales de las vénulas poscapilares de intestino delgado. (Berlin *et al* 1993, Butcher, y Picker 1996). Asimismo se ha encontrado que la inmunización intranasal con la pCry1Ac provoca un incremento en el porcentaje de linfocitos T CD4 activados en vagina así como un incremento en la expresión de L-selectina en linfocitos vaginales (Moreno-Fierros datos no publicados).

Mediante la técnica de ELISA se ha demostrado que al inmunizar por vía intraperitoneal con la pCry1Ac en ratones se estimula la producción de IgG en intestino, pero no se sabe si proviene del suero ó si es producido a nivel local por células intraepiteliales o de lámina propia. Actualmente no se ha reportado la presencia de linfocitos B intraepiteliales en intestinos, sin embargo nosotros suponemos que las células productoras de anticuerpo intraepiteliales podrían secretar el anticuerpo directamente al lumen intestinal y explicar los altos niveles de IgG detectados en lavados intestinales. En cambio en la lámina propia intestinal esta reportada la existencia de linfocitos B que maduran a células plasmáticas principalmente del isotipo IgA+, claro que sí los altos niveles de IgG detectados por ELISA fueran producidos por las células productoras de anticuerpo de la lámina propia, entonces debería existir un mecanismo de transporte que aún no ha sido descrito en mucosas intestinales de ratones adultos, por lo tanto es importante determinar si existen células productoras de IgG anti Cry1Ac en epitelio y en la

lámina propia de intestino delgado y grueso, una técnica que permite detectar células productoras de anticuerpo específico para el antígeno de distintos tejidos es ELISPOT, por lo que permitirá analizar la respuesta de las células productoras de anticuerpo anti Cry1Ac de linfocitos aislados de intestino en ratones Balb/c.

OBJETIVO GENERAL

Analizar la respuesta de las células formadoras de anticuerpo anti-Cry1Ac en linfocitos aislados de intestino en ratones Balb/c

OBJETIVOS PARTICULARES

1) Analizar la respuesta de anticuerpos anti Cry1Ac en lavados intestinales en ratones machos Balb/c inmunizados por las rutas intraperitoneal y oral a través de ELISA indirecto.

2) Determinar por ELISPOT si se inducen respuestas de células productoras de anticuerpos específicos anti-Cry en lámina propia e intraepiteliales intestinales después de haber inmunizado por la ruta intraperitoneal y oral con la protoxina Cry1Ac

- Determinar el isotipo de la respuesta de células formadoras de anticuerpos anti-Cry1Ac en linfocitos aislados de intestino en ratones machos Balb/c inmunizados por las rutas intraperitoneal y oral a través de ELISPOT

3) Determinar el número total de inmunoglobulinas de los diferentes isotipos en lavados intestinales en ratones machos Balb/c inmunizados por las rutas intraperitoneal y oral a través de ELISA directo.

4) Realizar un análisis inmunohistoquímico de las poblaciones de linfocitos B (IgA, IgG, IgM e IgE) en intestino grueso y delgado de ratones control e inmunizados por la vía intraperitoneal con la protoxina Cry1Ac.

MATERIALES Y MÉTODOS

1.- PRODUCCIÓN Y PURIFICACIÓN DE LA pCry1Ac A PARTIR DE *Escherichia coli*

Se inoculó una asada de *Escherichia coli* JM 103 (pOS9300) a un tubo con 5ml de medio Luria-Bertani (LB) suplementado con Kanamicina Kanamicina (30 μ g/ml) y ampicilina (50 μ g/ml), que luego se incubó toda la noche a 37°C en agitación constante. Después del tiempo de incubación se inoculó 1ml del cultivo anterior en un matraz con 500ml de medio LB con 0.5ml de kanamicina que se mantuvo en agitación por 5hr a 37°C, posteriormente se adicionaron 500 μ l de isopropil β -D-tiogalactopiranosido (IPTG) 1mM y se incubó por 24hr, al concluir las 24hr se adicionaron 250 μ l de IPTG 1mM más 0.5ml de kanamicina y se continuó la incubación hasta que la absorbancia a 540nm (A540) llegó a 0.5-1.0, posteriormente las bacterias se cosecharon por centrifugación a 12 000 rpm por 10min a 4°C, consecutivamente se resuspendió la pastilla con 50ml de Trizma 50mM pH 8 más EDTA 10mM (TE), a continuación se centrífugo nuevamente y se resuspendió la pastilla con 50ml de TE, pero ahora se le añadió 0.5ml de lisozima (2mg/ml) y se incubó 1hr a 37°C (mezclando suavemente de vez en cuando). El volumen se repartió en dos tubos Nalgene de 50ml y cada uno se sonicó cinco veces por 5min a 60 de amplitud mientras estaba sumergido en hielo por 5min. (Ultrasonic Homogeneizer 4710). Se reunieron los sonicados y la mezcla resultante se centrifugó a 10 000 rpm durante 20min a 4°C, subsiguientemente se resuspendió la pastilla en 50 ml de NaCl 0.5M y Tritón X-100 al 1%, a continuación se centrífugo 3 veces a 10 000 rpm por 15min a 4°C resuspendiendo la pastilla de cada centrifugado en 50ml de NaCl 0.5M y Tritón X-100 al 1%, consecutivamente se resuspendió en 30ml de H₂O estéril fría, se centrífugo a 10 000 rpm por 15min a 4°C, posteriormente se solubilizó la pastilla en 10 ml de buffer de carbonatos 0.1M pH 9.6 y 50 μ l de mercaptoetanol por 30min a 37°C en agitación, por último se centrifugó a 10 000 rpm por 15min a 4°C, se recuperó el sobrenadante y se almacenó a 4°C. (Fig.1)

2.- INMUNIZACIONES

En todos los experimentos se utilizaron ratones machos de la cepa Balb/c de 8-10 semanas de edad. Fueron mantenidos en jaulas con agua y alimento (Lab diet 5015, OMI Nutrition International) ad libitum. La protoxina Cry1Ac fue administrada vía oral (100µg por ratón) y vía intraperitoneal (50µg por ratón) una vez por semana durante tres semanas y los ratones fueron sacrificados siete días después de la última inmunización.

3.- OBTENCIÓN DE MUESTRAS

A) Líquidos intestinales

Se disectaron los intestinos delgado y grueso se separaron y lavaron internamente mediante una cánula de 10cm de largo por 3mm de grosor con medio RPMI más gentamicina (40mg/ml), para el intestino delgado se usaron 5ml y 3ml para el intestino grueso, al líquido obtenido se le adiciono inhibidor de proteasas (ácido P-hidroximercuribenzoico 0.036g/ml + trizma base 0.018g/ml, pH 8), posteriormente los líquidos se centrifugaron a 10 000rpm durante 10min, por último los sobrenadantes se alicuotaron en tubos eppendorf y se almacenaron a – 20° C.

B) Fijación y procesamiento de tejidos

Se disectaron los intestinos delgado y grueso, se separaron y se corto un centímetro de tejido que se coloco en paraformaldehido al 2% en solución amortiguadora de fosfatos (PBS) durante 2hr a temperatura ambiente, posteriormente se lavaron durante 2hr en PBS para deshidratarlos en alcoholes de concentración creciente (alcohol al 70%, 90% y 100%), por una hora cada uno, posteriormente se colocaron en alcohol amilico por 2hr y después se realizaron dos cambios de parafina e inclusión definitiva en paraplant Fisher. Se hicieron cortes de 5µm de grosor para después realizar la inmunohistoquímica

C) Obtención de linfocitos intraepiteliales y de lámina propia.

Después de extraer los intestinos delgado y grueso se colocaron en cajas Petri con medio RPMI sobre hielo, se lavaron con medio RPMI para lo cual se utilizo en vez de aguja una cánula en la jeringa, para succionar el medio RPMI y verterlo con ayuda de la cánula al interior de los intestinos logrando de esta manera no lastimar el tejido y ejercer presión sobre las

excretas consiguiendo eliminarlas. Después se introdujo un gancho de tejer al interior de los intestinos delgado y grueso para poder cortar las placas de Peyer y después voltearlos, posteriormente cada intestino (delgado y grueso) se colocó en tubos cónicos de 45ml con 25ml de la solución de EDTA-RPMI 0.5mM más 200µl de suero y se incubó en agitación constante a 37° C por 30min en posición horizontal, esto para que el EDTA quelara los iones calcio de los cuales depende la adhesión célula-célula, logre que los tejidos puedan ser disociados en células intraepiteliales mediante agitación suave, concluido el tiempo se colocó en cajas Petri la solución de EDTA-RPMI 0.5mM con los intestinos (delgado y grueso) para disgregar las células del epitelio empleando un embolo, consecutivamente se colocaron los intestinos en otra caja de Petri para quitarles el exceso de EDTA con medio RPMI y a continuación se colocó cada intestino (delgado y grueso) en tubos cónicos de 45ml con 25ml de colagenasa 60U/ml más 200µl de suero en agitación constante a 37° C durante 30min, esto para que la colagenasa degrade la matriz extracelular y las uniones intercelulares que mantienen unidas entre sí las células de la lamina propia. Mientras transcurrieron los 30 minutos, la suspensión de células epiteliales en EDTA-RPMI 0.5mM que estaban en las cajas de Petri se pasaron a tubos cónicos de 45ml y se dejaron en hielo. Concluido el tiempo de agitación de los intestinos delgado y grueso con colagenasa 60U/ml, los intestinos delgados se desecharon, mientras que los intestinos gruesos se envolvieron en organza y con ayuda de unas pinzas se apretaron los intestinos, logrando así desprender la mayor cantidad de células de la lámina propia, esta suspensión celular se puso en tubos cónicos de 45ml y después se filtraron todos los tubos con organza y se centrifugaron a 3000 rpm durante 10 minutos a 4° C, cumplidos los 10 minutos de centrifugación se desechó el sobrenadante de todos los tubos y a las pastillas se les adicionó 200µl de suero y 8ml de medio RPMI, se resuspendieron con pipetas Pasteur y nuevamente se filtraron los tubos, pero ahora en organza doble, excepto los tubos con células intraepiteliales y de lámina propia obtenidas a partir de los intestinos gruesos que solo se filtraron en organza sencilla, posteriormente se centrifugaron todos los tubos a 3000 rpm durante 10 minutos a 4° C, al terminar de centrifugarse los tubos, se desecharon todos los sobrenadantes y a las pastillas se les agregó 200µl de suero, se llevaron a 4ml de percoll al 40% y se resuspendieron, a continuación la suspensión celular en percoll al 40% de cada tubo se estratificó en un tubo cónico de 15ml con 4ml de percoll al 70% (lo mismo para todos los tubos) y se centrifugó a 2000 rpm durante 25 minutos a 4° C, el gradiente de percoll al centrifugarse formó un anillo en el cual se encuentran los linfocitos intraepiteliales y de la lámina propia de intestino delgado y grueso. El anillo de cada tubo se recuperó con una pipeta Pasteur y cada anillo se colocó en un

tubo cónico de 15ml, al cual se le agrego 200µl de suero y 5ml de medio RPMI (lo mismo para todos los tubos), después se centrifugaron los tubos por ultima vez a 1500 rpm durante 10 minutos a 4° C, al concluirse los 10 minutos se desecho el sobrenadante de todos los tubos y a cada pastilla se le adicionaron 200µl de suero y se llevo a 1ml de medio RPMI, por último se contó el número de linfocitos de cada tubo en una cámara de Neubauer, esto para determinar el número de linfocitos que se colocaron en cada pozo de la placa para ELISPOT.

4.- ENSAYO INMUNOENZIMATICO anti-Cry1Ac.

Se recubrieron placas de 96 pozos (Metrix) con 100µl de la protoxina Cry1Ac (1µg/ml) en amortiguador de carbonatos-bicarbonatos pH 9.6. Las placas se incubaron 24hr a 4° C; se lavaron tres veces con PBS + tween 20 al 0.05% (PBS-T) pH 7.4. El bloqueo de los sitios reactivos se realizó con 100µl de leche descremada (Sveltys) al 6% en PBS-T durante 2hr, posteriormente se lavaron 3 veces con PBS-T, a continuación se adicionaron 100µl de líquidos intestinales por pozo (todas las muestras se trabajaron por duplicado). Las placas se incubaron durante toda la noche a 4° C, posteriormente se lavaron 3 veces con PBS-T para colocarles el conjugado anti-inmunoglobulina de ratón marcado con peroxidasa IgA, IgG, IgM e IgE y se dejaron incubar durante 2hr los anticuerpos se diluyeron con PBS (IgA 1:800, IgG 1:1600, IgM 1:1200 e IgE 1:1000), después las placas se lavaron 3 veces con PBS-T y la reacción enzimática se realizó con solución de sustrato para ELISA (0.5mg/ml de o-feniléndiamina, 0.01% H₂O₂ en amortiguador de citratos-fosfatos 0.05M pH 5.2) durante 30min en la oscuridad. La reacción se detuvo con H₂SO₄ 2.5N y se midió la Absorbancia a 492nm en el lector de ELISA Bio-Rad M-450.

Análisis estadístico

El análisis de significancia estadística entre los niveles de anticuerpos en los grupos experimentales se determinó con un Análisis de Varianza (ANOVA) (P<0.05), seguido de una comparación múltiple de medias (prueba de Tukey) (P<0.05).

5.- ENSAYO INMUNOENZIMATICO DIRECTO (inmunoglobulinas totales)

Se recubrieron placas de 96 pozos (Metrix) con 100µl de líquidos intestinales por pozo (todas las muestras se trabajaron por duplicado). Las placas se incubaron durante toda la noche a 4º C, se lavaron tres veces con PBS-T. El bloqueo de los sitios reactivos se realizó con 100µl de leche descremada (Sveltys) al 6% en PBS-T durante 2hr, se lavaron 3 veces con PBS-T para colocarles el conjugado anti-inmunoglobulina de ratón marcado con peroxidasa IgA, IgG, IgM e IgE diluidos en PBS 1:500 y se dejaron incubar durante 2hr, después las placas se lavaron 3 veces con PBS-T y la reacción enzimática se realizó con solución de sustrato para ELISA (0.5mg/ml de o-feniléndiamina, 0.01% H₂O₂ en amortiguador de citratos-fosfatos 0.05M pH 5.2) durante 30min en la oscuridad. La reacción se detuvo con H₂SO₄ 2.5N y se midió la Absorbancia a 492nm en el lector de ELISA Bio-Rad M-450.

Análisis estadístico

El análisis de significancia estadística entre los niveles de anticuerpos en los grupos experimentales se determinó con un Análisis de Varianza (ANOVA) (P<0.05), seguido de una comparación múltiple de medias (prueba de Tukey) (P<0.05).

6.- INMUNOHISTOQUIMICA

Se desparafinaron los tejidos con xilol I y xilol II durante 1min cada uno, después se hidrato el tejido con alcoholes decrecientes (alcohol al 100%, 90% y 70%) durante un minuto cada uno, agua destilada y PBS durante 3min cada uno, posteriormente se inactivo la peroxidasa endógena con 100µl de la solución de metanol (3.6ml) y H₂O₂ (400µl) por laminilla en una cámara húmeda durante 15min, se bloqueo con albumina al 3% en PBS 1X durante una hora, se lavo 3 veces con PBS 1X y se agregaron los anticuerpos monoclonales anti inmunoglobulinas IgA, IgG, IgM e IgE diluidos 1:200 en PBS 1X durante 3hr a temperatura ambiente, se lavo perfectamente con PBS 1X y se agrego 100µl del sustrato: 2mg diaminobencidina (DAB) en 10 ml de PBS 1X con 50µl de peróxido de hidrógeno (33µl de peróxido de hidrógeno al 30% + 967ml de H₂O) por laminilla durante 30 minutos, nuevamente

se lavo con PBS y se hizo la contra tinción con hematoxilina de Mayer por un minuto y se deshidrataron los tejidos con alcoholes crecientes (alcohol al 70%, 90% y 100%), por un minuto cada uno, por último se montaron en resina sintética y se observaron los cortes al microscopio.

7.-Prueba de ELISPOT.

Se utilizaron placas de 24 pozos, donde se colocó papel de nitrocelulosa en cada pozo, consecutivamente los 24 pozos se recubrieron con la protoxina Cry 1Ac disuelta en PBS (10mg/500ml por pozo), posteriormente se incubaron las placas por 24hr a 4°C, después se lavaron de dos a cinco veces con PBS-T (0.05%) y tres veces más con PBS, después se bloqueó con 500µl por pozo con leche descremada al 6% durante dos horas a temperatura ambiente, terminado este tiempo se lavó perfectamente para eliminar el PBS-T de la solución bloqueadora, se lavó una vez con PBS-T (0.05%) y cinco veces con PBS, después se agregaron 500,000 linfocitos por pozo y se incubó a 37°C con CO₂ 5% por tres horas, transcurrido el tiempo se lavo seis veces con PBS-T, posteriormente se agregaron los anticuerpos monoclonales anti inmunoglobulinas conjugados a peroxidasa (1:1000) anti IgA, IgG, IgM e IgE y se incubaron por dos horas a temperatura ambiente, a continuación se lavó con PBS-T y se reveló con solución de 4-cloronaftol y por último se lavó una vez con PBS-T, tres veces con PBS y ocho veces con agua destilada

Por último el papel de nitrocelulosa de cada pozo se observo en el microscopio estereoscópico, para contar el número de células productoras de anticuerpo anti-Cry1Ac de linfocitos aislados de intestinos delgado y grueso.

ESTRATEGIA METODOLOGICA

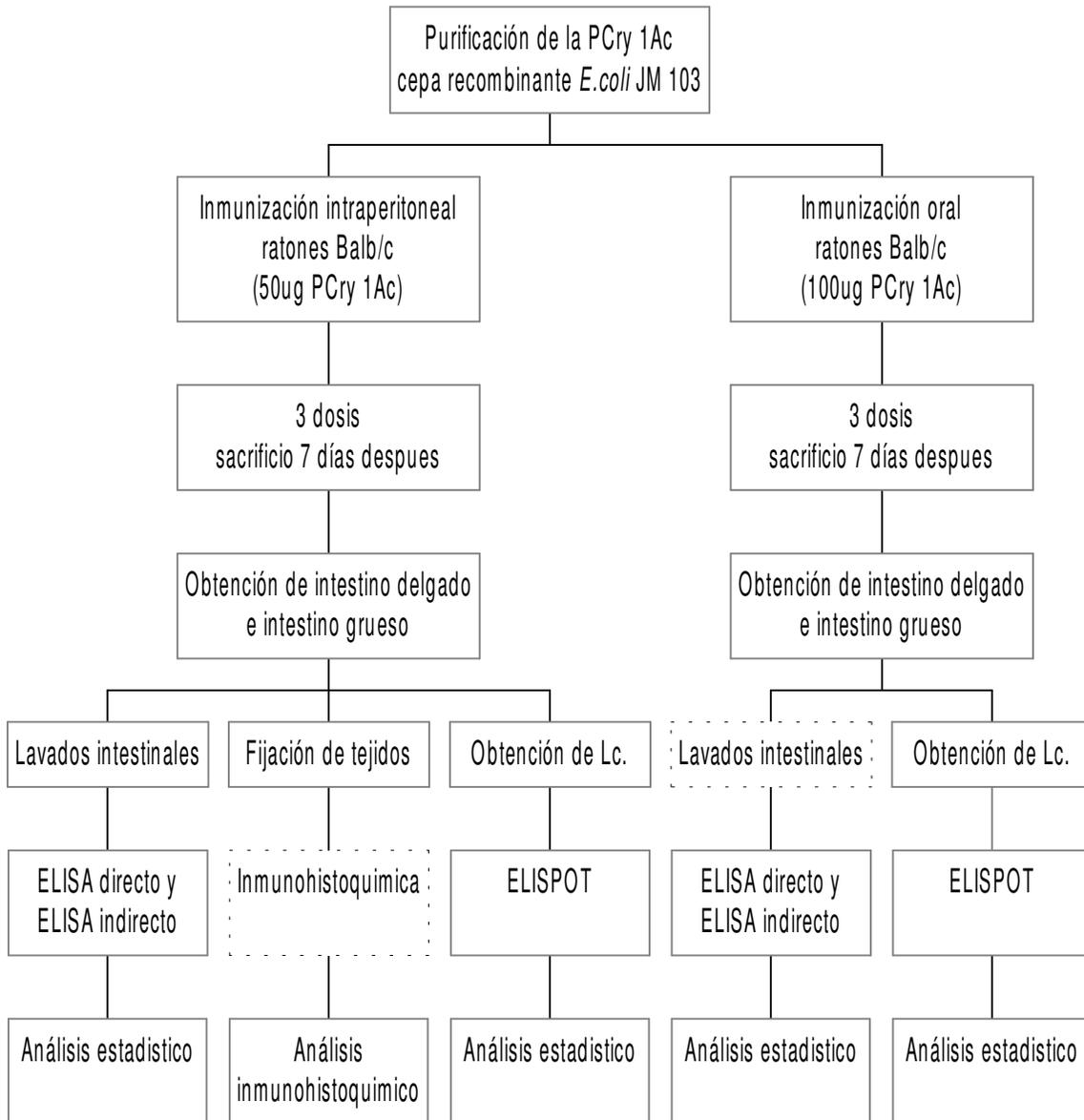


Fig.2. Estrategia metodologica para realizar las pruebas inmunológicas: ELISA directo e indirecto, ELISPOT e Inmunohistoquímica.

RESULTADOS

Obtención de Cry1Ac.

De un litro de cultivo de *E.coli* JM103 obtuvimos un rendimiento de 50mg de la pCry1Ac. El peso molecular de la pCry1Ac purificada (133 KDa) coincidió con el esperado (Adang *et al.*, 1985) (Fig.4).

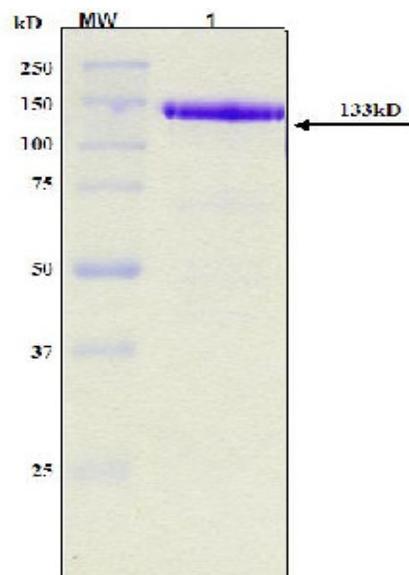


Fig.3. Electroforesis SDS-PAGE de la pCry1Ac purificada. Carril MW; marcadores de peso molecular. Carril 1; la pCry1Ac (4 μ g).

Efecto de la administración Intraperitoneal y Oral de la pCry1Ac en la respuesta de anticuerpos anti Cry1Ac.

Respuesta de anticuerpos anti Cry1Ac en líquidos de intestino delgado y grueso.

La inmunización Intraperitoneal con la pCry1Ac incremento la respuesta de anticuerpos IgG anti Cry1Ac con respecto al grupo no inmunizado ($P < 0.05$), pero no indujo respuestas significativas IgA, IgM e IgE anti Cry1Ac ($P > 0.05$) (Fig.4).

La inmunización Oral con la pCry1Ac no indujo respuestas IgA, IgG, IgM e IgE anti Cry1Ac ($P > 0.05$) (Fig.4).

Efecto de la administración Intraperitoneal y Oral de la pCry1Ac en niveles de inmunoglobulinas totales.

Para evaluar si la inmunización i.p y oral con la pCry1Ac modificaba los niveles de inmunoglobulinas totales intestinales, se determinaron por ELISA los niveles de anticuerpo de los distintos isotipos totales en lavados intestinales de ratones controles e inmunizados y se encontró gran variación en los niveles totales de absorbancia de los isotipos IgA, IgG, IgM e IgE tanto en lavados intestinales de ratones controles como inmunizados.

La inmunización no parece modificar los niveles de absorbancia IgA, IgG, IgM e IgE en intestino delgado, mientras que en intestino grueso los niveles de IgA e IgE de controles e inmunizados son similares. Se observa una tendencia no significativa (por la gran variación), de que los niveles de IgG e IgM de los ratones inmunizados sea mayor a la de los controles. (Fig.5).

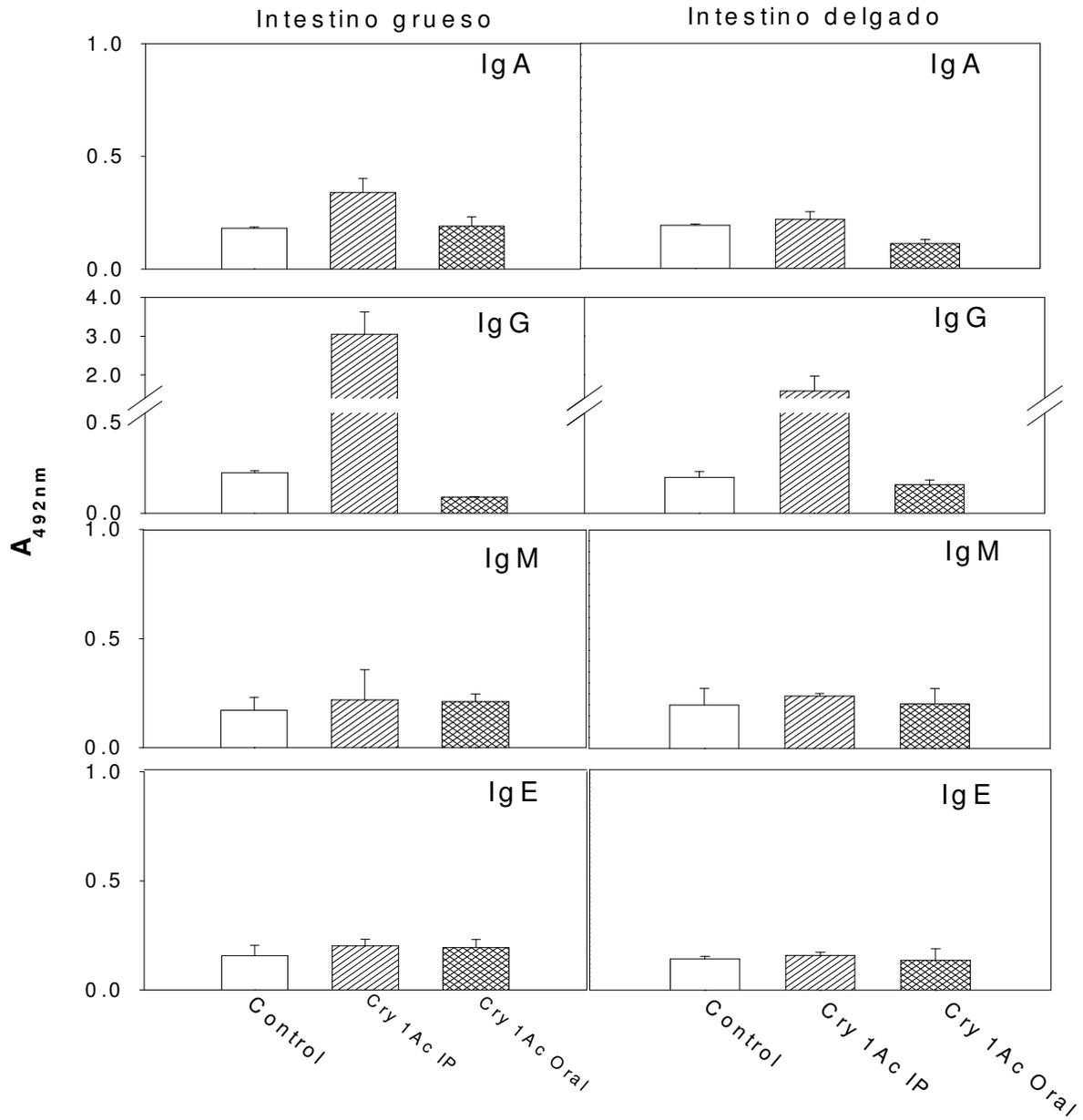


Fig.4. Respuesta de anticuerpos anti-Cry1Ac de clases IgA, IgG, IgM e IgE en liquido de intestino grueso y delgado. Grupos de 4 ratones machos Balb/c fueron inmunizados por la ruta intraperitoneal (i.p) con 50 μ g de la protoxina Cry1Ac y grupos de 4 ratones fueron inmunizados por la ruta oral con 100 μ g de la protoxina Cry1Ac. Los niveles de anticuerpos fueron determinados por ELISA y sus valores se expresan como lecturas de Absorbacia a 492nm (A_{492})

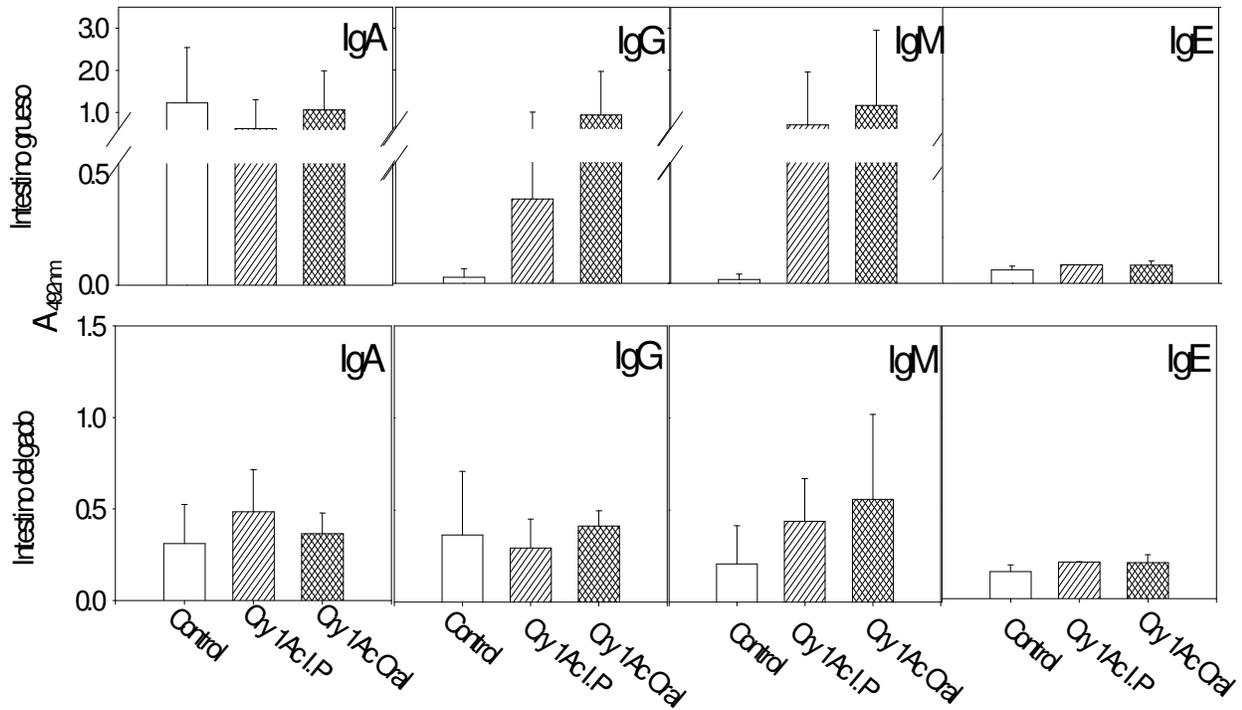


Fig.5. Inmunoglobulinas totales de clases IgA, IgG, IgM e IgE en liquido de intestino grueso y delgado. Grupos de 4 ratones machos Balb/c fueron inmunizados por la ruta intraperitoneal con 50µg de la protoxina Cry 1Ac y grupos de 4 ratones fueron inmunizados por la ruta oral con 100µg de la protoxina Cry 1Ac. Los niveles de anticuerpos fueron determinados por ELISA y sus valores se expresan como lecturas de A₄₉₂

Efecto de la administración Intraperitoneal y Oral de la pCry1Ac en la respuesta de las células productoras de anticuerpo anti Cry1Ac.

Respuestas de las células productoras de anticuerpo en epitelio de intestino delgado.

La inmunización intraperitoneal con la pCry1Ac indujo respuestas de las células productoras de anticuerpo IgA, IgG, IgM e IgE anti Cry 1Ac. El número de células productoras de IgM e IgE es más alto en comparación a los isotipos IgA e IgG anti Cry1Ac (Fig.7). Los spots de las células productoras de IgG anti Cry1Ac son más grandes e intensos que los spots de las células productoras de IgA, IgM e IgE anti Cry 1Ac. En contraste los spots de IgE fueron los más pequeños y menos intensos registrados en todos los compartimentos intestinales.

La inmunización Oral con la pCry1Ac no indujo respuestas de las células productoras de anticuerpo anti Cry1Ac IgA, IgG, IgM e IgE

Respuestas de las células productoras de anticuerpo en lámina propia de intestino delgado.

La lámina propia de intestino delgado fue el compartimento intestinal donde se indujeron las respuestas más altas de células productoras de IgA, IgG, IgM e IgE por la inmunización intraperitoneal con la pCry1Ac (Fig.7). El número de células productoras de anticuerpo de los distintos isotipos fue similar aunque los spots de las células productoras de IgG anti Cry1Ac fueron más grandes e intensos que los spots de las células productoras de IgA, IgM e IgE anti Cry1Ac.

La inmunización Oral con la pCry1Ac no indujo respuestas de las células productoras de anticuerpo anti Cry1Ac IgA, IgG, IgM e IgE

Respuestas de las células productoras de anticuerpo en epitelio de intestino grueso.

La inmunización intraperitoneal con la pCry1Ac indujo respuestas de las células productoras de anticuerpo IgA, IgG, IgM e IgE anti Cry1Ac (Fig.7). en este sitio se registro un número similar de células productoras de anticuerpo de los distintos isotipos pero los spots de las células productoras de IgG anti Cry1Ac fueron más grandes e intensos que los spots de las células productoras de IgA, IgM e IgE anti Cry1Ac.

La inmunización Oral con la pCry1Ac no indujo respuestas de las células productoras de anticuerpo anti Cry1Ac IgA, IgG, IgM e IgE.

Respuestas de las células productoras de anticuerpo en lámina propia de intestino grueso.

La inmunización intraperitoneal con la pCry1Ac indujo la respuesta más baja de las células productoras de IgA, IgG, IgM e IgE anti Cry1Ac (Fig.7). El número de células productoras de anticuerpo de los distintos isotipos fue similar aunque los spots de las células productoras de IgG anti Cry1Ac (Fig.6) son más grandes e intensos que los spots de las células productoras de IgA (Fig.6), IgM (Fig.6), e IgE (Fig.6) anti Cry1Ac.

La inmunización Oral con la pCry1Ac no indujo respuestas de las células productoras de anticuerpo anti Cry1Ac IgA, IgG, IgM e IgE.

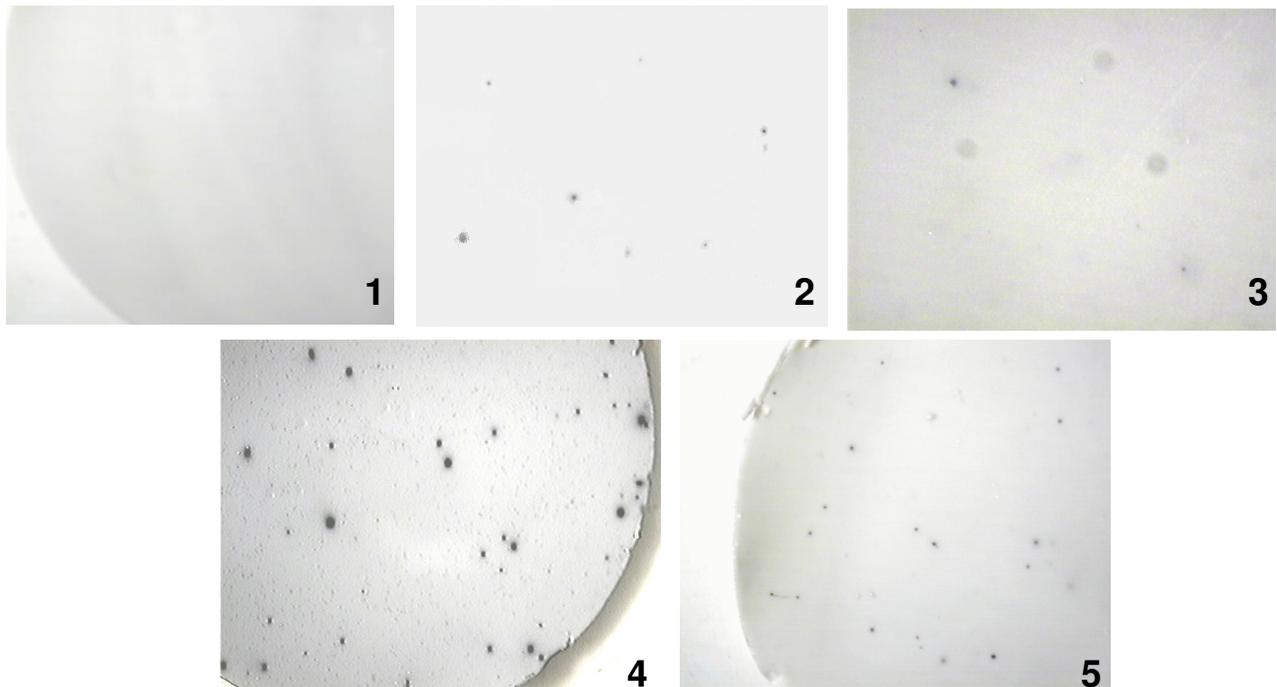


Fig.6. Spots de células productoras de anticuerpo en lámina propia de intestino grueso.1) raton control IgG 20x, 2,3,4,5) ratones inmunizados por vía i.p con la pCry1Ac. 2) IgM 20x, 3) IgE 60x, 4) IgG 20x, 5) IgA 20x.

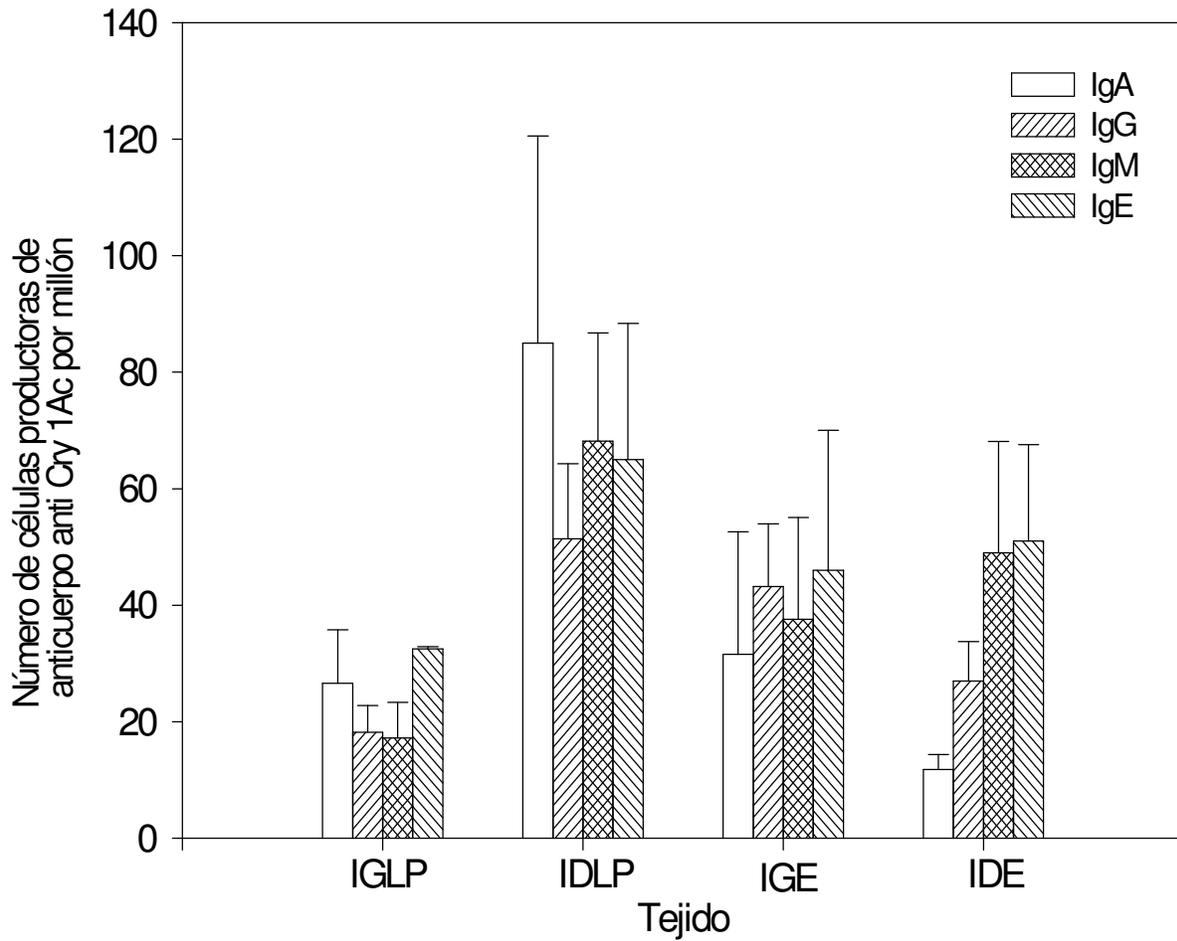


Fig.7. Respuesta de las células productoras de anticuerpo IgA, IgG, IgM e IgE anti Cry1Ac en linfocitos aislados de intestino delgado y grueso en ratones Balb/c después de tres inmunizaciones intraperitoneales con 50µg de la protoxina Cry1Ac. El número de células productoras de anticuerpo anti Cry1Ac fue determinado por ELISPOT.

Detección de linfocitos B en ratones control e inmunizados por la vía i.p con la pCry1Ac

Detección de linfocitos B en epitelio de intestino delgado y grueso.

En el compartimento intraepitelial de ambos intestinos se detectaron bajas proporciones de linfocitos (Lc) B. En ratones control se detectó un bajo número de Lc B IgG (Fig.11b), pero que fue mayor al de IgA (Fig.11a) seguido del de IgM (Fig.8b y 12a) y las más bajas proporciones fueron las de IgE (Fig.10 y 12b).

En ratones inmunizados con la pCry1Ac detectamos un ligero incremento de Lc B IgG (Fig.9), pero la inmunización no parece modificar las proporciones de Lc B IgA (Fig.8a), IgM (Fig.8b) e IgE (Fig.10).

Detección de linfocitos B en lámina propia de intestino delgado.

En este compartimento se detectó el mayor porcentaje de linfocitos B IgA, IgG, IgM e IgE. En ratones control se detectaron altas proporciones de Lc B IgG (Fig.9) mayores a las proporciones de Lc B IgA (Fig.8a) seguidas de las proporciones de Lc B IgM (Fig.8b) y las proporciones de Lc B IgE fueron las más bajas (Fig.10).

En ratones inmunizados se observó un incremento de Lc B IgG (Fig.9), pero al igual que en el epitelio de ambos intestinos la inmunización no parece modificar las proporciones de Lc B IgA (Fig.8a), IgM (Fig.8b) e IgE Fig.10).

Detección de linfocitos B en lámina propia de intestino grueso.

Se detectaron altas proporciones de linfocitos B de los cuatro isotipos. En ratones control se detectaron altas proporciones de Lc B IgG (Fig.11b) superiores a las proporciones de Lc B IgA (Fig.11a) seguidas de las proporciones de Lc B IgM (Fig.12a) y las proporciones de Lc B IgE fueron las más bajas (Fig.12b).

En ratones inmunizados se detectó un incremento de Lc B IgG (Fig.11b) y al igual que en el epitelio intestinal y en lámina propia de intestino delgado en este compartimento la inmunización no parece modificar los porcentajes de Lc B IgA (Fig.11a), IgM (Fig.12a) e IgE (Fig.12b).

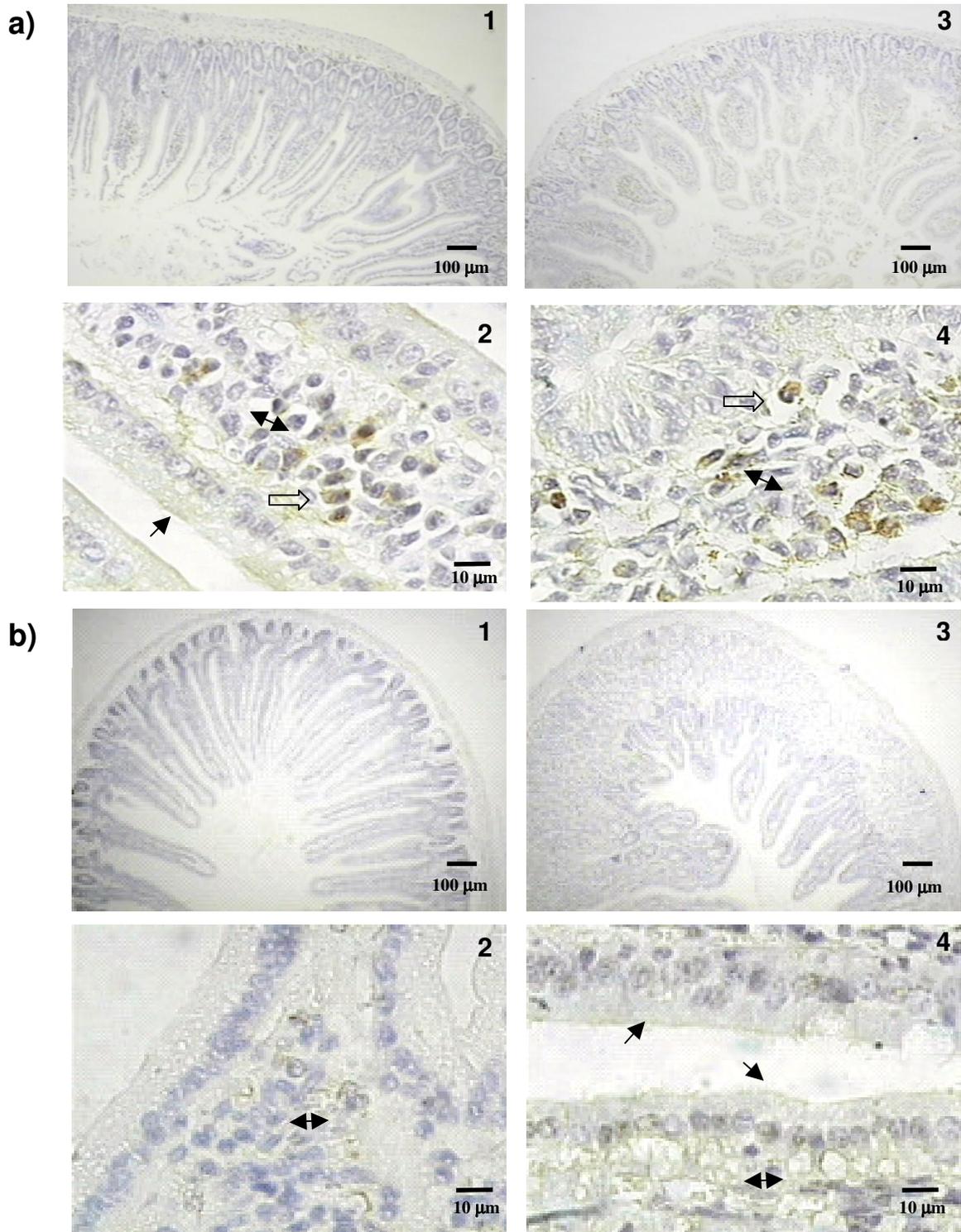


Fig.8. Efecto de la inmunización con la pCry1Ac en las proporciones de linfocitos B IgA e IgM en intestino delgado de ratones Balb/c. El procedimiento inmunohistoquímico es descrito en métodos. a)Detección de IgA; b)Detección de IgM. 1, 2)Inmunización intraperitoneal con la pCry 1Ac, 3,4) Controles. La flecha indica reacción positiva en epitelio, la flecha doble indica reacción positiva en lámina propia y la flecha de bloque derecha indica APC.

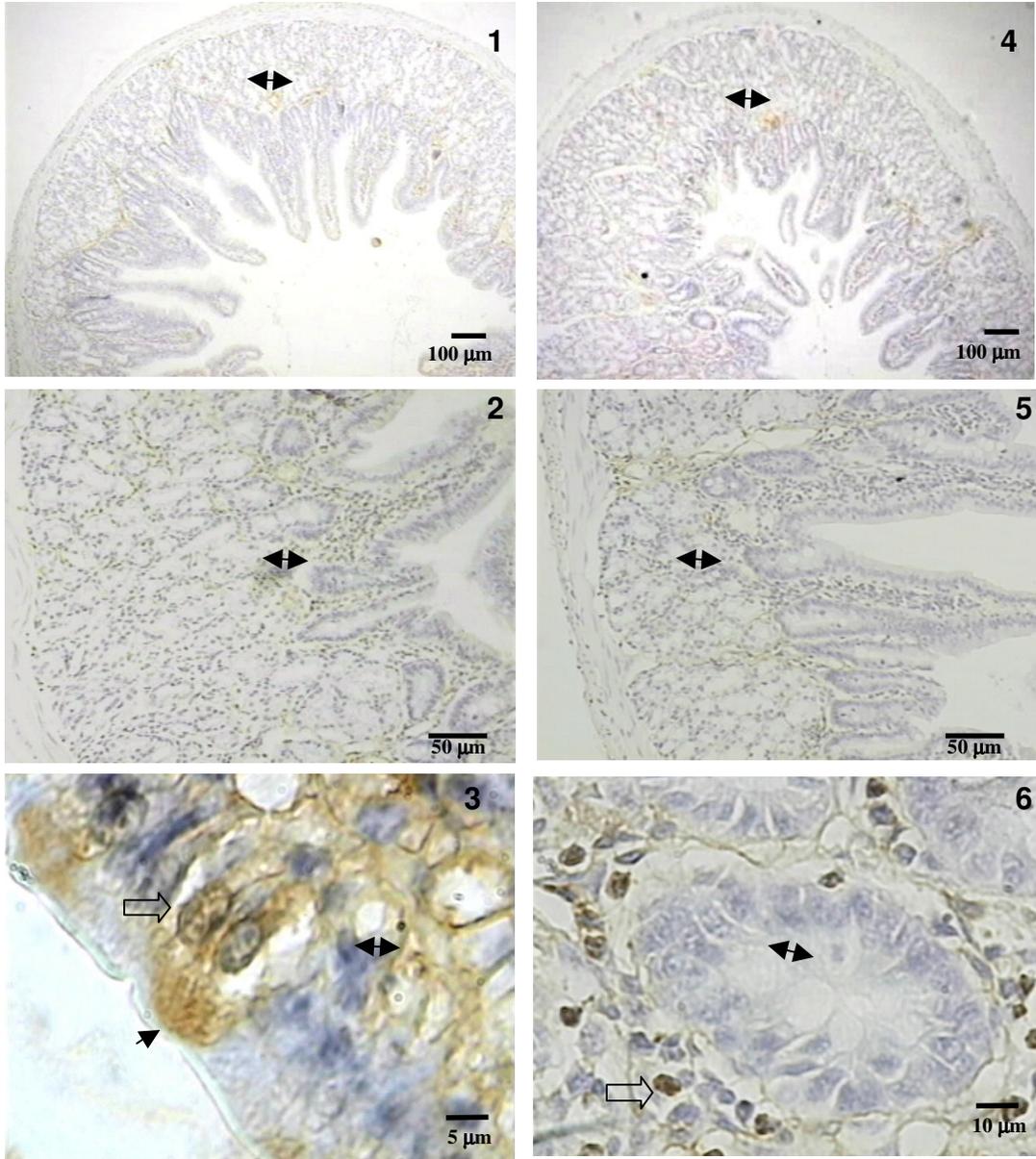


Fig.9. Efecto de la inmunización con la pCry1Ac en las proporciones de linfocitos B IgG en intestino delgado de ratones Balb/c. El procedimiento inmunohistoquímico es descrito en métodos. 1, 2, 3)Inmunización intraperitoneal con la pCry1Ac, 4, 5, 6)Controles. La flecha indica reacción positiva en epitelio, la flecha doble indica reacción positiva en lámina propia y la flecha de bloque derecha indica APC.

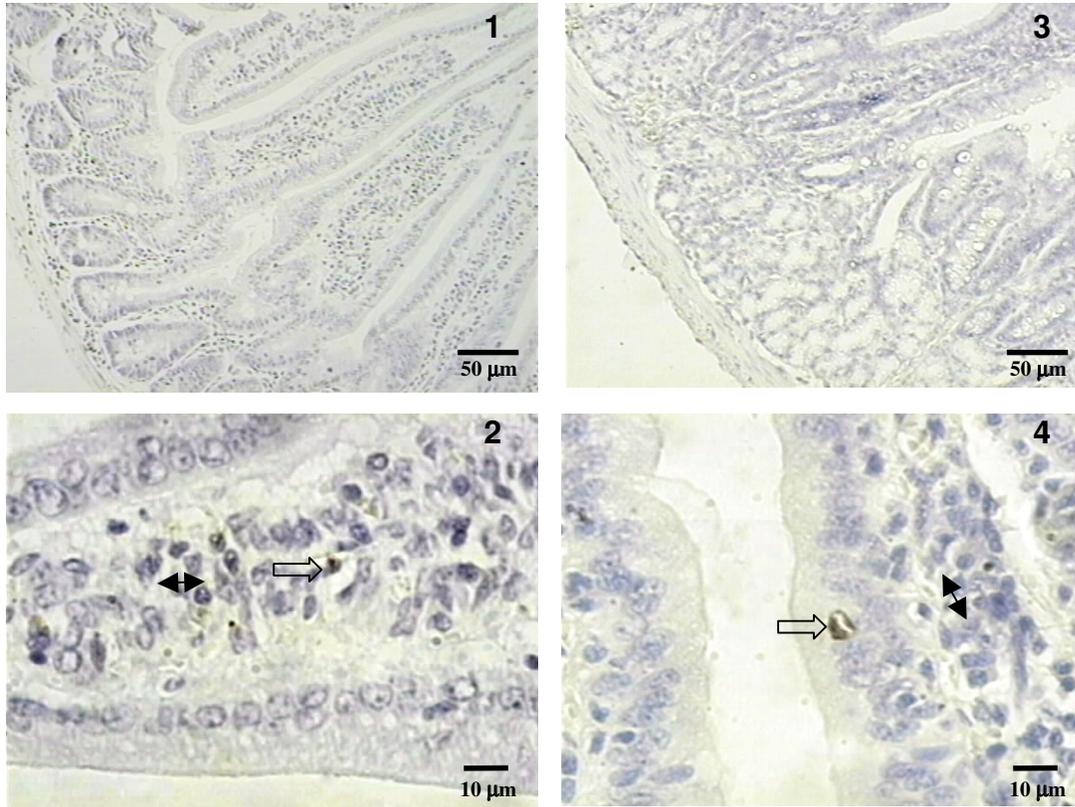


Fig.10. Efecto de la inmunización con la pCry1Ac en las proporciones de linfocitos B IgE en intestino delgado de ratones Balb/c. El procedimiento inmunohistoquímico es descrito en métodos. 1, 2,)Inmunización intraperitoneal con la pCry1Ac, 3, 4)Controles. La flecha indica reacción positiva en epitelio, la flecha doble indica reacción positiva en lámina propia y la flecha de bloque derecha indica APC.

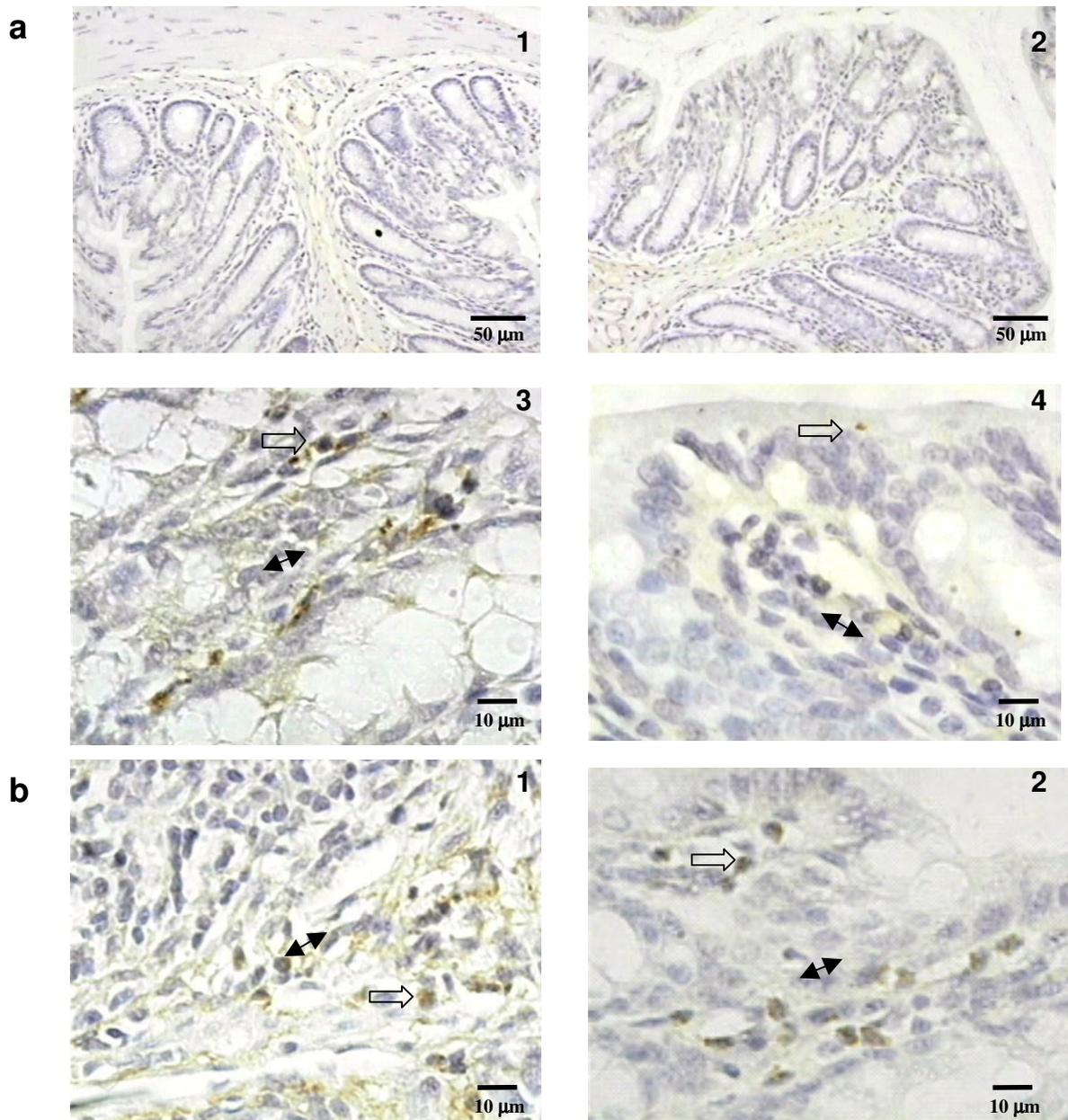


Fig.11. Efecto de la inmunización con la pCry1Ac en las proporciones de linfocitos B IgA e IgG en intestino grueso de ratones Balb/c. El procedimiento inmunohistoquímico es descrito en métodos. a)Detección de IgA; b)Detección de IgG. 1, 3)Inmunización intraperitoneal con la pCry1Ac, 2,4)Controles. La flecha indica reacción positiva en epitelio, la flecha doble indica reacción positiva en lámina propia y la flecha de bloque derecha indica APC.

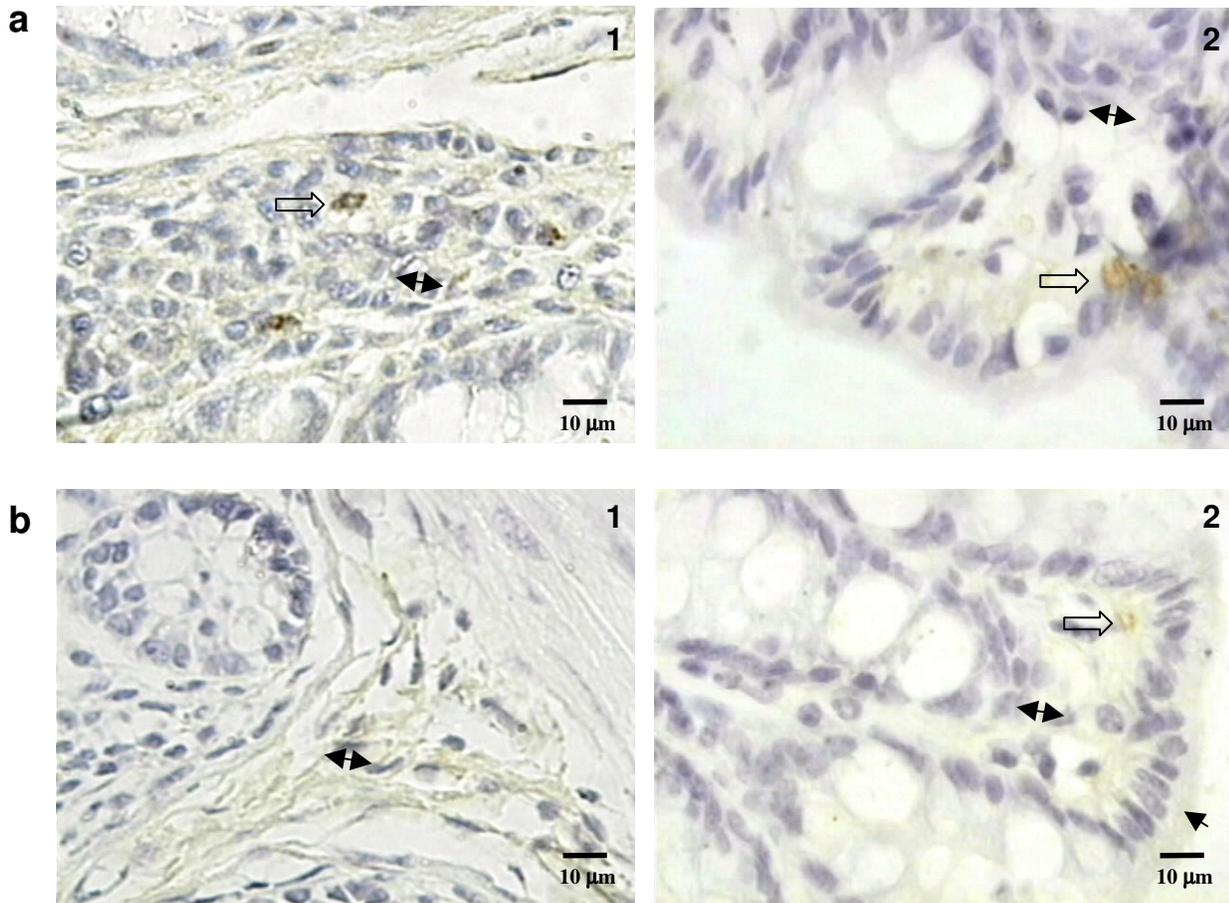


Fig.12. Efecto de la inmunización con la pCry1Ac en las proporciones de linfocitos B IgM e IgE en intestino grueso de ratones Balb/c. El procedimiento inmunohistoquímico es descrito en métodos. a)Detección de IgM; b)Detección de IgE. 1)Inmunización intraperitoneal con la pCry1Ac, 2)Controles. La flecha indica reacción positiva en epitelio, la flecha doble indica reacción positiva en lámina propia y la flecha de bloque derecha indica APC.

DISCUSION

Los resultados del presente trabajo demuestran que al inmunizar por la ruta i.p con la pCry1Ac se inducen respuestas de las células productoras de anticuerpo (APC) IgA, IgG, IgM e IgE anti Cry1Ac en epitelio y lamina propia de intestino delgado y grueso (Fig.7), detectándose altos niveles del isótopo IgG anti Cry1Ac. (Fig.4).

Generalmente la ruta de inmunización sistémica es inefectiva para inducir respuestas inmunes en mucosas, sin embargo en este trabajo se corrobora que al inmunizar por vía i.p con la pCry1Ac en ratones se estimula la producción de IgG específica en lavados de intestino (Fig.4). Esto corresponde con estudios en donde la inmunización parenteral en ratones con rotavirus y con sus partículas virales induce la formación de células productoras de IgA e IgG en intestino delgado y niveles elevados en heces de IgG (Yuan *et al.*, 1996). Con toxoide tetánico administrado parenteralmente en ratones hembras Balb/c fue inducido un gran aumento en los niveles de IgG en las secreciones y presencia de células productoras de anticuerpos IgG e IgA antitetánico en intestinos delgado y grueso, glándulas salivales y vagina. (Decroix *et al.*, 2001)

Algunos autores consideran al peritoneo como un tercer compartimento del sistema inmune. De hecho se ha comprobado que el mismo constituye un sitio muy importante para inducir altas respuestas inmunes tanto sistémicas como mucosas (Garosi *et al.*, 2001; O'Hagan, 2001; Watanobe, 2000). Por lo tanto esta ruta de inmunización ofrece ventajas sobre otras rutas, que son más limitadas en su capacidad para inducir respuestas inmunes tanto a nivel sistémico como mucoso.

El peritoneo es una membrana delgada que envuelve las cavidades abdominal y pélvica y cubre la mayoría de las vísceras abdominales. Además de estar compuesto por una capa de mesotelio que se encuentra reforzada por una delgada capa de tejido conectivo. En el peritoneo se encuentra además una población apreciable de macrófagos, linfocitos T, B y células cebadas (Balabanian, 2002; Krist, 1995). Se ha demostrado que las células mesoteliales del peritoneo expresan moléculas de adhesión (ICAM-1, ICAM-2 y VCAM-1) que juegan un rol importante en la adhesión y migración de los leucocitos presentes en la cavidad peritoneal. En respuesta a compuestos bacterianos y moléculas inflamatorias, las células del mesotelio del peritoneo secretan IL-1 e IL-6 así como quimiocinas IL-8, MCP-1 y RANTES, las cuales amplifican las señales inflamatorias, e inducen la activación del endotelio, permitiendo la migración de leucocitos a la cavidad peritoneal. Las células del mesotelio también pueden activar a linfocitos T. Estas células presentan antígenos, secretan IL-15 y expresan la molécula CD40 (Balabanian,

2002). Debido a que la cavidad peritoneal drena en el nódulo linfático paratímico, las células B y T activadas en el peritoneo pueden migrar hacia este nódulo y a través de los vasos linfáticos y la sangre, pasar a mucosas y nódulos sistémicos (Biewenga, 1993; Watanabe, 2000). Esto puede explicar como la administración de la pCry1Ac por la ruta i.p genera respuesta inmune en mucosa intestinal. De hecho, se ha demostrado que la mitad de las células plasmáticas presentes en la lámina propia del intestino delgado derivan de las células B-1 peritoneales (Biewenga, 1993). Nuestros resultados sugieren que la mayoría de la IgG anti Cry1Ac detectada en lavados intestinales de ratones inmunizados intraperitonealmente (Fig.4), es producida localmente por células plasmáticas de la lámina propia intestinal. Ya que en este sitio fue donde se detectó por ELISPOT un mayor número de células productoras de anticuerpo específicas de distintos isotipos (Fig.7); Y el análisis en base al tamaño e intensidad de los Spots de las células productoras anticuerpos detectadas, sugiere que las células productoras de IgG inducidas parecen producir mayor cantidad de anticuerpo que las de los otros isotipos (Fig.6). El análisis inmunohistoquímico también apoya la existencia de una mayor proporción de células plasmáticas de distintos isotipos en la lámina propia de ambos intestinos (Fig.8, 9, 10, 11 y 12), así como el incremento de células productoras de IgG (Fig.9 y 11b) inducido por la inmunización con la pCry1Ac. Claro que, si los altos niveles de IgG detectados en lavados intestinales fueran producidos principalmente por las células productoras de anticuerpo de la lámina propia, entonces, debería existir un mecanismo de transporte que aún no ha sido descrito en mucosas intestinales de ratones adultos.

Por otra parte no se ha reportado la presencia de linfocitos B intraepiteliales en intestinos, no obstante nuestros resultados muestran la existencia de éstos (Fig.9, 10 y 11a]. Las células productoras de anticuerpo intraepiteliales podrían secretar el anticuerpo directamente al lumen intestinal. Sin embargo el número de linfocitos B intraepiteliales es muy bajo en relación a la proporción de linfocitos T, que constituye alrededor del 90% de linfocitos intraepiteliales; por lo tanto no se puede descartar la existencia de un mecanismo de transporte de IgG, para explicar la gran cantidad de este isotipo detectada en el lumen intestinal de los ratones inmunizados por la vía i.p con la pCry1Ac.

Nuestros resultados obtenidos empleando la técnica de ELISPOT muestran que en los linfocitos intraepiteliales y de lámina propia de intestino delgado y grueso se inducen respuestas de APC IgA, IgG, IgM e IgE anti-Cry 1Ac en ratones inmunizados con la pCry1Ac por la ruta i.p. (Fig.7). De acuerdo con la bibliografía en las mucosas intestinales el isotipo predominante es IgA (80%), en contraste por la inmunización intraperitoneal con la pCry1Ac encontramos que no

se inducen respuestas predominantes del isotipo IgA en intestino, sino que se encontraron números similares de células productoras de anticuerpos de los distintos isotipos (Fig.7). Aunque es importante mencionar que el tamaño e intensidad de los spots detectados para los distintos isotipos de anticuerpos fue diferente. Los spots de las células productoras de IgG anti Cry1Ac de la lámina propia y epitelio son más grandes e intensos que los spots de las células productoras de IgA, IgM e IgE (Fig.6), lo cual corresponde a una concentración más alta de IgG tal como se detecto por ELISA, en las muestras de lavados intestinales de ratones inmunizados por vía i.p. con la pCry1Ac (Fig.4). Usualmente se considera que la presencia de IgG en las secreciones intestinales es debida a una gran liberación del suero al lumen intestinal vía bilis como la forma normal del catabolismo de la IgG sérica (Benerman *et al.*, 1998) y que la IgG de pulmones, mucosa nasal, saco gingival y endometrio es derivada del suero por translocación a través del epitelio debido a una probable irritación local o proceso inflamatorio que produce la liberación de proteínas hacia la superficies mucosas (Brandtzaeg *et al.*, 1995; Marlojein *et al.*, 2001; Bouvet, 2002). Nosotros descartamos dichas posibilidades pues aunque por ELISA encontramos altos niveles de IgG no encontramos altos niveles de IgE (Fig.4) y por ELISPOT encontramos células productoras de anticuerpo IgG e IgE (Fig.7), sin embargo los spots de las células productoras de IgE son más pequeños y difusos que los spots de las células productoras de IgG (Fig.6) lo que corresponde a una baja concentración de IgE, además no se detecto daño en el tejido por lo que se descarta la posibilidad de que la IgG provenga del suero debido a un proceso inflamatorio, mas bien los altos niveles de IgG intestinales pueden deberse a que la pCry1Ac sea captada y presentada por la gran cantidad de macrófagos que residen en el peritoneo, que migran hacia la zona intestinal más eficientemente por su cercanía. El patrón de citocinas se puede modificar por el tipo de células que presenta al antígeno y esto puede determinar el tipo de respuesta Th1 o Th2 que se pueda dar. Las células IgM+B se diferencian a células plasmáticas IgA+B *in situ* en la lámina propia, con ayuda de las células dendríticas y estromales. Los macrófagos pueden por medio de la molécula CD1 activar a las células CD4 NK1 que producen cantidades importantes de IL-4 que dirige la respuesta a la producción de IgG e IgE en respuestas humorales. La pCry1Ac al igual que otros antígenos como Rotavirus, *Entamoeba histolítica* y *Naegleria fowleri* también inducen aumento de IgG secretada y de células IgG+ en ambos intestinos. En el caso de la inmunización con la pCry1Ac se detecta un aumento en la producción de células plasmáticas secretoras de IgG y aunque para IgE no se detecta aumento, existen células plasmáticas secretoras de IgE. Cry podrá modificar el patrón de citocinas y quimiocinas que normalmente induce la secreción preferencial de IgA en las

mucosas. En estudios del laboratorio sobre las citocinas inducidas por la administración i.p con la pCry1Ac en linfocitos intraepiteliales y de lámina propia se ha encontrado que se produce activación de los linfocitos *in vitro* y después de tres inmunizaciones por el aumento de CD69 y un aumento en la expresión de IL-2, así mismo se observa aumento en la expresión de IL-4 en lámina propia de ambos intestinos después de una administración y a tres inmunizaciones un aumento de IL-10. La presencia de IL-4 en lámina propia inducida por la pCry1Ac explica la presencia de IgG, pues esta citocina dirige su disparo y la presencia de IL-10 después de tres dosis explicaría la homeostasis del patrón de citocinas inducida inicialmente por la pCry1Ac.

El encontrar linfocitos B intraepiteliales en intestino delgado (Fig.9 y 10) y grueso (Fig.11a) es un hallazgo relevante pues aun no está reportado y además podría ayudar a explicar la presencia de IgG en las secreciones intestinales sin requerir un mecanismo de transporte, ya que el anticuerpo secretado por los linfocitos B intraepiteliales podría ser liberado directamente al lumen intestinal. La existencia de células plasmáticas en lámina propia de intestinos está bien establecida. De acuerdo a la bibliografía, las células B que se encuentran en la lámina propia son células plasmáticas IgA+ (80%), aunque también hay presencia de IgG e IgM. Sin embargo de acuerdo con nuestros datos de inmunohistoquímica no se aprecia que sea tan marcado el predominio de células positivas de IgA en relación a los otros isotipos de anticuerpo, ni en cortes de ratones controles ni en los inmunizados. En relación al análisis inmunohistoquímico de las células que contienen IgG en intestinos, encontramos un marcado incremento en la expresión en los intestinos de los animales inmunizados (Fig.9 y 11b) en relación a los controles (Fig.9 y 11b) (evaluado en base al número de células con reacción positiva y a la intensidad de reacción detectada). La mayoría de las células positivas para IgG se localizan en la lámina propia de ambos intestinos (Fig.9 y 11). Además interesantemente encontramos que algunas células epiteliales muestran reacción positiva para IgG (Fig.9), lo que permite inferir que puede existir un mecanismo de transporte de esta inmunoglobulina hacia el lumen intestinal.

Actualmente está descrito un modelo para el mecanismo de transporte de IgG a través de monocapas de una línea celular de epitelio intestinal humano, este mecanismo de transporte bidireccional y específico para el receptor Fc y dependiente de la acidificación endosomal. A diferencia del componente secretor, que es la proteína transportadora de IgA e IgM polimérica, el receptor para IgG es reciclado después de la disociación del complejo ligando-receptor en el polo apical de la célula (Dickinson *et al.*, 1999). Este proceso explicaría la presencia de esta inmunoglobulina en las secreciones intestinales en adulto pues está bien descrito que el

receptor Fc, FcRn, relacionado a la clase MHC-I es el mediador en el transporte materno de IgG al neonato en roedores y al transporte trasplacental de IgG materna por transcitosis en humano (Simister y Rees, 1985; Abrahamson y Rodewald, 1981). Recientemente se ha identificado el receptor FcRn en células epiteliales intestinales y epiteliales de pulmón en humano adulto (Kwan, Malik, 2003). También se ha detectado en Monocapas de células epiteliales de pulmón de roedor, primate no humano y humano (Spiekerman y col. 2002). Estas evidencias en conjunto con nuestros resultados que demuestran la presencia de células productoras de anticuerpo IgG en intestinos de ratones inmunizados intraperitonealmente con la pCry1Ac, así como nuestros resultados histológicos que muestran células epiteliales que presentan reacción positiva para IgG, son antecedentes para sugerir la existencia de un mecanismo de transporte de IgG hacia el lumen intestinal que podría estar mediado por el receptor Fc expresado en el epitelio intestinal de los ratones adultos. Para estudios posteriores consideramos importante estudiar si el receptor Fc esta presente en células epiteliales intestinales y si su expresión se incrementa en los ratones inmunizados intraperitonealmente con la pCry1Ac .

En este trabajo nos interesó estudiar si utilizando una ruta de inmunización mucosa (oral) también se inducían respuestas predominantes de IgG al inmunizar con la pCry1Ac, como ocurría al inmunizar por la ruta intraperitoneal , o si por el contrario encontraríamos respuestas de otros isotipos. Sin embargo al inmunizar con la pCry1Ac por la ruta oral encontramos que no se indujeron respuestas significativas de células productoras de IgA, IgG, IgM e IgE anti Cry1Ac ni en epitelio ni en lámina propia de intestino delgado y grueso. Existen evidencias que indican que la administración de determinados antígenos por vías mucosas puede estimular cualquier tipo de respuesta inmune: S-IgA, anticuerpos IgG séricos neutralizantes contra toxinas y virus, así como respuesta mediada por células, que comprende proliferación de linfocitos, producción de citocinas y actividad de linfocitos T CD8+ citotóxicos (Levine, 2003). Además en numerosos estudios han demostrado que las inmunizaciones por vías mucosas dan como resultado la estimulación de respuesta inmune tanto sistémica como mucosa (Nugent, 1998). La ausencia de respuesta al inmunizar por ruta oral con la pCry1Ac (Fig.4) y los altos niveles de IgG producidos por la Inmunización i.p con el mismo antígeno confirman que la habilidad de inducir una respuesta inmune sistémica y secretora esta determinada por una serie de factores, los cuales incluyen; el tipo y forma de los antígenos administrados, la ruta y el método de inmunización, la naturaleza de los distintos compartimentos mucosos y el modelo animal donde se llevara a cabo el estudio (Ogra *et al.*, 2001; Zhao *et al.*, 2003).

El pH ácido del estómago, la presencia de un gran número de enzimas digestivas en el intestino y el moco protector que limita el acceso del antígeno al epitelio (O'Hagan, 2001) pudiera explicar porque después de inmunizar por la ruta oral no hay presencia de APC anti-Cry1Ac. Además la ausencia de respuesta inmune en mucosa intestinal se ha reportado con anterioridad en algunos trabajos (Moreno *et al.*, 1999; Ruiz, 2001; Moreno *et al.*, 2002). Recientemente en un trabajo del laboratorio sobre inducción de respuesta inmune sistémica y mucosa por administración de Pet y PetS2601 de *Escherichia Coli* enteroagregativa, encontraron que, a pesar de que la administración oral de petS2601 resultó eficiente para inducir respuesta inmune a nivel sistémico y de mucosa traqueopulmonar, es incapaz de promover una respuesta intestinal y en tracto genital femenino

Otra posible explicación a la falta de respuesta inmune encontrada después de inmunizar por ruta oral con la pCry1Ac, podría ser la inducción de tolerancia, pues como lo menciona Tomasi en 1980 y Mowat en 1994, la administración oral de proteínas induce ausencia de respuesta inmune. Las APC profesionales pueden estimular a los linfocitos presentes en la mucosa o migrar a los ganglios mesentéricos, donde entran en contacto con los linfocitos B y T que allí circulan. La presentación del antígeno con las células B y T va a realizarse en un ambiente en el que pueden encontrarse distintas citocinas. Si el reconocimiento ocurre en un ambiente en el que predominan citocinas "represoras" (TGF β , IL-10 y en algunos casos IL-4), se favorecerá el desarrollo de tolerancia hacia el antígeno. (Kelsall *et al.*, 1999). Aunque como lo menciona Czerkinsky la tolerancia no solo se genera por la participación de citocinas represoras también puede ser inducida por otros mecanismos como anergia y/o delección.

Para evidenciar la presencia de linfocitos B intraepiteliales y de lámina propia se llevó a cabo la inmunohistoquímica pues permite detectar APC *in situ* de distintos tejidos. Encontramos reacción positiva en epitelio (Fig.8, 9, 10, 11 y 12) y lámina propia de intestino delgado (Fig.8, 9 y 10) y grueso (Fig.11 y 12), indicando que existen células productoras de IgA, IgG, IgM e IgE en epitelio y lámina propia de intestino delgado y grueso. Es importante resaltar que encontramos los cuatro isotipos distribuidos en el tejido intersticial de epitelio y lámina propia de intestino delgado y grueso (Fig.8, 9, 10, 11 y 12), sin embargo existe una mayor cantidad de IgG (Fig.9 y 11) que de los otros isotipos, además de un mayor número de células productoras de anticuerpo IgG en lámina propia de intestino delgado (Fig.9) lo que corresponde con los resultados obtenidos por ELISA y ELISPOT.

El papel de la IgG en la protección de las mucosas aún está por determinarse, sin

embargo se ha observado la prevención de la infección vaginal o rectal del virus de VIH por la administración intravenosa de IgG en macaco rhesus (Baba *et al.*, 2000; Mascola *et al.*, 2000), y protección en mucosas por IgG e IgM contra virus de Influenza y rotavirus en ratones knockout de IgA (Mbawuiké *et al.*, 1999; O'Neal *et al.*, 2000).

El método de ELISPOT en papel de nitrocelulosa empleado en este trabajo nos permitió demostrar la existencia de células productoras de anticuerpos anti Cry1Ac en los compartimentos intraepitelial y de la lámina propia de ambos intestinos. El método de ELISPOT que utilizamos se basa en la técnica de ELISPOT modificada por Moller-Borrebaek que permite detectar células productoras de anticuerpo específicas al antígeno en distintos tejidos, por lo que ofrece ventajas sobre otros métodos descritos para la detección de células productoras de anticuerpo tales como el ELISPOT en placas de poliester y la técnica de placa hemolítica. En la técnica de placa hemolítica o también llamada prueba de formación de placa los eritrocitos son sensibilizados con el antígeno, entonces estos eritrocitos sirven como células indicadoras, se mezclan con las células productoras de anticuerpos específicos y se incuban en un soporte de medio semisólido para permitir al anticuerpo secretado que se una a la superficie del eritrocito, si el anticuerpo liga al complemento con avidéz la adición posterior del complemento producirá la lisis de las células indicadoras cubiertas con el anticuerpo específico como resultado se forman zonas claras de lisis alrededor de las células productoras de anticuerpo, este análisis puede usarse también para detectar anticuerpos que no fijan el complemento incorporando al medio un anticuerpo anti-Ig que se una al complemento, que cubrirá a las células indicadoras a las que se haya unido antes el anticuerpo específico. Las desventajas son que tiene una baja sensibilidad para detectar APC IgA, además de presentar dificultad en el acoplamiento de muchos antígenos con los eritrocitos así como inestabilidad de los eritrocitos sensibilizados con el antígeno al unirse con las APC (Lycke, 1986, Czerkinsky *et al.*, 1983)

Mientras que la técnica de ELISPOT en placas publicada en el mismo año (1983) y en la misma revista (*Journal of Immunological Methods*) por diferentes autores (Czerkinsky y Sedwick) representa muchas ventajas en la detección de APC específicas para el antígeno en comparación con la técnica de placa hemolítica ya que no se tiene que trabajar con eritrocitos que representan un problema pues además de que deben de estar frescos tienen que acoplarse al antígeno con el que fueron sensibilizados y además acoplarse a las células plasmáticas.

Sedwick y Holt reportaron que ELISPOT en placas es más sensible para detectar APC IgM e IgG en comparación con la técnica de placa hemolítica. Las APC IgA no fueron

investigadas por estos autores, pero N. Lycke hizo experimentos en diversas ocasiones con linfocitos de lámina propia en ratones inmunizados con toxina de cólera empleando la técnica de placa hemolítica y ELISPOT y encontró que por ELISPOT se detectaron APC en lámina propia y en bazo, mientras que en la técnica de placa hemolítica solo se detectaron APC en bazo. Aunque esta técnica de ELISPOT es más eficiente que la técnica de placa hemolítica la modificación que Moller-Borrebaek le hicieron a la técnica de ELISPOT, que es la que empleamos en el presente trabajo, ofrece ventajas adicionales. En esta técnica de ELISPOT modificada se emplea papel de nitrocelulosa para fijar el antígeno en vez de fijar el antígeno a las placas. Además no se requiere emplear agarosa para disolver el sustrato y revelar los spots. Esto facilita la técnica, ya que trabajar con agarosa es laborioso y complicado, porque hay que regular la temperatura de la agarosa a 50 ° C al disolver el sustrato cuidando de que no se gelifique antes de agregarla a los pozos. Además las placas reveladas deben contarse inmediatamente y rápidamente porque la reacción del sustrato no se puede parar y si después de 30 min. de reacción ya no es posible contar los spots porque se confunden con precipitados del sustrato. Estos inconvenientes dificultan el manejo y análisis de varias muestras simultáneamente. En cambio con la técnica de ELISPOT en papel de nitrocelulosa se pueden procesar varias muestras simultáneamente, la reacción del sustrato se puede parar lavando con agua y los spots se pueden contar con calma posteriormente, ya que se pueden guardar por meses los papeles de nitrocelulosa revelados sin que se alteren.

Los resultados obtenidos al emplear ELISPOT demuestran que al inmunizar por la ruta intraperitoneal con la pCry1Ac se inducen respuestas de las células productoras de anticuerpo IgA, IgG, IgM e IgE anti Cry1Ac, en epitelio y lámina propia de intestino delgado y grueso, detectándose altos niveles del isotipo IgG anti Cry1Ac en epitelio intestinal y principalmente en lámina propia de intestino delgado, mientras que por inmunohistoquímica se demuestra la existencia de células productoras de los cuatro isotipos en epitelio y lámina propia de intestinos, encontrando un mayor número de células productoras de IgG así como una mayor cantidad del isotipo IgG en comparación a los otros isotipos en el tejido intersticial principalmente en la lámina propia de intestino delgado.

CONCLUSIONES

- Mediante la técnica de ELISA se corrobora que al inmunizar con la pCry1Ac por la vía intraperitoneal en ratones se estimula principalmente la producción del isotipo IgG en lavados de intestino delgado y grueso.
- Por ELISPOT se demuestra que en los linfocitos intraepiteliales y de lámina propia de los intestinos delgado y grueso se inducen respuestas significativas de las células productoras de IgA, IgG, IgM e IgE anti Cry1Ac en ratones inmunizados por vía i.p con la pCry1Ac.
- La respuesta más alta de las células productoras de IgA, IgG, IgM e IgE anti Cry1Ac la presentan los linfocitos de lámina propia de intestino delgado y en este mismo compartimiento por inmunohistoquímica detectamos un mayor número de células productoras de los cuatro isotipos.
- Los spots de las células productoras de IgG anti Cry1Ac de la lámina propia y epitelio son más grandes e intensos que los spots de las células productoras de IgA, IgM e IgE, lo cual corresponde a una concentración más alta de IgG tal como se detecto por ELISA, en las muestras de lavados intestinales de ratones inmunizados por vía i.p. con la pCry1Ac.
- La inmunización por vía oral con la pCry1Ac en ratones no induce respuestas de células productoras de IgA, IgG, IgM e IgE anti Cry1Ac ni en epitelio ni en lámina propia de intestino delgado y grueso.
- Por inmunohistoquímica encontramos que los isotipos IgA, IgG, IgM e IgE se encuentran distribuidas en el tejido intersticial de epitelio y lámina propia de intestino delgado y grueso, sin embargo existe una mayor cantidad de IgG que de los otros isotipos lo que corresponde con los resultados obtenidos por ELISA y ELISPOT.
- No se ha reportado la presencia de linfocitos B intraepiteliales en intestinos, sin embargo nuestros resultados muestran la existencia de estos y aunque encontramos un número bajo de linfocitos B en epitelio su existencia sugiere que el anticuerpo sea liberado directamente al lumen intestinal sin requerir de un mecanismo de transporte.
- Los altos niveles del isotipo IgG detectados en la lámina propia intestinal sugieren la existencia de un mecanismo de transporte que aun no ha sido descrito en mucosas intestinales de ratones adultos

BIBLIOGRAFÍA

Abbas, A.K., A.H. Lichtman y J.S. Pober. 1998. Inmunología Celular y Molecular. McGraw Hill-Interamericana. 2ª edición. p.257-267.

Abrahamson D.R., and Rodewald R. 1981. Evidence for the sorting of endocytic vesicle contents during the receptor-mediated transport of IgG across the newborn rat intestine. *J. Cell Biol.* 91:270-280.

Baba, W.T., V. Liska, R. Hofmann-Lehmann, J. Vlasak, W. Xu, S. Ayehunie, A.L. Cavacini, R.M. Posner, H. Katinger, G. Stiegler, J.B. Bernacky, A.T. Rizvi, R. Schmidt, R.L. Hill, E.M Keeling, Y. Lu, E.J. Wright, T. Chou and M.R. Ruprecht. 2000. Human neutralizing monoclonal antibodies of the IgG1 subtype Project against mucosal simian-human immunodeficiency virus infection. *Nature Medicine.* 6(2):200-206.

Balabanian K. 2002. Interleukin10 modulates the sensitivity of peritoneal B lymphocytes to chemokines with opposite effects on stromal cell-derived factor-1 and B lymphocyte chemoattractant. *Blood.* 99(2):427-436

Berneman A., Belec L., Fischetti V.A. Bouvet J.P. 1998. The specificity patterns of human immunoglobulin G antibodies in serum differ from those in autologous secretions. *Infect. and Imm.* 66(9):4163-4168.

Bernstein, I.L., Bernstein J.A., Miller M., Tierzieva S., Bernstein D.I., Lummus Z. Selgrade M.K., Doerfler D.L., Seligy V.L. 1999. Immune Responses in farm Workers after exposure to *Bacillus thuringiensis* Pesticides. *Envm. Health Perspec.* 107(7):575-582

Biewenga J. 1993. Induction and regulation of IgA responses in the microenvironment of the gut. *Clinical immunology and immunopathology.* 67:1-7
Bouvet J.P., Decroix N. and Pamosinlapatham P. 2002. Stimulation of local antibody production: parenteral or mucosal vaccination? *Trends in immunology.* 23(4):209-213

Brandtzaeg P.E. 1995. Molecular and cellular aspects of the secretory immunoglobulin system. *Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand* 103:1-19

Czerkinsky, C., Andersson, G., Ekre, H.P., Nilsson, L.A., Klare-skog, L., Ouchterlony, O. 1988. Reverse ELISPOT assay for clonal analysis of cytokine production: I. Enumeration of gamma-interferon-secreting cells. *J. Immunol. Methods.* 110:29-36.

Czerkinsky, C., Nilsson, L.-A., Nygren, H., Ouchterlony, O., Tarkowaki, A. 1983. A solid-phase enzyme-linked immunospot (ELISPOT) assay for enumeration of specific antibody-secreting cells. *J. Immunol. Methods.* 65:109-121.

Czerkinsky, C. 1999. Mucosal immunity and tolerance: relevance to vaccine development. *Immunological Reviews.* 170:197-222.

- Czerkinsky, C., Sedgwick, J. 1993. Enzyme-linked immunospot (ELISPOT) assay for detection of specific antibody-secreting cells. In: Masseyeff, R.F., Albert, W.H., Staines, N.A., (Eds), Methods of immunological Analysis. VCH Verlagsge-sellschaft, Weinheim, 504.
- Dickinson B.L., Badizadegan K., Wu Z., Ahouse J.C. Zhu Xiaoping, Simister, Blumberg N.E., Richard S. Wayne I. 1999. Bi-directional FcRn-dependent IgG transport in a polarized human intestinal epithelial cell line. J. Clin. Invest. 104(7):903-911
- Ge, A.Z, Pfister, R.M., & D.H. Dean. 1990. Hyper expression of a *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin-encoding gene in *Escherichia coli*: properties of the product. Gene 93:49-54
- Eldridge JH, Gilley RM, Stats JK, Moldoveanu Z, Meulbroek JA, and Tice TR. 1989. Biodegradable Microspheres: Vaccine Delivery System for Oral Immunization. Current Topics in Microbiology and Immunology. 146: 59-66.
- Eldridge, J.H., Staas, J.K., Meulbroek, J.A., McGhee, J.R., Tice, T.R., & R.M. Gilley. 1991. Biodegradable microspheres as vaccine delivery system. Mol. Immunol. 28:287-294.
- Elson CO and Ealding W. 1984. Cholera Toxin feeding did not induce oral tolerance to unrelated protein antigen. J.Immunol. 133: 2892-2887.
- Elson. C.O., S. Holland, and S. Woogen. 1990. Preferential inhibition of the CD⁺ T cell subset by cholera toxin (CT) and its B subunit (CT-B). FASEB J. 4:A1864.
- Garosi G, Paolo N. 2001. Recent advances in peritoneal morphology: the milky spots in peritoneal dialysis. Adv Perit Dial. 17:25-28
- Gallichan, W.S., & L. Rosenthal. 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.
- Hackett, J. 1990. Salmonella-based vaccines. Vaccine 8:5-11.
- Höfte, H., & H. Whiteley. 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. Microbiol. Rev. 53:242- 255.
- Hopkins S, Kraehenbuhl JP, Schödel F, Potts A, Peterson D, De Grandi P and Nardelli-Haefliger. 1995. A Recombinant Salmonella typhimurium Vaccine Induces Local Immunity by Four Different Routes of Immunization. Infection and Immunity. 63:3279-3289.
- Jackson RJ, Fujihashi K, Xu-Amano J, Kiyono H, Elson CO and McGhee JR. 1993. Optimizing Oral Vaccines: Induction of Systemic and Mucosal B-Cell and Antibody Responses to tetanus Toxoide by Use of Cholera Toxin as an Adjuvant. Infect. Immunol. 61:4272-4279.
- Johansson E.L., Rask C., Fredriksson M., Eriksson K., Czerkinsky C., 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. Infect. Immunol. 66:514-520.
- Kelsall B., Strober W. 1999. Gut-associated lymphoid tissue.Mucosal immunity.2nd edition.p485-506

Krist LF. 1995. Cellular composition of milky spots in the human greater omentum: an immunochemical and ultrastructural study. *Anat Rec.* 241(2):163-174

Laferriere M., Bastille A., y Nadeu A. 1987. Immunologic study of the components of the biological insecticide *Bacillus Thuringiensis var. Kurstaki*. Public Health Administration, Grand Portage Regional Hospital Center, Quebec.

Lakew, M., Nordström, I., Czerkinsky, C., Quiding, J.M., 1997. Combined immunomagnetic cell sorting and ELISPOT assay for the phenotypic characterization of specific antibody-forming cells. *Journal of Immunological Methods.* 203:193-198.

Lycke, N., & J. Holmgren. 1986. Strong adjuvant properties of cholera toxin on gut mucosal immune responses to orally presented antigens. *Immunology.* 59:301-308.

Marlojein V.E., Damen C.A., Van Spriël A.B., Vidarsson G., Garderen E.V. and Van de Winkel G.J. 2001. IgA and the IgA Fc receptor. *Trends Immunol.* 22(4):205-211

Mascola, R.J., G. Siegler, T.C. VanCott, H. Katinger, C.B. Carpenter, C.E. Hanson, H. Beary, D. Hayes, S.S. Frankel, D.L. Brix and M.G. Lewis. 2000. Protection of macaques against vaginal transmission of a pathogenic HIV-1/SIV chimeric virus by passive infusion of neutralizing antibodies. *Nature Medicine.* 6(2):207-210.

Mbawuike I.N., Pacheco S., Acuna C.L., Switzer K.C., Zhang Y., Harriman G.R. 1999. Mucosal immunity to influenza without IgA: an IgA knockout mouse model. *J. Immunol.* 162:1230-1237.

McClintock, J.T., Schaffer, C.R., & R.D. Sjoblad. 1995. A comparative reviews of the mammalian toxicity of *Bacillus thuringiensis*-based pesticides. *Pestic. Sci.* 45:95-105.

McCluskie MJ & Davis HL.1999. Mucosal Immunization with DNA vaccines. *Microbes and Infection.* 1:685-698.

McGhee J., Stroeber W. 1999. Mucosal immune responses. *Mucosal immunology.* 2nd edition.p485-506

Mestecky J and McGhee JR.1989. Oral Immunization: Past and Present. *Current Topics in Microbiology and Immunology.*146:51-58.

Mestecky J. 1987. The Common Mucosal Immune System and Current Strategies for Induction of Immune Responses in External Secretions. *J. Clin. Immunol.* 7:265-276.

Mestecky J. Abraham R and Ogra PL. 1994. Common Mucosal Immune System and Strategies for Development of Vaccines Effective at the Mucosal Surfaces. In *Handbook of Mucosal Immunology* (PL Ogra, W Strober, J. Mesteckey, ME Lamm, JR McGhee, J, Bienestock. Ed). Academic Press Inc, USA. p. 357-371.

Michalek SM, Childers NK, Katz J, Denys FRT, Berry AK, Eldrige JH, McGhee JR and Curtis II R. 1989. Liposomes as oral Adjuvants. *Current Topics in Microbiology and Immunology.*146:51-58.

Michalek, S.M., Eldridge, J.H., Curtis III, R., & K.L. Rosenthal. 1994. Antigen delivery systems: new approaches to mucosal immunization. In Handbook of Mucosal Immunology. (PL Ogra, W Strober, J. Mesteckey, ME Lamm, JR McGhee, J, Bienestock. Ed), (1994) pp. 373-390. Academic Press Inc, USA.

Moreno-Fierros, L. Resendiz-Albor, AA. and López Revilla R. 1999a. "Different antiamebic antibody isotype patterns in the large and small intestine after local and systemic immunization of mice with glutaraldehyde fixed trophozoites". Life Sciences 64:1079-1089.

Moreno-Fierros L, García N, Gutiérrez R, López-Revilla R and Vázquez-Padrón RI. 2000. Intranasal, Rectal and Intraperitoneal Immunization with Protoxin Cry1Ac from *Bacillus thuringiensis* Induces Serum, Intestinal, Vaginal and Pulmonary Responses in Balb/c Mice. Microbes and Infection. 2:885-890

Moreno-Fierros, L., Domínguez-Robles, MC, and Enríquez-Rincón F.1995. "*Entamoeba histolytica*: Induction and Isotype Analysis of Antibody Producing Cells Responses in Peyer's Patches and Spleen, After Local and Systemic Immunization in male and female mice". Exp. Parasitol. 80:541-549.

Mowat, AM Oral Tolerance and Regulation of Immunity to Dietary Antigens. In Handbook of Mucosal Immunology (PL Ogra, W Strober, J. Mesteckey, ME Lamm, JR McGhee, J, Bienestock. Ed), (1994) pp185-201. Academic Press Inc, USA.

Ogra, P.L., H. Faden and R.C. Welliver. 2001. Vaccination strategies for mucosal immune responses. Clinical Microbiology Reviews. 14(2):430-445.

O'Hagan D. 2001. Recent developments in adjuvants for vaccines against infectious diseases. Biomolecular Engineering. 18:69-85

O'Neal, C.M., G.R. Harriman and M. E. Conner. 2001. Protection of the villus epithelial cells of the small intestine from rotavirus infection does not require immunoglobulin A. Journal of Virology. 74(9):4102-4109.

Prasad, S.S.S.V. & Y.I. Shethna. 1975. Enhancement of immune responds by the proteinaceous crystal of *Bacillus thuringiensis*. Biochem. Biophysics. Res. Commun. 62:517-521

Robinson, K., L.M. Chamberlain, K.M. Schofield, J.M. Wells and R.W.F. Le Page. 1997. Oral vaccination of mice against tetanus with recombinant *Lactococcus lactis*. Nature Biotechnology. 15:653.

Ruiz, M.E.J. 2001. La protoxina Cry1Ac de *Bacillus thuringiensis* HD73 como acarreador y adyuvante de polisacáridos de *Streptococcus pneumoniae*, Tesis licenciatura, UNAM, México, p.96.

Scheibenbogen, C., Lee, K.H., Mayer, S., Stevanovic, S., bankar, S., Williamson, A.R., Zweerink, H., 1991. The mini-Moebius, U., Herr, W., Rammensee, H.G., Keilholz, U. 1997. A sensitive ELISPOT assay for detection of CD81 T lymphocytes specific for HLA class I-binding peptide epitopes derived from influenza proteins in the blood of healthy donors melanoma patients. Clin. Cancer Res. 3, 221

Scheibenbogen, C., Romero, P., Rivoltini, L., Herr, W., Schmittel, A., Cerrotini, J.C., Woelfel, T., Eggermont, A.M.M., Keilholz, Czerkinsky, C.C., Andersson, G., Ekre, H.P., Nielsson, L.A., U. 2000a. Quantitation of antigen-reactive T cells in peripheral blood by IFN γ -ELISPOT assay and chromium release assay: a four-center comparative trial. *J. Immunol. Meth.* 244, 81

Schinjs Virgil. 2000. Immunological concepts of vaccine adjuvant activity current opinion in immunology.12:456-463

Simister N.E., and Ress A.R. 1985. Isolation and characterization of an Fc receptor from neonatal rat small intestine. *Euro. J. Immunol.* 15:733-738

Staats HF, Montgomery SP, Palker TJ. 1997. Intranasal immunization is superior to vaginal, gastric, or rectal immunization for the induction of systemic and mucosal anti-HIV antibody responses. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 13:945-52.

Tomasi TB Jr. 1980. Oral tolerance. *Transplantation* 29:353-356.

Turner.J.T. Lampel, J.S., Stearman, R.S., Sundin. G.W., Gunyuzlu,P., & J.J. Anderson. 1991. Stability of \bullet -endotoxin gene from *Bacillus thuringiensis subsp. Kurstaki* in a recombinant strain of *Clavibacter xyli subsp. cynodontis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:3522-3533.

Vázquez-Padrón RI, Moreno-Fierros L, Neri-Bazán L, Del la Riva GA and López- Revilla R. 1999a. *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac protoxin is a potent systemic and mucosal adjuvant. *Scand. J. Immunol.* 46:578-584.

Vázquez-Padrón RI, Moreno-Fierros L, Neri-Bazán L, Del la Riva GA and López- Revilla R. 1999b. Intragastric and intraperitoneal administration of Cry1Ac protoxin from *Bacillus thuringiensis* induces systemic and mucosal antibody response in mice. *Life Sciences* 64:1897-1912.

Vázquez, P.R.I., Moreno, F.L., Neri, B.L., López, R.R., 1999. *Bacillus thuringiensis* Cry 1Ac Protoxin is a Potent Systemic and Mucosal Adjuvant. *Scand. J. Immunol.* 49:578-584.

Vadlamudi, R.K., Weber, E., Ji, I., Ji, T.H., & L. A. Bulla, JR. 1995. Cloning and expression of a receptor for an insecticidal toxin of *Bacillus thuringiensis*. *J. Biol. Chem.* 270:5490-5494.

Watanabe Norihiko. 2000. Migration and differentiation of autoreactive B-1 cells induced by activated γ/δ T cells in antierythrocyte immunoglobulin transgenic mice. *J. Exp. Med.*, 192(11):1577-1586

Wilson, A.D., C.J. Clarke, and C.R. Stokes. 1990. Whole cholera toxin and B subunit act synergistically as an adjuvant for the mucosal immune response of mice to Keyhole limpet haemocyanin. *Scand. J. Immunol.* 139:3764.