

31960



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Estudios Superiores

"IZTACALA"

Inducción de Respuesta Inmune en el Tracto Genital
por la Protoxina Cry 1Ac de *Bacillus thuringiensis*
durante el Ciclo Estral en Ratones

TESIS

Que para obtener el Grado de:

**Maestría en:
BIOLOGIA DE LA REPRODUCCION**

Presenta:

M.V.Z. Ma. Inés Pérez Ordóñez

Tutora: Dra. Leticia Moreno Fierros

Edo. de México

2005.

M343341



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Ma. Inés Pérez
Ordóñez

FECHA: 20 04 05

FIRMA: Inés P.O.

**Este trabajo fue apoyado parcialmente por el proyecto
CONACYT 43102M y UNAM DGAPA PAPIIT IN213903**

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Leticia Moreno Fierros por haberme aceptado en su laboratorio, por sus enseñanzas, consejos y regaños (que en realidad fueron pocos). Gracias por la motivación en continuar y ante todo en terminar.

Al Dr. Martin Palomar Morales por ayudarme a salir del hoyo en la parte estadística y la revisión en la redacción y mi “spanglish”. MIL GRACIAS por animarme a seguir adelante.

Al Dr. Edelmiro Santiago Osorio por sus observaciones de ver de manera objetiva, además de constructiva de la presente tesis.

Al Dr. Mario Agustín Altamirano Lozano no podría decir menos al respecto, toda vez que por ser un profesionalista en la materia, sus consejos fueron de gran valía.

A mis compañeros de Laboratorio: Rita, Monica, Aldo.

DEDICATORIAS

A mi esposo José Antonio que siempre me apoya en todo y por todo el amor y cariño que nos tenemos.

**A mis padres José y Guadalupe porque siempre me han apoyado en todo.
GRACIAS.**

A mis amigas y compañeras de Maestría: Maru y Conchita.

A mi colega M.V.Z José Antonio Lopez por haberme ayudado en los cambios de la tesis y la presentación de la misma en transparencias.

A todas aquellas personas que de alguna manera me dieron consejos y ánimo para concluir esta tesis para obtener el grado.

JURADO

Presidente: Dr. Mario Agustín Altamirano Lozano

Vocal: Dr. Edelmiro Santiago Osorio

Secretaria: Dra. Leticia Moreno Fierros

Suplente: Dr. Martín Palomar Morales

Suplente: M. en C. Silvia Leticia Verdín Terán

ÍNDICE

	Pag.
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
ASPECTOS GENERALES	2
Protoxina Cry 1Ac	2-3
Sistema Inmune de la Mucosa del Tracto Genital Femenino	3-4
Mecanismos Inductivos para Inmunidad	5-7
Secretora en Tracto Genital Femenino	
Elementos Inmunológicos del Tracto Reproductor Femenino	7-9
Vagina	
Cervix	
Utero	
Oviducto	
Secreciones	
Respuesta Inmune en Diestro y Estro	9-10
Ciclo Estral en Roedores	11-12
Generales de Estrógenos	13
JUSTIFICACIÓN	14
HIPÓTESIS	14
OBJETIVOS	14
OBJETIVO GENERAL	
OBJETIVOS PARTICULARES	14-15
METODOLOGIA	15-16
RESULTADOS	17-20
DISCUSION	21-27
CONCLUSIONES	27
APÉNDICE	28-31
BIBLIOGRAFÍA	32-38
ARTÍCULO	
Slight Influence of the estrous cycle on the mucosal and systemic specific antibody response induced after vaginal and intraperitoneal immunization with protoxin Cry 1 Ac from <i>Bacillus thuringiensis</i> in mice. Life Sciences 71 (2002) 2667-2680.	

RESUMEN

La mayoría de los agentes infecciosos virales, bacterianos o protozoarios que penetran al organismo lo hacen a través de las superficies de los tractos gastrointestinal, respiratorio y urogenital. Para lograr protección contra estos patógenos se requiere desarrollar estrategias de vacunación para estimular la respuesta inmune mucosa y sistémica.

En el presente trabajo se evaluó si la fase del ciclo estral modifica la respuesta inmune sistémica y mucosa inducida mediante la inmunización intraperitoneal e intravaginal en ratones Balb/c hembra con protoxina Cry 1Ac de *Bacillus thuringiensis*. Se probó la influencia mediante 3 inmunizaciones sobre la respuesta a anticuerpos específicos en 2 etapas del ciclo estral: diestro y estro, en las cuales el antígeno fue aplicado. Tanto por aplicación intraperitoneal como la intravaginal, en diestro o estro, se encontró respuesta específica a anticuerpos en suero, vagina e intestino grueso. La etapa del ciclo estral tiene pequeña o ninguna influencia en la magnitud de respuesta inducida, sólo en el suero la IgM fué ligeramente más alta en estro que en diestro en respuesta a la inmunización por ambas vías. En intestino grueso solo la IgA por vía intraperitoneal cambió, siendo más alta en diestro; mientras que en lavados vaginales no hubo cambio significativo con el ciclo en la respuesta de IgA inducida. Los resultados del presente trabajo sugieren que Cry 1Ac puede usarse como un acarreador de antígeno ya que puede inducir respuesta de anticuerpos a nivel sistémico y varios sitios mucosos, incluyendo vagina, la respuesta inducida por ambas vías de inmunización no tiene ninguna modificación significativa a lo largo del ciclo reproductivo.

INTRODUCCIÓN

A) ASPECTOS GENERALES

La protección óptima de las mucosas depende del sistema inmune asociado a mucosas, el cual responde contra patógenos virales y bacterianos. Dentro del tracto reproductivo femenino el sistema inmune asociado a mucosas ha evolucionado para proteger contra patógenos potenciales sin comprometer la supervivencia fetal. El sistema inmune del útero, vagina y cervix está expuesto periódicamente a espermatozoides alógenicos y a la unidad fetoplacentaria, que son inmunológicamente distintos y es controlado por hormonas sexuales para optimizar tanto la sobrevivencia fetal, como la materna. Dependiendo del sitio analizado y del estado reproductivo (Balance endócrino), la inmunocompetencia del tracto reproductivo femenino puede aumentarse o suprimirse para atender a las necesidades fetales y maternas.

A pesar de la efectividad de la protección inmune, las enfermedades de transmisión sexual representan uno de los principales problemas de salud que amenazan tanto a adultos como recién nacidos. Es necesario entender mejor a los elementos del sistema inmune secretor en el tracto reproductor femenino y la forma por la cual el sistema endócrino regula la función inmune en esos sitios para poder combatir infecciones como la gonorrea, *Chlamydia*, *Streptococcus*, Herpes Simplex 2 y HIV, contra las que existe un éxito limitado del sistema inmune para controlarlas.

1.-Protoxina Cry1Ac *Bacillus thuringiensis*

Bacillus thuringiensis es un bacilo esporulado G (+) (Knowles, 1994) formado por flagelos peritricos. Durante la esporulación (al terminar el crecimiento vegetativo) estas bacterias sintetizan cuerpos de inclusión paraesporales formados por una o más delta endotoxinas conocidas como proteínas Cry, las cuales tienen un peso molecular que se encuentra en un rango de 130-140 Kda (Feitelson y cols., 1992). El *Bacillus thuringiensis* es común en el ambiente, ha sido usado como bioinsecticida desde hace más de 50 años (Stewart y cols., 1996) y es considerado como la principal especie bacteriana utilizada en la agricultura moderna como bioinsecticida. Este microorganismo se caracteriza por producir 7 diferentes toxinas, activas contra larvas de invertebrados como algunos insectos, nematodos y protozoarios (Feitelson y cols., 1992). La habilidad insecticida de esta bacteria es atribuida a sus proteínas cristalinas, también conocidas como proteínas Cry o como delta-endotoxinas (Ge y cols., 1990), cuyos cristales se disuelven en el intestino medio del insecto, se activan por enzimas proteolíticas, generando poros en la membrana celular de la cubierta intestinal ocasionando desbalance osmótico y provocando la lisis celular (Feitelson y cols., 1992). Las toxinas Cry se ligan especialmente al borde en cepillo de las membranas de las células columnares del intestino medio de los insectos (Knowles, 1994). La protoxina de *Bacillus thuringiensis* ha sido estudiada para determinar su mecanismo bioinsecticida (Knowles, 1994). Los genes de Cry1Ac han sido clonados y transferidos a bacterias y plantas para generar autopesticidas (Herrea y cols., 1994; Perlak y cols., 1990). Sin embargo hay pocos trabajos en los que se han estudiado los efectos fisiológicos o inmunológicos de la familia de las proteínas Cry en los vertebrados (Watson y Mann, 1988). En trabajos de nuestro laboratorio, se encontró que la protoxina Cry1Ac es un potente inmunógeno sistémico y mucoso y tiene efectos adyuvantes cuando se administra

por las vías intragástrica, intraperitoneal e intranasal(Moreno-Fierros y col., 2000, 2003, Vazquez-Padrón y col., 1999 a y b) pero faltaba explorar si por otras rutas mucosas como la vaginal era inmunógena.

SISTEMA INMUNE DE LA MUCOSA DEL TRACTO GENITAL FEMENINO

El sistema inmune reacciona contra microorganismos y ayuda a mantener un ambiente aséptico en el tracto genital femenino durante las diferentes etapas del proceso reproductivo. La superficie mucosa del cuerpo forma una barrera mecánica y fisiológica entre el sistema inmune sistémico y el ambiente externo. El epitelio de la mucosa cubre más de 400 mts.² de superficie corporal y contiene más del 85% del tejido linfóide total del cuerpo y la IgA secretora es cuantitativamente la inmunoglobulina más importante del sistema inmune humoral en el cuerpo (Brandtzaeg y Prydz, 1989). Se han examinado los mecanismos de inducción de la respuesta inmune en superficies mucosas, tales como: el tracto respiratorio y gastrointestinal; y existen evidencias de un sistema inmune local en el tracto genital femenino (Kutteh y cols., 1988), pero hay poca información sobre la respuesta inmune local, distal y sistémica después de la administración de alguna clase de antígeno dentro del tracto genital femenino.

Por la aparente compartimentalización de los sistemas inmunes: secretor y o sistémico, la administración parenteral de vacunas no estimula consistentemente la inmunidad mucosa y por lo tanto son poco efectivas contra patógenos mucosos tales como *Vibrio cholerae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamidia trachomatis* e influenza virus. Las vacunas administradas localmente son más efectivas contra agentes infecciosos los cuales entran al cuerpo a través de superficies mucosas; el buen éxito de la vacuna del virus de la polio vivo atenuado (Sabin) demuestra el beneficio de esta vía de entrada.

El concepto de un sistema inmune de mucosas común permite la generación de una respuesta inmune a los antígenos presentados a las superficies mucosas distantes, el cual proporciona una explicación para la detección de anticuerpos secretados contra antígenos administrados oralmente, en productos tales como: calostro, lágrimas y saliva. La respuesta está dada por la degradación directa del antígeno captado selectivamente por células M epiteliales mucosas, y esta distribución es fundamental en el tejido linfóide, el cual estimula a las células precursoras para producir inmunoglobulinas (Wolf y Bye, 1984). Estas células migran dentro la circulación sanguínea por vía de linfáticos, originan y maduran en lámina propia y se ordenan en la superficie mucosa donde ellas secretan inmunoglobulinas específicas, en la mayoría de los casos IgA secretora (Mestecky y McGhee, 1987).

Los mecanismos de captación y de procesamiento del antígeno en el tracto reproductor femenino aún no están bien esclarecidos. Las células M no han sido descritas en la vagina o cervix, pero las células tipo Langerhans y macrófagos están presentes en la mucosa vaginal. Las células de Langerhans captan antígenos lumbinales por endocitosis durante el metaestro y el diestro cuando el epitelio es más permeable (Parr et al.,1990), no lo atraviesan en el estro (Parr y Parr,1990) presentan moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase II, son abundantes en la mucosa vaginal y ectocervical de la mujer (Edwards y Morris, 1985; Bjercke y cols., 1983; Hackemann y cols., 1968) y monos (Miller y cols., 1992), estas células son comunes en la piel donde pueden unirse al antígeno y migrar por conductos hacia el nódulo linfático.

El sistema inmune de mucosas en el tracto genital de monos rhesus hembras, consiste de una población residente de macrófagos, monocitos, y células T en la submucosa de la vagina y el cervix (Miller y cols., 1992); esas células son específicamente localizadas en la superficie submucosa justo debajo del epitelio vaginal.

Una población similar del linfocitos y macrófagos han sido descritos en la submucosa del cervix humano llamado tejido linfoide asociado a mucosas (MALT), (Edwards,1985); la respuesta inmune primaria en el tejido linfoide asociado a intestinos (GALT), el antígeno que llega a la submucosa de la vagina es recibido por células presentadoras de antígeno las cuales migran a los nódulos linfoides, una vez en los nódulos linfáticos las células presentadoras de antígeno estimulan a los linfocitos B y T, incluyendo las subpoblaciones de células de memoria que entran al torrente sanguíneo vía conducto torácico y linfa migrando al tracto genital. Es probable que en la vagina las células de Langerhans y los fagocitos mononucleares sean capaces de actuar como células presentadoras de antígeno e iniciar una respuesta inmune.

Al parecer, cambios en la concentración sérica de hormonas sexuales, afectan las concentraciones de inmunoglobulinas en secreciones cervicovaginales (Wira y Sandoe, 1977), lo cual sugiere que la respuesta inmune local en el tracto genital femenino puede estar bajo control hormonal (Wira y Sandoe, 1980; Sullivan y cols, 1985). Las concentraciones de inmunoglobulinas en el moco cervical son más bajas al tiempo de la ovulación, se reducen 10% antes de la ovulación y de nuevo aumentan después de la ovulación. En mujeres que usan dosis secuenciales de anticonceptivos orales las concentraciones de anticuerpos locales en el moco cervical permanecen disminuidos durante todo el ciclo comparado con las que no usan anticonceptivos.

Los principales elementos de la inmunidad secretora en el tracto genital parecen ser un componente secretor (SC) en células epiteliales, células plasmáticas IgA en el estroma e inmunoglobulinas (IgA e IgG) en fluidos luminales.

En humanos el componente secretor, y las células plasmáticas IgA del tracto genital femenino han sido tema de numerosas investigaciones. Estos estudios han demostrado que el istmo y ampula del oviducto contiene componente secretor en el epitelio luminal y células plasmáticas IgA en el estroma. Indicando que en el oviducto es un sitio potencial para la inmunidad mucosa en el tracto genital de la mujer (Tourville y cols., 1970; Kutteh y cols., 1988, 1990). Las células plasmáticas e inmunoglobulinas intersticiales están más concentradas en el oviducto del ratón (Parr y Parr, 1985).

El cuerpo y fondo del útero contienen componente secretor e IgA en el epitelio y lámina glandular (Tourville et al., 1970; Vaerman y Ferin, 1974; Rebello y cols., 1975; Kelly y Fox, 1979; Kutteh y cols., 1988). Sin embargo, las células plasmáticas IgA positivas son raras o estan ausentes, esto sugiere que el suero puede ser una importante fuente de IgA para secretarla en el útero. El endocervix en humanos esta forrado de epitelio columnar y contiene numerosas glándulas, las cuales tienen componente secretor sobre el epitelio luminal y glandular; además que contienen muchas células plasmáticas IgA (Rebello et al., 1975; Kutteh y cols., 1988).

Varios estudios demuestran que la IgA e IgG están presentes en fluidos cervico-vaginales y parece ser que la IgG es la inmunoglobulina predominante; pero los reportes indican que la proporción IgG e IgA varia de aproximadamente 2:1 a 10:1 (Chordiker y Tomasi, 1963; Masson y cols., 1969; Schumacher, 1973, 1980; Tickronegoro y Sirisinha, 1975; Usala y cols., 1989).

Mecanismos Inductivos para Inmunidad Secretora en el Tracto Genital Femenino

La inmunización local de mucosas del tracto respiratorio o gastrointestinal puede ser un camino efectivo para estimular la respuesta inmune secretora a esos sitios, pero la inmunización local de el tracto reproductor femenino bajo condiciones fisiológicas produce poca, o nula la generación de anticuerpos específicos en secreciones del tracto genital. Una indicación temprana de este hecho es la observación de que la inmunización intravaginal del ratón con espermatozoides no tuvo efecto sobre la fertilidad, mientras que la inmunización parenteral con espermatozoides la disminuye significativamente (Bell, 1969). Estudios subsecuentes de inmunización en el lumen uterino del humano y conejo con ferritina de caballo, espermatozoides o con peroxidasa de rabano no fueron capaces de producir una respuesta inmune (Vaerman y Feron, 1974; Mc. Anulty y Morton, 1978; Moretty-Rojas y cols., 1990), no obstante anticuerpos específicos fueron detectados en el tracto después de la inmunización intrauterina con virus de influenza muerto (Ogra y Ogra, 1973).

Otros reportes indican que la respuesta inmune se detecta en el tracto reproductor después de la inmunización intrauterina, comprometiendo condiciones no fisiológicas, tales como ligaduras para cerrar el cervix del utero después de la inmunización o mezclando los antígenos con un adyuvante (Menge y Lieberman, 1974; Lande y cols., 1981; Lande, 1986; Wira y Sandoe, 1989). Estudios comparativos han demostrado que los títulos de anticuerpos en fluidos lumbales del tracto femenino de monos y ratones después de la inmunización intravaginal disminuyen en comparación con títulos producidos por inmunización sistémica (Yang y Schumacher, 1979; Parr y cols., 1988a, Thapar y cols., 1990b, 1991). Los adyuvantes tales como el hidróxido de aluminio y lípido A, aumentan la respuesta inmune local por inmunización intravaginal con grandes dosis de ferritina de caballo en el ratón, pero los títulos específicos de IgA observados en fluido vaginal fueron ligeramente mas altos, que los obtenidos por inmunización parenteral con dosis únicas de ferritina, los títulos de IgG fueron disminuidos (Thapar y cols., 1990a).

La respuesta inmune relativamente débil, que se produce después de la inmunización local en el utero o vagina con antígenos no invasivos es probablemente causado por la incapacidad del antígeno para penetrar el epitelio luminal y por la pérdida del antígeno del tracto genital. La respuesta que se logra mediante inmunización intravaginal en el ratón puede ser más alta si los animales fueran inmunizados durante el diestro o en embarazo temprano donde la penetración de proteínas al epitelio vaginal es mayor (Parr y Parr, 1990). Edwards (1960) reporta que la inmunización vaginal del conejo con espermatozoides durante el embarazo temprano dará una respuesta inmune mayor que la inmunización en etapa del estro. La respuesta también puede ser mayor por el uso de microesferas bioadesivas y agentes que aumentan la absorción, los cuales promueven la absorción y retención de proteínas sobre la superficie mucosa (Illum y cols., 1990).

En contraste a los antígenos proteicos, los microorganismos invasivos si pueden penetrar al epitelio del tracto reproductivo. Se ha estudiado la infección vaginal con HSV2 en el ratón, usando una cepa viral aislada de humanos y adaptada al ratón ; el virus causa enfermedad neurológica letal en el ratón después de la inoculación intravaginal, pero una cepa atenuada solo causa una infección vaginal pasajera y es incapaz de provocar daño neurológico letal. La inoculación intravaginal con virus atenuado induce inmunidad protectora a una infección letal subsecuente con virus tipo silvestre (Mc Dermott y cols., 1984,1987, 1990; Mc Dermott y Sved, 1989).

La infección del tracto genital femenino puede ser marcadamente dependiente del estado del proceso reproductivo por ejemplo la infección intravaginal con HSV2 esta aumentada en ratonas embarazadas o adultas tratados con progesterona (Baker y Plotkin, 1978) y la infección genital de ratón con *Chlamydia trachomatis* requiere pretratamiento con un progestageno (Tuffrey y cols., 1986).

Se sugiere que la inmunización en el intestino el cual tiene células epiteliales especializadas en el transporte de antígeno, efectivamente puede generar una respuesta inmune en el tracto genital. Esta relación ha sido ilustrada por varios estudios; anticuerpos específicos IgA en lavados uterinos de ratón fueron producidos por dos inmunizaciones orales con una vacuna de influenza viva (Briese y cols., 1987). La vacunación oral de cuyos con HSV1 desarrollo protección contra la reinfección intravaginal con HSV2, probablemente por causa de la similitud antigénica de los dos virus (Sturm y Scheweis, 1978). Una vacuna de *Chlamydia* viva administrada oralmente resulta ser efectiva contra retos ocular y vaginal con organismos homólogos en cuyos (Nichols y cols., 1975), y contra el reto vaginal y pulmonar en ratón (La Scolea y cols., 1991). La inmunización oral de ratas con espermatozoides causa reducida fecundidad (Allardyce, 1984). Sin embargo la inmunización oral de ratón con una gran dosis de ferritina de caballo (5mg) sin adyuvante no causa una respuesta detectable en lavados vaginales, aunque sí prepara al ratón para un levantamiento vaginal (Parr y cols., 1988a). El título de IgA en fluido vaginal de ratón después de la inmunización oral y vaginal fue aproximadamente igual a la producida por una única inmunización paraenteral de ferritina con adyuvante completo de Freund's. La inmunización oral con grandes dosis de ferritina también causa una respuesta IgA detectable, pero no IgG en fluido uterino (Parr y Parr, 1990). La magnitud de esta respuesta IgA no fue tan grande como aquella producida por otras vías de inmunización. En general, la respuesta inmune secretora en el intestino esta más desarrollada por la replicación de microorganismos (Mestecky y Mc Ghee, 1987), la mayor parte de antígenos no replicables no estimula una respuesta inmune vigorosa en el intestino (Waldman y Ganguly, 1974 ; Fuhrman y Cebra, 1981 ; Nicklin y Miller ; Elson y Ealdin, 1984 ; Dahlgren y cols., 1986), quizá por causa de la digestión de antígenos en el intestino, el complejo con anticuerpos resistentes o la falla al penetrar a la capa de moco que cubre el epitelio (Mestecky y Mc Ghee, 1987), a pesar de esas limitaciones las ventajas de la vacuna oral para generar una respuesta inmune en el tracto genital son obvias. Un acercamiento para mejorar la respuesta en el intestino es el uso de microparticulas conteniendo antígenos los cuales son transportados a través de células M hacia las placas de Peyers (Eldridge y cols., 1990).

La inmunización paraenteral generalmente esta asociada con la respuesta a IgG en suero y poca IgA secretora. Sin embargo pocos reportes sugieren que la inmunización parenteral en la vecindad de un órgano mucoso puede producir IgA en secreciones por esa vía (Thapar y cols., 1990b).

La inmunización de ratones hembras en dos sitios parenterales en la pelvis: en el espacio subseroso o el espacio presacral; con ferritina de caballo adsorbida en hidróxido de aluminio o con un complejo inmunostimulante Quil A (ISCOM) que contiene proteínas de membrana de eritrocitos de camero, causa un mayor aumento y mejora la títulos de IgA sostenidos en fluido vaginal que la inmunización parenteral en sitios no pélvicos. Todas las inmunizaciones paraenterales, en la pelvis o en cualquiera otra parte generan títulos de IgG similares en el fluido vaginal (Thapar y cols., 1990b, 1991).

Las bases inmunológicas de respuesta de IgA en tracto reproductor femenino después de la inmunización paraenteral en la pelvis no están bien entendidas, pero respuestas semejantes

son probablemente generadas por los nódulos linfáticos iliaco o para-aorticos que drenan en el tracto reproductor (Thapar y cols., 1990b). Los nódulos linfáticos que drenan en tejidos mucosos semejantes a los del pulmón y del tracto genital femenino pueden diferir a aquellos nódulos linfáticos que drenan en el tejido no mucoso.

La respuesta isotípica y los títulos dependen del sitio de inmunización en el tracto genital del murino. La respuesta de IgA e IgG con la inmunización subcutánea seguida por la intravaginal, la inmunización presacral también produce una respuesta similar a IgA; solo se produjo en el fluido uterino por inmunización intragástrica o grandes dosis de antígeno principalmente en la vagina (Parr y Parr, 1990).

La inmunización local del tracto digestivo o respiratorio puede ser un camino efectivo para estimular la respuesta inmune secretora a esos sitios, pero la inmunización en el tracto reproductivo de la hembra bajo condiciones fisiológicas son de poco éxito o no se producen anticuerpos específicos en secreciones del tracto genital.

La vía oral es la ruta preferida para administrar vacunas y así proteger de infecciones en el tracto gastrointestinal, pero no es ideal para proteger el tracto respiratorio o urogenital. Estudios recientes demuestran que la inmunización vaginal puede ser mejor que la oral para inducir anticuerpos específicos en secreciones cervicales y vaginales (Di Tomaso y cols., 1996; Johansson y cols., 1998; Wassen y cols., 1996) y la inmunización nasal en animales ha sido superior que la inmunización oral para la estimulación en la producción de anticuerpos locales en la mucosa aérea (Bergquist, 1995; Hopkins y cols., 1995). Notablemente la inmunización nasal también induce respuesta de anticuerpos en la vagina, tanto en los animales como en los humanos, el cual ha hecho que sea una vía atractiva para la futura vacunación contra enfermedades transmitidas sexualmente (Di Tomasso y cols., 1996; Hopkins y cols., 1995; Johansson y cols., 1998; Russell, 1996).

La inmunización rectal es superior a otras rutas o vías para la inducción de altos niveles de IgA e IgG en secreciones rectales, pero fue menos efectivo para generar anticuerpos en el tracto genital femenino (secreciones). Sólo la inmunización vaginal aumenta la IgA e IgG tanto en cervix como en vagina (Kozlowski y cols., 1997).

Elementos Inmunológicos del Tracto Reproductor Femenino

Vagina

Existen glándulas definidas, pero son raras, excepto por el aparato paravestibular, tales como las glándulas de Bartholin's y vestibulares como fuentes de secreción. El estroma de la vagina es notable por los poca IgG, linfocitos intraepiteliales CD8+ ocasionales y algunas células procesadoras de antígeno (Kutteh y cols, 1988; Ogra y cols, 1981). Los linfáticos de la vagina son abundantes e indican el proceso y distribución del antígeno, el cual a su vez podría estimular los tejidos linfoides locales (Head y Billingham, 1986).

Estudios en mujeres y ratonas histerectomizadas indican que en fluidos vaginales la mayoría de IgA se origina en útero y cervix; mientras que IgG es de origen vaginal (Jalanti e Isliker, 1977; Parr y Parr, 1990). En fluido vaginal puro predomina IgG con pequeñas cantidades de IgA. Durante el ciclo menstrual, cuando se da el cambio de fase folicular a fase lutea las concentraciones de IgG se incrementan (Usala y cols., 1989)

Cervix

El estroma cervical tiene un alto número de inmunocitos en el tracto genital (Kutteh y cols., 1988). La mayoría de las células plasmáticas son IgA positivas con un aumento en la concentración de células IgA2 similares a las del colon. El epitelio endocervical tiñe de componente secretor a la superficie basolateral (Mestecky y cols., 1990; Rebello y cols., 1975). La síntesis de componente secretor puede ser regulada por citocinas liberadas por células inmunes en respuesta a la inflamación local. Se han identificado en modelos humanos y animales elementos celulares para el procesamiento del antígeno por el tejido epitelial cervical, pero los mecanismos de procesamiento del antígeno están mal definidos en la unión cervico-vaginal.

La IgG es el mayor componente de las secreciones cervico-vaginales con proporción IgG/IgA variando con la exposición del cervix. La IgG aumenta con la inflamación e infecciones; IgA aumenta en el embarazo y displasia cervical y disminuye después de la menopausia (Govers y Girard, 1972).

El epitelio cervical tiene una zona de transformación el cual parece estar influenciado por hormonas sexuales esteroides. También, bajo control hormonal esta la secreción cervical, el cual a mitad del ciclo tiene un volumen máximo, pero las concentraciones de los componentes inmunes y no inmunes son mínimas.

Utero

El epitelio glandular del útero experimenta un ciclo constante de crecimiento, maduración y degeneración en respuesta al ciclo de esteroides sexuales durante la ovulación. Aunque la población celular mononuclear del endometrio humano, se pierde continuamente en cada ciclo menstrual parece ser restaurada en parte por la actividad proliferativa de una población celular remanente (Tabibzadeh, 1990).

Las células T presentes en el estroma están difusas por todo el tejido con 10 a 15% siendo positivas por antígenos leucocitarios comunes T3 con T8 (supresor/citotóxicos), dominando T4 (cooperador) (Kamat e Isaacson, 1989). Los linfocitos endometriales intraepiteliales aumentan en número durante la fase secretora y la implantación temprana.

Las células plasmáticas infiltradas en endometrio de ratones parece ser que incrementan por estrógenos o bien por el proestro y disminuyen por la progesterona o el diestro (Canning y Billington, 1983).

Oviducto

Se ha demostrado que existe, producción de componente secretor y células plasmáticas IgA en las trompas de falopio y se ha visto que estos componentes se aumentaron como parte de la respuesta inflamatoria. Estudios en monos rhesus sugieren que los niveles de anticuerpos IgA e IgG reflejan títulos en el suero y es influenciado por hormonas gonadales.

Secreciones

El moco cervical contiene lisozima, inhibidores de tripsina, albúmina y lactoferrina; los cuales varían con la ovulación y aumentan agudamente durante la fase secretora del ciclo menstrual (Schumacher, 1968, 1970) los niveles de inmunoglobulinas cervicales parece ser independientes de la concentración de albúmina.

Las secreciones de los oviductos, el cervix y la vagina contienen cantidades significantes de IgA e IgG mientras que las secreciones uterinas generalmente tienen niveles bajos de IgG. Es raro encontrar IgM en cualquiera de las secreciones antes mencionadas, excepto bajo condiciones inflamatorias. El cervix es la mayor fuente de secreción de inmunoglobulinas, contiene muchas células plasmáticas de los diferentes isotipos distribuidas en el tejido de mucosas. En secreciones cervicales y vaginales de mujeres se ha encontrado que contienen anticuerpos séricos (IgG) y secretores (IgA y ocasionalmente IgM), contra varios agentes infecciosos, así como contra células espermáticas (Archibald y cols., 1987; Merriman y cols., 1984; O'Reilly y cols., 1976; Richmond y cols., 1988; Terho y Meurman, 1981).

Respuesta Inmune en Diestro y Estro

Los títulos de la IgA en lavados vaginales son más altos en el estro que en el diestro o en el proestro; en tanto que la IgG es más alta durante el diestro que el estro. La infección con HSV-2 es sólo susceptible intravaginalmente durante el diestro y los niveles de anticuerpos en el tracto genital dependen del estado en que se encuentre el ciclo estral (Gallichan y Rosenthal, 1996).

El análisis Inmunohistoquímico demuestra que es dependiente de los cambios del ciclo en la población celular inmune del útero y la vagina: macrófagos, granulocitos, epitelio glandular y células dendríticas está presentes en gran número en el estroma del endometrio y alrededor del epitelio en el útero en la etapa del estro cuando los niveles del estradiol son altos, relacionados con el diestro cuando los niveles de estrógenos son bajos y la progesterona es la hormona predominante (Kaustic y cols., 1998). En otros experimentos cuando las ratas fueron infectadas en estro y diestro con *Chlamidia* sin previo tratamiento con progesterona, no fueron detectados tampoco ni en útero ni en vagina; pero cuando las ratas son tratadas con progesterona e inoculadas por instilación de *Chlamidia trachomatis* (mouse pneumonitis strain MoPn) en cada cuerno uterino a los 14 días post-infección, ambos: útero y vagina fueron positivos comparados con los de las ratas tratadas con solución salina (Kaushic y cols., 1998; Murdin, 1998). El efecto de la madurez sexual sobre la susceptibilidad del ratón a las infecciones genitales por herpes virus fué analizado durante las 4 etapas del ciclo estral e inoculados intravaginalmente con varias dosis de Herpes simple-2 (HSV-2) cadena 186; ya muertas las ratas, observaron como indicadores de susceptibilidad como sigue: proestro 33%, estro 16%, metaestro 9% y diestro 75%, para determinar el curso de infección en las diferentes etapas usaron cotonetes para coleccionar especímenes vaginales varias veces post-inoculación para titulación del virus, los ratones durante el diestro fueron positivos al virus a las 6 horas post-inoculación y los títulos aumentaron por él 3° día periodo, y en otras etapas la respuesta se vio después de las 6 horas brevemente (Teepe y cols., 1990).

Se ha demostrado que el ciclo estral y el tratamiento hormonal regulan la presencia de células en el tracto reproductor femenino ya que las hormonas influyen en la respuesta celular del bazo a los mitógenos y varía con el ciclo estral, y la administración de estradiol a hembras ovariectomizadas aumenta la respuesta mitogénica de células del bazo a linfocitos B y T mitogénico (Prabhala y Wira, 1995). En otros estudios cuando a ratas ovariectomizadas se administra estradiol por 3 días y miden pIgR y el mRNA a las 4 y 12 horas después de la inyección los niveles de pIgR y mRNA son altos comparados con los controles tratados con solución salina; los niveles altos de pIgR fueron detectados en células epiteliales y secreciones uterinas; pero cuando el estradiol y la progesterona son dados en combinación, la progesterona parcialmente revierte (antagoniza) el efecto de estradiol sobre los niveles pIgR y mRNA y la expresión de pIgR en células epiteliales (Kaushic y Richardson, 1995).

Ciclo Estral en Roedores.

Los roedores como la rata y el ratón tienen un ciclo estral de 4 a 6 días de duración; el ciclo en animales en cautiverio ocurre a lo largo de todo el año, interrumpiéndose solamente en caso de preñez. Estos ciclos son de corta duración, lo cual se debe a que los cuerpos lúteos que se forman después de la ovulación nunca son funcionales, pero si hay preñez, este fenómeno estimula el desarrollo de un cuerpo lúteo funcional. El ciclo estral suele dividirse en varias fases sucesivas (proestro, estro, metaestro y diestro), cada una de las cuales presenta cambios característicos en la estructura y el funcionamiento de los órganos sexuales. En los roedores podemos reconocer fácilmente estas fases, examinando al microscopio las células que se exfolian de la vagina (Fujji, 1986), dichas fases se describen a continuación se observa en la figura 1.

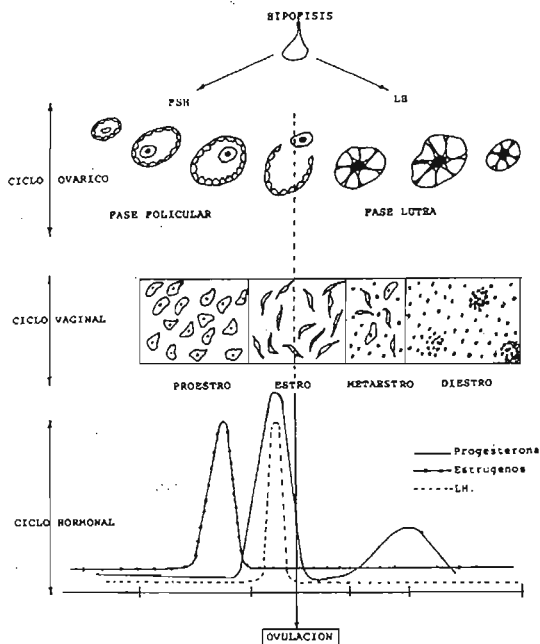


FIGURA 1. REPRESENTACION ESQUEMATICA DEL CICLO SEXUAL EN RATAS. (Tomado de Sadleir 1982 y Litter 1988).

a).- Proestro. Tiene una duración de 12 horas aproximadamente y es básicamente un periodo de preparación durante el cual crecen los folículos que están madurando y hay un incremento en la liberación de estrógenos, la secreción de esta hormona hace que la pared del útero se hidrate y el líquido distienda su cavidad, mientras que las células del epitelio vaginal se multiplican formando una capa gruesa de células epiteliales no cornificadas, cuyas células externas se desprenden: de este modo el frotis vaginal característico de esta etapa contiene células nucleadas sin leucocitos; como se observa en la figura 1. La secreción de 17 β -estradiol de los folículos de Von Graaf alcanza sus valores máximos, lo que desencadena un incremento preovulatorio de hormona luteinizante (LH) que induce la ovulación, la cual ocurre en la siguiente etapa del ciclo. Las concentraciones sanguíneas de LH y prolactina también se elevan hacia el final del proestro (Barrington, 1975; McCormack, 1974; Song, 1980).

b).- Estro. Dura aproximadamente 12 horas: es el periodo de receptividad sexual o etapa de calor o celo. En esta fase la hembra acepta al macho para copular y en ella ocurre la ovulación, como consecuencia de la acción hormonal. Los óvulos penetran en los oviductos en el momento más apropiado para que la fecundación sea probable. Durante el estro, el lumen uterino permanece distendido, pero tiene lugar una degeneración parcial de su epitelio, mientras que la creciente cornificación del epitelio vaginal provoca que en el frotis vaginal se observen principalmente células cornificadas y no nucleadas. Además los folículos cuya ovulación va a tener lugar en el estro siguiente inician su crecimiento. La concentración de progesterona en el plasma, presenta un pico de máxima secreción (Barrington, 1975; McCormack, 1974; Song, 1980).

c).- Metaestro. Con una duración de unas 21 horas aproximadamente; esta señalada por la invasión de leucocitos en el epitelio vaginal, por lo cual esas células predominan en los frotis vaginales, aunque también aparecen algunas células cornificadas y algunas nucleadas. El tamaño del útero se reduce al acercarse la etapa de descanso característico del diestro, produciéndose entonces una disminución notable en la secreción de estrógenos en el ovario (Barrington, 1975; McCormack, 1974; Song, 1980).

d).- Diestro. Dura aproximadamente 57 horas: es una etapa que se caracteriza por la presencia de células nucleadas junto con leucocitos en los frotis vaginales y por la formación de cuerpos lúteos en el ovario; estos sin embargo carecen prácticamente de función en la rata y el ratón y comienza a degenerar a los tres días de la ovulación lo cual hace que el ciclo estrual de los animales tenga una duración corta. En realidad en las hembras de esta especie que no se han apareado, el ciclo es puramente folicular (Barrington, 1975; McCormack, 1974; Song, 1980).

Tabla I. Tipos celulares en frotis vaginales de ratón, detectados en las diferentes etapas del ciclo estral.

ETAPA DEL CICLO	TIPO DE CELULAS
Proestro	Epiteliales no cornificadas
Estro	Cornificadas no nucleadas
Metaestro	Leucocitos, Cornificadas y Nucleadas
Diestro	Leucocitos

4.-Generalidades de estrógenos

Los estrógenos se originan en el folículo de Von Graaf debido a una acción conjunta entre las células de la teca interna y de la granulosa durante la fase folicular del ovario. Asimismo se producen en las fase progestacional del ciclo estral y menstrual, formándose entonces por las células tecales del cuerpo amarillo. En las hembras preñadas, los estrógenos provienen de la placenta y del cuerpo luteo, mientras que en los machos se producen en el testículo y en la corteza suprarrenal. La acción fundamental de los estrógenos es estimular el desarrollo y mantenimiento de los órganos accesorios de la reproducción como son: oviducto, útero, vagina, genitales externos y de los caracteres sexuales secundarios femeninos.

Tanto los estrógenos como la progesterona intervienen en el desarrollo continuo del útero y de las glándulas mamarias. Los estrógenos actúan como hormona de crecimiento específico de la masa muscular uterina y contribuyen así a la fuerza contráctil que se necesitará en última instancia para expulsar el feto en el momento de parto.

En los mamíferos inferiores los estrógenos desencadenan el inicio del estro, el cual es evidente en la mucosa vaginal.

JUSTIFICACIÓN

Ya que las superficies mucosas son los sitios donde más frecuentemente ocurre el primer contacto entre el huésped y las enfermedades sexuales, se requieren estudios de estrategias de vacunación que induzcan tanto inmunidad en mucosas, como a nivel sistémico. Debido a que generalmente la inmunización sistémica es inefectiva para la inducción de respuestas inmune en mucosas, se han evaluado otras estrategias y la mayoría se ha enfocado al desarrollo de vacunas, como la oral pero por esta ruta las respuestas obtenidas son pobres o de corta duración y no se induce una respuesta en el tracto genitourinario y del recto.

Sin embargo tales vacunas no están actualmente disponibles, debido en parte a la falta de información acerca de cómo logra estimular mejor tales respuestas. La inmunización en la mucosa vaginal para inducir respuestas de anticuerpos locales ha dado resultados variables, se han reportado fluctuaciones en la distribución de células plasmáticas genitales y en los niveles de anticuerpos uterinos durante las diferentes etapas del ciclo estral. En base a las observaciones mencionadas, es claro que la evaluación de la inmunidad humoral en el tracto genital se debe tomar en cuenta las fluctuaciones en los niveles de anticuerpos específicos como una función del ciclo estral o menstrual. Por lo tanto, el presente trabajo se diseñó para determinar si la etapa del ciclo estral (estro o diestro) modificaba las respuestas inmunes mucosas y sistémicas inducidas por la inmunización intraperitoneal y vaginal de ratones con la protoxina Cry 1Ac.

HIPÓTESIS:

La respuesta de anticuerpos específicos inducida en suero y en secreciones de mucosas vaginales e intestinales inducida por administración de Cry 1Ac en estro y diestro por las vías intraperitoneal e intravaginal, no varía significativamente con el ciclo estral en ratones hembra.

OBJETIVOS:

OBJETIVO GENERAL:

Analizar la respuesta específica de anticuerpos inducida en vagina, suero e intestino grueso en el estro y en el diestro, por la inmunización intraperitoneal e intra vaginal con Cry1Ac en estro ó diestro de ratones hembra.

OBJETIVOS PARTICULARES:

Determinar si la inmunización vaginal e intraperitoneal en diestro ó estro con la protoxina Cry 1Ac induce respuestas de anticuerpos IgA, IgG e IgM en suero, intestino grueso y vagina.

Determinar si la posible respuesta de anticuerpos inducida en suero, intestino grueso y vagina varía dependiendo de la ruta de inmunización.

Determinar si las dos etapas del ciclo estral (estro ó diestro) modifican la respuesta inmune sistémica y mucosa inducida por inmunización intraperitoneal e intravaginal con protoxina Cry1Ac

Analizar la respuesta específica de anticuerpos inducida en vagina, suero e intestino grueso o bajo la influencia de hormonas sexuales.

METODOLOGÍA

Se utilizaron 30 ratones hembras de la cepa Balb/c de 3 meses de edad, distribuidos en 6 grupos. Cada grupo experimental se formó por cinco animales a los cuales se les aplicaron tres dosis de Cry 1 Ac en etapa de estro o diestro como sigue: Se tomó el frotis por lo menos durante dos semanas, para asegurar ciclicidad, y cuando estuvieron en la etapa deseada, fueron inmunizados. El estado del ciclo estral se determinó por observación al microscopio de células vaginales obtenidas mediante lavados vaginales con solución salina (Teepe y cols., 1990) para poder agrupar los animales; en el ESTRO se observan células epiteliales cornificadas y no nucleadas; en el DIESTRO predominan los leucocitos (Snell, 1941). El grupo 1 se inmunizó por vía intraperitoneal en etapa de diestro; el grupo 2 se inmunizó intraperitonealmente en etapa de estro; el grupo 3 se inmunizó intravaginalmente en etapa de diestro; y el grupo 4 se inmunizó intravaginalmente en etapa de estro. Se consideró 10 ratones hembras no inmunizadas, 5 en estro y 5 en diestro, como grupo control.

Los ratones se inmunizaron con 100 µg de Cry 1 Ac disuelto en 25 µl de buffer de fosfatos (PBS) por la vía vaginal; o en 100 µl de PBS para ser administrado por la vía intraperitoneal. Los ratones se inmunizaron intravaginalmente o intraperitonealmente una vez por semana y se sacrificaron 7 días después de la última inmunización y se tomaron las muestras de suero, fluido vaginal e intestinal. Para la inmunización vaginal los ratones se pusieron boca abajo en un "sujetador" por 15 minutos para reducir el riesgo de que se salga lo inoculado.

TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS:

- 1) Fluido vaginal.- antes del sacrificio de las hembras se procedió a hacer 5 lavados vaginales con medio RPMI + gentamicina (40mg/ml) resuspendiendo 3 veces el medio intravaginalmente, posteriormente el fluido obtenido se centrifugó a 8000/rpm durante 10 minutos para obtener el sobrenadante.
 - 2) Suero.- se obtuvieron por centrifugación a 8000/rpm durante 10 minutos a partir de sangre extraída mediante punción cardíaca con el animal anestesiado.
 - 3) Líquido intestinal .- se obtuvo el intestino grueso y se lavó con 3 ml de RPMI + gentamicina (40mg/ml) + un inhibidor de proteasas (ácido P-hidroximercuribenzoico 0.036 + trisma base 0.018g/ml a pH 8.0) posteriormente el líquido obtenido se centrifugó a 8000/rpm durante 10 minutos para obtener el sobrenadante.
- Todas las muestras se mantuvieron - 20 grados hasta su utilización

PRUEBA DE ELISAS:

Se utilizaron placas con 96 pozos cada una (metrix) las cuales fueron recubiertas con 25µl de protoxina Cry 10 ml amortiguador de carbonatos (0.1 M pH 9.6) en un volumen final de 100µl por pozo, las placas se incubaron a 4 °C durante 24 horas, posteriormente se lavaron 3 veces con solución amortiguadora con fosfatos (PBS) y Tween 20 al 0.05% (PBS-T) El bloqueo de los sitios reactivos se realizó con 100 µl de leche descremada (Svelty) al 6% en PBS-T durante 2 horas.

Se lavó con PBS-Tween20 por 3 veces y dejar con PBS-T hasta tener listas las muestras.

Para la prueba de ELISA, las muestras se trataron como sigue:

- * Suero: se diluyeron en una porción 1:50 con leche descremada al 1% con PBS-T.
- * Líquido intestinal: se diluyeron con leche descremada al 30% con PBS-T quedando una dilución 1:50.
- * Fluidos vaginales: se ajustaron a un volumen de 150 µl para poner en 3 pozos 50 µl de cada uno.

Todas las muestras se trabajaron por duplicado.

Se incubaron las placas 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 e IgM y se dejaron incubar durante 2 horas, los anticuerpos se diluyeron con PBS- Leche descremada al 1% (IgA 1:1000, IgG 1:6400. IgM 1:6400), se lavaron las placas 3 veces con PBS-T, se incubaron con el medio de reacción (100µl por pozo) que contenía 0.5µg/ml de o-fenildiamina, 0.01% de H₂O₂ en amortiguador de citratos (0.05M, pH5.2) durante 30 minutos. Transcurrido el tiempo se detuvo la reacción con 50 µl por pozo de H₂SO₄ (1.5M) para IgG e IgM a los 10 minutos, IgM a los 20 minutos y se procedió a registrar la absorbancia de las muestras a 492 nm en un lector de Elisa Biorad (Thompson,1981).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO:

Después de haber obtenido las absorbancia de las muestras se procedió a calcular las medias y las desviaciones estándar para posteriormente graficarlas.

Los distintos grupos fueron tratados con ANOVA simple, seguida de la prueba de Tukey. Se consideró una significancia (<) de 0.05.

RESULTADOS

Sueros.

ANTICUERPOS ANTI Cry 1Ac EN SUERO:

La administración de Cry 1 Ac por las vías intraperitoneal e intravaginal indujo una respuesta significativa de anticuerpos IgG, IgM e IgA en suero de ratona. El análisis por ELISA demostró que mediante la inmunización de ratones hembra con Cry 1 Ac se induce una alta respuesta de anticuerpos tipo IgG e IgM anti-Cry 1Ac en suero (Fig.2) por la vía de inmunización intraperitoneal; y por la vía en que se detectó más baja respuesta fue por la vía vaginal. El isotipo que predominó en la vía intraperitoneal fue IgG seguido por IgM y finalmente por una moderada respuesta de IgA (Fig.2). La respuesta de IgG e IgA en suero inducida por ambas vías tanto intraperitoneal como intravaginal no fué influenciada por el ciclo estral, pero en ambas la respuesta de IgM fue un poco más alta en el estro que en diestro (P < 0.05)

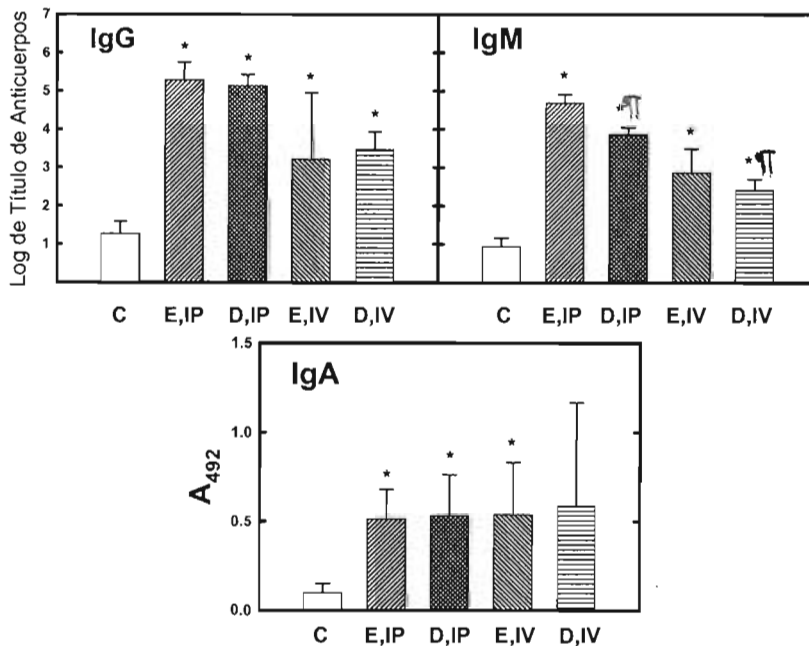


Fig. 2. Detección de anticuerpos Anti-Cry1Ac en suero. Se inmunizó un grupo de 5 ratones hembra Balb/c en 2 etapas del ciclo estral: Estro (E) y Diestro (D) por 2 vías de inmunización intravaginal (iv) e intraperitoneal (ip) las hembras recibieron 1 dosis semanal durante 3 semanas de 100 µg de Cry 1Ac y fueron sacrificados 7 días después de la última inmunización. Los ratones que no se inmunizaron sirvieron de controles (C). Se determinó por ELISA la respuesta de anticuerpos IgG, IgM e IgA Anti-Cry 1Ac. Los anticuerpos Anti-Cry 1Ac: tipo IgG e IgM fueron expresados por titulación de anticuerpos (El logaritmo de su punto final de dilución). El anticuerpo IgA Anti-Cry1Ac es expresado por lectura de absorbancia A_{492nm}. Las barras representan la media ± D.E. de cada grupo experimental (N=5). Los resultados fueron comparados con ANOVA simple, seguido de la prueba Tukey s. * P < 0.05 con respecto al control, ¶ P < 0.05 con respecto a la etapa del ciclo estral y § P < 0.05 con respecto a la vía de inmunización.

ANTICUERPOS VAGINALES ANTI-Cry 1Ac.

La respuesta de IgA en lavados de fluido vaginal inducida por ambas vías: intraperitoneal e intravaginal fue moderada. La magnitud de la respuesta a IgA por ambas vías tanto intraperitoneal como intravaginal fue similar en las dos etapas del ciclo estral, por lo cual suponemos que no influye la vía de administración. (Fig.3).

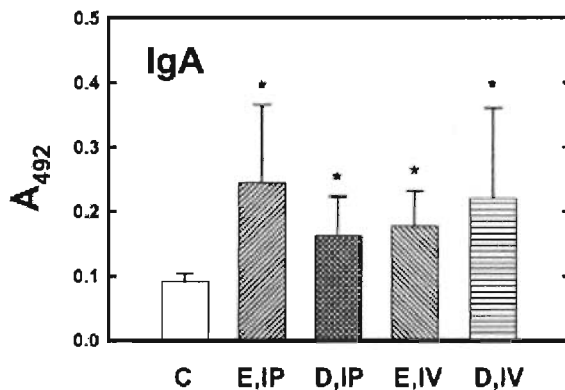


Fig.3 Detección de anticuerpos Anti-Cry 1Ac en lavados vaginales. Se inmunizó un grupo de 5 ratones hembra Balb/c en 2 etapas del ciclo estral: Estro (E) y Diestro (D) por 2 vías, intravaginal (iv) e intraperitoneal (ip). Las hembras recibieron 1 dosis semanal durante 3 semanas de 25 µg de Cry 1Ac y fueron sacrificadas 7 días después de la última inmunización y los no inmunizados sirvieron de controles (C). Se determinaron por ELISA los anticuerpos IgG, IgM e IgA Anti-Cry 1Ac. Ya que no hay diferencias entre los grupos para IgG e IgM, no están representados. El anticuerpo IgA Anti-Cry 1Ac es expresado como A₄₉₂nm. Las barras representan la media ± D.E de cada grupo experimental (N=5). Los resultados fueron analizados por ANOVA simple, seguido de la prueba de Tukey s. * P < 0.05 con respecto al control.

ANTICUERPOS DE LÍQUIDO DE INTESTINO GRUESO ANTI-Cry 1Ac

Por ambas vías de inmunización tanto la intraperitoneal como la intravaginal se detectó respuesta de anticuerpos anti-Cry 1 Ac de los isotipos IgA e IgM en intestino grueso (Fig. 4). En relación con la respuesta total anti-Cry 1Ac se observó que en ambas vías: intraperitoneal e intravaginal hubo una respuesta alta y similar entre ellas en cuanto a su magnitud, y la mejor respuesta y un poco más alta fue del isotipo IgA comparado con el isotipo IgM. En ninguna de las dos respuestas, ni para el isotipo IgA inducido por vía vaginal, ni la respuesta del isotipo IgM inducido por ambas vías: intraperitoneal e intravaginal varió con el ciclo estral; con excepción de la vía intraperitoneal en la que se detectó respuesta de anticuerpos anti-Cry 1Ac del isotipo IgA el cual fue más alto en diestro que en el estro ($P < 0.05$).

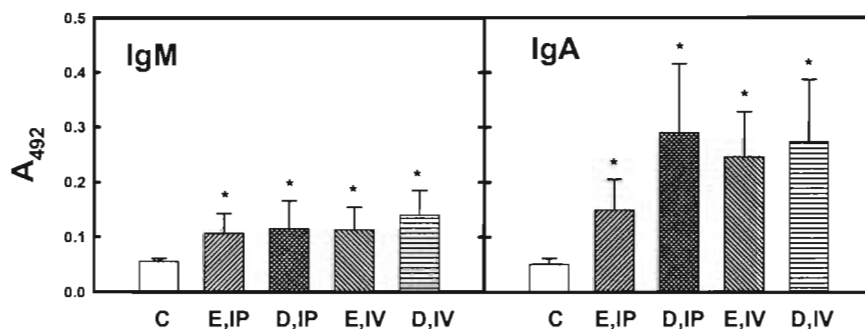


Fig.4 Detección de anticuerpos Anti-Cry 1Ac de líquido intestinal. . Se inmunizó un grupo de 5 ratones hembra Balb/c en 2 etapas del ciclo estral: Estro (E) y Diestro (D) por 2 vías, intravaginal (iv) e intraperitoneal (ip). Las hembras recibieron 1 dosis semanal durante 3 semanas de 100 μ g de Cry 1Ac y fueron sacrificadas 7 días después de la última inmunización y los que no se inmunizaron sirvieron de control (C). Se determinó por ELISA la respuesta de anticuerpos IgG, IgM e IgA. Ya que IgG no muestra ninguna diferencia no representada. Los anticuerpos Anti-Cry 1Ac IgM e IgA son representados como manómetros de lectura de Elisa A492. Las barras representan la media \pm D.E de cada grupo experimental (N=5). Los resultados fueron comparados con ANOVA simple, seguido de la prueba de Tukey . * $P < 0.05$ con respecto al control; ¶ $P < 0.05$ con respecto al ciclo estral.

NIVELES DE INMUNOGLOBULINAS TOTALES EN VAGINA DURANTE EL CICLO ESTRUAL.

Los niveles de inmunoglobulinas fueron medidos en muestras de secreciones vaginales tomadas durante las diferentes etapas del ciclo estrual del ratón para determinar la pérdida de variación cíclica en la respuesta única a anticuerpos específicos con el antígeno usado. Los niveles de IgA e IgG fueron altos durante el proestro, siguen altos durante el estro, decaen en el metaestro y son más bajos en diestro. Mientras los niveles de IgG fueron más altos sólo en proestro, decaen en el estro y quedan bajos durante metaestro y diestro. (Fig. 5).

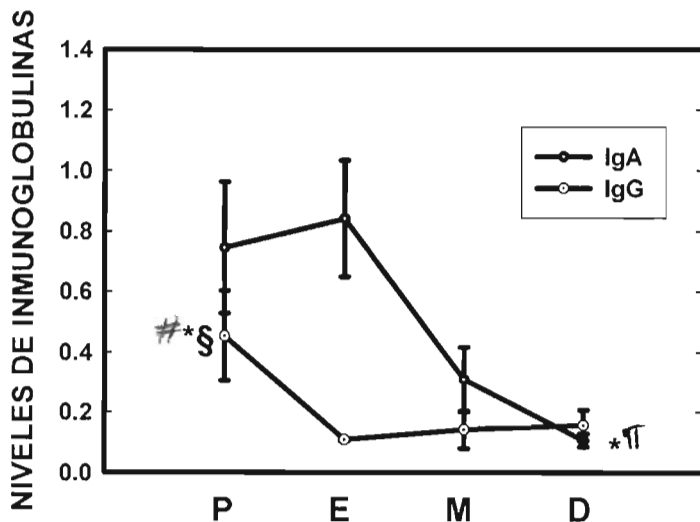


Fig.5 Los niveles vaginales de IgG e IgA en ratones hembras maduras, a lo largo del ciclo estral. Los valores que muestran la media \pm D.E de por lo menos 5 ratones normales. P: proestro, E: estro, M: metaestro y D: diestro. * P < 0.05 entre las etapas P y D; ¶ P < 0.05 entre las etapas E y D; § P < 0.05 entre las etapas P y E; # P < 0.05 entre las etapas P y M.

DISCUSIÓN

Se ha reportado que los niveles de inmunoglobulinas totales (Wira et al, 1977; 1980; 1999) y específicas (Gallichan y Rosenthal, 1996; Allardyce, 1984) en el tracto genital femenino cambian a lo largo del ciclo estral o por efecto de la influencia de hormonas sexuales (Wira et al., 1987; 1999). A la luz a esas observaciones, es claro que la evaluación de la inmunidad humoral en el tracto genital debe tomar en cuenta las fluctuaciones en los niveles de anticuerpos específicos como una función en el ciclo estral o menstrual. Algunos trabajos han analizado el efecto de estadio del ciclo estral en niveles de inmunoglobulinas totales en vagina, en útero y en suero (Wira y cols.,1977; 1980; 1999; Lü y cols.,1999 y Rosenthal y Gallichan, 1997); otros reportes han analizado la influencia del ciclo estral o menstrual sobre la respuesta a anticuerpos: a) sólo tomando en cuenta el estadio en la inmunización vaginal sencilla con bacterias vivas (Hopkins y cols.,1995) o por dos inmunizaciones orales con espermatozoides (Allardyce, 1984); ó b) solo considerando el estado del ciclo en el momento de analizar la respuesta inmune a anticuerpos inducida después de la inmunización intranasal con virus (Gallichan y Rosenthal, 1996) ó después de la inmunización intramuscular con toxoide tetánico y hemocina de luciérnaga junto con la inmunización oral con toxina de cólera (Lü y cols., 1999).

La influencia del tratamiento hormonal sobre la respuesta inmune específica (Wira y Sandoe, 1987, 1989) también ha sido analizada, así como con el efecto del ciclo sexual sobre la susceptibilidad a la infección con virus (Teepe y cols., 1990; Parr y Parr, 1997). Con objeto de determinar si los cambios en el grosor del epitelio vaginal (Parr y cols., 1994) o el estadio hormonal (Wira y cols., 1999) característicos del estro y diestro modifican significativamente la respuesta a anticuerpos, en el presente estudio la protoxina Cry 1Ac fué utilizada como un modelo inmunogénico en mucosas para valorar la respuesta en la producción de anticuerpos específicos en intestino grueso, vagina y suero por inducción por vía vaginal e intraperitoneal, en ratón. Nosotros probamos la influencia de tres inmunizaciones sobre la respuesta específica de los anticuerpos en las etapas de diestro y estro, que fueron las mismas en las que se aplicó el antígeno, y también son las etapas del ciclo estral en las que se ha reportado variación sobre los niveles totales de inmunoglobulinas (Wira y cols., 1977; 1980; 1999) o sobre la respuesta específica de anticuerpos (Gallichan y Rosenthal, 1996; Allardyce, 1984) producida en vagina. Tanto la inmunización intraperitoneal como la vaginal de las ratonas con Cry1Ac en estro o diestro, indujo respuesta específica de anticuerpos en intestino grueso, suero y vagina. El estadio del ciclo estral tiene poca o ninguna influencia en la respuesta inducida, ya que en el suero sólo la IgM se encontró ligeramente alta en el estro con respecto al diestro en respuesta a la inmunización por ambas vías, pero en el intestino grueso solo la respuesta a IgA por vía intraperitoneal tuvo cambios, siendo más alta en el diestro. En la vagina no hubo variaciones significativas de IgA por la vía intraperitoneal, siendo más alta en el estro que en el diestro. La inmunización en el tracto genital femenino bajo es difícil. La variación de los niveles de anticuerpos en el tracto genital femenino probablemente reflejan los cambios que ocurren en el tracto genital femenino durante el curso del ciclo estral. El número de células dendríticas, la permeabilidad del epitelio a proteínas y la habilidad de las células presentadoras de antígeno (APC) para presentar antígenos en la vagina y el útero varía con las etapas del ciclo estral y esta bajo regulación hormonal (Wira y cols., 1999,1995; Parr y Parr, 1990; Young y cols., 1985). Los niveles de CS en el tracto genital femenino cambian en las diferentes etapas del ciclo estral (Wira y cols., 1999; Sullivan y cols., 1983), de acuerdo a los cambios en los niveles totales de IgA en útero. En roedores el CS esta

presente en niveles altos en fluido uterino durante el proestro y estro (Sullivan y cols., 1983) y los niveles totales de IgA en secreciones uterinas de rata son altos en estro comparados con el diestro (Wira y Sandoe, 1977, 1980). Los niveles de IgG total muestran cambios con respecto al ciclo estral, con niveles más altos durante el proestro (Wira y Sandoe, 1977, 1980). La migración y localización de linfocitos dentro del tracto genital esta también influenciada por el ciclo estral, ya que aumenta el número de células precursoras plasmáticas secretoras de IgA derivadas de nódulos linfáticos periféricos (McDermott y cols., 1980) y células plasmáticas secretoras de IgA e IgG (Canning y Billington, 1983; Rachman y cols., 1983) son observados en tejido genital durante el estro y proestro y mínimos durante el metaestro y el diestro. Esos cambios cíclicos en niveles de CS y anticuerpos totales son observados también en humanos, sugiriendo que las hormonas que controlan el ciclo reproductivo están íntimamente relacionadas con esos cambios (Sullivan y cols., 1984; Bjercke y Brandtzaeg, 1993; Usala y cols., 1989). Efectivamente, se ha demostrado que la progesterona y los estrógenos son responsables de influenciar los niveles de CS y anticuerpos (McDermott y cols., 1980; Wira y Sandoe, 1977; Sullivan y cols., 1983), así como el número de células B en el tracto genital (McDermott y cols., 1980; Canning y Billington, 1983). Estos datos sugieren que la migración incrementada de células plasmáticas al tracto genital durante el proestro y el estro, y el incremento en la producción de CS en el epitelio uterino que fluctúa con el ciclo estral y esta asociado con la administración de estradiol pueden contribuir al incremento de IgA durante el estro. No obstante los presentes datos sugieren que los cambios que suceden en el epitelio vaginal durante el ciclo estral no influyen la captura de Cry 1Ac vía vaginal ya que la respuesta de anticuerpos en el estro y el diestro después de la inmunización vaginal en los mismos estadios del ciclo son iguales. En contraste algunos reportes apoyan que la inducción de respuesta inmune (Hopkins y cols., 1995) o infección (Teepe y cols., 1990; Parr y cols., 1994) por vía vaginal es mejor en diestro que en estro porque el grosor del epitelio es más delgado (Parr y cols., 1994) y los patógenos y los antígenos penetran más fácilmente o son captados por un número mayor de células de Langerhans (Young y cols., 1985). Por consiguiente, la inmunización vaginal con una vacuna recombinante para *Salmonella* dio dos respuestas diferentes en el ratón: alta y baja. El nivel de respuesta inmune específica se relaciona con la etapa sexual de la ratona al momento de la inmunización vaginal (Hopkins y cols., 1995) puesto que la respuesta inmune se logró sólo cuando el ratón estaba en la última fase del metaestro o inicio del diestro. Apoyando esos datos (Parr y Parr, 1990) muestran que los son tomados preferencialmente en diestro por las células de Langerhans en la vagina.

La respuesta de anticuerpos IgA e IgG (Wira y Sandoe, 1987, 1989) y la susceptibilidad a infección son controlados hormonalmente, no importando la vía de inmunización (Teepe y cols., 1990; Sano y cols., 1992). La resistencia no específica a la infección por *Paracoccidiosis brasiliensis* por vías diferentes, intravenosa, intraperitoneal e intratraqueal en ratones Balb/c fue influenciada por el ciclo estral y aumentada por estrógenos (Sano y cols., 1992). Después de la inmunización intranasal ó intravaginal de ratonas con HSV-2, con tratamiento con progesterona, o intravaginalmente con tratamiento con estradiol, la respuesta de IgG antiviral en suero e IgA antiviral mostrada en secreciones vaginales son similares, pero las inmunizaciones vaginales producen títulos altos de IgG en secreciones vaginales (Parr y Parr, 1999).

En ratones inmunizados intranasalmente con adenovirus recombinante glicoproteína B virus herpes simple, anticuerpos específicos IgG e IgA son inducidos en lavados vaginales (Gallichan y Rosenthal, 1996). Interesantemente los títulos específicos de IgA son más

altos durante el estro que el diestro y los títulos específicos de IgG son más altos durante el diestro que el estro. Esto fué demostrado también con ratones tratados hormonalmente donde la administración de progesterona induce un estado parecido al diestro y da como resultado un aumento de IgA e IgG (Gallichan y Rosenthal, 1996). En ratones tratados hormonalmente, se ha encontrado que el estradiol aumenta la respuesta inmune, mientras que con progesterona son más susceptibles a infección. (Teepe y cols., 1990; Sano y cols., 1992). Igualmente, se ha reportado que el estradiol aumenta los niveles de IgA e IgG en ratas ovariectomizadas, pero la progesterona no tiene efecto (Wira y Sandoe, 1980). La influencia del ciclo reproductivo sobre la respuesta inmune se ha reportado también en monos rhesus (Lü y cols., 1999). De acuerdo con algunos autores, se ha mostrado que ratones no inmunizados son susceptibles a infección con virus de herpes simple tipo 2 durante el diestro pero no en el estro (Teepe y cols., 1990; Parr y cols., 1994). La diferencia en grosor y permeabilidad del epitelio vaginal, así como la disponibilidad de receptores virales durante ese periodo pueden ser responsables ya que el tratamiento con progesterona induce en el ratón hembra un estado similar al diestro y los hace más susceptible a infección intravaginal con HSV-2. Las ratonas ovariectomizadas, las cuales tienen la mucosa vaginal parecida a la de ratones en diestro son altamente susceptibles a HSV-2 intravaginalmente inoculado, pero si reciben tratamiento con estradiol, que estimula la aparición de estro, se vuelven resistentes. Los efectos del ciclo estral, el embarazo y las hormonas sexuales sobre la infección por HSV-2 en un modelo de ratón indican que el estado hormonal de la hembra es un importante determinante de la infección vaginal puesto que ratonas adultas bajo tratamiento con progesterona son infectadas pero no ratones tratados con estradiol (Parr y cols., 1994). El tratamiento con progesterona aumenta la transmisión del virus de inmunodeficiencia en monos macacos. El epitelio de ratones bajo progesterona es permeable a una variedad de proteínas administradas intraluminalmente, pero el epitelio dominado por estrógenos no lo es (Parr y cols., 1994).

Para explicar porque no encontramos diferencias significativas en la respuesta de anticuerpos específicos después de inmunizar en el estro y el diestro, además de la posibilidad que el Cry 1Ac puede ser igualmente captado en ambas etapas del ciclo cuando es administrado por vía vaginal, debe ser tomado en cuenta que la respuesta inmune puede variar de acuerdo a la especie estudiada, la vía de administración y la dosis y tipo del antígeno (Moreno-Fierros y cols., 2001; Haneberg y cols., 1994; Wira y Sandoe, 1989; Hopkins y cols., 1995; Wira y Russell, 1995; Parr y Parr, 1999; Kutteh, 1999). Nosotros evaluamos la respuesta inmune después de tres inmunizaciones con una proteína inmunogénicamente soluble (Moreno-Fierros y cols., 2001; Vázquez-Padrón y cols., 1999), en contraste con otros estudios, los cuales emplean una simple aplicación con antígenos replicantes que inducen respuesta a anticuerpos vaginales (Hopkins, 1995). Otros estudios conciernen con la inducción de respuesta inmune en el tracto genital y no analiza el estado del ciclo estral sobre la respuesta a anticuerpos específicos (Parr y Parr, 1999; Kutteh, 1999; Hook y cols., 1999), y pocos lo toman en cuenta al momento de la inmunización (Allardyce, 1984; Hopkins y cols., 1995) o solo consideran al momento de analizar la respuesta inmune (Gallichan y Rosenthal, 1996).

En este trabajo consideramos el ciclo estral tanto al momento de inmunizar como el momento de la evaluación de la respuesta inmune. Algunos reportes sugieren que el ciclo estral tiene influencia en la función inmune del tracto genital, y están basados sobre los cambios observados en niveles totales de anticuerpos IgA e IgG en el útero o la vagina en las diferentes etapas del ciclo estral (Wira y Sandoe, 1977, 1980). Mientras otros trabajos evalúan la respuesta inmune específica de anticuerpos en animales ovariectomizados y

recibiendo tratamiento hormonal esteroidal pero no durante el ciclo sexual normal (Wira y cols., 1999). Adicionalmente en relación al isotipo IgG, los niveles específicos de anticuerpos específicos y totales en el tracto genital muestran cambios con respecto al ciclo estral o tratamiento hormonal (Gallichan y Rosenthal, 1996; Wira y Sandoe, 1977, 1980; Wira y cols., 1999) pero no se observa variación cuando se inmuniza con Cry IAc, el cual no induce una respuesta significativa en lavados vaginales en cualquiera de las dos etapas analizadas del ciclo.

Las tentativas de inmunizar vía vaginal en algunas especies animales por vías sistémica o mucosas han mostrado resultados inconsistentes (Parr y Parr, 1999; Kutteh, 1999; Livingston, 1998). Los anticuerpos vaginales son inducidos como resultado a la infección natural o experimental del tracto reproductor bajo, ó por inmunización vía intravaginal o intrauterina con una variedad de microorganismos vivos (Parr y Parr, 1997) pero muchos de esos modelos requieren de tratamiento con progesterona para alcanzar la infección e inmunidad (Parr y Parr, 1999). La inmunización intravaginal con microorganismos vivos o células infectadas por virus ha producido respuesta local a anticuerpos (Parr y Parr, 1999; Ogra y Ogra, 1973) pero en la mayoría de los estudios, la respuesta de anticuerpos a inmunizaciones locales fue pobre (Parr y Parr, 1992; Yang y Schumacher, 1979). Vías de inmunización alterna para inducción de IgA en el tracto reproductor femenino han sido estudiadas, pero las óptimas no han sido establecidas (Haneberg y cols., 1994; Lehner y cols., 1992). El tracto reproductor femenino es un órgano efector después de la inmunización a distancia en las vías oral, intranasal e intraperitoneal (Parr y Parr, 1997; Hook y cols., 1999). Sin embargo generalmente el tracto genital es incapaz de responder a antígenos no replicantes o proteínas inmunogénicas después de la inmunización intravaginal. Se requieren adyuvantes fuertes, así como dosis múltiples y grandes de antígenos, para inducir respuesta significativa de anticuerpos en el tracto genital (Livingston y cols., 1998; Yang y Schumacher, 1979).

Con respecto a la inmunización con proteínas solubles posterior a una inmunización vaginal con toxina de cólera y CTB, se han reportado resultados variables. Pueden estar involucradas diferencias entre especies ya que CTB es un inmunógeno mucoso para humanos (Kozlowski y cols., 1997; Bergquist y cols., 1997), pero puede inducir tolerancia en ratón (Weiner, 2001). La inmunización local con CTB en el tracto genital femenino estimula una respuesta local a anticuerpos IgG que no es evidente en mujeres inmunizadas oralmente (Kozlowski y cols., 1997). La inmunización con CTB induce una respuesta de anticuerpos IgG e IgA en secreciones vaginales de humanos (Bergquist y cols., 1997). En ratones tratados con progesterona a lo largo del estudio e inmunizados vaginalmente e intranasalmente con subunidad B de toxina de cólera (CTB) junto con CT induce respuesta a anticuerpos en el tracto genital femenino. El CTB puede actuar como un eficiente acarreador para un antígeno conjugado para la inducción de respuesta a anticuerpos específicos en el tracto genital después de inmunización vaginal o intranasal aunque una respuesta fuerte de anticuerpos vaginales es alcanzada después de inmunizar intranasalmente el conjugado junto con CT (Johansson y cols., 1998).

El hallazgo de que la CTB induce una respuesta a anticuerpos fuerte en el tracto genital femenino después de la inmunización vaginal (Johansson y cols., 1998; Wassén y cols., 1996), difieren con los resultados reportados por (Haneberg y cols., 1994), quienes encontraron que el CTB no induce alguna respuesta a anticuerpos vaginales por esta vía en el ratón. La explicación probable a esta discrepancia es que los animales usados por Johansson y cols., 1998 fueron tratados con progesterona, mientras que los usados por Haneberg y cols., 1994 no. El Cry IAc puede ser un mejor inmunógeno que el CTB, ya

que no requiere tratamiento hormonal con progesterona para inducir una respuesta inmune por la vía vaginal. El tratamiento con progesterona antes de la inmunización o infección ha sido utilizado para alcanzar la respuesta inmune e infección vía vaginal y reducir la variabilidad en los resultados debida a la influencia hormonal. La progesterona mantiene los animales en una etapa parecida al diestro, sin embargo se sabe que esta hormona afecta al sistema inmune (Parr y Parr, 1999). El tratamiento con progesterona aumenta la respuesta de células secretoras de anticuerpo IgG y títulos antivirales en el tejido genital después de la inmunización mucosa, pero más marcadamente después de la inmunización vaginal (Parr y Parr, 1999). El desarrollo de vacunas para producir respuesta inmune en la vagina podría ser más atractivo si no se requiriera el tratamiento hormonal.

En el presente estudio, solo la respuesta específica IgA fue inducida en la vagina. La inmunización intragástrica con espermatozoides en ratas en las diferentes etapas del ciclo estral solo induce una respuesta específica de IgA en la vagina, la cual es más alta en el proestro (Allardyce, 1984). En cambio, en otros trabajos predominantemente inducen respuesta de IgG en ese sitio (Parr y Parr, 1999). La explicación posible a esos resultados contradictorios es que el antígeno empleado (soluble no replicante contra replicante) y a la falta con tratamiento con progesterona (Allardyce, 1984) y en el presente trabajo con relación a otros (Parr y Parr, 1999). Por otro lado, la magnitud de respuesta específica de IgA inducida en vagina después de la inmunización con Cry1AC fue similar por las dos vías, en las dos etapas del ciclo analizado.

Tanto la IgA como la IgG están presentes en las secreciones del tracto genital y muestran variaciones con el ciclo sexual (Wira y Sandoe, 1977), Cuando medimos los niveles totales de inmunoglobulinas a lo largo del ciclo estral, encontramos que tanto IgA como la IgG en lavados vaginales en ratones hembra Balb/c aumentan en el proestro, pero la IgG en el estro disminuye mientras que la IgA estuvo aumentada. En el diestro, los niveles de IgA e IgG fueron bajos. Esos datos son similares a los reportados en secreciones uterinas de rata (Wira y Sandoe, 1977,1980) y de la distribución de las células plasmáticas IgA e IgG en útero de ratonas (Canning y Billington, 1983; Rachman y cols., 1983). Algunos trabajos indican que los mecanismos de control de las cantidades de inmunoglobulinas en el útero y la vagina son diferentes (Wira y Sandoe, 1980; Wira y Sullivan, 1985). La mayoría indica que el útero es la fuente más cercana para la IgA y los niveles son drásticamente disminuidos en la vagina después de una histerectomía en la mujer y del ratón; mientras que la IgG es originada en la vagina, y está presente en niveles normales (Parr y Parr, 1990, 1999; Jalanti y Isliker, 1997), o reducidos a la mitad (Johansson, 1998). La cantidad de anticuerpos en fluidos uterinos esta regulada por hormonas esteroides, con grandes cantidades de IgA e IgG durante el proestro y el estro o por tratamiento con estradiol, que durante el diestro o por tratamiento con progesterona después de la ovariectomía (Wira y Sandoe, 1977; Wira y Sullivan, 1985).

En contraste, la IgA y la IgG vaginal disminuyen por tratamiento con estradiol. Armstrong demostró que la aplicación de estradiol podría bloquear el componente uterino por cierre del cervix, y podría reducir la trasudación a través de la mucosa vaginal por causar adelgazamiento del epitelio vaginal (Armstrong, 1968; Parr y Parr, 1990). El estradiol administrado a ratas ovariectomizadas incrementa la IgA y la IgG; sin embargo, no altera los niveles sanguíneos de IgA o IgG (Wira y Sandoe, 1977). Por otro lado una rápida reversión del efecto del estrógeno es causada por la administración de progesterona. Esta observación sugiere que la progesterona puede causar reducción del cervix, facilitando el paso de ambas inmunoglobulinas del útero y cervix (Wira y Sandoe, 1980).

Las hormonas del ovario que manejan el ciclo menstrual pueden influenciar la inmunidad

del tracto genital en hembras de primates pero no afectan los niveles de inmunoglobulinas totales sistémicas o los niveles específicos de anticuerpos (Lü y cols., 1999). Los niveles específicos de anticuerpos, antígenos y de inmunoglobulinas totales en el moco cervical de la mujer y del macaco varían de acuerdo al ciclo menstrual; los niveles altos de anticuerpos ocurren durante la menstruación y los niveles bajos ocurren alrededor de la ovulación (Lü y cols., 1999; Kutteh, 1999, 1996). En contraste al presente trabajo el estudio de Lü y cols., no consideran el estado del ciclo sexual al tiempo de la inmunización, y de acuerdo a pequeñas variaciones durante el estro y el diestro sobre la respuesta específica de anticuerpos en suero e intestino grueso ellos encuentran anticuerpos y antígeno específico y niveles de inmunoglobulinas en suero y lavados rectales los cuales no cambian con estado del ciclo menstrual (Lü y cols., 1999).

Algunos reportes apoyan la idea que la calidad y cantidad de la respuesta de anticuerpos depende de las diferentes especies mucosas, de las vías de inmunización, la naturaleza del antígeno, la especie animal y el sitio analizado (Haneberg, 1994; Moer-Fieros y cols., 1999; Hopkins y cols., 1995). Sin embargo, la vía de inmunización vaginal o intraperitoneal puede no tener efecto sobre la magnitud de respuesta por inmunización con Cry IAc en vagina e intestino grueso, pero en suero la respuesta de IgG e IgM son altas por inmunización intraperitoneal.

Otros autores han reportado la inducción de respuesta de anticuerpos vaginales después de la inmunización intraperitoneal u otras parenterales. La inmunización intraperitoneal de ratas con eritrocitos de oveja induce anticuerpos específicos IgA e IgG en secreciones del tracto genital femenino (Wira y Sandoe, 1987). Se ha sugerido que cuando el antígeno es colocado en la cavidad peritoneal, los precursores peritoneales de IgA son estimulados y subsecuentemente pueblan el tracto genital (Kutteh, 1999). Se sabe que los linfoblastos de IgA migran dentro del tracto genital del ratón durante el ciclo estral (McDermott y cols., 1980), mas aún, la inmunización con ferritina de caballo en dos sitios no mucosos en la pelvis femenina de ratón causan títulos más altos en fluidos vaginales que la aplicación directa de diez dosis de vacuna en la mucosa vaginal (Thapar y cols., 1990).

Las propiedades bioquímicas de las proteínas entomocidal Cry de *Bacillus thuringiensis* (Bt) tales como su alta resistencia a proteólisis, solubilidad y estabilidad en pH alcalino (Ge y cols., 1990) la hacen una alternativa interesante para el desarrollo de acarreadores de epitopes relevantes en vacunas. Nosotros hemos demostrado que Cry IAc es un potente inmunogeno mucoso capaz de estimular la respuesta local y distante. El CryIAC administrado por las vías probadas: intraperitoneal, rectal, oral, intranasal, (y vaginal en el presente trabajo) inducen anticuerpos específicos en suero y muestras mucosas, pero la magnitud de la respuesta al isotipo depende de la vía usada y el sitio analizado (Moreno-Fierros y cols., 2001).

La inducción de inmunidad local en la mucosa genital es requerida para prevenir la transmisión sexual de infecciones virales y bacterianas (Parr y Parr, 1999; Johansson y cols., 1998). La magnitud de respuesta a anticuerpos en la superficie vaginal por CryIAC es remarcable ya que la inducción de respuesta a anticuerpos en el tracto genital femenino no puede ser lograda con proteínas solubles (Gallichan y Rosenthal, 1995). La principal ventaja de utilizar Cry IAc sobre otros inmunógenos es su inocuidad en vertebrados, su bajo costo, estabilidad, que puede producir respuesta a anticuerpos a nivel sistémico y en varios sitios mucosos incluyendo la vagina, que no son modificados a través del ciclo reproductivo, a pesar de las bien conocidas variaciones de niveles de anticuerpos y respuesta específica a hormonas, en respuesta al ciclo estral, el cual es responsable de los cambios del epitelio del tracto genital tales como el adelgazamiento, la expresión del

componente secretor y el número células presentadoras de antígeno, las cuales son responsables de la respuesta inmune y la susceptibilidad a infecciones vaginales (Wira y cols., 1999; Parr y Parr, 1999).

CONCLUSIONES

En el presente trabajo se encontró que la protoxina Cry IAc induce respuestas específicas de anticuerpos a nivel sistémico y en varios sitios mucosos, incluyendo la vagina, cuando se administra por las ruta intraperitoneal e intravaginal; la respuesta inducida por ambas vías de inmunización no tiene ninguna modificación significativa a lo largo del ciclo reproductivo.

La generación de anticuerpos con la protoxina Cry en diferentes secreciones mucosas por ambas vías convierte a esta protoxina de fácil producción en una molécula de interés farmacéutico y biotecnológico, esto nos sugiere que puede ser usado como acarreador de epitopes vacunales de interés, también pudiera servir como adyuvante mucoso.

Ambas rutas intraperitoneal e intravaginal confieren inmunidad sistémica y mucosa.

Nuestros resultados sugieren que el Cry IAc puede ser utilizado como acarreador de antígeno para inducir inmunidad protectora contra enfermedades transmitidas sexualmente en tracto genital femenino.

APÉNDICE

MATERIALES

Lector de ELISA Biorad, Centrífuga refrigerada Hettich, Balanza semianalítica Scientech, Congelador Revco -30°, Vortex thermolyne, Refrigerador, Micropipetas, Multipipetas, Tubos ependorf, Placas de ELISA de 96 pozos y jeringas

MÉTODOS

1) Sustancias

Protoxina Cry IAc de *B. Thuringiensis*

Anticuerpos peroxidados de anti inmunoglobulina de ratón IgG (anti cadena Fc χ (Pierce), IgM (anti cadena μ) (Pierce) e IgA anti cadena α) (Sigma).

Leche descremada Svelty

Ácido sulfúrico (1.5 M)

1) Composición y preparación de reactivos para ELISA

Solución amortiguadora de recubrimiento

a) Composición:

Sustancias	Cantidad
Na ₂ CO ₃	1.59 g.
NaHCO ₃	2.93 g.
H ₂ O	L

b) Preparación:

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

Solución salina amortiguadora con fosfatos tween

a) Composición:

Sustancias	Cantidad
NaCL	8 g.
KCL	0.2 g
KH ₂ PO ₄	0.2 g.
Tween 20	0.5 g.
H ₂ O	l.

b) Preparación:

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

Sustrato para ELISA

a) Composición:

Solución amortiguadora de fosfatos:

Sustancias	cantidad
Na ₂ HPO ₄ 0.1 M.	28.4 g.
H ₂ O	.1L

Solución amortiguadora de citratos:

Sustancias	cantidad
Ácido cítrico	19.2 g.
H ₂ O	1 L.

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

Sustrato final

a) Composición:

Sustancias	cantidad
Amortiguador de fosfatos	25.7 ml.
Amortiguador de citratos	24.3 ml.
Ortopenyldiamina	.040 g.
H ₂ O ₂ al 30%	40 ml.
H ₂ O	100 ml.

b) Preparación:

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

Inhibidor de proteasas

a) Composición:

Sustancias	cantidad
Trisma base	1.8 g.
Ácido p-hidroxymercuribenzoico	0.3607 g.

b) Preparación:

Se disuelve trisma-base en 100 ml. De agua destilada quedando a 1.50 milimolar, de esta solución se toman 10 ml. Y se disuelve el ácido p-hidroxymercuribenzoico, finalmente se prepara en alicuotas de 1 ml.

Medio RPMI

a) Composición:

Sustancias	cantidad
Medio RPMI	0.98 g.
Gentamicina	125 μ l. (40mg/ml)
H ₂ O	100 ml.

b) Preparación:

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

BIBLIOGRAFÍA

- Aibender, E., Weisinger, R. y Hevizi, M. (1968). Differences in the immunoglobulin class of polioantibody in the serum of men and women. *J. Immunol.* **101**, 92.
- Allardyce, R. (1984). Effect of ingested sperm on fecundity in the rat. *J. Exp. Med.* **159**, 1548-1553.
- Archibald, D. W., Witt, D. J., Craven, D. E., Voyt, M. W., Hirsch, M. S., y Essex, M. (1987). Antibodies to human immunodeficiency virus in cervical secretions from at risk for AIDS. *J. Infect. Dis.* **156**, 240.
- Armstrong DT. Hormonal control of uterine lumen fluid retention in the rat *A.J. Phys.* (1968) 214:764-71.
- Barrignston, E.J. (1975). Introducción a la Endocrinología General y Comparada. Blume., Madrid. 145-151.
- Bell, J. B. (1969). Immunological control of fertility in the mouse: A comparison of Systemic and Intravaginal immunization. *J. Reprod. Fertil.* **18**, 183-190.
- Bergquist C, Johansson EC, Lagergad T, Holmgren J, Rudin A. (1997). Intranasal vaccination of humans with recombinant cholera toxin B subunit induces systemic and local antibody responses in the upper respiratory tract and vagina. *Infect. Immun.* **65**, 2672-2684.
- Bjercke, S., Scott, H., Braathen, L. R., Thorsby, E. (1983). HLA-DR-expressing Langerhans-like cells in vaginal and cervical epithelium. *Acta Gynecol. Scand.* **62**, 585-589.
- Bjercke S, Brandtzaeg P. (1993). Glandular distribution of immunoglobulins, J chain, secretory component, and HLA-DR in the human endometrium throughout the menstrual cycle. *H. Reprod.* **9**, 1420-1425.
- Brandtzaeg P., y Prydz, H. (1984). Direct evidence for an integrated function of J-chain and secretory component in epithelial transport of immunoglobulins. *Nature (London)*. **311**, 71-73.
- Canning, M. B., y Billington, W. D. (1983). Hormonal regulation of immunoglobulin and plasma cells in the mouse uterus. *J. Endocr.* **97**, 418.
- Cates, W. Jr. (1986). Priorities for sexually transmitted disease in the late 1980's and beyond. *Sex. Trans. Dis.* **13**, 114-117.
- Chordirker, W. B., y Tomasi, T. B. J. (1983). Gammaglobulins quantitative relationships in human serum and non-vascular fluids. *Science.* **142**, 1080-1081.
- Cotter, T. y Meng, Q. (1995). Protective Efficacy of Major Outer Membrane Protein-Specific Immunoglobulin A (IgA) and IgG Monoclonal Antibodies in a Murine Model of *Chlamydia trachomatis* Genital Tract Infection. *Infect. and Immun.* **63**, 4704-4714.
- Di Tomaso, A., G. Saletti, M. Pizza, R. Rappuoli, G. Dougan, S. Abridani, G. Douce y M.T. Magistris (1996). Induction of antigen-specific antibodies in vaginal secretions by using a nontoxic mutant of heat-labile enterotoxin as a mucosal adjuvant. *Infect. Immun.* **64**: 974-979.
- Edwards, J. N. T., Morris, H. B. (1985). Langerhans cells and lymphocyte subsets in the female genital tract. *Br. J. Obstet. Gynecol.* **92**, 974-982.
- Feitelson, J.S. Payne., y Kim, L. (1992). *Bacillus thuringiensis*: insect and beyond. *Biotech.* **10**: 271-275.

- Fudenberg, H. H, Caldwell, J.L., Stites, D.p. y Wells, J.V. *Inmunología Clínica*. 3a.Ed. El Manual Moderno S.A. México D:F: 1982. pp 98, 117, 176, 226, 351, 418.
- Gallichan, W.S., Rosenthal, K.L (1993). Effects of the Estrus Cycle on Local Humoral Immune Responses and Protection of Intranasally Immunized Female Mice against Herpes Simplex Virus Type 2 Infection in the Genital Tract. *Virology*. **224**, 487-497.
- Gallichan WS y Rosenthal KL. (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.
- Gallichan, W.S. y Rosenthal, K.L. (1996). Effects of the estrous cycle on local humoral immune responses and protection of intranasally immunized female mice against herpes simplex virus type 2 infection in the genital. *Virology*. Oct 15, **224**(2), 487-97.
- Ge, A., Pfister, R. y Dean, D. (1990). Hyperexpression of a Bacillus thuringiensis delta-endotoxin-encoding gene in Escherichia coli; properties of the product. *Gene*. **93**:49-54.
- Govers, J., y Girard, J. P. (1972). Some immunologic properties of human cervical and vaginal secretions. *Gynecol. Invest.* **3**, 184.
- Hackemann, M., Grubb, C., Hill, K. R. (1968). The ultrastructure of normal squamous epithelium of the human cervix uteri. *J. Ultrastruct. Res.* **22**, 443-457.
- Haneberg, B., Kendall, D., Amerogen, H., Apter, M., Kraehenbuhl, J., y Neutra M (1994). Induction of Specific Immunoglobulin A in the Small Intestine, Colon-Rectum, and Vagina Measured by a New Method for Collection of Secretions from Local Mucosal Surfaces. *Infect. and Immun.* **62** (1), 15-23.
- Head, J. R., y Billingham, R. E., (1986). Concerning the immunology of the uterus. *Am. J. Reprod. Immunol. Microbiol.* **10**, 76-81.
- Heremans, J.F., y Bazin H. (1971). Antibodies induced by local antigenic stimulation of mucosal surfaces N. *Ann. Y. Acad. Sci.* **190**, 268-275.
- Heremans, J.F. (1974). Immunoglobulin A: In "The Antigens" (M Sela, ed.). Vol. II pp. 365-522. Academic Press, New York.
- Herrera, G., Snyman, S.J y Thompson, J.A. (1994). Construction of a bioinsecticidal strain of Pseudomonas fluorescens active against the sugarcane borer, Eldana saccharina. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:682-690.
- Hook III EW, Pate MS, Hedges SR, Russell MW, Mestecky J. (1999). Mucosal immunology of sexually transmitted diseases. In: Ogra PL, Mestecky J, Lamm M, Strober W, Bienenstock J, McGhee JRJ, editors. *Mucosal immunology*. San Diego: Academic Press. p. 1463-1481.
- Hopkins, S., J.P. Kraehenbuhl, F. Schodel, A. Potts, D. Peterson, P. de Grandi y D. Nardelli-Haeffliger. (1995). A recombinant Salmonella Typhimurium vaccine induces local immunity by for different routes of immunization. *Infect. Immun.* **63**:3279-3286.
- Hornquist, E., Grdic, D., Mak, T. y Lyke, N. (1986). *Immunology*. **87**, 220-229.
- Jalanti, R., y Isliker, H. (1977). Immunoglobulins in human cervico-vaginal secretions. *Int. Archs. Allergy. Appl. Immunol.* **53**, 402-408.
- Jalanti R, y Isliker H. (1997). Immunoglobulins in human cervico-vaginal secretions. *Internat. Archiv. of Allergy and Applied Immunology*. **53**, 402-408.

- Johansson, E.-L., C. Rask, M. Fredriksson, K. Eriksson, C. Czerkinsky y J. Holmgren.(1998). Antibodies and antibody-secreting cells in the female genital tract after vaginal or intranasal immunization with Cholera toxin B subunit or conjugates.*Infect. Immun.*66, 514-520.
- Kamat, B., y Isaacson, P. (1987). The Immunocytochemical distribution of leukocytic subpopulations in human endometrium. *Am. J. Pathol.*127, 66.
- Kaushic, C. y Richardson, J. M. (1995). Regulation of polymeric immunoglobulin A receptor messenger ribonucleic acid expression in rodent uteri: effect of sex hormones. *Endocrin.*136 (7), 2836-2844.
- Kaushic, C., Frauendorf,E., Rossoll,R.M., Richardson,J.M., Wira,C.R.(1998). Influence of the estrous cycle on the presence and distribution of immune cells in the rat reproductive tract.*Am. J. Reprod. Immunol.* 39(3), 209-216.
- Kelly, J. K., y Fox, H. (1979). The local immunological defense system of the human endometrium. *J. Reprod. Immun.*1, 39-45.
- Knowles, B.H. (1994). Mechanis of action of Bacillus thurigiensis Insecticidal δ endotoxin. *Adv. In Insect.Phis.*24, 275-307.
- Kozbowski, P.A., S Cu-Uvin, M. R., Neutra y T.P. Flanigan. (1997). Comparison of the oral, rectal and vaginal immunization routes for induction of antibodies in rectal and genital tract. *Infect.Immun.* 65(4), 1387-1394.
- Kutteh, W. H., Hatach, K. D., Blackwell, R. E., y Mestecky, J. (1988). Secretory immune system of the female reproductive tract: I. Immunoglobulins and secretory component containing cells.*Obstet. Gynecol.*71, 56-60.
- Kutteh, W. H., Blackwell, R. E., Gote, H., Kutteh, C. C., Carr, B. R., y Mestecky, J. (1990). Secretory immune system of the female reproductive tract. II. Local immune system in normal and infected fallopian tube. *Fertil. Steril.*54, 51-55.
- Kutteh WS, Prince SJ, Hammond KR, Kutteh CC, y Mestecky J. (1996) Variations in immunoglobulins and IgA subclasses of human uterine cervical secretions around the time of ovulation.*Clinic and Exp. Immun.*104, 538.542.
- Kutteh S. (1999). Mucosal immunity in the human female reproductive tract. In: Ogra PL, Mestecky J, Lamm M, Strober W, Bienennstock J, McGhee JRJ, editors. Mucosal immunology. San Diego: Academic Press, p. 1423-1433.
- Lehner T, Bergmeier LA, Panagiotidi C, Tao L, Brookes R, Klavinskis LS, Walker J, Ward RG, Hussain L, Gearing AJH, y Adams SE.(1992). Induction of mucosal and systemic immunity to recombinant simian immunodeficiency viral protein.*Science.*258, 1365-1369.
- Lü, F.X., Rourke, T., Srinivasan, S., McChesney, M., y Miller, C. (1999). Immunoglobulin Concentrations and Antigen-Specific Antibody Levels in Cervicovaginal Lavages of Rhesus Macaques Are Influenced by the Stage of the Menstrual Cycle. *Infection and Immunity.*67 (12), 6321-6328.
- Livingston JB, Lu S, Robinson H, Anderson DJ. (1998). Immunization of the female genital tract with a DNA-based vaccine. *Infect Immun.* 66, 322-329.
- McCormack, J., y Greewald, G. (1974) Progesterone and oestradiol-17 β concentrations in the peripheral plasma during pregnancy in the mouse. *J. Endocr.* 62, 101-107.
- Masson, P. L., Heremans, J. F., y Ferin, J. (1969). Clinical importance of the biochemical changes in the female genital tract. I. Studies on the proteins of cervical mucus. *Int. J. Fertil.* 14, 1-7.

- McDermott MR, Clark DA, y Bienenstock J. (1980). Evidence for a common mucosal immunologic system. II: Influence of the estrous cycle on B immunoblast migration into genital and intestinal tissues. *J. Immunol.* **124**, 2536-2539.
- McDonough, P. G. (1987). Cd4 (T4+) Lymphocytes in semen of healthy heterosexual men: Implications for the transmission of AIDS. *Fertil Steril.* **48**, 703-704.
- Mc Miller, M.M: (1979). Differential mortality by sex in fetal and neonatal deaths. *Science.* **204**, 89.
- Merriman, H., Woods, S., Winter, C., Fahnländer, A., y Corey, L. (1984). Secretory IgA antibody in cervicovaginal secretions from women with genital infection due to herpes simplex virus. *J. Infect.Dis.* **149**, 505-510.
- Mestecky, J., y Mc Ghee, J.R. (1987). Immunoglobulin A (IgA): Molecular and cellular interactions involved in IgA biosynthesis and immune response. *Adv. Immunol.* **40**, 153-245
- Mestecky, J., Kutteh, W. H., Ladjeva, I., y Peterman, J. H. The common mucosal immune system in the human genital tract and mammary gland, in *Reprod Immunol*, Mettler, L. and Billington, W. D., Eds., Elsevier, Kiel, Germany, 1990, 251.
- Miller, C. J., Kang D. W., Marthas M., Moldoveanu Z., Kiyono H., Marx P., Eldridge J. H., Mestecky J., y Mc Ghee J. R. (1992). Genital secretory immune response to chronic SIV infection: a comparison between intravenously and genitally inoculated rhesus macaques. *Clinic. Exp. Immunol.* **88**, 520-526.
- Moreno-Fierros L, Reséndiz-Albor AA, y López-Revilla R. (1999). Different antiamebic antibody isotype patterns in the large and small intestine after local and systemic immunization of mice with glutaraldehyde fixed trophozoites. *Life Science.* **64**, 1079-1089.
- Moreno-Fierros L, García N, Gutiérrez R, López-Revilla R, y Vázquez-Padrón R. (2000). Intranasal, rectal and intraperitoneal immunization with protoxina CryIAC from *Bacillus thuringiensis* induces compartmentalized serum, intestinal, vaginal and pulmonary immune responses in Balb/c mice. *Microbes and Infect.* **2**, 885-890.
- Moreno-Fierros L, Ruiz Medina J, Esquivel R, López-Revilla R Piña Cruz Saúl. CryIAC protoxin as carrier and adjuvant for the induction of mucosal and systemic antibody immune responses to polysaccharides of *S. pneumoniae* by intranasal immunization in mice. *Scand J Immunol* 2003 (57): 45-55.
-
- Ogra PL, y Ogra SS. (1973). Local antibody response to poliovaccine in the human female genital tract. *J. Immunol.* **110**, 1307-1311.
- Ogra, P.L., Yamanaka, T. y Lososky, G.A. (1981). Local immunologic defense in the genital tract. In " Reproductive Immunology " (N. Fleicher, ed.) pp 381-89 Liss, New York.
- O'Reilly, R. J., Lee, L., y Welch, B. G. (1976). Secretory IgA antibody responses to *Neisseria gonorrhoeae* in the genital secretions of infected females. *J. Infect. Dis.* **133**, 118.
- Parr, E. I., y Parr, M. B., (1985). Secretory immunoglobulin binding to bacteria in the mouse uterus after mating. *J. Reprod. Immunol.* **8**, 71-82.
- Parr, E., y Parr, M. (1990). A comparison of antibody titers in mouse uterine fluid after immunization by several routes, and the effect of the uterus on antibody titers in vaginal fluid. *J. Reprod. Fertil.* **89**, 619-625.

- Parr, E.L. (1994). A mouse model for studies of mucosal immunity to vaginal infection by herpes simplex virus type 2. *Lab. Invest.* **70**, 369-380.
- Parr EL, y Parr MB. (1999). Immune responses and protection against vaginal infection after nesal or vaginal immunitation with attenuated herpes simplex virus type-2. *Immunol.* **98**, 639-645.
- Parr MB, y Parr EL. (1990). Antigen recognition in the female reproductive tract. I. Uptake of intraluminal protein tracer in the mouse vagina. *J. Reprod. Immunol.* **17**, 101-114.
- Parr, M. B., Kepple, L., Parr, E. L. (1991a). Antigen recognition in the female reproductive tract: II. Endocytosis of horseradish peroxidase by Langerhans cells in murine vaginal epithelium. *Biol. Reprod.* **45**, 261-265.
- Parr, M.B., Kepple, L., Mcdermott, M.R., Drew, M.D., Bozzola, J.J., y Parr, E.L. (1994). A mouse model for studies of mucosal immunity to vaginal infection by herpes simplex virus type 2. *Lab. Invest.* **70**, 369-380.
- Parr MB, y Parr EL. (1999). Female genital tract immunity in animal models. In: Ogra PL, Mestecky J, Lamm M, Strober W, Bienenstock J, McGhee JRJ, editors. *Mucosal immunology*. San Diego: Academic Press; p. 1395-409.
- Prabhala, R.H., y Wira, C.R. (1995). Influence of estrous cycle an estradiol on mitogenia responses of splenic T and B lymphocytes. *Adv. Exp.Med.Biol.* **371A**, 379-381.
- Perlak, F.J., Deaton, R.W., Armstrong, T.A., Fuch, R.T., Sims, S.R., Greenplate, J.T: y Fischhoff, D.A. (1990). Insect resistant cotton plants. *Bio-Technol.* **8**, 939-943.
- Peterman, T. A., y Curran, J. W. (1986). Sexual transmission of human immunodeficiency virus. *J. Am. Med. Assoc.* **256**, 222-226.
- Pierce, N., y Cray, W. (1981). Cellular dissemination of priming for a mucosal immune response to Cholera toxin in rats. *J. Immunol.* **127**, 2461.
- Piot, P., Plummer, F. A., Mhalu, F.S., Lamboray, J. I., Chin, J., y Mann J. M. (1988). AIDS An international perspective. *Science.* **239**, 573-579.
- Rachman F, Casimiri V, Psychoyos A, y Bernard O. (1983). Immunoglobulins in the mouse uterus during teh estrous cycle. *J. Reprod. Fertil.* **69**, 17-21.
- Rebello, R., Green, F. H. Y., y Fox, H. (1975). A study of the secretory immune system of the female genital tract. *Brit. J. Obstet. Gynaecol.* **82**, 812-816.
- Rosenthal KL, y Gallichan WS. (1997). Challenges for vaccination against sexually-transmitted diseases: induction and long-term maintenance of mucosal immune responses in the female genital tract. *Seminars in Immunol.* **9**, 303-314.
- Richmond, S. J., Milne, J. D., Hilton, A. L., y Caul, E. O. (1988). Antibodies to Chlamidia trachomatis in cervicovaginal secretions: Relation to serum antibodies and current Chlamydial infection. *Sex. Trans. Dis.* **7**, 11.
- Russell, M.W., Z. Moldoveanu, P.L., White, G.J., Silbert, J., Mestecky y S.M, Michalek. (1996). Salivary, nasal, genital and systemic antibody responses in monkey immunized intranasally with a bacterial protein antigen and The Cholera toxin B subunit. *Infect. Immun.* **64**, 1272-1283.
- Sano A, Miyaji M, y Nishimura K, (1992). Studies on the relationship between the estrous cycle of Balb/c mice and their resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* infection. *Mycopath.* **119**, 141.145.
- Schumacher, G. (1968). Protein analysis of secretions of the female genital tract. *J. Reprod. Med.* **1**, 61.

- Schumacher, G. (1970). Biochemistry of cervical mucus. *Fertil. Steril.* **21**, 697.
- Schumacher, G. F. B. (1980). Humoral immune factors in the female reproductive tract and their changes during the cycle. In "Immunological Aspects of Infertility and Fertility Control" (D. Dinsa and G. Schumacher, eds.), pp. 93-141. North Holland/Elsevier, New York.
- Schumacher, G. F. B., y Yang, S. L.: Cyclic changes of immunoglobulins and specific antibodies in human and rhesus monkey cervical mucus in: The uterine cervix in reproduction.
- Scicchitano, R., Stanisz, A., Ernst, P., y Bienenstock, J., A common mucosal system revisited, in Migration and Homing of Lymphoid Cells, Vol. 2, Husband, A. J., Ed., CRC Press, Boca Raton, FL, 1988, 1.
- Shen, L., y Fanger, M.W. (1981). Secretory IgA antibodies synergize with IgG in promoting ADCC by human polymorphonuclear cell, monocytes and lymphocytes. *Cell. Immunol.* **59**, 75-81.
- Snell, G.D (1941). Biology of the Laboratory Mouse. Reproduction. Dover Publications. Inc., New York.
- Song, Ch., y Kappas, A. (1980) The influence of estrogens, progestins and pregnancy on the liver. en Farber, E. & Fisher, M. (Ed.). Toxic injury of the liver., Part B., Marcel Dekker New York. p. 147-195.
- Sullivan, D. A., Richarson, G. S., McLaughlin, D. T., y Wira, C. R. (1984). Variations in the nivels of secretory component in human uterine fluid during the menstrual cycle. *J. Steroid Biochem.* **20**, 509-513.
- Sullivan DA, Underdown BJ, y Wira DA. (1983). Steroid hormone regulation of free secretory component in the rat uterus. *Immunol.* **49**, 379-386.
- Tabibzadeh, S. (1990). Proliferative activity of lymphoid cells in human endometrium throughout the menstrual cycle. *J. Clin. Metab.* **70**, 437.
- Teepe, AG., Allen, L.B., Wordinger, R.J., y Harris, E.F. (1990). Effect of the estrous cycle on susceptibility of female mice to intravaginal inoculation of herpes simplex virus type 2 (HSV-2). *Antiviral Res.* Oct.-Nov., **14**(4-5), 227-235.
- Terho; P., y Meurman, O. (1981). Chlamydial serum IgG, IgA and local IgA antibodies in patients with genital-tract infections measured by solid-phase radioimmunoassay. *J. Med. Microbiol.* **14**, 77.
- Thapar, M.A, Parr, E.L, y Parr M.B. (1990) Secretory immune responses in mouse vaginal fluid after pelvic, parenteral or vaginal immunization. *Immunol.* **70**, 121-125.
- Thompson, R. (1981). Techniques in clinical immunology. Second Edition. Ed. Blackwell. Scientific Publications. USA. P.157-162.
- Tjokronegoro, A., y Sirisinha, S. (1975). Quantitative analysis of immunoglobulins and albumin in secretion of female reproductive tract. *Fertil. Steril.* **26**, 413-417.
- Tourville, D. R., Ogra, S. S., Lippes, J., y Tomasi, T. B. (1970). The human female reproductive tract: Immunohistological localization of A, G. M secretory "piece" and lactoferrin. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **108**, 1102-1108.
- Usala, S. J., Usala, F. O., Hariski, R., Holt, J. A., y Schumacher, G. F. B. (1989). IgG and IgA content of vaginal fluid during the menstrual cycle. *J. Reprod. Med.* **34**, 292.
- Vaerman, J. P., y Ferin, J. (1974). Local immunological response of the vagina, cervix and endometrium. *Acta Endocrinol. Suppl.* **194**, 281-301.

- Vázquez-Padron IR, Moreno-Fierros L, Neri-Bazán L, De la riva G, López-Revilla R. (1999a). Intragastric and intraperitoneal administration of Cry1AC protoxin from *Bacillus thuringiensis* induce systemic and mucosal antibody response in mice. *Life Sciences*. **64**, 1897-1912.
- Vázquez-Padrón RI, Moreno-Fierros L, Neri-Bazán L, Del la Riva GA and López-Revilla R. (1999b). *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac protoxin is a potent systemic and mucosal adjuvant. *Scand. J. Immunol.* **46**:578-584
- Wassen, L., K. Schoon, J. Holmgren, M. Jertborn y N. Lycke. (1996). Local intravaginal vaccination of the female genital tract. *Scand J. Immunol.* **44**, 408-414.
- Watson, G.M.F., and N.H. Mann. (1988). Protein Phosphorylation in *Bacillus thuringiensis* during growth and endotoxin production. *J. Gen. Microb.* **134**, 2559-2565.
- Williams, R.C., y Gibbons, R.J. (1972). Inhibition of bacterial adherence by secretory immunoglobulin A: A mechanism of antigen disposal. *Science*. **177**, 697-699.
- Wira, C. R., y Sandoe, C. P. (1977). Sex steroid hormone regulation of IgG and IgA in rat uterine secretions. *Nature*. (London) **268**, 534-536.
- Wira, C. R., y Sandoe, C. P. (1980). Hormone regulation of immunoglobulins: Influence of estradiol on IgA and IgG in the rat uterus. *Endocrinol.* **106**, 1020-1026.
- Wira, C. R., y Sullivan, D. A. (1985). Estradiol and progesterone regulation of IgA, IgG and secretory component in cervico-vaginal secretions of the rat. *Biol. Reprod.* **32**, 90-95.
- Wira, C.R., y Sandoe, C. P. (1987) Specific IgA e IgG antibodies in the secretions of the female reproductive tract: Effects of immunization and oestradiol on the expression of this response in vivo. *J. Immunol.* **138**, 4159.
- Wira, C., y Sandoe, C. (1989). Effect of uterine immunization and oestradiol on specific IgA and IgG antibodies in uterine, vaginal and salivary secretions. *Immunol.* **68**, 24.
- Wira CR, Rossoll RM. (1995). Antigen-presenting cells in the female reproductive tract: influence of sex hormones on antigen presentation in the vagina. *Immunol.* **84**, 505-508.
- Wira CR, y Rossoll RM. (1995). Antigen-presenting cells in the female reproductive tract: influence of the estrous cycle on antigen presentation by uterine epithelial and stromal cells. *Endocrinol.* **136**, 4526-4534.
- Wira CR, Kaushic C, y Richardson J. (1999). Role of sex hormones and cytokines in regulating the mucosal immune system in the female reproductive tract. In: Ogra PL, Mestecky J, Lamm M, Strober W, Bienenstock J, McGhee JRJ, editors. *Mucosal immunology*. San Diego: Academic Press; p. 1449-1461.
- Wolf, J.L., y Bye, W.A. (1984). The membranous epithelial (M) cell and the mucosal immune system. *Annu Rev Med.* **35**, 95-112.
- Yang SI, y Schumacher GF. (1979). Immune response after vaginal application of antigens in the rhesus monkey. *Fertil. Sterility.* **32**, 588-598.
- Young WG, Newcomb GM, y Hskins AR. (1985). The effect of atrophy, hyperplasia and keratinization accompanying the estrous cycle on Langerhans cells in mouse vaginal epithelium. *American J. Anat.* **174**, 173-186.



ELSEVIER

Life Sciences 71 (2002) 2667–2680

Life Sciences

www.elsevier.com/locate/lifescie

Slight influence of the estrous cycle stage on the mucosal and systemic specific antibody response induced after vaginal and intraperitoneal immunization with protoxin Cry1Ac from *Bacillus thuringiensis* in mice

Leticia Moreno-Fierros^{a,b,*}, Inés Pérez-Ordóñez^a, Martín Palomar-Morales^a

^aUnidad de Morfología y Función, FES-Iztacala-UNAM, Ap. postal 314, Tlalnepantla, Méx., Mexico

^bDepartamento de Biología Celular, CINVESTAV-IPN, Ap. postal 14-740, 07000 México, D.F., Mexico

Received 27 November 2001; accepted 24 June 2002

Abstract

Since the immune response appears to be variable according to the hormonal stage of the mammalian female, the aim of this study was to determine whether estrous cycle stage modifies the mucosal and systemic immune responses induced by intraperitoneal and vaginal immunization of mice with protoxin Cry1Ac. We tested the influence of three immunizations on the specific antibody response elicited at estrus and diestrus, that were the same estrous cycle stages at which the antigen was applied. Both intraperitoneal and vaginal immunization of mice with Cry1Ac either at estrus or diestrus induces specific antibody responses at serum, vagina and large intestine. The stage of the estrous cycle have little or non influence in the magnitude of the response induced, since only at serum the IgM was slightly higher at estrus than at diestrus by both routes. At the large intestine only the IgA response elicited via the intraperitoneal route changed, being higher at diestrus, whereas at the vagina IgA response induced did not change significantly due to the cycle stage. Present results suggest that Cry1Ac may be used as an antigen carrier as it can elicit antibody responses at systemic level and at several mucosal sites including the vagina that are not modified significantly throughout the reproductive cycle.

© 2002 Elsevier Science Inc. All rights reserved.

Keywords: estrous cycle; mucosal immunity; Cry1Ac; vaginal immunization

* Corresponding author. Mucosal Immunology, UBIPRO FES Iztacala UNAM, Avenida de los Barrios s/n Los Reyes Iztacala Apartado Postal 314, Tlalnepantla Estado de México, Mexico. Tel.: +56-23-11-03; fax: +56-23-11-25.

E-mail address: lemofi@servidor.unam.mx (L. Moreno-Fierros).

Introduction

Vaccines able to induce immune responses at mucosal surfaces of the genito-urinary tract and rectum have potentially widespread applications, for prevention of sexually transmitted diseases. No such vaccines, however are currently available, largely because of lack of information about how best to stimulate such responses. Recently we discovered that the Cry1Ac protoxin of *Bacillus thuringiensis* administered to Balb/c mice by the intraperitoneal (i.p.), rectal, intranasal or the intragastric routes is a systemic and mucosal immunogen [1]. Induction of mucosal immune response at genital tract by Cry1Ac is relevant as such responses are rarely induced with soluble proteins. Entomocidal Cry proteins of *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) are massively and inexpensively produced through large-scale fermentation based on either *Bt* or transgenic microorganisms. Moreover, biochemical properties of Cry proteins such as high resistance to proteolysis, their solubility and stability in highly alkaline pH, as well as their demonstrated innocuousness to vertebrates [2] make them an interesting alternative for the development of carriers of relevant epitopes in vaccines. However, there are a very few studies on the physiological or immunological effects of the Cry protein family on vertebrate organisms.

Immunizations at the vaginal mucosa to induce a local antibody response have given variable results [3–5]. Fluctuations in the distribution of genital plasma cells [6] and levels of uterine antibodies [7–9], have been reported during various stages of the estrous cycle or under the influence of sex hormones [10–12].

In light of the mentioned observations, it is clear that evaluation of humoral immunity in the genital tract must take into account the fluctuations in the levels of specific antibodies as a function of estrous or menstrual cycle. Therefore, present work was designed to determine whether estrous cycle stage (estrus or diestrus) modifies the mucosal and systemic immune responses induced by intraperitoneal and vaginal immunization of mice with protoxin Cry1Ac.

Our results indicate that immune responses induced at serum, vagina and large intestine by Cry1Ac are little or not affected by the estrous cycle stage.

Methods

Immunizations

Recombinant Cry1Ac was purified from IPTG-induced *E. coli* JM103 (pOS9300) cultures as described [2,13]. Twenty female mice, of the strain Balb/c, eight to ten week-old, were randomly distributed in four groups. The stage of the estrus cycle was determined by microscopic observation of vaginal smears following lavage with normal saline [14]. The mice were cycled, and when they were in the desired stage, were immunized. Each experimental group consisted of five animals to which three Cry1Ac doses were applied at estrus or diestrus as follows: Group 1 was immunized intraperitoneally at diestrus; group 2 was immunized intraperitoneally at estrus; group 3 was immunized intravaginally at diestrus; and group 4 was immunized intravaginally at estrus. Additionally, ten non-immunized female mice, five in estrus and five in diestrus, were considered as the control groups.

Mice were immunized with 100 µg of Cry1Ac, dissolved either in 25 µl of phosphate buffered saline (PBS) and administered by the vaginal route, or in 100 µl of PBS to be administered by the intraperitoneal (i.p.) route. Mice were intravaginally or intraperitoneally boosted twice, once a week at the same estrous cycle stage of immunization, and were sacrificed at estrus or diestrus from seven to

ten days after the last boost, and serum, intestinal, and vaginal fluid samples collected from them. For vaginal immunizations, mice were held positioned with the vagina facing upwards for about 15 min to reduce leakage of the inoculum.

Sample collection

Before the sacrifice, vaginal washes were performed by introducing and collecting 50 μ l cold RPMI medium plus gentamicine (40 U/ml) in the vagina of non-anesthetized mice, five times with a micropipette; pooled washes were centrifuged 10 min at $8,000 \times g$ and 4 °C and the supernatants were immediately frozen and stored at -20 °C.

Serum samples were obtained from blood extracted by cardiac puncture from ether-anaesthetized mice.

Fluids from the large intestine were collected as described [15]. The contents of the large intestine were flushed out with 3 ml of cold RPMI medium; 1/10 volume of 100 mM p-hydroxymercuribenzoate (pHMB, dissolved in Tris 150 mM) was added immediately to the washing fluid, which was centrifuged 10 min at $8,000 \times g$ and 4 °C, and the supernatants were immediately frozen and stored at -20 °C.

ELISA for determination of anti Cry1Ac antibodies

Anti Cry1Ac specific antibody levels in sera, vaginal and intestinal fluid samples were determined by an indirect enzyme-linked immunosorbent assay described elsewhere [1]. Briefly, 96-well polystyrene plates were coated with 100 μ l of Cry1Ac (10 μ g/ml) in carbonate buffer (0.1 M Na₂CO₃, pH 9.6). The plates were incubated 12 h at 4 °C and washed three times with 0.05% Tween 20 in PBS (PBST). Blocking was performed with PBST with 3% fat-free milk, and further washing with PBST. Serial dilution of sera samples was done with 1% fat-free milk in PBST. The values of IgG and IgM responses (showed in Fig. 1) are expressed as antibody titre whereas the values of IgA correspond to the 1:100 dilution. Serial dilution of intestinal and vaginal samples was performed, the values included in the plots of Figs. 2 and 3 and correspond to the 1:2 dilution; which fall into the linear portion of the curve for all samples. Fluid samples from the large intestine were diluted in ice-cold PBST with 6% fat-free milk and 100 μ l added per microwell. Fifty microliters per well of vaginal fluid samples in PBS were added per well. Samples were ruled out in duplicate. The plates were incubated overnight at 4 °C, washed with PBST. One hundred- μ l of freshly diluted conjugate (horseradish peroxidase-labeled goat anti mouse immunoglobulin) were added per well and incubation proceeded at room temperature for 2 h. The conjugates were diluted with 3% fat-free milk in PBST as follows: anti-IgG (Pierce, Rockford, IL) 1:12 800, anti-IgM (Pierce, Rockford, IL) 1: 6 400 and anti-IgA (Sigma Chemical Co.) 1: 1 000. The plates were washed three times with PBST and the enzyme reactions started by addition of 100 μ l per well of "substrate" solution (0.5 mg/ml ortho-phenylenediamine, 0.01% H₂O₂ in 0.05 M phosphate-citrate buffer, pH 5.2). After 15 min, reactions were stopped by adding 25 μ l 2.5 N H₂SO₄ and absorbency at 492 nm (A₄₉₂) measured with a Biorad ELISA reader.

Total immunoglobulin levels in vaginal secretions

Total immunoglobulin levels were measured by ELISA in vaginal secretions samples taken during the four different stages of the estrous cycle of mice (n = 5). Vaginal washes were collected as described

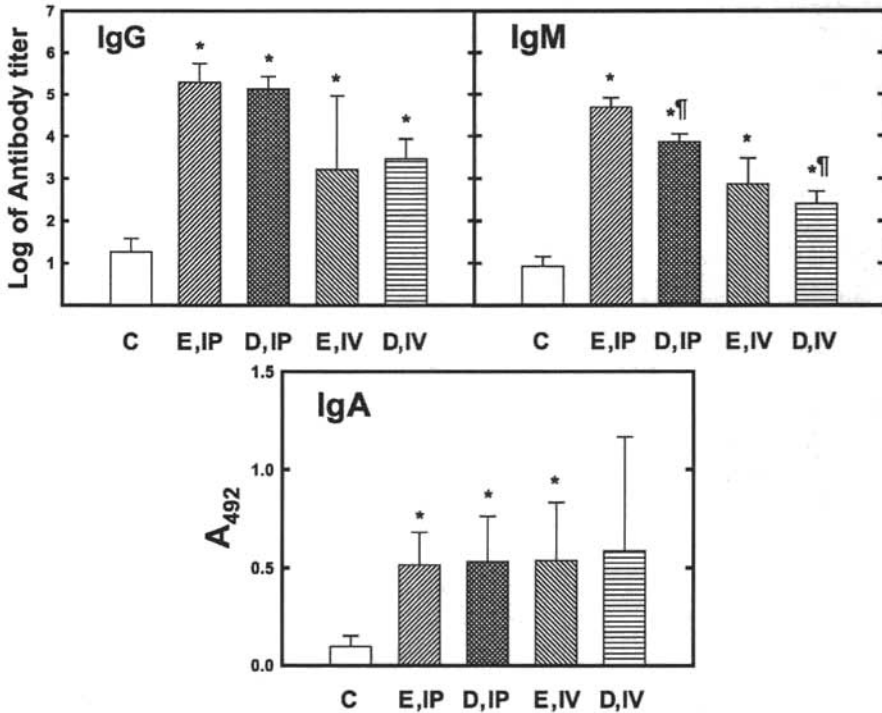


Fig. 1. Anti-Cry 1 Ac serum antibodies. Three weekly doses of 100 μ g of Cry 1 Ac were administered to female Balb/c mice at the estrus (E) or diestrus (D) stage of the estrous cycle, by intravaginal (IV) or intraperitoneal (IP) route. Non-immunized mice served as controls (C). Anti-Cry 1 Ac IgG, IgM and IgA were determined by ELISA in serum samples. Anti-Cry 1 Ac IgG and IgM are expressed as antibody titre (the logarithm of their end-point dilution). Anti Cry 1 Ac IgA is expressed as A_{492} readings. Bars represent the mean \pm S.D. of each experimental group (N = 5). Results were compared with two-way ANOVA and Tukey's test. * P < 0.05 with respect the control; †P < 0.05 with respect the estrous stage; ‡P < 0.05 with respect the IP route.

above, but with PBS instead of RPMI medium. 96-well Costar polystyrene plates were coated with 50 μ l per well of vaginal samples, incubated overnight at 4 °C and washed three times with PBST. Plates were then blocked by adding 100 μ l of 6% milk in PBST, incubated 2h, and washed three times with PBST. The conjugates (horseradish peroxidase-labeled goat anti mouse IgA, IgG and IgM), were added and diluted and as indicated above. The plates were revealed and read as described above in the indirect ELISA.

Calculations and statistics

The anti Cry1Ac antibody titres were defined as the reciprocal values of the highest end-point dilution of samples having an A_{492} > 0.05 (basal value), and the specific antibody levels were expressed as their

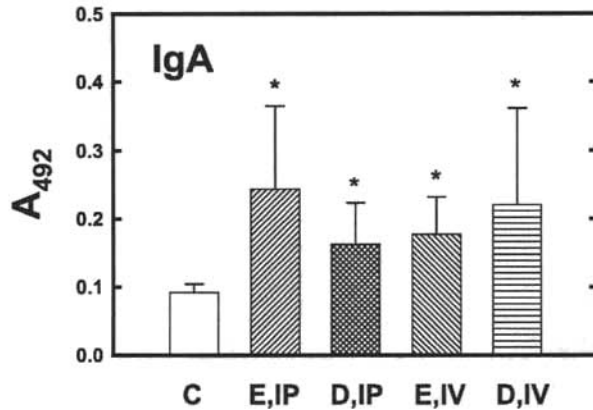


Fig. 2. Anti-Cry 1 Ac vaginal washes antibodies. Three weekly doses of 100 μ g of Cry 1 Ac were administered to female Balb/c mice at the estrus (E) or diestrus (D) stage of the estrous cycle, by the intravaginal (IV) or intraperitoneal (IP) route. Non-immunized mice served as controls (C). Anti-Cry 1 Ac IgG, IgM and IgA were determined by ELISA in vaginal fluid samples. Since there are not differences between groups for IgG and IgM, they are not represented. Anti Cry 1Ac IgA is expressed as A₄₉₂ readings. Bars represent the mean \pm S.D. of each experimental group (N = 5). Results were compared with two-way ANOVA and Tukey's test. * P < 0.05 with respect the control.

corresponding A₄₉₂ values. The data obtained were analyzed by two way-ANOVA, followed by Tukey test, when necessary, and differences were considered at p = 0.05. Since A₄₉₂ were not different between the control mice at estrus or diestrus, the data were pooled, and considered as the same control group.

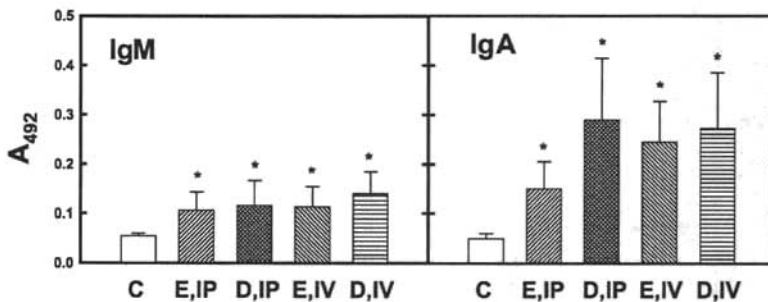


Fig. 3. Anti-Cry 1 Ac intestinal fluid antibodies. Three weekly doses of 100 μ g of Cry 1 Ac were administered to female Balb/c mice at the estrus (E) or diestrus (D) stage of the estrous cycle, by the intravaginal (IV) or intraperitoneal (IP) route. Non-immunized mice served as controls (C). Anti-Cry 1 Ac IgG, IgM and IgA were determined by ELISA in serum samples. Since IgG does not show any differences, it is not represented. Anti Cry 1Ac IgM and IgA are expressed as A₄₉₂ readings. Bars represent the mean \pm S.D. of each experimental group (n = 5). Results were compared with two-way ANOVA and Tukey's test. * P < 0.05 with respect the control; *P < 0.05 with respect the estrous stage.

Results

Anti Cry1Ac serum antibodies

Both i.p and vaginal immunization with Cry1Ac induced significant IgG, IgM and IgA serum antibody responses. Intraperitoneally immunized mice elicited higher IgG and IgM anti Cry1Ac responses than via vaginal route. By i.p. route the major response induced was IgG followed by IgM and the lowest response was IgA (Fig. 1).

The IgG and IgA anti Cry1Ac responses induced at serum by both i.p and vaginal routes were not influenced by the estrous cycle stage, but their IgM responses were slightly higher at estrus than diestrus ($p < 0.05$).

Anti Cry1Ac vaginal antibodies

Only significant IgA anti Cry1Ac antibody responses were induced by i.p and vaginal immunization in vaginal washes. The magnitude of IgA responses induced by intraperitoneal and vaginal routes were similar at estrus and diestrus and there was not influence of the immunization route (Fig. 2).

Anti Cry1Ac large intestine antibodies

Intraperitoneal and vaginal immunization with Cry1Ac elicited significant IgA and IgM antibody responses at the large intestine (Fig. 3). The magnitude of the antibody response was similar between both routes, and IgA responses elicited were higher than IgM responses. Nor the IgA response induced by vaginal route neither the IgM antibody response induced by i.p and vaginal routes varied with the estrous cycle stage, but by i.p route significant higher IgA responses were detected at diestrus than at estrus ($p < 0.05$).

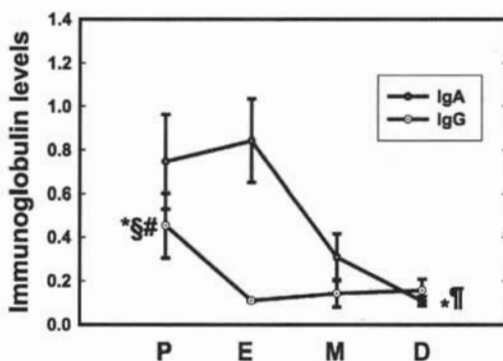


Fig. 4. Vaginal IgG and IgA levels in mature Balb/c female mice, along the estrous cycle. The values shown are the mean \pm standard deviation of at least five normal mice. P: proestrus; E: estrus; M: metoestrus; D: dioestrus. * $P < 0.05$ between P and D stages; $^{\#}P < 0.05$ between E and D stages; $^{\$}P < 0.05$ between P and E stages; $^{\#}P < 0.05$ between P and M stages.

Total immunoglobulin levels in vagina during the estrous cycle

Total immunoglobulin levels were measured in vaginal secretions samples taken during the four different stages of the estrous cycle of mice to determine whether the lack of cyclic variation in the specific antibody response was unique to antigen used.

Total levels of IgA and IgG were increased during proestrus, IgA levels remained high at estrus, dropped at metaestrus and were lowest at diestrus. Whereas IgG levels were only high at proestrus, they dropped at estrus and remained low during metaestrus and diestrus (Fig. 4).

Discussion

The levels of total [7,8,12] and specific [3,16] immunoglobulins in the female genital tract have been reported to change over the course of the estrous cycle, or under the influence of sex hormones [10–12]. In light of these observations, it is clear that evaluation of humoral immunity in the genital tract must take into account the fluctuations in the levels of specific antibodies as a function of estrous or menstrual cycle. Some works have analyzed the effect of the stage of the estrous or menstrual cycle on total immunoglobulin levels at vagina, uterus and serum [7,8,12,17,18]. Whereas other reports have analyzed the influence of the estrous or menstrual cycle stage on the antibody response: a) only taking into account the stage at the time of a single vaginal immunization with live bacteria [19], or two oral immunizations with sperm [16]; or b) only considering the stage at the time of analysing the genital antibody immune response induced after intranasal immunization with virus [3] or after intramuscularly immunization with tetanus toxoid and keyhole limpet hemocyanin in addition to oral immunization with cholera toxin [17]. The influence of hormonal treatments on the specific immune response [10,11], has also been analyzed, as well as the effect of the cycle stage on the susceptibility to infection with virus [14,20]. In order to determine whether the changes in vaginal epithelium thickness [21] or the hormonal status [12] characteristic of estrus and diestrus modify significantly the specific antibody response, in the present study protoxin Cry1Ac was used as a model mucosal immunogen to assess the vaginal and intraperitoneal routes for their abilities to induce specific antibody responses in the large intestine, vagina and serum in mice. We tested the influence of three immunizations on the specific antibody response elicited at estrus and diestrus, that were the same estrous cycle stages at which the antigen was applied, and also are the two estrous cycle stages at which it has been reported variation on total immunoglobulin levels [7,8,12] or on the specific antibody response [3,16] elicited in vagina.

Both intraperitoneal and vaginal immunization of mice with Cry1Ac either at estrus or diestrus induces specific antibody responses at serum, vagina and large intestine. The stage of the estrous cycle have little or non influence in the magnitude of the response induced, since at serum only the IgM was slightly higher at estrus than at diestrus by both routes whereas in the large intestine only the IgA response elicited via the i.p. route changed, being higher at diestrus. At the vagina a non significant variation was observed in the IgA response elicited via the i.p. route, being higher at estrus than at diestrus.

Immunizing the lower female genital tract is difficult. The variation in female genital antibody levels likely reflects the changes that occur in the female reproductive tract during the course of the estrous cycle. The number of dendritic cells, the permeability of the epithelium to proteins and the ability of antigen-presenting cells (APC) to present antigens in vagina and uterus varies with the stage of estrous cycle and is under the regulation of hormones [12,22–25]. The levels of SC in the female genital tract

change over the course of the estrous cycle [12,26], according to the changes in total IgA uterine levels. In rodents, SC is present at its highest levels in uterine fluids during proestrus and estrus [26], and total IgA levels in rat uterine secretions are significantly higher during these same estrous stages when compared to diestrus [7,8]. The levels of total IgG have been shown to change with estrous cycle, with the highest levels occurring during proestrus [7,8]. The migration and localization of lymphocytes into genital tract is also influenced by the estrous cycle, since increased numbers of mesenteric lymph node derived IgA plasma cell precursors [6] and IgA and IgG plasma cells [27,28] are observed in genital tissues during proestrus and estrus, and minimal during metestrus and diestrus. These cyclic changes in SC and total antibody levels are also observed in humans, suggesting that the hormones that control the reproductive cycle are intimately involved in these changes [9,29,30]. Indeed, progesterone and estrogen have been shown to be directly responsible for influencing the levels of SC and antibodies [6,7,26], as well as the numbers of B cells in the genital tract [6,27]. Altogether, these data suggest that the increased migration of plasma cells to the genital tract during proestrus and estrus and the increase in SC production in the uterine epithelium that fluctuates with the estrus cycle and is associated with estradiol administration that may contribute to increased IgA during estrus. Notwithstanding present data suggest that the changes that occurs in vaginal epithelium during the estrous cycle do not influence the uptake of Cry1Ac via vaginal route since the level of antibody response elicited at estrus and diestrus after vaginal immunization at the same cycle stages are equal. In contrast, several reports supports that induction of immune response [19] or infection [14,21] via vaginal route is better achieved at diestrus than at estrus because the epithelium thickness is thinner [21] and antigens and pathogens penetrate easier or are taken up by a higher number of Langerhans cells [23]. Accordingly, vaginal immunization with a recombinant salmonella vaccine resulted in two different responses in mice: high and low. The level of specific immune response was correlated with the estrous status of mice at the time of vaginal immunization [19] since it was only successful at inducing an immune response when the mice were at late metestrus or diestrus. Supporting these data, Parr and Parr [22] have shown that tracers are taken up preferentially at diestrus by Langerhans cells in the vagina.

The IgA and IgG antibodies response [10,11] and susceptibility to infection are hormonally controlled, irrespective of the immunization route [14,31]. Non-specific host resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* infection by different routes, intravenous, intraperitoneal and intratracheal in Balb/c mice was influenced by estrous cycle and enhanced by estrogen [31]. After intranasal or intravaginal immunization of mice with HSV-2, with progesterone treatment, or intravaginally with estradiol treatment, antiviral IgG in serum and antiviral IgA responses elicited in vaginal secretions are similar, but the vaginal immunizations produced higher IgG titres in vaginal secretions [32,33]. In mice intranasally immunized with a recombinant adenovirus expressing herpes simplex virus glycoprotein B, specific IgG and IgA antibody are induced in vaginal washes [3]. Interestingly, specific IgA titers are higher during estrus than at diestrus and specific IgG titers are higher during diestrus than at estrus. This was further demonstrated in hormone-treated mice where progesterone administration induces a diestrus-like state that results in elevated specific IgG to IgA ratios [3]. In mice hormonally treated, it has been found that estradiol enhances the immune response, while progesterone-treated are more susceptible to infection [14,31]. Likewise it has been reported that estradiol increase uterine IgA and IgG levels in ovariectomized rats, but progesterone has no effect [8]. This reproductive cycle-drive immune response has been reported also in rhesus macaques [17]. Accordingly, several authors have showed that non-immunized mice are susceptible to intravaginal herpes simplex virus type 2 HSV-2 infection during diestrus but not during estrus [14,21]. The

difference in thickness and permeability of the vaginal epithelium, as well as the availability of viral receptors during these periods may be responsible, since progesterone treatment induces female mice into a diestrus-like state and makes them highly susceptible to intravaginal HSV-2 infection. Ovariectomized mice, which have a vaginal mucosa resembling those of mice in diestrus, are highly susceptible to HSV-2 inoculated intravaginally, but if they receive an estradiol treatment to stimulate estrus stage, they become resistant. Moreover the effect of estrous cycle, pregnancy, and sex hormones on vaginal infection by HSV-2 tested on a mouse model, indicated that the hormonal status of the female is an important determinant of vaginal infection since progesterone-dominated adult mice become infected but estradiol-dominated mice did not [21]. Progesterone treatment also enhances simian immunodeficiency virus transmission in macaque monkeys. The vaginal epithelium of progesterone-dominated mice is permeable to a variety of intraluminally-administered proteins, but the estrogen-dominated epithelium is not [21].

To explain why we did not find significant differences in the specific antibody responses elicited after immunization at estrus and diestrus, besides the possibility that Cry1Ac may be equally taken up at both cycle stages when it is administered via vaginal route, it must be taken into account that the immune response can vary according to the species studied, the route of administration, and the dose and type of the antigen [1,4,11,19,24,33,34]. We evaluated the immune response after three immunizations with a soluble immunogenic protein [1,13], in contrast to other studies, which employ a single application with replicant antigens to induce vaginal antibody responses [19]. Moreover most studies concerned with the induction of immune responses in the genital tract do not analyze the effect of the estrous cycle stage on the specific antibody response [32–34,40], and the few regarding to it, only take into account the stage at the time of immunization [16,19] or only consider the cycle stage at the time of analyzing the immune response [3]. Whereas in this work we considered both the same cycle stages at the time of antigen application and at the time of evaluating the specific antibody response. Several reports, which suggest that the estrous cycle influence the immune function in the genital tract are based on the changes observed in the uterine or vaginal total levels of IgA and IgG antibodies at different stages of the estrous cycle [7,8], whereas some works which evaluate the specific antibody immune response were performed on oophorectomized animals receiving sex steroid hormonal treatments, but not during the normal sexual cycle [12]. Additionally, in relation to the IgG isotype, the levels of total and specific antibodies in genital tract have been shown to change with the estrous cycle or hormonal treatments [3,7,8,12] but we could not observe such variations since immunization with Cry1Ac did not induce significant IgG responses in vaginal washes at any estrous cycle stage analysed.

Attempts to immunize the vagina in several animal species by systemic and mucosal routes have yielded inconsistent results [33–35]. Vaginal antibodies are induced as a result of natural or experimental infection of the lower reproductive tract or via intravaginal or intrauterine immunizations with a variety of live microorganisms [20] but many of these models requires progesterone treatments to achieve infection and immunity [33]. Intravaginal immunization with live microorganisms or virus infected cells has produced local antibody responses [33,36], but in most studies, the antibody response to local genital immunization was poor [37,38]. Alternate immunization routes for induction of IgA in female reproductive tracts have been tested but the optimal route is not established [4,39]. The female reproductive tract is an effector organ after immunization at distant oral, intranasal and intestinal inductive site [20,40]. However, generally the female genital tract is unable to respond well to non-replicating antigens or protein immunogens following intravaginal immunization. Strong adjuvants and large, multiple doses of antigen are often required to induce significant antibody responses in the genital tract [35,38].

With regard to immunization with soluble proteins, following vaginal immunization with cholera toxin, and CTB variable results have been reported. Species differences may be involved since CTB is a mucosal immunogen for humans [41,42] but it can induce tolerance in mice [43]. Local immunization with CTB in the female genital tract stimulates a local IgG antibody response that is not evident in orally immunized women [41]. Immunization with CTB elicits a specific IgA and IgG antibody response in vaginal secretions of humans [42]. In mice treated with progesterone throughout the study, vaginal and intranasal immunization with Cholera toxin B subunit (CTB) together with CT induces antibody responses in the female genital tract. Besides CTB can act as an efficient carrier for a conjugated antigen for induction of a specific antibody response in the genital tract after vaginal or intranasal immunization, although strongest vaginal antibody responses are achieved after intranasal immunization with the conjugate together with CT [44].

The finding that CTB induces a strong antibody response in the female genital tract after vaginal immunization [44,45] differ from the results reported by Haneberg et al. [4], who found that CTB did not induce any vaginal antibody response by this route in mice. A likely explanation for this discrepancy is that the animals used by Johansson et al. [44] were treated with progesterone while those used by Haneberg et al. [4] did not. Therefore, Cry1Ac may be a better immunogen than CTB, as it did not require progesterone treatment to induce vaginal immune response after vaginal route. The treatment with progesterone before immunization or infection has been used in several models to achieve immunity and infection via vaginal route and to reduce the variability in the results due to hormonal influence. Progesterone maintains the animals in a diestrus-like cycle; however, this hormone is known to affect the immune system [32,33]. Progesterone treatment increases the IgG antibody secreting cells response and antiviral titres in the genital tissue after mucosal immunization, but most markedly after vaginal immunization [32]. Moreover the development of vaccines able to induce immune responses at vaginal surfaces should be more attractive if they do not require hormonal treatments.

In present study, only IgA specific responses were induced in vagina. Accordingly intragastric immunization with sperm in rats at the different stages of the estrous cycle only induce IgA specific responses in vagina, which are highest at proestrus [16]. In contrast to other works, which predominantly induce, IgG responses at this site [32,33]. The possible explanations to these different results may be related to the kind of antigen employed (soluble non replicating versus replicating) and to the lack of employment of progesterone treatment in [16] and present work in relation to other works [32,33]. On the other hand, the magnitude of IgA specific responses induced in vagina after immunization with Cry1Ac was similar by the two routes, at the two cycle stages analyzed.

Both IgA and IgG are present in secretions from the genital tract and show variation with the sexual cycle [7]. Accordingly, when we measured total immunoglobulin levels along the estrous cycle, we found that both IgA and IgG levels in vaginal washes of Balb/c mice increased at the proestrous stage of the estrous cycle, but at estrous IgG dropped to low levels while IgA remained elevated. At diestrus both IgA and IgG levels were low. These data are similar to those reported in uterine secretions from rats [7,8] and for the distribution of IgA and IgG plasma cells in the mouse uterus [27,28]. However, some works suggest that the mechanisms controlling the amounts of immunoglobulin and uterus and vagina are different [8,48]. Most reports indicate that the uterus is the source of nearly all IgA, as its levels are dramatically decreased after hysterectomy in the woman and mice vagina, while IgG originates mainly from the vagina as it is present at normal levels [33,46,47], or is reduced by one half [34]. The amount of antibody in uterine fluid is regulated by steroid hormones, with larger amounts of both IgA and IgG during proestrus and estrous or estradiol treatment than during diestrus, or progesterone treatment and

following oophorectomy in rats [7,48]. In contrast, vaginal IgA and IgG are reduced by estradiol treatment. Armstrong [49] demonstrated that estradiol treatment caused fluid retention in the rat uterine lumen by closure of the cervix, and might reduce transudation across the vaginal mucosa by causing the vaginal epithelium to become thicker. On basis of these observations it has been suggested that estradiol increases uterine and decreases vaginal IgA mainly by causing vaginal closure [47]. Estradiol treatment would block the uterine component by closure of the cervix, and might reduce transudation across the vaginal mucosa by causing the vaginal epithelium to become thicker [47]. Estradiol given to ovariectomized rats increase uterine IgA and IgG., however, it does not alter the levels of blood IgA or IgG [7]. On the other hand, a rapid reversal of estrogen effect is caused by progesterone administration. This observation suggests that progesterone may cause cervical relaxation, thereby facilitating the passage of both immunoglobulins out of the uterus through the cervix [8].

Ovarian hormones that drive the menstrual cycle also influence genital tract immunity in female primates, but do not affect systemic total immunoglobulin or specific antibody levels [17]. The levels of antigen specific antibodies and total immunoglobulins in the cervical mucus of women and macaques vary with the stage of the menstrual cycle, the highest levels of antibodies occurred during menses, and the lowest levels occurred around the time of ovulation [17,34,50]. Although in contrast to present work, the study of Lü and coworkers did not consider the sexual cycle stage at the time of immunization, according to present data showing little or not variations at estrus and diestrus on the specific antibody responses elicited in serum and large intestine, they found that the antigen specific antibodies and immunoglobulin levels in serum and rectal lavages did not change with the menstrual cycle stage [17].

Several reports support that the quality and quantity of the antibody responses elicited at different mucosal surfaces depend on the immunization route, nature of antigen, animal species and site analyzed [4,15,19]. However, the vaginal or intraperitoneal immunization route had no effect on the magnitude of the response elicited by Cry1Ac immunization at the vagina and large intestine, but in serum higher IgG and IgM responses via i.p. route were observed.

According to present data, other authors have reported induction of vaginal antibody responses after intraperitoneal or other parenteral immunizations. Intraperitoneal immunization of rats with sheep erythrocytes induces specific IgA and IgG antibodies in female genital tract secretions [10]. It has been suggested that when antigen is placed in the peritoneal cavity, peritoneal IgA precursors are stimulated which subsequently populate the genital tract [34]. IgA lymphoblasts are known to migrate into the mouse genital tract during the estrous cycle [6]. Moreover, immunization with horse ferritin at two non-mucosal sites in the female pelvis of mice caused much higher titres in vaginal fluid than direct application of 10-fold larger doses of vaccine to the vaginal mucosa [5].

Biochemical properties of Entomocidal Cry proteins of *Bacillus thuringiensis* (Bt) such as their high resistance to proteolysis, solubility and stability in alkaline pH [2] make them an interesting alternative for the development of carriers of relevant epitopes in vaccines. We have demonstrated that Cry 1Ac is a potent mucosal immunogen capable of stimulating local and distant immune responses. Cry1Ac administered by all routes tested, i.p. rectal, oral, intranasal, (and vaginal in present work) induces specific antibodies in the serum and the mucosal samples analyzed, but the magnitude of the isotype responses depended on the route used and the mucosal site analyzed [1].

Induction of local immunity at genital mucosae is required to prevent sexually transmitted viral and bacterial infections [33,44]. The magnitude of the antibody responses elicited at the vaginal surface by Cry1Ac is remarkable, since usually induction of significant antibody responses in the female genital tract cannot be achieved with soluble proteins [51]. The main advantage of employing Cry1Ac over other

immunogens besides its innocuousness to vertebrates, its low cost production, and its stability, is that it can elicit antibody responses at systemic level and at several mucosal sites including the vagina that are not modified significantly throughout the reproductive cycle in spite of the well known estrous cycle variations on the antibody levels and specific antibody response, that are related to the hormonal changes, which are responsible of the genital tract epithelial changes such as thickness, expression of SC, number of antigen presenting cells which have been related to the genital immune response and susceptibility to vaginal infections [12,33]. Therefore our results suggest that Cry1Ac may be used as an antigen carrier to induce protective immunity against sexually transmitted diseases in the female genital tract.

Acknowledgements

This work was supported by CONACYT (México) Grant 34834M and UNAM DGAPA PAPIIT (México) Grants IN209198 and IN207800.

References

- [1] Moreno-Fierros L, García N, Gutiérrez R, López-Revilla R, Vázquez-Padrón R. Intranasal, rectal and intraperitoneal immunization with protoxin Cry1Ac from *Bacillus thuringiensis* induces compartmentalized serum, intestinal, vaginal and pulmonary immune responses in Balb/c mice. *Microbes and Infection* 2001;2:885–90.
- [2] Ge AZ, Pfister RM, Dean DH. Hyperexpression of a *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin-encoding gene in *Escherichia coli*: properties of the product. *Gene* 1990;93:49–54.
- [3] Gallichan WS, Rosenthal KL. Effects of the estrous cycle on local humoral immune responses and protection of intranasally immunized female mice against herpes simplex virus type 2 infection in the genital tract. *Virology* 1996;224:487–97.
- [4] Haneberg B, Kendall D, Amerongen HM, Apter FM, Kraehenbuhl JP, Neutra MR. Induction of specific immunoglobulin a in the small intestine, colon-rectum, and vagina measured by a new method for collection of secretions from local mucosal surfaces. *Infection and Immunity* 1994;62:15–23.
- [5] Thapar MA, Parr EL, Parr MB. Secretory immune responses in mouse vaginal fluid after pelvic, parenteral or vaginal immunization. *Immunology* 1990;70:121–5.
- [6] McDermott MR, Clark DA, Bienenstock J. Evidence for a common mucosal immunologic system. II. Influence of the estrous cycle on B immunoblast migration into genital and intestinal tissues. *Journal of Immunology* 1980;124:2536–9.
- [7] Wira CR, Sandoe CP. Sex steroid hormone regulation of IgA and IgG in rat uterine secretions. *Nature* 1977;268:534–6.
- [8] Wira CR, Sandoe CP. Hormonal regulation of immunoglobulins: influence of estradiol on immunoglobulins A and G in the rat uterus. *Endocrinology* 1980;106:1020–6.
- [9] Sullivan DA, Richardson GS, MacLaughlin DT, Wira CR. Variations in the levels of secretory component in human uterine fluid during the menstrual cycle. *Journal of Steroid Biochemistry* 1984;20:509–13.
- [10] Wira CR, Sandoe CP. Specific IgA and IgG antibodies in the secretions of the female reproductive tract: effects of immunization and estradiol on expression of this response in vivo. *Journal of Immunology* 1987;138:4159–64.
- [11] Wira CR, Sandoe CP. Effects of uterine immunization and estradiol on specific IgA and IgG antibodies in uterine, vaginal and salivary secretions. *Immunology* 1989;68:24–30.
- [12] Wira CR, Kaushic C, Richardson J. Role of sex hormones and cytokines in regulating the mucosal immune system in the female reproductive tract. In: Ogra PL, Mestecky J, Lamm M, Strober W, Bienenstock J, McGhee JR, editors. *Mucosal immunology*. San Diego: Academic Press; 1999. p. 1449–61.
- [13] Vázquez-Padrón IR, Moreno-Fierros L, Neri-Bazán L, De La Riva G, López-Revilla R. Intragastric and intraperitoneal administration of Cry1Ac protoxin from *Bacillus thuringiensis* induce systemic and mucosal antibody response in mice. *Life Sciences* 1999;64:1897–912.
- [14] Teepe AG, Allen LB, Wordinger RJ, Harris EF. Effect of the estrous cycle on susceptibility of female mice to intravaginal inoculation of herpes simplex virus type 2 (HSV-2). *Antiviral Research* 1990;14:227–36.

- [15] Moreno-Fierros L, Reséndiz-Albor AA, López-Revilla R. Different antiamebic antibody isotype patterns in the large and small intestine after local and systemic immunization of mice with glutaraldehyde fixed trophozoites. *Life Sciences* 1999;64:1079–89.
- [16] Allardyce R. Effect of ingested sperm on fecundity in the rat. *Journal of Experimental Medicine* 1984;159:1548–53.
- [17] Lü FX, Ma Z, Rourke T, Srinivasan S, McChesney M, Miller C. Immunoglobulin concentration and antigen-specific antibody levels in cervicovaginal lavages of rhesus macaques are influenced by the stage of the menstrual cycle. *Infection and Immunity* 1999;67:6321–8.
- [18] Rosenthal KL, Gallichan WS. Challenges for vaccination against sexually-transmitted diseases: induction and long-term maintenance of mucosal immune responses in the female genital tract. *Seminars in Immunology* 1997;9:303–14.
- [19] Hopkins S, Kraehenbuhl JP, Schödel F, Potts A, Peterson D, De Grandi P, Nardelli-Haeffliger D. A recombinant *Salmonella typhimurium* vaccine induces local immunity by four different routes of immunization. *Infection and Immunity* 1995;63:3279–86.
- [20] Parr MB, Parr EL. Protective immunity against HSV-2 in the mouse vagina. *Journal of Reproductive Immunology* 1997;36:77–92.
- [21] Parr MB, Kepple L, McDermott MR, Drew MD, Bozzola JJ, Parr EL. A mouse model for studies of mucosal immunity to vaginal infection by herpes simplex virus type 2. *Laboratory Investigation* 1994;70:369–80.
- [22] Parr MB, Parr EL. Antigen recognition in the female reproductive tract. I. Uptake of intraluminal protein tracers in the mouse vagina. *Journal of Reproductive Immunology* 1990;17:101–14.
- [23] Young WG, Newcomb GM, Hoskins AR. The effect of atrophy, hyperplasia, and keratinization accompanying the estrous cycle on Langerhans' cells in mouse vaginal epithelium. *American Journal of Anatomy* 1985;174:173–86.
- [24] Wira CR, Rossoll RM. Antigen-presenting cells in the female reproductive tract: influence of the estrous cycle on antigen presentation by uterine epithelial and stromal cells. *Endocrinology* 1995;136:4526–34.
- [25] Wira CR, Rossoll RM. Antigen-presenting cells in the female reproductive tract: influence of sex hormones on antigen presentation in the vagina. *Immunology* 1995;84:505–8.
- [26] Sullivan DA, Underdown BJ, Wira DA. Steroid hormone regulation of free secretory component in the rat uterus. *Immunology* 1983;49:379–86.
- [27] Canning MB, Billington WD. Hormonal regulation of immunoglobulins and plasma cells in the mouse uterus. *Journal of Endocrinology* 1983;97:419–24.
- [28] Rachman F, Casimiri V, Psychoyos A, Bernard O. Immunoglobulins in the mouse uterus during the estrous cycle. *Journal of Reproduction and Fertility* 1983;69:17–21.
- [29] Bjercke S, Brandtzaeg P. Glandular distribution of immunoglobulins, J chain, secretory component, and HLA-DR in the human endometrium throughout the menstrual cycle. *Human Reproduction* 1993;9:1420–5.
- [30] Usala SJ, Usala FO, Haciski R, Holt JA, Schumacher GF. IgG and IgA content of vaginal fluid during the menstrual cycle. *Journal of Reproductive Medicine* 1989;34:292–4.
- [31] Sano A, Miyaji M, Nishimura K. Studies on the relationship between the estrous cycle of BALB/c mice and their resistance to *Paracoccidoides brasiliensis* infection. *Mycopathologia* 1992;119:141–5.
- [32] Parr EL, Parr MB. Immune responses and protection against vaginal infection after nasal or vaginal immunization with attenuated herpes simplex virus type-2. *Immunology* 1999;98:639–45.
- [33] Parr MB, Parr EL. Female genital tract immunity in animal models. In: Ogra PL, Mestecky J, Lamm M, Strober W, Bienenstock J, McGhee JRJ, editors. *Mucosal immunology*. San Diego: Academic Press; 1999. p. 1395–409.
- [34] Kuttah S. Mucosal immunity in the human female reproductive tract. In: Ogra PL, Mestecky J, Lamm M, Strober W, Bienenstock J, McGhee JRJ, editors. *Mucosal immunology*. San Diego: Academic Press; 1999. p. 1423–33.
- [35] Livingston JB, Lu S, Robinson H, Anderson DJ. Immunization of the female genital tract with a DNA-based vaccine. *Infection and Immunity* 1998;66:322–9.
- [36] Ogra PL, Ogra SS. Local antibody response to poliovaccine in the human female genital tract. *Journal of Immunology* 1973;110:1307–11.
- [37] Parr EL, Parr MB. Immunization for a secretory response in the female reproductive tract. *Vaccine Research* 1992;1:221–5.
- [38] Yang SI, Schumacher GF. Immune response after vaginal application of antigens in the rhesus monkey. *Fertility and Sterility* 1979;32:588–98.
- [39] Lehner T, Bergmeier LA, Panagiotidi C, Tao L, Brookes R, Klavinskis LS, Walker P, Walker J, Ward RG, Hussain L, Gearing AJH, Adams SE. Induction of mucosal and systemic immunity to a recombinant simian immunodeficiency viral protein. *Science* 1992;258:1365–9.

- [40] Hook III EW, Pate MS, Hedges SR, Russell MW, Mestecky J. Mucosal immunology of sexually transmitted diseases. In: Ogra PL, Mestecky J, Lamm M, Strober W, Bienenstock J, McGhee JR, editors. *Mucosal immunology*. San Diego: Academic Press; 1999. p. 1463–81.
- [41] Kozlowski PA, Cu-Uvin S, Neutra MR, Flanigan TP. Comparison of the oral, rectal, and vaginal immunization routes for induction of antibodies in rectal and genital tract secretions of women. *Infection and Immunity* 1997;65:1387–94.
- [42] Bergquist C, Johansson EC, Lagergard T, Holmgren J, Rudin A. Intranasal vaccination of humans with recombinant cholera toxin B subunit induces systemic and local antibody responses in the upper respiratory tract and vagina. *Infection and Immunity* 1997;65:2676–84.
- [43] Weiner HL. Oral tolerance: immune mechanisms and the generation of Th3-type TFG β -secreting regulatory cells. *Microbes and Infection* 2001;3:947–54.
- [44] Johansson EL, Rask C, Fredriksson M, Eriksson K, Czerkinsky C, Holmgren J. Antibodies and antibody-secreting cells in the female genital tract after vaginal or intranasal immunization with cholera toxin B subunit or conjugates. *Infection and Immunity* 1998;66:514–20.
- [45] Wassén L, Schön K, Holmgren J, Jertborn M, Lycke N. Local intravaginal vaccination of the female genital tract. *Scandinavian Journal of Immunology* 1996;44:408–14.
- [46] Jalanti R, Isliker H. Immunoglobulins in human cervico-vaginal secretions. *International Archives of Allergy and Applied Immunology* 1997;53:402–8.
- [47] Parr EL, Parr MB. A comparison of antibody titres in mouse uterine fluid after immunization by several routes, and the effect of the uterus on antibody titres in vaginal fluid. *Journal of Reproduction and Fertility* 1990;89:619–25.
- [48] Wira CR, Sullivan DA. Estradiol and progesterone regulation of immunoglobulin A and G and secretory component in cervicovaginal secretions of the rat. *Biology of Reproduction* 1985;32:90–5.
- [49] Armstrong DT. Hormonal control of uterine lumen fluid retention in the rat. *American Journal of Physiology* 1968;214:764–71.
- [50] Kutteh WS, Prince SJ, Hammond KR, Kutteh CC, Mestecky J. Variations in immunoglobulins and IgA subclasses of human uterine cervical secretions around the time of ovulation. *Clinical and Experimental Immunology* 1996;104:538–42.
- [51] Gallichan WS, Rosenthal KL. Specific secretory immune responses in the female genital tract following intranasal immunization with a recombinant adenovirus expressing glycoprotein B of herpes simplex virus. *Vaccine* 1995;13:1589–95.