



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Estudios Superiores Iztacala

INFLUENCIA DE LOS ADYUVANTES CRY1AC Y
CT EN LA INDUCCIÓN DE ALERGIA EN PULMÓN.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

B I O L O G O

PRESENTA

Alfredo Meneses Aguirre

DIRECTORA DE TESIS

DRA. Leticia Moreno Fierros

LOS REYES IZTACALA TLALNEPANTLA, EDO
DE MEX. 2010





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.

DEDICATORIA.

Este trabajo en especial se lo dedico a mis abuelos Josué Aguirre Pérez y Fidel Meneses Meneses que en donde quieran que estén se que están muy orgullosos de mi, como yo de ellos por toda su sabiduría que me han dejado y sobre todo por todos los momentos que vivimos juntos por los buenos y malos ratos que pasamos a lado que son inolvidables que no cabria en una vida para agradecerles todo lo que he aprendido y que gracias a ustedes estoy hoy donde estoy realizando un camino en mi vida, por estar conmigo en cada paso que doy, por fortalecer mi corazón e iluminar mi mente, y su orientación y rigurosidad ha sido clave en mi formación como persona y a pesar de no estar presentes físicamente, se que procuran mi bienestar. También les agradezco el haberme dado siempre su confianza y no haberles defraudado. Así que con mucho amor va por ustedes abuelos que los quiero mucho.

Agradecimientos.

En primer lugar debo dar gracias a la vida por brindarme todo lo que envuelve a la vida y la oportunidad de haberme puesto en el lugar y momento indicado en la realización de esta tesis, que si bien ha requerido de esfuerzo y mucha dedicación por parte de la mi y mi directora de tesis, no hubiese sido posible su finalización sin la Cooperación desinteresada de todas y cada una de las personas las cuales han sido un soporte muy fuerte en momentos de angustia y desesperación.

A mi familia mi madre Leticia Aguirre por darme todo, ser mi fuerza y mi refugio y siempre estar al pendiente de mi gracias mama te quiero mucho. A mi hermana Cinthya por ser como eres muy alivianada y por tu rebeldía. A mi abuela Rita por ser mi segunda madre, darme tu cariño incondicional .

A la Dra. Leticia Moreno Fierros, por permitirme la oportunidad de realizar este trabajo de investigación, por la confianza, por su paciencia en los malos momentos. Gracias Doctora, porque sin su apoyo no hubiera podido lograr esto.

A los Dr's Marco Aurelio, Lety Verdin por todas sus enseñanzas, el tiempo por los experimentos que llegue echar a perder y sobre todo por sus buenos consejos queme han dado.

A los Dr's Maximiliano Ibarra, y Luis Ignacio Terrazas Valdés, miembros del Comité Tutoral, por las revisiones, los consejos y por su tiempo.

También dedico y agradezco con especial cariño a:

Mis compañeros del laboratorio por su compañía, por los buenos y los malos ratos, (mas buenos ratos que malos) por todos esos momentos. Conchis, Ana, Lucio, Oscar, Alfredo (phelps), stephanie, laura, a los que se han ido, y los nuevos compañeros que llegan. Gracias.

A mis amigos que bueno que no hemos vivido por todos los momentos Luis uriel, ale, guadalais, Maribel, lucio, yuriko, clarita, Laurita, Sandra, (che amigochos los quiero) a consuelo por ser una gran amiga y estar cuando la he necesitado. La lista se hace larga y no quiero dejar a nadie fuera, a todos los demás que se me puedan escapar gracias por todos los momentos.

A Miriam por todo este tiempo que te conozco darme tu cariño, confianza y estar conmigo cuando mas te he necesitado gracias por llegar a mi vida.

Índice

Índice.....	1
Índice de Tablas y Figuras.....	3
Lista de Abreviaturas.....	4
Resumen.....	6
Introducción.....	8
Organización del sistema inmune en pulmón.....	8
Vías aéreas conductoras.....	8
Parénquima pulmonar.....	9
Inducción inmune en el pulmón.....	11
Alergia.....	12
Modelos de asma alérgica en el ratón.....	14
Inmunización intranasal.....	16
Adyuvantes en mucosas.....	17
Antecedentes.....	18
Justificación.....	20
Hipótesis.....	21
Objetivo general.....	21
Objetivos particulares.....	21
Material y métodos.....	22
Esquema de inmunización.....	22
Obtención de células de lavados broncoalveolares (BAL).....	23
Obtención de células de pulmón.....	23
Análisis de información.....	24
Procesamiento histológico.....	24
Método de pinkus orceina- Giemsa.....	25
Inmunofluorescencia para microscopia confocal.....	25
Niveles de citocinas.....	25
ELISAS para detección de niveles de IgG1, IgG2a e IgE.....	26
Análisis estadístico.....	26
Obtención y purificación de protoxina Cry 1Ac.....	26
Preparación de hidróxido de aluminio.....	27
Resultados.....	28
La administración intranasal de la proteína Cry1Ac con OVA induce cambios en las poblaciones celulares pulmonares que no parecen relacionarse con una reacción alérgica.....	28
CT y Alum modifican las poblaciones de linfocitos T en pulmón y BAL.....	29
Las células CD4+ B220+ se incrementan en los pulmones de los ratones inmunizados con OVA+CT y OVA +Alum.....	33
Los granulocitos se incrementan en los pulmones de los ratones inmunizados con OVA+CT y OVA +Alum.....	35
La expresión de moléculas coestimuladoras se incrementó en los macrófagos de pulmón y BAL de ratones sensibilizados.....	37
Histopatológica.....	39
Detección de IgE y Gr1 por Inmunofluorescencia en pulmón.....	41

Respuesta de anticuerpos anti OVA de las subclases IgG1 e IgG2a en los ratones inmunizados	43
Respuesta de citocinas en ratones inmunizados.....	45
Discusión.....	49
Conclusiones.....	56
Referencias.....	57
Apendice 1	62

Índice de Tablas y Figuras.

Figura 1.1 Captación del antígeno y patrones migratorios para la inducción inmune en los pulmones.

Fig. 2.1 Esquema de inmunización.

Tabla 2.2 Proporción de células B220 y Gr1 que expresen IgE en pulmón.

Tabla. 2.2 Proporción de linfocitos B y T CD4+ y CD8+ en pulmones de ratones tratados con OVA sola o coadministrada con Cry1Ac, CT o Alum.

Tabla. 2.3 Proporción de linfocitos B y T CD4+ y CD8+ en lavados bronqueoalveolares BAL de ratones tratados con OVA sola o coadministrada con Cry1Ac, CT o Alum

Tabla 2.4 Proporción de linfocitos CD4+B220+ en pulmón.

Tabla 2.5 Proporción de linfocitos CD4+B220+ en BAL.

Tabla 2.6 Granulocitos se incrementan en pulmones de ratones inmunizados.

Fig.2.6 Poblaciones de granulocitos (eosinófilos, neutrofilos de de ratones inmunizados

Fig. 3.1 Expresión de las moléculas coestimuladoras CD80 y CD86 de macrófagos de pulmón y de BAL.

Fig. 3.2 Expresión de las moléculas coestimuladoras CD80 y CD86 de células dendríticas DC de pulmón y de BAL.

Fig. 4.1 Cortes del tejido pulmonar teñidos con Orceina –Giemsa.

Fig.5.1 Expresión de células IgE+ y Gr1+ en pulmones de ratones.

Tabla 6.1 Respuesta de anticuerpos Anti-OVA en ratones inmunizados

Fig. 6.1 Absorbancia de las subclases de anticuerpo1/IgG2a e IgE en sueros.

Tabla 6.2 Niveles de citocinas IL-4, IL-13 en ratones inmunizados.

Fig. 6.2 Diferencias en los niveles de de citocinas IL-4, IL-13

Resumen.

Tomando en cuenta que por la ruta intranasal la protoxina Cry1Ac de *Bacillus thuringiensis* es altamente inmunogénica, posee efectos adyuvantes e induce respuestas Th2 similares a las inducidas por la toxina de cólera (CT), que es una proteína inmunogénica, adyuvante y además alergénica; en el presente proyecto nos propusimos establecer la seguridad de la aplicación intranasal de Cry1Ac determinando si Cry1Ac puede favorecer el desarrollo de respuestas alérgicas cuando es coadministrada con ovoalbúmina por la vía intranasal. Se analizó si la aplicación intranasal de OVA + Cry1Ac induce alteraciones pulmonares similares a las provocadas por la coadministración de OVA+ CT o de OVA+ Al(OH)₃ (controles Positivos de modelo de alergia), o si los efectos son comparables a las inducidas por la aplicación de OVA sola o a las poblaciones de los animales controles sin tratamiento. Se distinguió claramente que por la administración intranasal de OVA+Cry no se incrementa la proporción de células B220 o Gr1 IgE+ en pulmón, con respecto a los grupos experimentales. En los lavados Bronqueoalveolares (BAL) se encontró mayor proporción de células B que T, más células CD4+ que CD8+, y una gran cantidad células T B220+ en pulmón, y mucho menor en el BAL. También la proporción de linfocitos T CD3+ encontramos un notable incremento en la proporción de linfocitos DP CD4+CD8+ OVA+ Alum y OVA +CT en pulmón. La proporción de granulocitos se incrementan en los pulmones, incrementándose más los neutrófilos en OVA+Cry, OVA y OVA+Alum que los eosinófilos que fue más baja en general en todos los grupos a excepción del grupo OVA+CT donde las dos poblaciones de granulocitos son mas homogéneas. La inmunización intranasal con Cry1Ac incrementa la activación de los macrófagos y células dendríticas de pulmón y BAL ya que incrementa la expresión de las moléculas coestimuladoras CD80 y CD86. El análisis histológico de los pulmones indica que la administración de Cry1Ac no observaron alteraciones patológicas en los tejidos pulmonares, OVA sola o coadministrada con Alum o CT inducen cambios histopatológicos característicos de una reacción alérgica, que demuestran un aumento en el número de células mononucleares varios eosinófilos, linfocitos. Además la expresión del número de células de IgE positivas, de granulocitos (Gr1+) así como la coexpresión de Gr1 e IgE por inmunofluorescencia de cortes de pulmón fue mucho mayor al igual en los grupos de OVA sola o coadministrada con Alum o CT que en el de Cry1Ac presenta un menor número de granulocitos y de células que expresen IgE, así como menor intensidad de fluorescencia de IgE y Gr1. También la inmunización intranasal indujo respuestas específicas de células B que produjo una respuesta de anticuerpos anti OVA de las subclases IgG1 e IgG2a donde Cry1Ac presenta valores más homogéneos de las dos subclases de Ab, con respecto a los demás grupos. Todos los tratamientos provocaron un

aumento en los niveles de IL13 e IL4, tanto en los sueros como en el BAL. En general los niveles de estas citocinas inducidos por la coadministración de Cry1Ac fueron menores a los inducidos por la administración de OVA sola. Estos resultados en conjunto indican que la coadministración intranasal de la protoxina Cry1Ac no favorece el desarrollo de reacciones alérgicas. Además, contribuyen a explicar las propiedades inmunogénicas y adyuvantes de esta proteína.

Introducción.

Organización del sistema inmune en pulmón.

Los pulmones se pueden dividir en dos compartimientos funcionalmente distintos: las vías aéreas conductoras recubiertas por el tejido de la mucosa, y el parénquima de pulmón, que abarca los alvéolos de paredes delgadas que se especializan para el intercambio del gas (Fig. 1.1). Distintas poblaciones de células del sistema inmune residen en estas áreas adyacentes, reflejando las funciones diferentes de los tejidos locales, así como los diferentes niveles de exposición a los antígenos aerotransportados a través del árbol respiratorio.

Las superficies epiteliales respiratorias presentan una interfase frágil grande con el ambiente externo, que está expuesto continuamente a una amplia gama de antígenos durante la respiración. El mantenimiento de la homeostasis inmunológica local y por lo tanto la integridad de estas superficies intercambiadoras de gases fuerza las capacidades discriminatorias del sistema inmune a sus límites, pues los antígenos entrantes son dominados por las proteínas altamente inmunogénicas pero inofensivas de origen vegetal y animal que, si evocaran respuestas inmunes adaptativas eficientes, condenarían al hospedero a la muerte prematura por la inflamación crónica de las vías aéreas. El ejercicio de equilibrio que el sistema inmune de la mucosa respiratoria debe realizar implica la discriminación de este ruido antigénico de fondo, de las señales mucho más raras transmitidas por los antígenos asociados a patógenos. (Holt, Strickland et al. 2008)

Vías aéreas conductoras.

El epitelio respiratorio de la mucosa de la vía aérea comprende a las células ciliadas y a las células caliciformes secretoras que, junto con la IgA secretada localmente, proporcionan los mecanismos para la eliminación mucociliar de antígenos inhalados. La mucosa contiene las redes densas de las células dendríticas (DCs) y los macrófagos que se desarrollan tempranamente en la vida. Predominando en la mucosa de las vías aéreas el subtipo de DCs mieloides sobre las plasmacitoides. Las DCs residentes de la mucosa se encuentran estratégicamente posicionadas dentro y debajo de la superficie epitelial para captar antígenos del lumen aéreo. Las células T también se encuentran en números relativamente elevados en la mucosa, tanto intraepitelialmente como dentro de la lámina propia subyacente. Como en el intestino, la mayoría de las células T intraepiteliales expresan CD8, mientras que las células T CD4 se encuentran con mayor frecuencia en la lámina propia. Ambos subconjuntos tienen principalmente un fenotipo de células efectoras y/o de memoria, definido por su expresión de

CD45RO. La lamina propia también contiene las células cebadas y células plasmáticas (que producen principalmente IgA polimérica) y algunas células B dispersas.

Además de poblaciones de células efectoras, la mucosa de las vías aéreas también contiene los sitios inductivos potenciales conocidos como tejido linfoide asociado bronquios (BALT). El BALT y el tejido linfoide asociado nasal (NALT) constituyen agregados linfoides organizados que son capaces de inducir respuestas de células T y B hacia los antígenos inhalados.

El BALT, está situado sobre todo en las bifurcaciones del bronquio en animales y seres humanos, está presente en el feto y se induce rápidamente después del nacimiento, especialmente en presencia de los antígenos. La inmunorespuesta humoral producida en el BALT es principalmente la secreción local de la inmunoglobulina A producida por las células B derivadas del BALT que migran a los sitios de la mucosa distantes. (Lefrançois y Puddington2006).

Parénquima pulmonar.

La ramificación progresiva de los bronquios da lugar a los bronquiolos que se extienden a los conductos alveolares que se ramifican adicionalmente en los sacos alveolares con terminaciones ciegas (Fig. 1.1). Los alvéolos están separados por las paredes finas del intersticio que contienen los tubos capilares pulmonares que están en contacto cercano con el espacio alveolar, y algunas células estromales (Fig. 1.1). Las células inmunes en el parénquima de pulmón están situadas tanto sobre el epitelio alveolar en las vías aéreas terminales como en el parénquima subyacente. Bajo condiciones de estado estacionario, la población de leucocitos en el espacio alveolar es dominada por los macrófagos alveolares (más el de 90% de la población total de células), el resto son principalmente células DCc y linfocitos T.

El parénquima de pulmón también contiene macrófagos dispersados, células DCS y linfocitos T, así como las células B y las células cebadas, pero no contiene células plasmáticas. Además, una gran cantidad de células T se localizan en el lecho vascular del parénquima de pulmón. La contribución de esta población de células a la homeostasis inmunológica local es confusa, pero muchas parecen estar activadas 'y podrían representar las células de memoria post-activadas de fase final en el camino para ser removidas a través del hígado o por el (*transporte hacia arriba de flujo de moco de los pulmones por células epiteliales ciliadas) (Holt, Strickland et al. 2008)

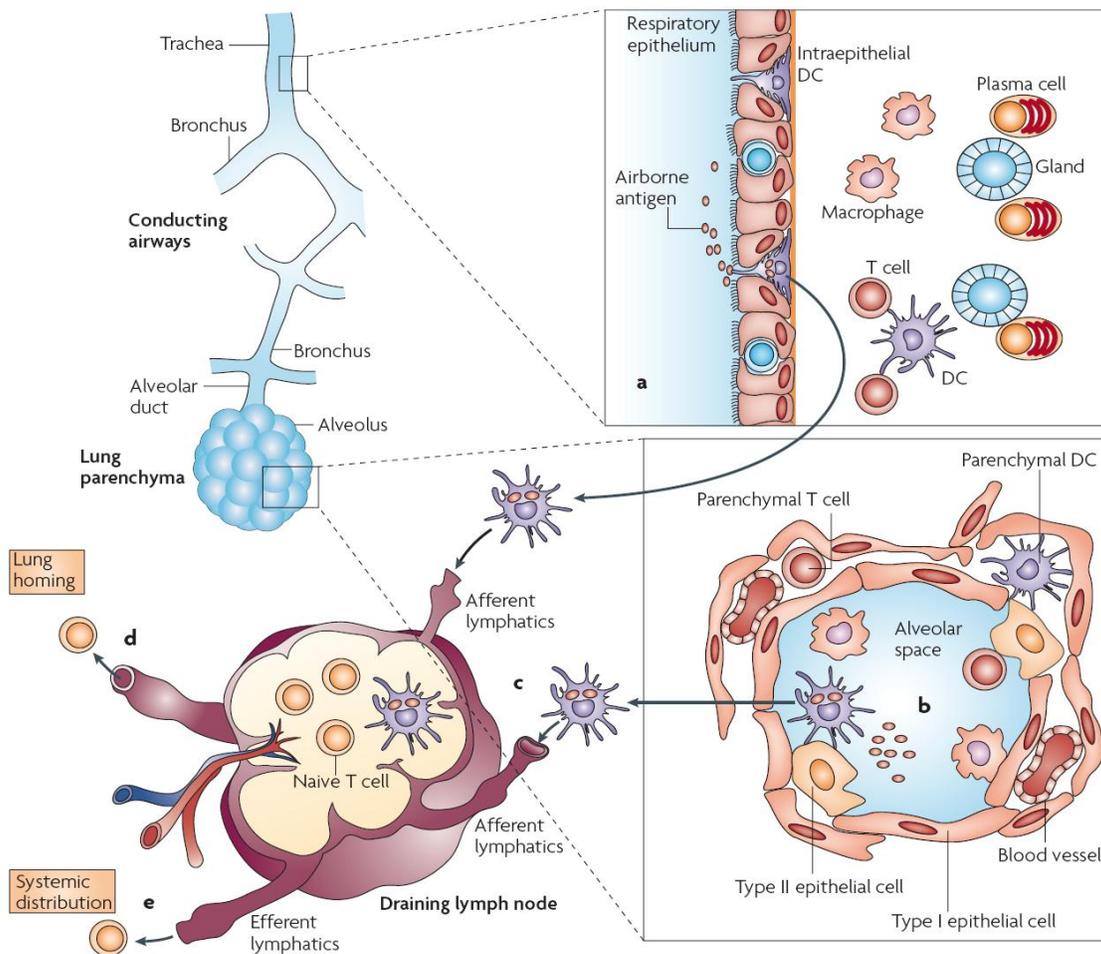


Fig.1.1 Captación del antígeno y patrones migratorios para la inducción inmune en los pulmones. Células inmunes locales en los dos compartimientos del pulmón que muestran la captura de antígenos aerotransportados y el subsecuente reconocimiento por las células T en los nodos de drenaje linfáticos. Los antígenos luminales son muestreados por las células dendríticas (DCs) que están situadas dentro de la superficie epitelial de la mucosa bronquial (a) o en los alvéolos (b). Las DCs que portan antígeno regulan la expresión del receptor de quimiocina CC-7 y migran a través de los vasos linfáticos aferentes hacia los nódulos linfáticos que drenan y presentan péptidos antigénicos a células T vírgenes antígeno específicas (c). Las células de T activadas proliferan y emigran a través de los vasos linfáticos eferentes y hacia vía el conducto torácico. Dependiendo de su perfil de receptor para migrar selectivamente a un tejido específico (tissue-homing), las células efectoras se saldrán del torrente sanguíneo ingresando a la mucosa bronquial a través de las venulas postcapilares en la lámina propia o a través de los tubos capilares pulmonares en el parénquima de pulmonar (d), o diseminarse desde la circulación sanguínea hacia el sistema inmune periférico (por ejemplo, a otros sitios de la mucosa) (e)

Inducción inmune en el pulmón.

La mucosa respiratoria está expuesta crónicamente a miles de antígenos ambientales no patógenos, sobre todo en las vías aéreas conductoras superiores. Para proteger contra consecuencias potencialmente inmunopatológicas de responder continuamente hacia dichos estímulos, la respuesta local típica toma la forma de no inflamatoria, inmunidad celular T cooperadora 2 (Th2) de bajo nivel y/o tolerancia inmunológica mediada por células T. Los mecanismos que controlan esta respuesta protectora parecen estar controlados por subpoblaciones de DCs, Aunque existe un nivel de control adicional de reserva para regular la intensidad de las respuestas de células T de memoria que rompieron la tolerancia, que evade la respuesta protectora en forma de una potente actividad inhibitoria de células T por macrófagos alveolares. Este mecanismo es particularmente activo en el parénquima pulmonar a través de las funciones inmunosupresoras de los macrófagos alveolares residentes, previendo una última línea de defensa para las superficies alveolares de intercambio de gases contra la inflamación mediada por células T.

La identificación de antígenos potencialmente patógenos es facilitada por receptores de reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos, tales como los TLRs que se expresan por la red de DCs centinelas de las vías aéreas mucosas (AM) y que resulta en el desvío efectivo de la respuesta Th2 “por defecto” y en la subsecuente generación de respuestas efectoras de memoria contra estos antígenos. Sin embargo es interesante notar que parece que se requiere cierto nivel (bajo) de estimulación de TLRs en DC en la mucosa aérea para permitir el reconocimiento inicial de antígenos inertes inhalados.

La inducción de la inmunidad en la superficie de la mucosa respiratoria y gastrointestinal, depende de los antígenos Ag(s) inhalados o ingeridos vía la mucosa de la zona respiratoria o digestiva, aunque por estas rutas se induce generalmente un estado de insensibilidad inmunológica específica que es llamado tolerancia oral o nasal. A este respecto, la tolerancia oral o nasal a algunos antígenos se puede abrogar por la administración intranasal u oral de antígenos dependiendo de varios factores, incluyendo la dosis del Ag(s), forma, y la frecuencia de la exposición (Wise, Baginski et al. 1999). Entonces por la ruta nasal se puede inducir típicamente tolerancia, o alergia.

Alergia.

Las reacciones alérgicas son una enfermedad inflamatoria crónica de las vías respiratorias, que se producen cuando un individuo que ha producido anticuerpos de la clase IgE en respuesta a un antígeno inocuo o alérgeno se encuentra de nuevo con el mismo alérgeno. El alérgeno desencadena la activación de la IgE vinculada a mastocitos en el tejido expuesto, dando lugar a la degranulación de los mastocitos y a una serie de respuestas que son característica de la alergia. Existen los alérgenos ambientales tales como los ácaros del polvo doméstico o el polen (Czerkinsky, Anjuere et al. 1999) y cuando un alérgeno es inhalado se asocia con el desarrollo de asma.

Se entiende como asma bronquial, a la alteración respiratoria causada por una inflamación crónica de las vías respiratorias, que lleva en cuestión de segundos a una constricción bronquial y secreción aumentada de moco y fluido. Una característica del asma es la infiltración de la submucosa aérea por linfocitos Th2 activados, monocitos, y de leucocitos polimorfonucleares como neutrófilos y especialmente eosinófilos.

La activación de eosinófilos, neutrófilos y mastocitos provocan la síntesis y liberación de quimiocinas, mediadores lipídicos tales como leucotrienos y factor activador de plaquetas (PAF), y de citocinas como la IL-4 e IL-13 que perpetúan la respuesta Th2. Estos mediadores contribuyen a las respuestas inflamatorias agudas y la crónica. (Mosmann and Coffman 1989)

Una de las características patológicas del asma más importantes es la hiperreactividad aérea o bronquial (AHR). La AHR es un incremento en la sensibilidad, presentado por los sujetos asmáticos hacia una variedad de estímulos incluyendo alérgenos, contaminantes, aire frío, ejercicio, agua destilada y methacolina que causan vasoconstricción. En humanos la AHR observada en pacientes asmáticos está asociada con remodelación aérea caracterizada por el depósito o exceso de colágeno en la capa subepitelial de la mucosa aérea debida a la inflamación crónica de las paredes bronquiales aéreas y la hiperplasia del músculo liso aéreo. (Busse and Lemanske 2001).

Así, el asma alérgica es una enfermedad inflamatoria crónica de las vías aéreas asociadas a una respuesta predominante Th2 a los alérgenos inhalados que llevan a la infiltración de la vía aérea por los eosinófilos (Van Rij et al 2002), y puede tener un efecto perjudicial sobre las vías aéreas respiratorias, que esta caracterizado por la obstrucción de las vías respiratorias, (AHR) y una infiltración celular de la vía aérea por los mastocitos, los linfocitos, los eosinófilos, los neutrófilos y aumento de las citocinas, en lavados bronco alveolares del pulmón (BAL) (Wise, Baginski et al. 1999). La alergia tiene una variedad de causas, incluyendo la exposición por la inhalación a los agentes alérgicos, incluyendo componentes microbianos y virales, aunque

en muchos casos los agentes causales sean desconocidos generalmente, la patología y el curso de la enfermedad son similares al asma sin importar la causa.

Las superficies de la mucosa se asocian a la generación de respuestas de la inmunoglobulina E (IgE), que desempeñan papeles esenciales en las alergias y el asma respiratorios. Las respuestas IgE pueden también contribuir a la patogénesis de enfermedades infecciosas, incluyendo el micoplasma y las pulmonías virales (Hamelmann E, K. 1999). La producción aumentada de la (IgE) en respuesta a los antígenos ambientales comunes depende de la activación de los mastocitos que tienen un mecanismo central en las reacciones alérgicas inmediatas incluidos alérgenos que van a inducir bronco constricción mediante el mínimo aumento de histamina y leucotrienos, D4. Además, el patrón de la expresión de las citocinas en líquido del BAL es crítico para entender los factores que influyen las inmunorrespuestas que pueden afectar la progresión y la prevención de enfermedades respiratorias.

El incremento en número de los eosinófilos, depende de la producción y regulación de las células T CD4+ que son un componente importante del infiltrado pulmonar (Unger, Hauet-Broere et al. 2003). La respuesta alérgica depende de la generación de una gran cantidad de células T alérgeno-específicas en pulmón así la tolerancia, la inmunidad, y la alergia son todas las consecuencias de la activación de la célula T CD4+ que desempeñan un papel central en la marcha de la regulación de la producción de la IgE y la función efector de los mastocitos y eosinófilos. (Hogan, Matthaei et al. 1998). Las células T CD4 se pueden dividir en dos poblaciones funcionales importantes, las células Th1 promueven respuestas transmitidas por células e inflamatorias con la producción de citocinas, tales como de IL-2 y de IFN- γ . Las respuestas Th1 son críticas en controlar las infecciones pulmonares micro bacteriológicas. En contraste con las células Th1, las células Th2 regulan respuestas de anticuerpo (Ab) con la secreción de IL-4, de IL-5, de IL-10, y IL-13 (Oumouna, Datta et al. 2006). Estas respuestas son cruciales en la orquestación de la respuesta inflamatoria alérgica que lleva a la hiper-respuesta de las vías aéreas (AHR) (Tomkinson, Duez et al. 2001). La IL-5 es la principal citocina que se sabe que actúa para regular el crecimiento, la diferenciación, la activación, y la supervivencia de eosinófilos y parece ser esencial en el desarrollo de la eosinofilia alérgica de la vía aérea y AHR en los ratones (Marinaro, Staats et al. 1995; Tomkinson, Duez et al. 2001). La IL-4 es crítica para comprometer a las células T al fenotipo de CD4+ Th2, mientras que la IL-13, que comparte varias respuestas biológicas con IL-4, puede también ser importante para el desarrollo de la eosinofilia alérgica y de AHR. La IL-13 desempeña un papel regulador en la activación Th2 (Oriss, Ostroukhova et al. 2005). IL-4 o IL-13 se requieren para inducir el cambio hacia el isotipo de IgE en las células B. Además, IL-4 e IL-13 regulan la expresión de la

clase de MHC II y el receptor de IgE de baja-afinidad (CD23, FcεRII) en las células B y en los monocitos, realzando la presentación del Ag así como la regulación de la función de los macrófagos (Van Rijt et al 2002, (Itakura, Tokuda et al. 2001).Importantemente, IL-4 e IL-13 aumentan también la expresión de VCAM-1 en las células endoteliales, facilitando el reclutamiento preferencial de eosinófilos y de células T a los tejidos de la vía aérea IL-4 e IL-13 también aumentan la secreción del moco de la vía aérea, que puede exacerbar la sensibilidad de la vía aérea (Hodge, Marinaro et al. 2001) pero sigue habiendo preguntas en cuanto como el sistema inmune regula el desarrollo de estos estados. Sin embargo estudios recientes (Marinaro, Staats et al. 1995) sugieren que las células Th1 puedan también contribuir a la patogenia de las respuestas inflamatorias asociadas a la alergia y asma.

Modelos de asma alérgica en el ratón

Se han propuesto muchos modelos experimentales de asma inducida en el ratón. En general, todos los protocolos de inducción se basan en una sensibilización sistémica mediante la inyección de un alérgeno con el fin de generar una respuesta inmunitaria de memoria, seguida de la reexposición local del sistema respiratorio al mismo alérgeno. En ocasiones, en la sensibilización se administra el alérgeno junto con un coadyuvante o compuesto inmunopotenciador inespecífico como el sulfato de aluminio o *alum* para garantizar una respuesta inmunitaria suficientemente intensa. Estudios comparativos han demostrado que no todas las cepas de ratón responden de igual manera al contacto con un alérgeno. En lo que concierne a las cepas más comúnmente utilizadas, se ha visto, por ejemplo, que los ratones BALB/c sensibilizados desarrollan una mayor hiperreactividad bronquial (Torres, Picado et al. 2005) (Herz, Braun et al. 1998), generan 4 veces más IgE total e IgE específica y contienen más células y una mayor concentración de citocinas en el BAL (Brewer, Kisselgof et al. 1999) que los ratones C57BL/6 sensibilizados. De entre los numerosos antígenos utilizados en la inducción de asma en ratones, el más común ha sido la Ovoalbúmina (OVA). En la mayoría de los modelos descritos la sensibilización del animal se realiza por vía intraperitoneal, mientras que en la reexposición al antígeno (reto o *challenge*) suele utilizarse la vía intranasal por aplicación directa en las fosas nasales o bien por nebulización (Torres, Picado et al. 2005). Los protocolos más recientes y más depurados proponen que ambas fases se realicen por vía aerógena con el fin de imitar el proceso natural de exposición en los pacientes asmáticos (Cates, Gajewska et al. 2003). La inducción de asma alérgica en los ratones requiere entre días y meses dependiendo del protocolo. Se ha trabajado principalmente con los modelos de corta duración (o exposición corta al alérgeno), en los que en un período relativamente breve (entre

días y pocas semanas) se expone a los animales a elevadas concentraciones de alérgeno, lo que da lugar al llamado “modelo de asma aguda”. Los modelos de exposición corta o agudos no reproducen algunos de los signos del asma alérgica observados en los asmáticos crónicos. Los modelos de asma alérgica inducida en el ratón generalmente se caracterizan por la existencia de hiperreactividad bronquial, inflamación broncopulmonar, aumento de la concentración sérica de IgE e hipersecreción mucosa. Además, los modelos de exposición larga ó “crónica” presentan cambios estructurales de las vías respiratorias. Uno de los aspectos determinantes para establecer un paralelismo entre el asma en pacientes y el asma en mürinos es la caracterización histopatológica de las vías respiratorias y del parénquima pulmonar. En el asma humana destacan una inflamación crónica broncopulmonar, con abundancia de eosinófilos localizados incluso intraepitelialmente y presencia también de otras células inflamatorias, y cambios estructurales característicos de la pared de las vías respiratorias que secundan al proceso inflamatorio (*remodeling*). En los modelos de asma alérgica inducida en el ratón la inflamación pulmonar se puede evaluar por 2 procedimientos: en el BAL y en secciones histológicas del pulmón (Jungsuwadee, Dekan et al. 2002; Mojtabavi, Dekan et al. 2002; Torres, Picado et al. 2005). En las secciones histológicas de pulmón teñidas con hematoxilina y eosina suele observarse una inflamación broncovascular que, se puede distribuir en focos pequeños y densos, aunque también puede abarcar zonas más extensas; estos últimos infiltrados son por lo general más difusos. En todos los procesos inflamatorios en ratones asmáticos hay, en mayor o menor medida, eosinófilos (del 30 al 80% según el modelo) y las vías respiratorias afectadas pueden ser tanto las principales como las más pequeñas. Las variaciones en cuanto a la composición celular, el grado de inflamación y la localización de los focos inflamatorios dependen del protocolo de inmunización y de la cepa de ratón, (Mojtabavi, Dekan et al. 2002; Torres, Picado et al. 2005). En los modelos de inducción más naturales como, por ejemplo, aquellos en los que se expone al ratón al alérgeno sin coadyuvantes como el *alum*, se tiende a generar un proceso inflamatorio más parecido al observado en las biopsias y autopsias de los bronquios de individuos asmáticos.

Numerosos grupos han investigado la importancia de las citocinas en los diversos modelos de asma en el ratón. Se ha estudiado la expresión local y sistémica de citocinas y se ha inducido asma a ratones genéticamente deficientes en alguna de ellas para establecer su relevancia. Además de su expresión local, también se ha determinado la expresión sérica de muchas de esas citocinas. Estos mediadores inmunitarios desempeñan un papel inmunorregulador de la respuesta alérgica, y algunas de ellas cumplen una función inductora del proceso inflamatorio broncovascular. El patrón de expresión de las citocinas ha llevado a pensar que en la mayoría

de los modelos de asma alérgica en murinos, al igual que en el humano, predomina una respuesta de tipo Th2 entre las cuales destacan la IL-4, la IL-5 y la IL-13. El primer contacto de un individuo atópico con el alérgeno lo sensibiliza o, en términos inmunológicos, induce la producción de anticuerpos anafilácticos específicos

frente a ese alérgeno. El principal anticuerpo anafiláctico es la IgE, una molécula cuyo aumento se observa en prácticamente todos los individuos con asma (Garlisi, Falcone et al. 1995); Se sabe, sin embargo, que la IgE producida se une a los mastocitos del sistema respiratorio (en el parénquima pulmonar y la mucosa de las vías respiratorias) y posiblemente a otras células que expresan receptores para esta inmunoglobulina.

Los mastocitos sensibilizados con IgE en su superficie y activados tras un nuevo contacto con el alérgeno pueden contribuir como células efectoras, mediante la liberación de una gran diversidad de mediadores, tanto al broncospasmo como a la inducción del proceso inflamatorio. Es de destacar que algunas células en individuos normales no tienen receptor de IgE lo expresan en individuos asmáticos (células dendríticas, macrófagos, eosinófilos, etc. (Torres, Picado et al. 2005), (Campbell, Vachier et al. 1998). En la mayoría de los modelos de asma inducida en el ratón también se detecta un aumento en el suero de la IgE total y de la IgE específica para el alérgeno. No existe un modelo experimental idóneo en el que se puedan estudiar todos y cada uno de los fenómenos patogénicos del asma (Persson 2002). La elección del modelo adecuado depende de la hipótesis de trabajo. Si además el contacto del alérgeno se realiza por vía respiratoria, tanto en su fase inicial de sensibilización como en fases posteriores, y de una manera continua (a diario o prácticamente a diario), en vez de en ciclos, se mimetiza mejor la forma de exposición natural a los alérgenos de los pacientes y, por lo tanto, se logra posiblemente un modelo más fiel.

Inmunización intranasal.

La inmunización intranasal es de uso general ya que induce inmunidad a lo largo de las vías respiratorias. Esta ruta de la inmunización da lugar a una respuesta IgA de la mucosa y a las respuestas sistémicas de IgG Ab, que tiene la ventaja de proteger las vías respiratorias enteras contra las infecciones respiratorias (Jones, Hodge et al. 2001). La inmunización intranasal también tiene el potencial para provocar las respuestas inmunopatológicas. Pues puede dar lugar a la generación de respuestas específicas de IgE Ab. Las superficies de la mucosa se asocian a la generación de respuestas de IgE, que desempeñan papeles esenciales en las alergias y el asma respiratorios (Hodge, Marinero et al. 2001). Las respuestas mediadas por IgE pueden también contribuir a la patogénesis de enfermedades infecciosas, Aunque la

inmunización intranasal puede lograr la inducción de respuestas inmunes antigénicas específicas a nivel local o sistémico, además de conferir inmunidad protectora, generalmente se requiere emplear alguna estrategia para incrementar las respuestas en mucosas, como el uso de diversos sistemas de entrega de antígeno o el uso de adyuvantes.

Adyuvantes en mucosas.

Entre las toxinas bacterianas con actividad adyuvante en mucosas más estudiadas se encuentran la toxina de cólera (CT) y la toxina termolábil de *E. coli* (LT). Tanto CT (Lycke and Holmgren 1986) como LT (Clements, Hartzog et al. 1988) tienen efectos adyuvantes en las respuestas mucosas cuando se coadministran o se conjugan con proteínas solubles que no son inmunogénicas en mucosas.

Se ha encontrado que CT y LT afectan varios pasos en la inducción de la respuesta inmune, los cuales solos o en combinación podrían explicar su fuerte actividad adyuvante después de la inmunización oral e intranasal (Holmgren, Czerkinsky et al. 2003). Entre estos efectos se incluyen: a) el incremento en la permeabilidad del epitelio que lleva a un incremento en la captación del antígeno coadministrado; b) el incremento en la presentación de antígeno en varios tipos celulares. (Bromander, Holmgren et al. 1991; Lycke, Karlsson et al. 1991). En relación con esta actividad CT incrementa la expresión de moléculas coestimuladoras (B7.1 y B7.2), de moléculas de histocompatibilidad MHC así como de receptores de quimiocinas e induce la secreción de IL-1 β . c) promueve la diferenciación de células B hacia el isotipo IgA, y d) tienen efectos complejos estimulatorios e inhibitorios en la proliferación de células T y en la producción de citocinas. En este sentido se ha reportado que LT induce una respuesta mezclada tipo Th1 y Th2 mientras que CT induce respuestas tipo Th2. (Williams, Hirst et al. 1999). Aunque hay reportes que indican que CT coadministrada o conjugada también induce respuestas mezcladas tipo Th1 y Th2, además de respuestas CTL, en contraste con la unidad B de CT (CTB) conjugada con OVA que solo induce respuestas Th2 (Ryan, Daly et al. 2001; Holmgren, Czerkinsky et al. 2003). Sin embargo a pesar de su potente actividad adyuvante la aplicación de CT y LT en humanos no es factible por su toxicidad y altos costos de producción. Para eliminar la toxicidad de CT y LT, se han empleado las subunidades B de CT (CTB) y de LT (LTB). Sin embargo la capacidad adyuvante de CTB y LTB mínima es por la ruta oral. Por la ruta intranasal CTB y LTB si presentan actividad adyuvante aunque menor que las holotoxinas. Recientemente se han desarrollado también mutantes no tóxicos de CT y LT que mantienen parcialmente la adyuvancia por la ruta intranasal (Dickinson and Clements 1995; Connell 2007), (Yamamoto, Kiyono et al. 1997) Lycke 2005, (Partidos, Pizza et al. 1996). Sin embargo existe preocupación acerca de la seguridad de la aplicación intranasal de las mutantes no tóxicas de CT y LT así como de CTB y LTB, ya que estas proteínas mantienen su capacidad de unirse a su receptor el gangliósido GM1 (Connell 2007), lo cual podría facilitar que las vacunas se dirigieran a los tejidos neuronales. De hecho se ha reportado que CT puede redirigir a las proteínas vacúnales hacia los tejidos neuronales vía el bulbo olfatorio (van Ginkel,

Jackson et al. 2000). Además una vacuna de aplicación nasal contra la influenza que se administraba en humanos con una baja dosis de LT (2 µg) tuvo que ser retirada del mercado porque provocaba parálisis facial. También se ha observado que LT puede provocar eosinofilia pulmonar y agravar infecciones virales (Eriksson and Holmgren 2002).

De lo anterior resalta la importancia de estudiar nuevos adyuvantes mucosos, que no sean tóxicos para humanos, que sean estables y de bajos costos, y que puedan aplicarse por vías mucosas. Las proteínas Cry1Ac de *Bacillus thuringiensis* reúnen estas características; ya que presentan alta resistencia a proteólisis, son estables en pH alcalino, no son tóxicas en vertebrados y sus costos de producción son bajos (Hofte and Whiteley 1989)

Antecedentes

Cry1Ac es una proteína producida por la bacteria *Bacillus thuringiensis* (Bt) Gram-positiva, aerobia estricta, morfológicamente relacionada con *Bacillus cereus* y *Bacillus anthracis*. Bt es considerada una bacteria ubicua ya que se ha aislado de todas partes del mundo y de muy diversos sistemas como suelo, agua, hojas de plantas, insectos muertos, telarañas, etc. A Bt se le diferencia de *B. cereus* y *B. anthracis* por contener un cuerpo paraesporal conocido como cristal, el cual es de naturaleza proteica y tiene propiedades insecticidas. Este cristal está constituido por proteínas denominadas δ -endotoxinas también conocidas como proteínas Cyt y Cry. Estas proteínas denominadas Cry son específicas para los insectos y son inocuas para los mamíferos y son completamente biodegradables (Hofte and Whiteley 1989). Las proteínas Cry se han utilizado como bioinsecticidas comerciales desde 1930, su actividad entomopatogénica ha sido ampliamente estudiada, sus sistemas de expresión han sido optimizados y se producen a través de fermentación en *B. thuringiensis*, y mediante microorganismos y plantas transgénicos.

Se ha sugerido que los cristales de estas proteínas pudieran tener actividad antitumoral contra el sarcoma Yoshida en ratas (Prasad and Shethna 1975). Sin embargo, las propiedades inmunológicas de estas proteínas solamente han sido estudiadas por nuestro grupo de investigación.

En reportes previos del laboratorio se ha demostrado que Cry1Ac recombinante clonada a partir de *Bacillus thuringiensis* es altamente inmunogénica y posee efectos adyuvantes tan potentes como los de la toxina del cólera tanto a nivel mucoso como sistémico (Vazquez *et al* 1999^a, b, Moreno-Fierros *et al* 2000, 2002, 2003).

La inmunogenicidad mucosa y sistémica de Cry1Ac se ha evaluado aplicando a la proteína por distintas rutas de inmunización en ratones Balb/c. Nuestros resultados indican que la inmunización intranasal (in), rectal (r), vaginal, intraperitoneal (ip) y oral con Cry1Ac es capaz de inducir respuestas de anticuerpos en suero y en varias secreciones mucosas (vaginales, intestinales y de tracto respiratorio) (Vázquez *et al.* 1999^a, Moreno-Fierros *et al* 2000, 2002).

Los efectos adyuvantes de Cry1Ac en la respuesta de anticuerpos sistémica y mucosa se han observado coadministrándola con proteínas y polisacáridos, por las vías oral, ip, in y r. encontrando efectos adyuvantes en la respuesta de anticuerpos hacia el antígeno de superficie de hepatitis B (Vazquez-Padrón *et al* 1999^a), péptidos de VIH (Esquivel-Perez and Moreno-Fierros 2005) y polisacáridos de pneumococos (Moreno-Fierros *et al* 2003). Además se ha encontrado que Cry1Ac puede incrementar la protección en contra la infección por *Naegleria*

fowleri cuando es coadministrada con lisados amibianos por la ruta intranasal (Rojas-Hernandez, Rodriguez-Monroy et al. 2007).

Los resultados de las investigaciones realizadas por nuestro grupo indican también que la protoxina Cry1Ac *Bacillus thuringiensis* ejerce efectos inmunomoduladores en linfocitos y macrófagos (en linfocitos induce activación, proliferación e induce y/o modifica la expresión de citocinas, modifica la expresión de receptores de migración homing y de moléculas de adhesión endotelial; en macrófagos incrementa la expresión de moléculas coestimuladoras).

Los resultados de las investigaciones sobre las propiedades inmunológicas de la protoxina Cry1Ac *Bacillus thuringiensis* en conjunto apoyan la utilidad potencial de la actividad de esta proteína como una herramienta para incrementar la eficacia de vacunas induciendo inmunoprotección en mucosas (si se emplea ya sea como adyuvante, o como inmunomodulador) así como para caracterizar la compartimentalización del sistema inmunitario de las mucosas. Sin embargo, para definir su utilidad como adyuvante vacunal es importante establecer la seguridad de la administración intranasal de Cry1Ac determinando si la proteína Cry1Ac es alergénica o puede favorecer el desarrollo de respuestas alérgicas cuando es coadministrada con otro antígeno por la vía intranasal.

Consideramos importante realizar este estudio en virtud de que se ha descrito que la toxina de cólera favorece el desarrollo de respuestas alérgicas (Simecka, Jackson et al. 2000),(Wikstrom, Batanero et al. 2006), y que nosotros hemos observado que la respuesta inmune inducida con Cry1Ac es parecida a la inducida con la toxina de cólera en varios aspectos. Primero hemos observado que la adyuvantividad de Cry1Ac es similar a la de la toxina del cólera. Asimismo hemos observado que cuando Cry1Ac es administrada por la ruta intranasal induce altas respuestas de anticuerpos, induce activación de linfocitos e induce fuertes respuestas de citocinas Th2. Es importante mencionar que este tipo de respuestas son similares a las obtenidas por la administración intranasal de toxina de cólera (Williams, Hirst et al. 1999), que es considerada el más potente inmunógeno y adyuvante de mucosas.

Además es importante mencionar que algunos de los trabajos que hemos publicado relacionados con la inmunogenicidad y adyuvantividad de Cry1Ac han sido citados por varios autores, (Kuiper, Kleter et al. 2001; Siegel 2001), preocupados por la bioseguridad de los alimentos transgénicos que contienen proteínas Cry1Ac, porque aunque nos hemos enfocado al estudio de su potencial utilidad vacunal, surge la posibilidad de que el consumo de alimentos transgénicos o que contienen proteínas Cry pudieran provocar alteraciones inmunitarias en los consumidores (Vazquez –Padrón et al 2000 a,b).

Por lo tanto en este proyecto planteamos usar un modelo murino de alergia a ovoalbúmina para determinar si la inmunización intranasal de OVA con Cry1Ac como adyuvante induce respuestas alérgicas en mucosas respiratorias. Se eligió este modelo porque la administración de proteínas solubles como la ovoalbúmina (OVA) por la ruta nasal induce típicamente tolerancia, pero puede inducir respuestas alérgicas si se coadministra con adyuvantes que polaricen la respuesta hacia Th2 como la toxina del cólera (CT) (Torres, Picado et al. 2005; Wikstrom, Batanero et al. 2006).

Justificación.

Tomando en cuenta que por la ruta intranasal la protoxina Cry1Ac de *Bacillus thuringiensis* es altamente inmunogénica, y posee efectos adyuvantes e induce respuestas Th2 similares a las inducidas por la toxina de cólera (CT), que es una proteína inmunogénica, adyuvante y alergénica; en el presente proyecto nos propusimos establecer la seguridad de la aplicación intranasal de Cry1Ac determinando si esta proteína puede favorecer respuestas alérgicas cuando es coadministrada con ovoalbúmina por la vía intranasal.

Hipótesis.

La administración intranasal de Cry1Ac favorece el desarrollo de alergia.

Objetivo general.

- Determinar si la protoxina Cry1Ac es alergénica o ejerce un efecto alergénico estimulador en un “modelo murino de asma agudo”, cuando es coadministrada con ovoalbúmina por la vía intranasal.
- Analizar si la aplicación intranasal de OVA + Cry1Ac induce alteraciones pulmonares similares a las provocadas por la coadministración de OVA+ CT o de OVA+ Al(OH)₃ (controles Positivos de modelo de alergia), o si los efectos son comparables a las inducidas por la aplicación de OVA sola o a las poblaciones de los animales controles sin tratamiento.

Objetivos particulares

1. Determinar por citometría de flujo si la aplicación intranasal de OVA + Cry1Ac induce cambios en las poblaciones pulmonares de linfocitos y granulocitos, relacionados con una reacción alérgica.
 - 1.1. Determinar si se modifica la proporción de células B y granulocitos que expresen IgE,
 - 1.2. Determinar si se modifican las proporciones de linfocitos B y T CD4 y CD8
 - 1.3. Determinar si se incrementa la proporción de células CD11b y CD11c que expresan moléculas coestimuladoras CD80 y CD86
2. Determinar si la administración de Cry+ OVA induce cambios histopatológicos característicos de una reacción alérgica.
 - 2.1. Obtener pulmones de los animales tratados y controles y analizar histológicamente en cortes teñidos con tinción HyE y Giemsa si existe evidencia de respuesta inflamatoria o alteraciones histopatológicas en los tejidos de los animales inoculados con OVA+Cry
 - 2.2. Analizar por inmunofluorescencia cortes de pulmón si existe incremento en la

expresión de IgE y Gr1.

3. Determinar si al administrar OVA sola o Coadministrarla con Cry1Ac o CT por la vía intranasal se elevan los niveles de IgG1, IgG2A, IgE total y específica hacia OVA.

4. Determinar si se modifican los niveles de citocinas Th2 y Th1 (IL4, IL5, IL13, IFN γ , TNF α , IL-2) en suero, lavados broncoalveolares.

Material y métodos.

Estrategia para evaluar si la co-administración de la Protoxina Cry1Ac intranasal con OVA induce respuestas alérgicas.

Se uso un modelo de alergia a ovoalbúmina para determinar si la inmunización intranasal de OVA con la Protoxina Cry1Ac como adyuvante induce respuestas alérgicas en mucosas respiratorias.

Esquema de inmunización.

Se utilizaron ratones Balb/c hembras de 6 a 8 semanas. Proporcionados por el bioterio de la FES Iztacala, cuentan con la aprobación del comité de Bioseguridad de la FES Iztacala. Se formaron 4 grupos experimentales (n= 6) y un grupo control.

Como control positivo de modelo de alergia, un grupo se administró al día cero y al día siete con 100µg de OVA +2mg de Al(OH)₃ vía intraperitoneal, mientras que los otros grupos fueron inmunizados vía intranasal los días cero y 7 con 100 µg de OVA sola o coadministrada con 5µg CT, o 5 µg Cry1Ac. Posteriormente los 4 grupos experimentales recibieron dosis de 25 µg de OVA los días 14, 15, 16, 19, 20, y fueron sacrificados el día 21 (24 horas después de la última inmunización). Se aislaron células bronco alveolares y de tejido de pulmón, y se analizaron por citometría de flujo las poblaciones de linfocitos, granulocitos, monocitos y dendríticas (de Heer, Hammad et al. 2004). Se colectaron sueros y lavados bronco alveolares para análisis de citocinas y anticuerpos. Los cambios histopatológicos característicos de una reacción alérgica se evaluaron en cortes de muestras de tejido de pulmón, que se procesaron con la técnica histológica de rutina, utilizándose las tinciones de Orceina- Giemsa y Hematoxilina-Eosina. (Torres, Picado et al. 2005). También se analizó la presencia de IgE y de granulocitos por microscopía confocal en cortes de pulmón (Wikstrom, Batanero et al. 2006).

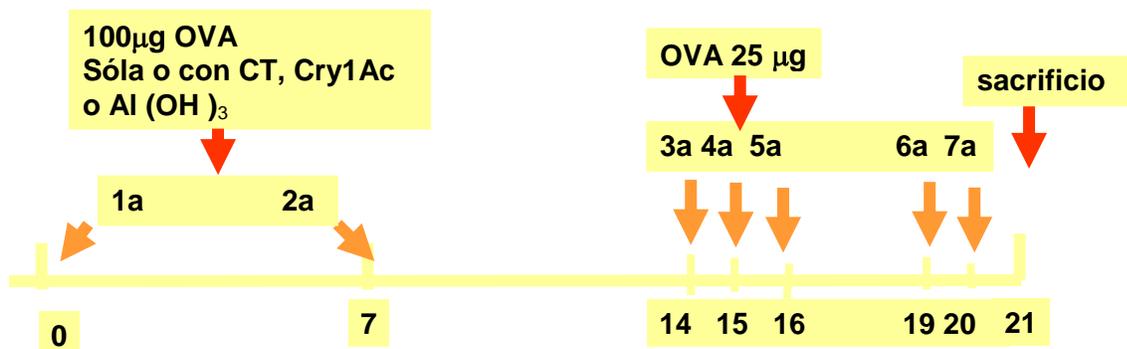


Fig. 2.1 Esquema de inmunización.

Obtención de células de lavados broncoalveolares (BAL).

Los ratones se sacrificaron por dislocación cervical, después se realizó un corte longitudinal exponiendo la cavidad torácica. Se abrió la cavidad torácica y para la obtención de las células traqueó alveolares se retiraron los pulmones con la tráquea a la cual se le colocó una cánula y se le realizaron dos lavados el primero se le inyectó 1 ml de PBS frío estéril y se recuperó en una caja de petri el fluido perfundido a través de las paredes pulmonares, se centrifugó el sobrenadante y se almacenó a -70° , para el segundo lavado se le inyectaron 3 ml de PBS frío estéril que fueron recuperados y se centrifugaron a 1500 rpm por 10 min. a 4° C. Se recuperó la pastilla celular y se le agregaron 2 ml de medio RPMI Y 6ml de amortiguador de Lisis (para lisar eritrocitos), se centrifugó de igual manera, y se lavó nuevamente la pastilla con RPMI y el paquete celular se resuspendió en RPMI.

Obtención de células de pulmón.

Los pulmones extraídos del ratón se maceraron con embolo de plástico y fueron filtrados con organza al cual se agregaron 3ml de RPMI y 8 ml de amortiguador de Lisis y colocados en un tubo cónico de 15 ml para después ser centrifugados a 1500 rpm por 10 min a 4° C. Se decantó y se recuperó la pastilla y se resuspendieron las pastillas con 2 ml de RPMI. Se tomaron 10 μ l. De la muestra y se le añadieron 80 μ l de RPMI 1640 y 10 μ l de azul Tripán para exclusión de células.

Tinción de linfocitos, macrófagos y leucocitos polimorfonucleares.

Las células aisladas se centrifugaron a 1500 rpm por 5 min. a 4° C, una vez centrifugados se decantaron y se les agregó 20 μ l de la solución de los siguientes anticuerpos: IgE FITC, Gr1 APC, B220 PE, CD11c Cy5PE, CD80 PE, CD86 FITC, CD 11 b Cy5, CD3 Cy5, B220 Cy5PE, CD4 FITC, CD8 PE, a las células disgregadas de pulmón y 10 μ l a las de traqueo pulmonar y se resuspendieron y se incubaron 30 min. a 4° C en oscuridad, pasado este lapso se les agregó 500 μ l de PBA para posteriormente centrifugarlos a 1500 rpm a 4° C por 7 min. Una vez hecho esto el sobrenadante fue decantado y se le agregaron 300 μ l de paraformaldehído 1% y se resuspendió la pastilla, la solución es colocada en tubos de FACS y se adicionaron 150 μ l de paraformaldehído 1% La adquisición de datos se llevó a cabo mediante citometría de flujo en un Calibur (Becton Dickinson, San José, CA) los eventos contados fueron un mínimo de 50,000. El análisis de resultados se llevó a cabo en un Software para análisis de citometría de flujo (LYSYS II). Los resultados se presentaron como porcentajes de células positivas.

Análisis de información.

Todos los datos fueron analizados por el software WinMDI 2.8 para determinar las diferencias entre los grupos experimentales.

Obtención de suero

Se obtuvo a partir de la sangre colectada por punción cardiaca o por punción de la arteria aorta abdominal. El suero se recuperó por centrifugación y se almacenó a -70°C hasta su uso.

Procesamiento Histológico.

Después de obtener los pulmones, fueron fijados en una solución de sales de zinc a un pH 7.4 por 72 hr haciendo un cambio de fijador nuevo, después se lavaron del exceso de las sales de zinc en agua mq en agitación 24 horas. Pasado ese tiempo se deshidrataron en alcoholes de 70%, 80% y 90% 2 horas, en cada uno respectivamente, alcohol 100% una hora y en butanol 24 horas. Pasado ese lapso los pulmones pasaron a la primera inclusión en parafina 24 hrs. cada cambio para después ser incluidos. Se hicieron cortes de $5\mu\text{m}$ con ayuda de un micrótopo, los cortes se montaron en laminillas, previamente lisinadas al cual se le agregaron unas gotas de ruyter para que el tejido quedara bien extendido, y se dejaron las laminillas en un horno a 60°C durante 24 horas para que se adhiriera mejor el tejido. Se realizó tinción de H-E y se estandarizo el método de Pinkus orceina- Giemsa

Tinción de Hematoxilina, Eosina (H YE)

Los cortes de pulmón deben ser entre $4-6\mu\text{m}$, las laminillas se hidrataron primero en Xilol I, Xilol II y Xilol-alcohol 5 minutos en cada Xilol respectivamente, después en OH- 100%, 90%, 80% y 70% 3 minutos en cada uno, después las laminillas pasan por agua destilada 3 minutos, Hematoxilina de Harris cinco minutos, unos segundos en alcohol ácido, y se volvieron a lavar en agua 1 minuto para después en eosina alcohólica 3 minutos. Después se enjuagaron en agua del exceso del colorante y se deshidrataron en OH 70% 1 min, OH 80%, 90%, 100% y OH- Xilol 3 minutos en cada uno, y Xilol I y Xilol II 5 minutos respectivamente. Fueron montadas con Entellan (Merck).

Método de Pinkus Orceina- Giemsa.

Se hidrato igual, que (H Y E) después las laminillas pasaron en Orceina 30 minutos, se enjuagaron con agua destilada 15 minutos y después se dejaron en el colorante de Giemsa al 1% a un pH de 4.4 , en un buffer de fosfatos- citratos por 24 horas, se deshidrato y montó igual que en la tinción de H y E.

Inmunofluorescencia para microscopia confocal.

Las laminillas lisinadas se hidrataron, se permeabilizo con PBS-triton al 0.07%, el bloqueo fue con suero fetal bovino al 5% en PBS-tritón por 1 hora a temperatura ambiente (T.A.). Después pasado el lapso se hacen 3 lavados con el PBS – triton. Se incubaron con la mezcla de anticuerpos anti IgE FITC (Beckton Dickinson) en dilución (1:1000) y anti LyG-6 APC (eBioscience) (1:500) en PBS-triton, 200 µl por laminilla incubando por 2 horas a T.A en oscuridad, pasado el lapso se volvieron hacer tres lavados con PBS-triton 5 min en cada uno, PBS 1x un minuto, y se realizó contra-tinción con Hematoxilina de Weigert 30' se lavaron del exceso con agua destilada un minuto, y procede a deshidratarse, al final se monto con Entellan (Merck Germany) y se guardan a -20°C en papel aluminio. Las imágenes fueron obtenidas en un microscopio confocal modelo marca Leica (Mannheim, Germany).

Niveles de citocinas.

Los niveles de citocinas in vivo, en suero y lavados traqueo pulmonares (IL-4, IL-13) se evaluaron por el método de *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay* (ELISA), tipo sándwich Peptotech, siguiendo las instrucciones de manufactura como sigue, las placas de 96 pozos marca Nunc se recubrieron con 100µl del anticuerpo de captura a una concentración de 1-2 µg/ml en PBS, y se dejaron incubando durante toda la noche a 4°C. Se lavan las placas 4 veces con PBS-T y se bloquearon con 300 µl de albúmina serica bovina (PBA) al 1% en PBS-T e igualmente se dejo incubando toda la noche a 4°C. Posteriormente las placas se lavaron 4 veces con PBS-T y agregaron las muestras de suero por duplicado a una dilución 1:2.5 en PBS-T+BSA al 1% se dejo incubando 2 horas a temperatura ambiente. En otros pozos se coloco una curva por duplicado de una concentración conocida de la citosina a analizar (IL-4, IL-13). Posteriormente las placas se lavaron por 4 veces con PBS-T y se añadió 100µl de anticuerpo biotilnado anti-citocina a una concentración de 0.25µg/ml; se dejo incubar por 2 horas a temperatura ambiente y se lavaron 4 veces con PBS-T. Se añaden 100µl de estreptoavidina peroxidasa a una dilución 1:5000 en PBS-T+BSA al 1% se deja incubando la placa por 30 minutos a temperatura ambiente y se lavó 4 veces con PBS-T. Se añadieron 100µl de sustrato ABTS 2,2'-Azino-DI-(3-Ethylbenzthiazoline-6-Sulfonic Acid), y se incubó a temperatura ambiente (5-20 min). Finalmente, se midió la absorbancia a 405nm en un lector de microplacas (Termo-Labystems). Las concentraciones de citocinas de las muestras se calcularon los valores en la curva de citocinas.

Para el análisis de citocinas *in vivo* en sueros y lavados broncoalveolares de las siguientes citocinas: IFN γ , TNF α , IL-5, IL-4, IL-2; se utilizó el BD CBA Mouse Th1 Th2 Kit (BD Biosciences Pharmingen San Diego, CA), se mezcló 25 μ l de muestras con 25 μ l de las perlas que contienen cada una de las citocinas más 25 μ l de agente de detección PE y se incubó por dos horas a temperatura ambiente, pasado este lapso se centrifugó a 1500 rpm por 5 min a 4° C, la pastilla se resuspendió con 300 μ l de Wash buffer 1x y se leyeron las muestras en el citómetro de flujo FACScalibur usando el CB BDA Software.

ELISAS para detección de niveles de IgG1, IgG2a e IgE.

Para determinar las inmunoglobulinas específicas para OVA en suero, se usó una prueba de ELISA indirecta (Moreno-Fierros et al 2000). Las placas de 96 pozos fueron recubiertas con 100 μ l de OVA (10 μ g proteína/ ml) en buffer de carbonatos (0.1 M Na₂CO₃, Ph 9.6) y se incubó toda la noche a 4°C, después se lavaron con PBS-T, se bloquearon con leche descremada al 6% en PBS-T y se incubaron 2 h a temperatura ambiente. Diluciones seriadas de suero comenzando 1:200 en PBS-T se colocaron en las placas y se incubaron toda la noche a 4°C. Posteriormente las placas se lavaron con PBS-T y se agregaron anticuerpos peroxidados anti- IgG1, e anti- IgG2a, 1:1000; anti- IgE, 1:1000; los anticuerpos se incubaron 2 h después las placas se lavaron con PBS-T. Se añadió 100 μ l de solución de sustrato ABTS 2,2'-Azino-DI-(3-Ethylbenzthiazoline-6-Sulfonic Acid) y se incubó a temperatura ambiente (5-20 min). Finalmente, se midió la absorbancia a 405nm en un lector de microplacas (Termo-Labystems).

Análisis estadístico.

Las diferencias significativas se determinaron con la prueba estadística One-way ANOVA con un nivel de significancia 0.01 (P<0.01) usando el programa de cómputo PRISM 4 (GraphPad, San Diego)

Obtención y purificación de protoxina Cry 1Ac

Se utilizó la cepa recombinante de *E. coli*. Las bacterias se cultivaron en medio Luria Broth (USBiological Swampscott, MA 01907) y se adicionó ampicilina (100 μ g/ml). Posteriormente se incubó a 37° C por 48 hrs. a 300 rpm en agitación constante. Para la cosecha de las bacterias se centrifugó a 10000 rpm. a 4°C por 15 minutos y se lavaron dos veces con amortiguador TE (Tris-HCl 0.05M, EDTA 1mM, pH 8.0). Posteriormente se lisaron las bacterias incubándolas a 37°C durante 1 hora con 20 mg/ml de lisozima+ sacarosa al 15% para posteriormente

sonicarlas durante 5 ciclos de 5 min. Cada uno, a una amplitud de 100 htz. Los cuerpos de inclusión se recuperaron por centrifugado a 10000 rpm a 4°C por 10 minutos, al término la pastilla se lavó cinco veces con 50 ml de NaCl 0.5M más Triton X-100 al 1% sonicando entre cada lavado. Posteriormente se realizó otra centrifugación bajo las mismas condiciones para resuspender la pastilla en 30 ml de agua bidestilada a 4°C. Una vez más se centrifugó a 10000 rpm por 15' a 4° C y se solubilizó la pastilla en 10 ml de amortiguador de carbonatos (Na₂CO₃ 0.1M, NaHCO₃ 0.1M, pH 9.6 más 10mM de DTT) por 30 minutos a 37°C en agitación a 300 rpm. La pCry1Ac solubilizada se obtiene por centrifugación a 10000 rpm 4°C por 15 minutos, recuperando el sobrenadante. Los restos de endotoxina se eliminaron purificando la proteína por una columna de Polimixina (BioRad Lab, CA) y se verificó la ausencia de LPS mediante la prueba de E-Toxate. Finalmente la concentración de proteínas se determinó por el método de Bradford y la pureza mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS- PAGE).

El manejo de las bacterias se realizó cumpliendo el reglamento Bioseguridad de la UNAM – FES Iztacala.

Preparación de hidróxido de aluminio.

El aluminio se obtuvo de papel aluminio alufim modificando la técnica (S. Silva Martínez et al 2005) El papel aluminio se cortó en pequeños trozos para aumentar la superficie de contacto y se pusieron 8 gramos de éstos en contacto con 100 ml de una solución 4 mol L⁻¹ de NaOH a temperatura ambiente por espacio de 60 minutos. En la reacción química del Al con NaOH los productos de reacción generados, ecuación (1), son una sal metálica de hidróxido de aluminio sódico, NaAl(OH)₄ y gas hidrógeno.



La sal metálica de sodio es aprovechada para la preparación del hidróxido de aluminio. Al final de la reacción, la solución alcalina de la sal metálica se filtró a través de un papel filtro (Watman). El filtrado se neutralizó con una solución diluida de ácido sulfúrico, formándose así el hidróxido de aluminio que tiene una apariencia lechosa y de consistencia viscosa.

Resultados.

La administración intranasal de la proteína Cry1Ac con OVA induce cambios en las poblaciones celulares pulmonares que no parecen relacionarse con una reacción alérgica

En los pulmones de ratones inmunizados con OVA+Cry1Ac no se incrementa la proporción de células B220 o Gr1 IgE+.

Para investigar el efecto de la proteína Cry1Ac sobre el posible desarrollo de alergia se obtuvieron células del lavado bronqueoalveolar (BAL) y de disgregado de pulmón de los ratones BALB/c, control y de los grupos experimentales OVA, OVA+ alum, OVA +Cry1Ac, OVA+CT; y fueron analizados por citometría de flujo para determinar si se modificaba la proporción de linfocitos B y granulocitos IgE+. Los resultados se muestran en la Fig. 2.2, al inmunizar con OVA+Cry1Ac no se observó un aumento significativo de linfocitos B que expresen IgE ($13.31\% \pm 9.54$) con respecto al control ($8.71\% \pm 2.18$). De hecho la proporción de linfocitos B IgE+ en los pulmones del grupo OVA+Cry1Ac fue menor a lo observada en los demás grupos experimentales que presentaron un claro incremento en esta población celular, especialmente en el grupo de OVA+Alum ($36.79\% \pm 15.23$). En el BAL no se detectaron valores significativos de poblaciones de linfocitos B que expresen IgE en ninguno de los grupos (datos no mostrados).

En contraste usando anticuerpos hacia el marcador de Gr1 de leucocitos polimorfonucleares se observó que la proporción de células Gr1+ era menor en el grupo control y en el grupo OVA+Cry1Ac con respecto a los demás grupos experimentales. Al analizar los porcentajes de células Gr1+IgE+ se observaron valores similares entre los diferentes grupos experimentales, tanto en el disgregado de pulmón como en el BAL, (OVA $14.55\% \pm 13.66$, OVA+Alum $18.35\% \pm 15.42$, OVA+Cry1Ac $15.06\% \pm 9.71$), a excepción del grupo de OVA+ CT en el que se observó que los leucocitos polimorfonucleares IgE+ aumentaron significativamente ($25.58\% \pm 12.46$) con respecto al los demás grupos experimentales y al control ($10.14\% \pm 1.96$) (Tabla 2.2, Fig. 2.2.).

Estos resultados apoyan evidencias que indican que las células B que son reclutadas a los pulmones durante la enfermedad pulmonar crónica alérgica y podrían participar en la patología de la alergia en los pulmones a través de la IgE. En estudios previos se observó que las células B se acumulan en el pulmón de una manera espectacular durante una exposición crónica al alérgeno. (Lindell, 2008) Esto demuestra que las células B contribuyen a que el alérgeno induzca AHR durante la alergia.

Tabla 2.2 Proporción de células B220 y Gr1 que expresan IgE en pulmón.

Marcadores celulares	Control	OVA	OVA+Cry1Ac	OVA+Alum	OVA+CT
B220+	91.28±2.18	73.54±8.41	86.69±9.54	63.20±15.23*	81.08±3.53
B220/IgE+	8.71±2.18	26.46±8.41	13.31±9.54*	36.79±15.23	19.71±4.99

Marcadores celulares	Control	OVA	OVA+Cry1Ac	OVA+Alum	OVA+ CT
Gr1+	90.51±1.80	81.42±0.15	86.13±7.16*	73.43±9.46	71.72±9.39
Gr1/IgE+	9.48±1.80	18.57±0.15	15.06±9.71*	22.57±9.45	28.27±9.39

Tabla 2.2 Los linfocitos y leucocitos polimorfonucleares fueron aislados del pulmón de ratones normales e inmunizados se tiñeron con mAbs acoplados con fluorocromos y analizados por citometria de flujo. Los datos representan la media de los porcentajes de expresión ± la desviación estándar de 5 experimentos independientes usando un conjunto de células de 6 ratones. * señala las diferencias significativas de los porcentajes de la población celular entre los grupos inmunizados y control.

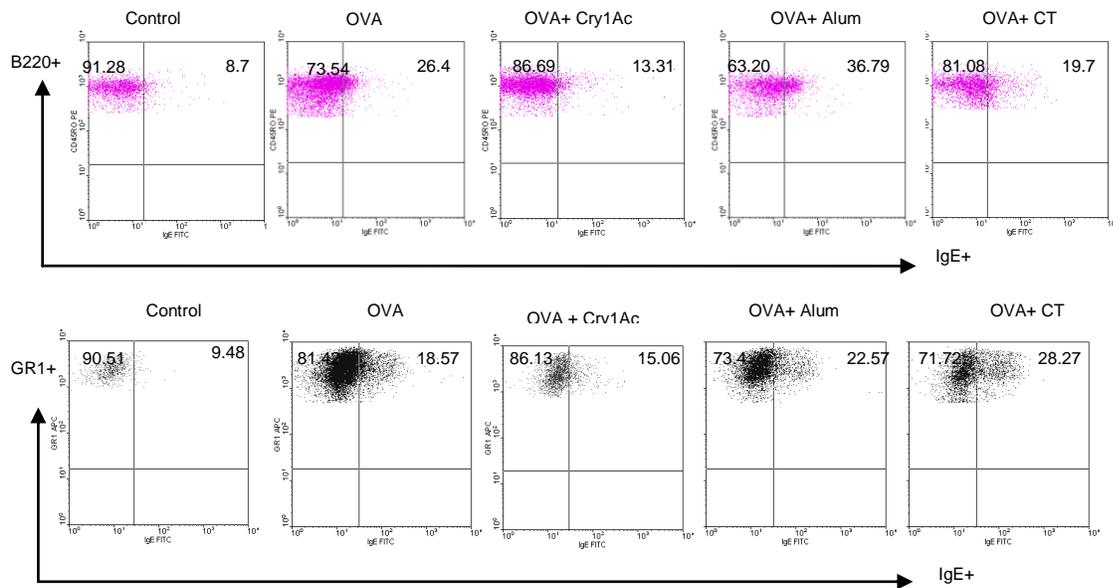


Fig. 2.2 Porcentaje de la población de linfocitos B y de la población de leucocitos polimorfonucleares que expresen IgE+ de pulmón. Los linfocitos B de pulmón fueron aislados de ratones BALB/c normales e inmunizados i.n. Las células fueron teñidas con mAbs anti B220, anti Gr1 y anti IgE marcados con fluorocromos y analizados por citometria de flujo. Los dotplots son representativos de 5 experimentos independientes y los valores representan la media de los porcentajes.

CT y Alum modifican las poblaciones de linfocitos T en pulmón y BAL.

El fenotipo de los linfocitos de pulmón y BAL analizados por citometria de flujo, los grupos (OVA, OVA+ Alum, OVA +Cry1Ac, OVA+CT, y control) se muestra en la Fig. 2.3. Tanto en los grupos experimentales como en el control, las células B fueron más abundantes que las T, en pulmón y BAL. En todos los grupos experimentales se observó un incremento en la proporción de linfocitos B en pulmón, el cual fue más marcado en el grupo OVA +Alum y OVA + CT. Al inmunizar con CT, los porcentajes de células B en pulmón son más similares con el grupo inmunizado de OVA+Alum (46.65 ± 8.45 y 52.55 ± 8.02 respectivamente). Aunque también hay un aumento significativo de linfocitos B en los pulmones inmunizados con OVA+ Cry1Ac y OVA (40.90 ± 7.93 y 42.15 ± 6.52 respectivamente) con respecto al control (34.21 ± 5.85) Fig. 2.3 y Tabla 2.3. Sin embargo en los grupos OVA+Alum y OVA + CT, existe una característica distintiva en la expresión de B220+, ya que se observaron claramente dos poblaciones de células B (B220+ brillantes hi y pálidas Low), mientras que los pulmones de los demás grupos inmunizados y control solo contienen células B220+ hi, las células B220 low podrían ser células plasmáticas. En contraste en el BAL en todos los grupos inmunizados y control se observan claramente las poblaciones de la célula B (B220+hi y B220+low). Además tanto en las células de pulmón, como en el BAL se presenta una característica importante, contienen una proporción significativa de células doble positivas (DP) que son CD3+ B220+. Las proporciones de esta población CD3+B220+ son similares en los grupos inmunizados y control tanto en pulmón como en el BAL, posiblemente estas células sean linfocitos T activados o tal vez están relacionadas con las células T regulatorias activadas, para diferenciarse en células Th1 o Th2 dependiendo de la estimulación antigénica. Tabla. 2.3 y 2.4

La proporción de células T CD3+ en pulmones del grupo inmunizado con OVA +Alum (23.65 ± 5.19) es menor a la presentada por el grupo control (32.79 ± 7.85), el grupo OVA +CT presenta también una disminución no significativa de linfocitos T (26.88 ± 5.89) mientras que los grupos OVA y OVA +Cry1Ac presentan porcentajes similares con respecto al control (29.85 ± 5.17 y 30.30 ± 5.91 respectivamente). En contraste en el BAL las proporciones de células T CD3+ en todos los grupos inmunizados son un poco más bajas que el control 24.22 ± 2.89 , y los grupos OVA +CT y OVA+Alum presentan las proporciones más bajas (16.01 ± 5.44 y 16.74 ± 5.34 respectivamente). Tabla 2.4. En todos los grupos se observó que la proporción de células T CD4 en pulmón y BAL es mayor a la proporción de CD8+. La proporción de células CD4+ en pulmón de controles y de los grupos OVA, y OVA+Cry1Ac son similares (64.18 ± 5.31 , 63.08 ± 5.64 y 63.92 ± 4.20 respectivamente), mientras que el grupo inmunizado de OVA+CT presenta un ligero incremento (67.07 ± 3.40) a diferencia del grupo

OVA+ Alum en el que disminuyen significativamente (54.33 ± 4.47). En el BAL también se observó que el grupo OVA+Alum presentó una disminución en la proporción de linfocitos T CD4+ (52.78 ± 4.92), mientras que los demás grupos presentaron valores similares al control (59.49 ± 5.96). Aunque en el BAL en el grupo OVA+ Cry1Ac se observa un pequeño aumento no significativo en las proporciones de estas células CD4+ (62.64 ± 0.98) Las proporciones de células CD8+ de pulmón en los grupos control, OVA, OVA+Cry1Ac, OVA+ CT fueron muy similares (29.20 ± 1.04 , 29.28 ± 5.50 , 28.54 ± 4.13 , 24.33 ± 3.53) a excepción del OVA+ Alum en la que disminuyó significativamente a diferencia de los demás grupos (19.93 ± 0.66). Además en las células del BAL en el grupo de OVA+Alum se puede observar un incremento importante en las proporciones de las células CD8+ (33.38 ± 7.80) con respecto al control (23.14 ± 4.33) y a los demás grupos inmunizados OVA, OVA+ Cry1Ac, OVA+ CT (23.07 ± 2.08 , 15.06 ± 0.89 , y 24.69 ± 2.02 respectivamente).

Un cambio importante observado en los pulmones exclusivamente en los grupos OVA +Alum y OVA+ CT fue un marcado incremento en la proporción de células T células doble positivas (DP) CD4+/CD8+ (11.39 ± 2.34 y 10.67 ± 2.21 respectivamente). En contraste en el BAL solo en el grupo de OVA+ Alum se presenta un aumento aún más marcado de células T CD3+ doble positivas CD4+/CD8+ (33.10 ± 3.10).

Tabla. 2.3 Proporción de linfocitos B y T CD4+ y CD8+ en pulmones de ratones tratados con OVA sola o coadministrada con Cry1Ac, CT o Alum.

<i>Marcadores celulares</i>	<i>control</i>	<i>OVA</i>	<i>OVA+Cry1Ac</i>	<i>OVA+Alum</i>	<i>OVA+CT</i>
B220+	34.21± 5.85	42.15± 6.52	40.90± 7.93	52.55± 8.02*	46.65± 8.45
CD3+	32.79± 7.85	29.85± 5.17	30.30± 5.91	23.63± 5.91*	26.88± 5.89
B/T	21.14±2.74*	19.96± 4.00	18.78± 4.02	15.5± 0.39	17.21± 4.46
CD4+	63.92± 4.21	64.18± 5.31	63.08± 5.68	54.33± 4.47*	67.07± 3.40
CD8+	29.20± 1.04	29.28± 5.50	28.54± 4.13	19.93±0.66*	24.33± 3.53
CD4+/ CD8	1.43± 0.19	3.63± 0.58	1.28± 0.34	11.39 ± 2.34*	10.67±2.21*

Tabla 2.3 Los linfocitos aislados de pulmón de ratones normales e inmunizados se tiñeron con mAbs acoplados con fluorocromos y analizados por citometría de flujo. Los datos representan la media de los porcentajes de expresión \pm la desviación estandar de 5 experimentos independientes usando el conjunto de células de 7 ratones. * señala las diferencias significativas de los porcentajes de las poblaciones celulares entre los grupos inmunizados y control.

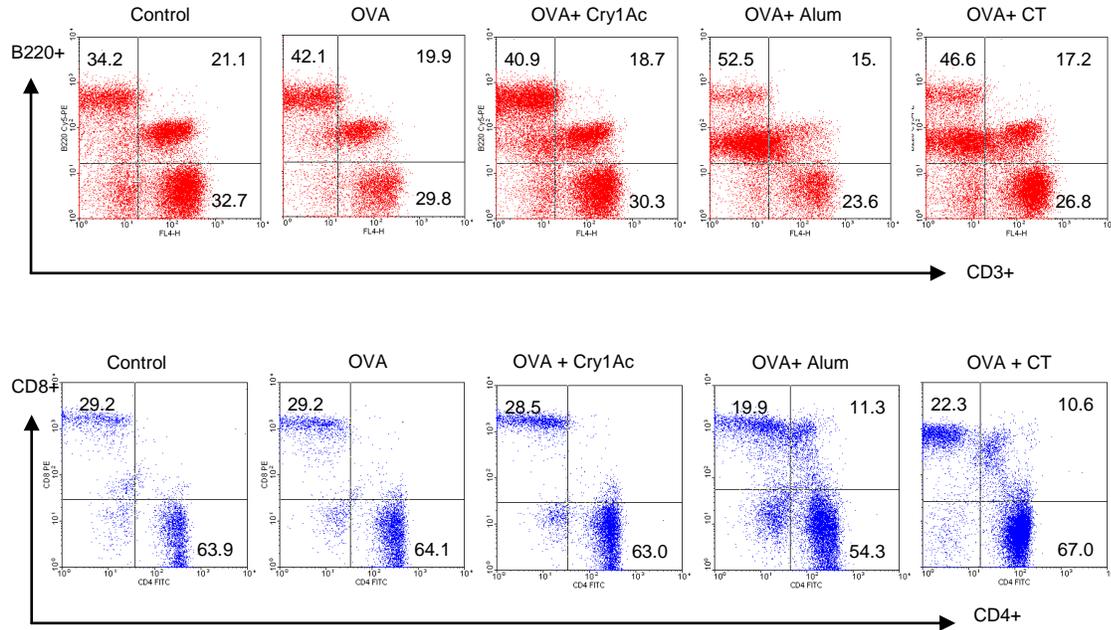


FIG. 2.3 Porcentaje de las poblaciones de linfocitos B y T CD4 y CD8 de pulmón. Los linfocitos fueron aislados de ratones BALB/c normales e inmunizados con OVA sola o coadministrada con CRy1Ac, CT o Alum como se indica en métodos. Las células fueron teñidas con mAbs con fluorocromos y analizadas por citometría de flujo. Los dotplots son representativos de 5 experimentos independientes y los valores representan la media de los porcentajes.

Tabla. 2.4 Proporción de linfocitos B y T CD4+ y CD8+ en lavados bronqueoalveolares BAL de ratones tratados con OVA sola o coadministrada con Cry1Ac, CT o Alum

Marcadores celulares	BAL control	BAL OVA	BAL OVA+Cry1Ac	BAL OVA+Alum	BAL OVA+CT
B220+	28.68±8.43	52.06±2.29*	36.62±7.89	20.01±8.44	30.71±6.22
CD3+	24.22±2.89*	19.74± 1.32	20± 7.48	16.01± 5.44	16.74±5.34
B/T	9.32± 2.51	14.75±1.18*	8.35± 1.70	4.25± 1.04	8.97± 2.12
CD4+	59.49±5.96	60.83±4.52	62.64±0.98	52.78±4.92*	57.88± 1.83
CD8+	23.14±4.33	23.07±2.08	15.06±0.89*	33.38±7.80	24.69± 2.02
CD4+ / CD8	1.75± 0.84	2.58±0.92	0.87±0.23	33.10±3.10*	2.16± 2.04

Tabla 2.4 Los linfocitos aislados del BAL de ratones normales e inmunizados se teñieron con mAbs acoplados con fluorocromos y analizados por citometría de flujo. Los datos representan la media de los porcentajes de expresión ± la desviación estandar de 5 experimentos independientes usando el conjunto de células de 7 ratones. * señala las diferencias significativas de los porcentajes de las poblaciones celulares entre los grupos inmunizados y control.

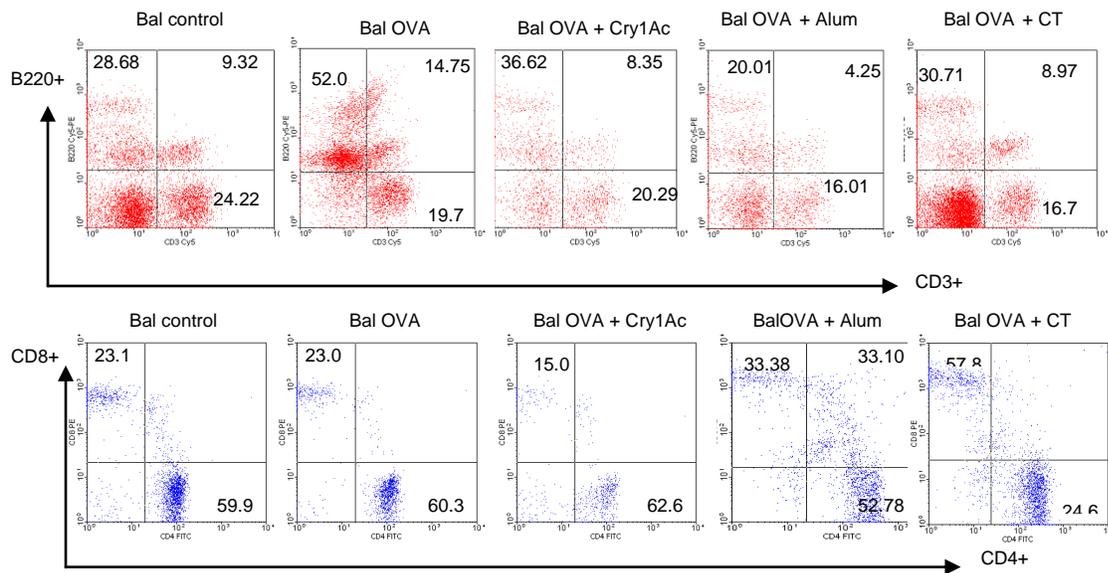


FIG. 2.4 Porcentaje de las poblaciones de linfocitos B y T de BAL. Los linfocitos fueron aislados de ratones BALB/c normales e inmunizados. Las células fueron teñidas con mAbs con fluorocromos y analizadas por citometría de flujo. Los dotplots son representativos de 5 experimentos independientes y los valores representan la media de los porcentajes.

Las células CD4+ B220+ se incrementan en los pulmones de los ratones inmunizados con OVA+CT y OVA +Alum

Para caracterizar mejor el efecto de la administración de OVA con los adyuvantes en las poblaciones de linfocitos se analizó la expresión de CD4 y B220 en los linfocitos de pulmón de ratones Balb/c controles e inmunizados OVA, OVA+Alum, OVA+Cry1Ac y OVA+CT. Interesantemente se encontró que las poblaciones de linfocitos DP CD4+B220+ se incrementan notablemente en los pulmones de los grupos OVA+Alum y OVA+CT donde comprenden el 56.79 ± 4.3 y 38.55 ± 6.64 respectivamente del total de los linfocitos. Estas diferencias son significativas con respecto a los controles (1.43 ± 0.19) y a los demás grupos inmunizados (3.04 ± 0.82 OVA, 4.98 ± 4.56 OVA+Cry1Ac) y tabla 2.5, Fig. 2.5

En la población de células B220+CD4- se distinguieron dos poblaciones con diferente nivel de expresión de B220. En los controles y en el grupo en el grupo OVA +Cry1Ac las dos subpoblaciones de células B220 hi y low representaban el 50% de linfocitos, aunque la proporción de las hi estaba más acentuada en el grupo con Cry1Ac. El grupo OVA presento las 2 subpoblaciones de B220 hi y low pero en mayor proporción que el control 60%. Mientras que en los grupos OVA+ Alum y OVA+CT la proporción de células B220+CD4- es significativamente menor a la encontrada en los controles y se distingue principalmente la población B220 hi especialmente en el grupo OVA+Alum.

En el BAL se detectó claramente la existencia una población de linfocitos CD4+B220+, de hecho en los controles representa el 17% de la población de linfocitos, en el grupo tratado con OVA esta población se elevó significativamente (47%) sin embargo los demás grupos experimentales presentaron proporciones menores que los controles de estas células CD4+B220+.

También analizamos la proporción de células CD4+CD8+ sobre la región correspondiente al tamaño y granularidad de linfocitos, pero sin hacer la región (gate) de linfocitos T CD3+. En los pulmones, encontramos un notable incremento en la proporción de linfocitos DP CD4+CD8+ en los ratones inmunizados con OVA+ Alum y OVA +CT (56.79 y 38.55% respectivamente). Sin embargo en el BAL los controles presentaron proporciones considerables de linfocitos DP CD4+CD8+ (15%), en el grupo inmunizado con OVA+Alum se observó un incremento marcado esta población mientras que el resto de grupos experimentales presentaron menor proporción que los controles de esta población.

Tabla 2.5 Proporción de linfocitos CD4+B220+ en pulmón.

Marcador celular	control	OVA	OVA+Cry1Ac	OVA+Alum	OVA+ CT
B220+	49.30± 2.46	55.84±1.93*	52.98 ± 6.23*	20.32 ± 2.58	27.23 ± 1.95
CD4+	33.86± 2.91	20.15± 4	31.15± 7.82	17.53±4.32*	27.91 ± 0.97
CD4/ B220	3.29 ± 0.70	5.50 ± 0.74	5.86 ± 3.96	53.33±4.40*	35.98 ± 5.64
CD4+	38.55±4.11*	22.33± 2.81	32.19 ± 7.75	14.35± 3.75	25.49 ± 2
CD8+	21.07± 1.18	19.35± 5.23	16.20 ± 1.54	8.65 ± 5.21	13.90± 0.85*
CD4/CD8	1.43 ± 0.19	3.63 ± 0.82	4.98 ± 4.56	56.79±5.56*	38.55±6.64*

Tabla 2.5 Los linfocitos aislados de pulmón de ratones normales e inmunizados se tiñeron con mAbs acoplados con fluorocromos y analizados por citometria de flujo. Los datos representan la media de los porcentajes de expresión ± la desviación estándar de 5 experimentos independientes usando el conjunto de células de 7 ratones. * señala las diferencias significativas de los porcentajes de las poblaciones celulares entre los grupos inmunizados y control.

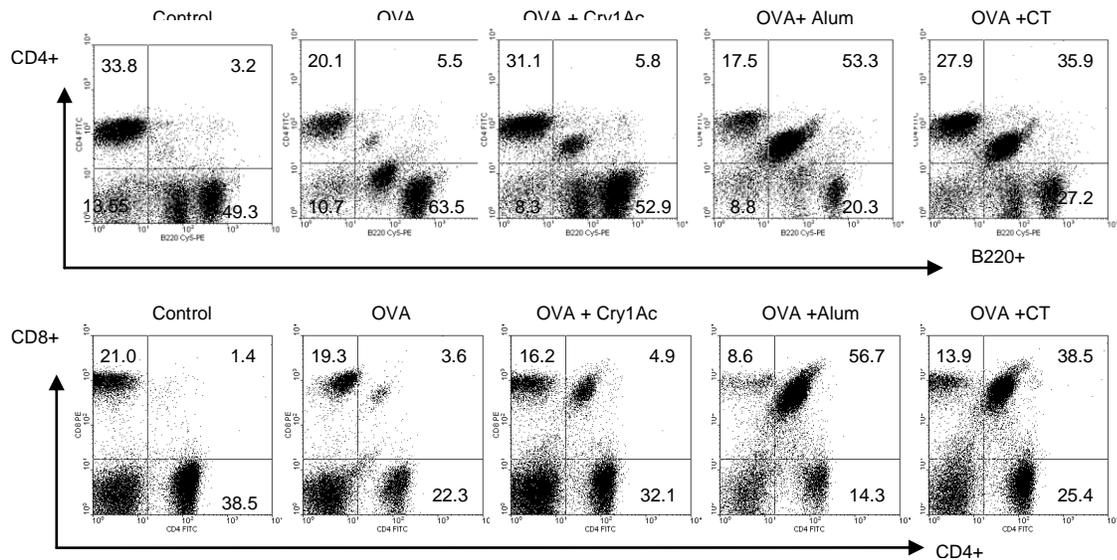


FIG. 2.5 Análisis de la expresión de B220+ y CD4+ en linfocitos de pulmón. Los linfocitos fueron aislados de ratones BALB/c normales e inmunizados. Las células fueron teñidas con mAbs con fluorocromos y analizadas por citometría de flujo. Los dotplots son representativos de 5 experimentos independientes y los valores representan la media de los porcentajes.

Tabla 2.6 Proporción de linfocitos CD4+B220+ en BAL.

Marcadores celulares	BAL control	BAL OVA	BAL OVA+Cry1Ac	BAL OVA+Alum	BAL OVA+CT
B220+	29.67 ± 7.69	47.58 ± 4.03*	21.78 ± 5.09	21.88 ± 3.23	13.94 ± 3.56
CD4+	26.85 ± 1.39	25.96 ± 3.6	17.08 ± 9.63	20.81 ± 6.89	10.48 ± 3.12
CD4/B220	17.44 ± 5	8.46 ± 6.2	9.62 ± 4.42	47.92 ± 4.21*	5.49 ± 1.59
CD4+	25.25 ± 3.25	26.26 ± 2.85	11.62 ± 3.39	26.51 ± 2.65	11.09 ± 1.76
CD8+	10.16 ± 1.47	11.79 ± 4.43	4.51 ± 0.92*	10.04 ± 3.14	6.32 ± 2.10
CD4+/ CD8	15.63 ± 4.88	1.31 ± 0.56	3.92 ± 2.90	44.34 ± 5.14*	4.62 ± 0.43

Tabla 2.6 Los linfocitos aislados del BAL de ratones normales e inmunizados se tiñeron con mAbs acoplados con fluorocromos y analizados por citometría de flujo. Los datos representan la media de los porcentajes de expresión ± la desviación estandar de 5 experimentos independientes usando el conjunto de células de 7 ratones. * señala las diferencias significativas de los porcentajes de las poblaciones celulares entre los grupos inmunizados y control.

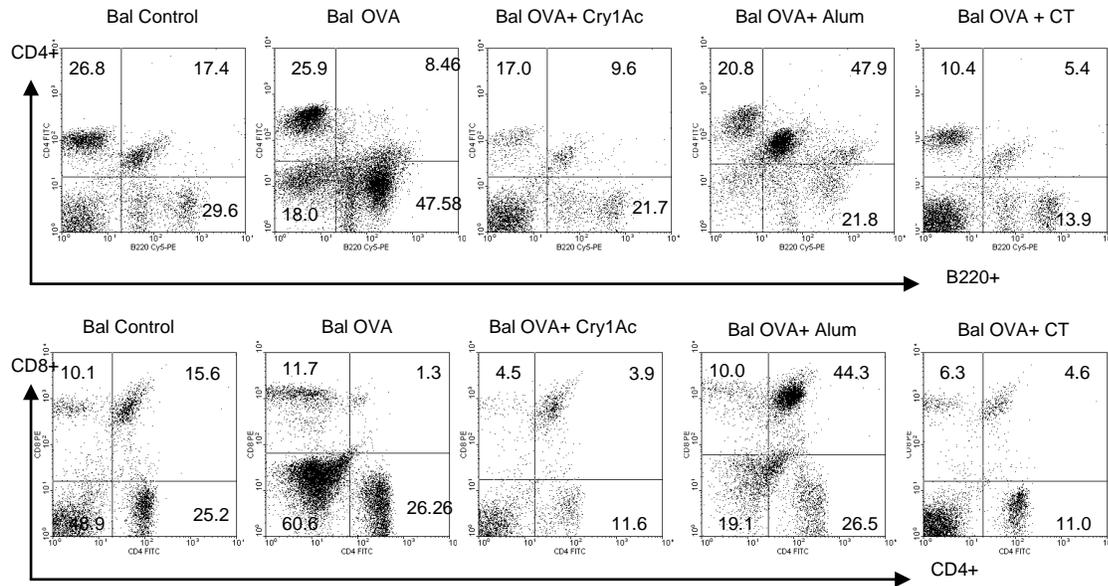
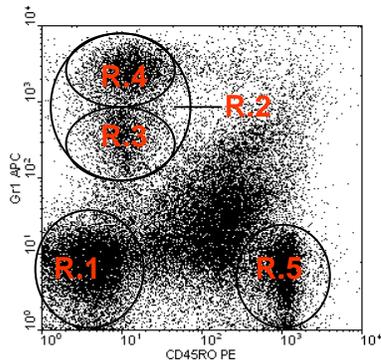


FIG. 2.6 Porcentaje de las poblaciones de linfocitos de BAL. Los linfocitos fueron aislados de ratones BALB/c normales e inmunizados. Las células fueron teñidas con mAbs con fluorocromos y analizadas por citometria de flujo. Los dotplots son representativos de 5 experimentos independientes y los valores representan la media de los porcentajes.

Los granulocitos se incrementan en los pulmones de los ratones inmunizados con OVA+CT y OVA +Alum

Para determinar mejor el efecto de los adyuvantes se analizó las poblaciones de los granulocitos (de Heer, Hammad et al. 2004). Por citometria de flujo específicamente (eosinófilos y neutrofilos) en pulmón de ratones Balb/c controles e inmunizados OVA, OVA+Alum, OVA+Cry1Ac y OVA+CT. Interesantemente se encontró que las poblaciones de neutrofilos se incrementan notablemente en los pulmones de los grupos OVA+Alum 58.16%, OVA 63.02% y OVA+Cry1Ac 61.42% donde comprenden la mayoría de los granulocitos, tabla 2.7 respectivamente, estas diferencias son significativas con respecto al grupo control y del grupo inmunizado con OVA +CT 44.43%. Dado que las poblaciones de eosinófilos son mucho menor pero mas uniformes en los grupos inmunizados, a excepción del grupo de OVA+Alum en el cual hay un incremento proporcional al de los eosinófilos 40.92%, y del control que presenta un menor número de eosinófilos y neutrofilos, Fig.2.7.



% células en región Tipo de células predominantes

R 1	Linfocitos T
R 2	Granulocitos
R 3	Eosinófilos
R 4	Neutrófilos
R 5	Linfocitos B

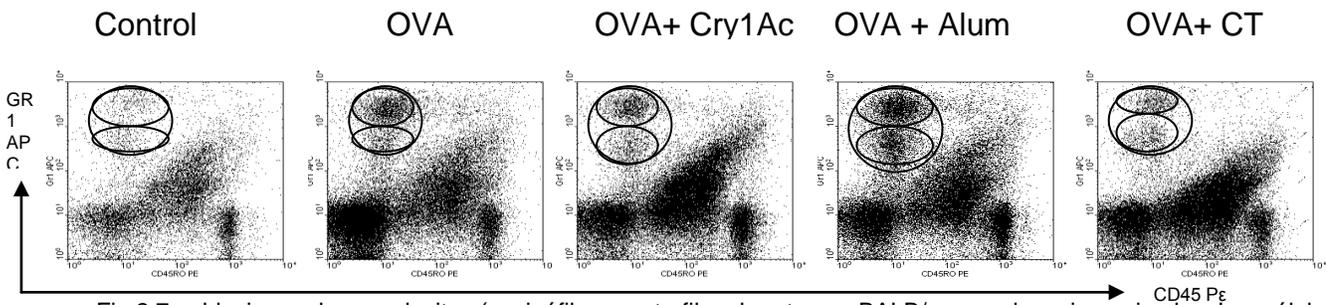
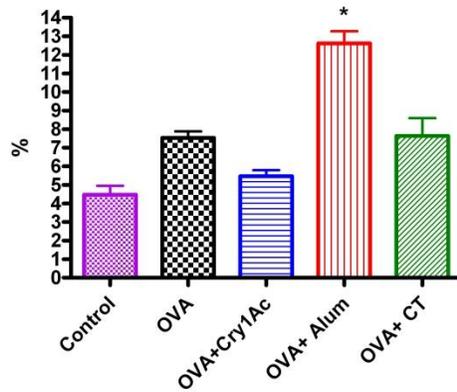
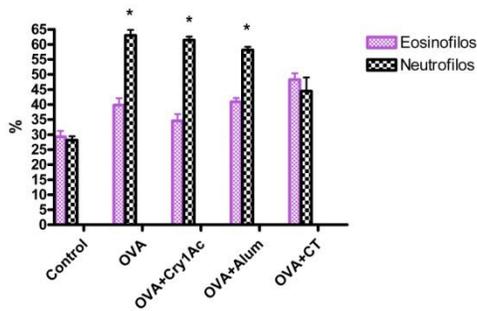


Fig.2.7 poblaciones de granulocitos (eosinófilos, neutrófilos de ratones BALB/c normales e inmunizados. Las células fueron teñidas con mAbs con fluorocromos y analizadas por citometria de flujo. Los dotplots son representativos de 1 experimento independiente.



La expresión de moléculas coestimuladoras se incrementó en los macrófagos de pulmón y BAL de ratones sensibilizados.

La expresión de moléculas coestimuladoras B7-1 (CD80) y B7-2 (CD86), en la superficie de macrófagos, y de células dendríticas en pulmón y en el BAL en ratones Balb/c fue analizado por citometría de flujo. (Fig. 3.1) Las células obtenidas se tiñeron con un anticuerpo anti un marcador para macrófagos el cual fue CD11b Cy5, y se realizó el análisis de la expresión de moléculas CD80 y CD86. En la figura 3.1 se muestran histogramas representativos de los resultados. En los macrófagos de pulmón y del BAL de los animales control se observó una expresión constitutiva de CD80, la cual fue ligeramente mayor en el BAL. Los macrófagos del pulmón también presentaron una expresión constitutiva de CD86 aunque en un número muy reducido de células mientras que en BAL se registraron un mayor número de macrófagos que presentaron expresión constitutiva de CD86. En los cuatro grupos experimentales (OVA, OVA+Cry1Ac, OVA+CT y OVA +Alum) se observó un incremento significativo con respecto a los controles en la expresión de CD80 y CD86 tanto en los Macrófagos del pulmón como del BAL, sin embargo se encontraron claras diferencias en la expresión de estas moléculas entre los diferentes tejidos así como entre los diferentes tratamientos, En pulmón se detectaron claramente dos poblaciones (dos picos) de macrófagos similares en proporción con diferente nivel de expresión de CD80 en los 4 grupos experimentales. Sin embargo el grupo OVA+Alum presentó la mayor expresión ya que ambos picos registrados claramente se desplazan sobre los picos de los grupos OVA, OVA+Cry y OVA+CT, que presentaron un incremento similar en la expresión de CD80, significativo con respecto al grupo control que solo presenta una población (un pico) con menor expresión al pico de menor intensidad de los 4 grupos experimentales. En el grupo OVA+CT se distingue claramente que la magnitud de la población con mayor expresión de CD80 (segundo pico) es mayor a la del pico con expresión moderada, mientras que en los demás grupos esta diferencia no está tan acentuada.

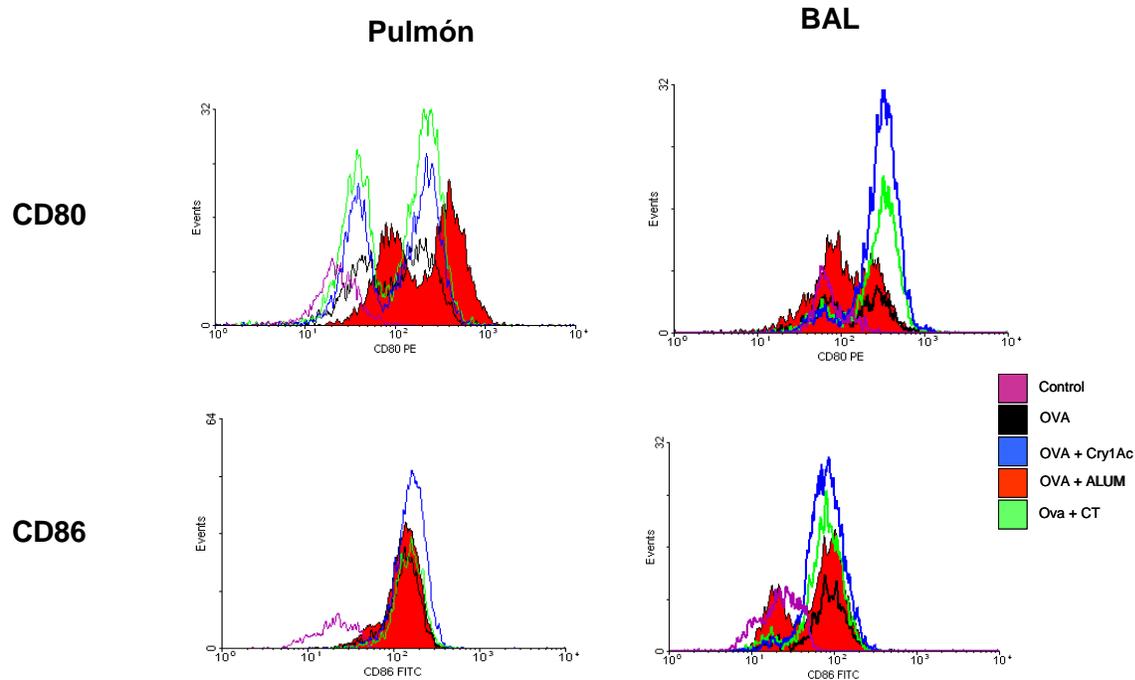


Fig 3.1 Expresión de las moléculas coestimuladoras CD80 y CD86 de macrófagos de pulmón y de BAL. Las células de ratón de cada grupo inmunizado se analizaron por citometría de flujo. Los histogramas morados corresponden a la expresión de moléculas CD80 y CD86 presentada por macrófagos de animales control. Se aprecia en los histogramas el incremento en la expresión de estas moléculas provocado por la inmunización con OVA (negro), OVA+ Alum (rojo), OVA+CT (verde) y OVA+ Cry1Ac (azul). Los resultados mostrados corresponden a un experimento representativo.

La expresión de las moléculas coestimuladoras CD80 y CD86 en células dendríticas de pulmón y del BAL fue muy similar a la de los macrófagos pulmonares. Las células obtenidas se tiñeron con un marcador para dendríticas el cual fue CD11c Cy5 PE, y se realizó el análisis de las poblaciones que presentaran este marcador. En las DC de pulmón y del BAL de los animales control se observó una expresión constitutiva de CD80 mientras que la expresión de CD86 en pulmón fue nula y en el BAL se observó una expresión constitutiva pero en un número reducido de células. Fig.3.2 En los cuatro grupos experimentales (OVA, OVA +Cry, OVA+CT y OVA +Alum) se observó un incremento en la expresión de CD80 y CD86 tanto en las DC del pulmón como del BAL, sin embargo se observaron algunas diferencias entre los diferentes tratamientos. El grupo OVA+Alum presentó el mayor incremento en la expresión de CD80 en pulmón, mientras que la expresión de los grupos OVA, OVA +Cry y OVA+CT fue similar. Sin embargo en BAL el grupo OVA+CT fue el que presentó mayor expresión de CD80 en DCs, mientras que el grupo OVA+Alum presentó una expresión ligeramente mayor a los grupos OVA

y OVA+Cry que presentaron una expresión similar y significativamente mayor a los controles. La expresión de CD86 en pulmón se incrementó de forma similar en los 4 grupos experimentales, aunque el grupo OVA+Cry presentó una expresión ligeramente mayor. En contraste en el BAL el grupo OVA+CT presentó mayor expresión de CD86 que los demás grupos. Mientras que el grupo OVA+Alum presentó una expresión de CD86 ligeramente mayor a los grupos OVA y OVA +Cry quienes presentaron una expresión similar significativamente mayor a los controles.

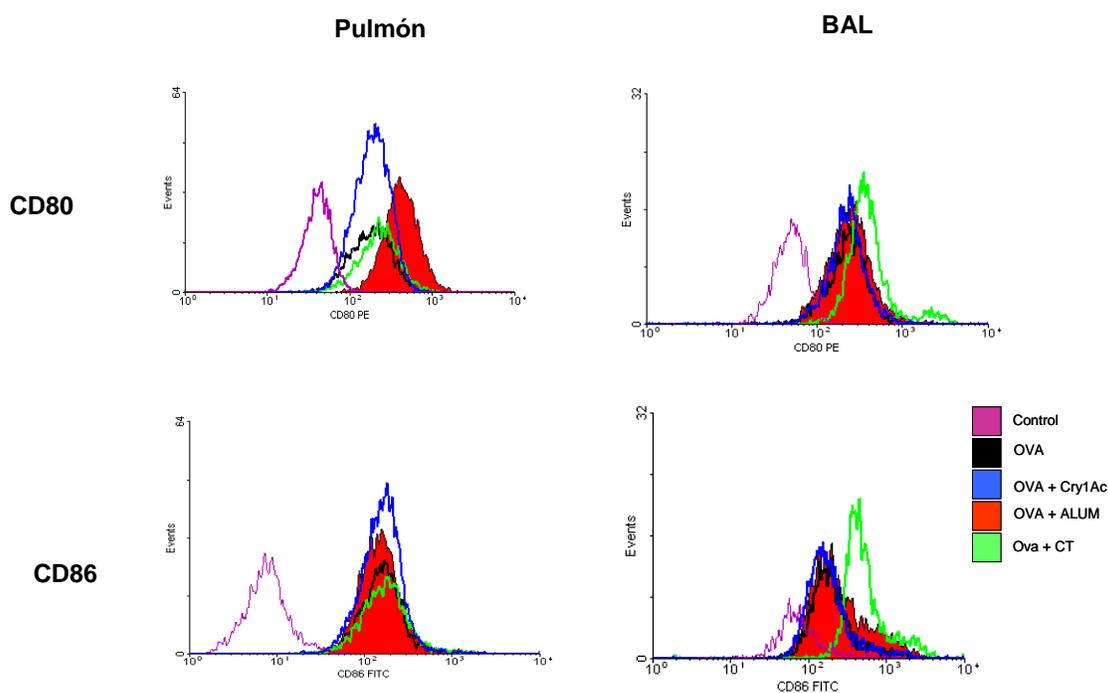


Fig 3.2 Expresión de las moléculas coestimuladoras CD80 y CD86 de células dendríticas DC de pulmón y de BAL. Las células de ratón de cada grupo inmunizado se analizaron por citometría de flujo. Los histogramas morados corresponden a la expresión de moléculas CD80 y CD86 presentada por las DCs de animales control. Se aprecia en los histogramas el incremento en la expresión de estas moléculas provocado por la inmunización con OVA (negro), OVA+ Alum (rojo), OVA+CT (verde) y OVA+ Cry1Ac (azul). Los resultados mostrados corresponden a un experimento representativo.

Histopatología.

La histología de tejido pulmonar de los distintos grupos de ratones tanto controles como inmunizados se presentan en la Fig. 4.1 Como era de esperarse no se observaron alteraciones patológicas en los tejidos pulmonares de los ratones controles, los cuales presentan numerosos macrófagos. Los ratones inmunizados con OVA+ Cry1Ac demuestran un aumento en el número de células mononucleares, y se observo en la submucosa bronquial un mínimo edema peri vascular y moderada infiltración en el epitelio respiratorio de eosinófilos, neutrofilos y linfocitos principalmente, en contraste en los otros grupos inmunizados OVA (control negativo), OVA +Alum y OVA+ CT (controles positivos) se observan alteraciones histopatológicas mas severas. Ya que en los tres grupos se presentan cambios inflamatorios en el tejido pulmonar que incluye de una moderada a severa hiperplasia del epitelio bronquial que contienen varios eosinófilos, linfocitos y células caliciformes que contienen moco. Y además, un severo edema peri vascular compuesto por numerosos eosinófilos y linfocitos que están presentes en estos grupos inmunizados. Estas características histológicas son similares a las descritas de pacientes humanos con asma alérgica.

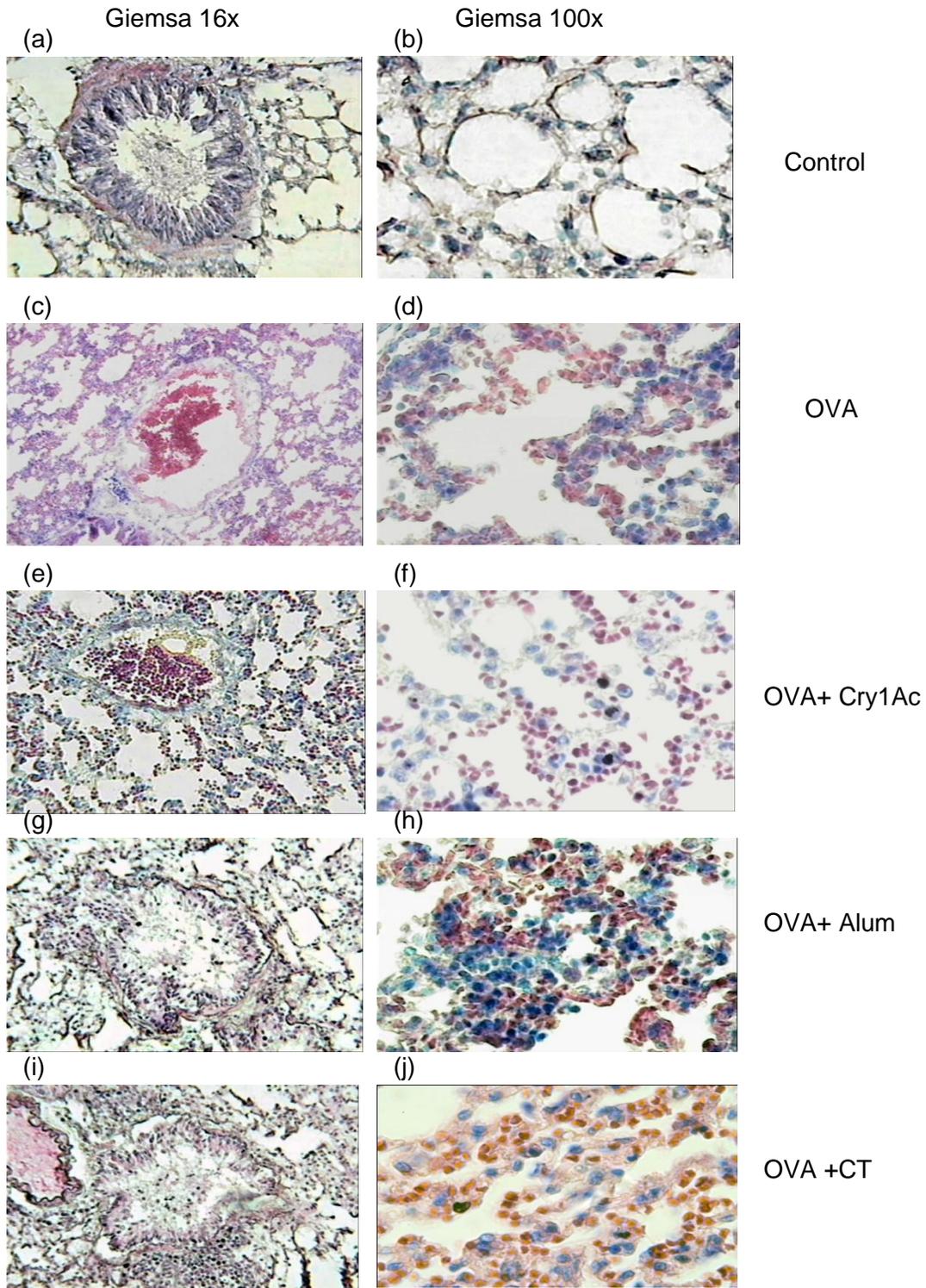


Fig. 4.1 Cortes del tejido pulmonar. Los cortes fueron de 5µm. teñidos con orceína –Giemsa. En el tejido de pulmón del ratón control tejido normal pulmonar muestra una ausencia de infiltración de célula inflamatoria alrededor de bronquios, con una capa sola de epitelio ciliado columnar 16x (a), en la amplificación se aprecia la de presencia Y Se presentan un aumento de monocitos 100x (b) los cambios inflamatorios por el infiltrado eosinofílico en los grupos negativos(c,d) y positivos(g,h,i,j) inmunizados son similares entre si, una amplificación más alta del tejido pulmonar muestra numeroso Eosinófilos localizado en el epitelio respiratorio 100x (d,h,j). A diferencia en el grupo de OVA+Cry1Ac 16x(c) donde un mínimo edema peri vascular y el infiltrado es menor en el epitelio respiratorio 100x (d) En concreto, la infiltración eosinofílica y linfocítica en el epitelio respiratorio y lámina propia y la hiperplasia de células es observado en muchas vías respiratorias.

Detección de IgE y Gr1 por Inmunofluorescencia en pulmón.

Además de caracterizar las propiedades de la infiltración, en los tejidos pulmonares, se determinó por inmunofluorescencia la expresión del número de células de IgE positivas, de granulocitos (Gr1+) así como la coexpresión de Gr1 e IgE. Las laminillas de los cortes de los tejidos de pulmón tanto de los ratones controles como inmunizados se observan en la Fig. 5.1 de igual forma como en la tinción de orceina- Giemsa, los cortes fueron de 5 μm pero se incubaron con anticuerpo anti-IgE mAb FTIC en dilución (1:1000) y anti- LyG-6 mAb APC (1:500) diluido en PBS-triton, y se colocaron 20 μl del anticuerpo a las laminillas tanto para los ratones control e inmunizados. En los pulmones de ratones control se observa un escaso número de células IgE+ con baja intensidad y nula tinción de Gr1. Mientras que en los pulmones los grupos de OVA+Alum y OVA+CT se observó un claro incremento en número de células que coexpresan Gr1+ e IgE+, con alta intensidad. En el grupo OVA-CT el número de células IgE+ Gr1+ es mucho mayor que en el grupo OVA-Alum y además la intensidad de la fluorescencia es mucho más alta. El grupo OVA-Cry presenta un menor número de granulocitos y de células que expresen IgE, así como presenta menor intensidad de fluorescencia de IgE y Gr1 que los grupos de OVA+Alum y OVA CT. En el grupo OVA la intensidad y número de células IgE+ es similar a la observada en el grupo OVA +Cry1Ac sin embargo presenta mayor número de células que expresan Gr1 y con mayor intensidad. Estos resultados nos indican que en los ratones inmunizados con OVA más Cry1Ac hay un infiltrado en número mucho menor de leucocitos polimornucleares que estén expresando en la superficie celular IgE menor al presentado en los ratones administrados con OVA sola o coadministrada con Alum o CT.

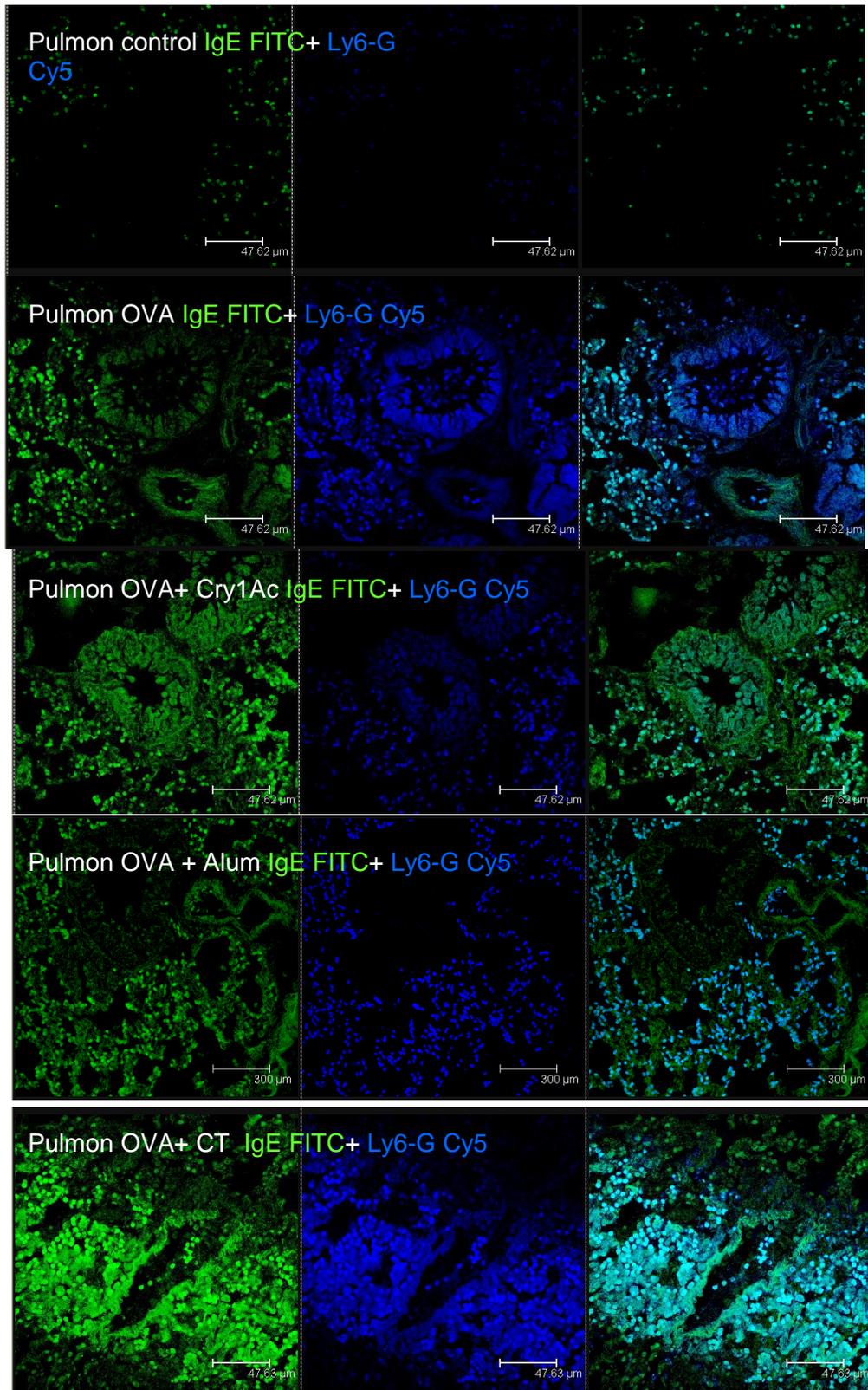


Fig. 5.1. inmunofluorescencia de la expresión IgE+ y Ly6-G Cy5
 Como la coexpresión de Ly6-G Cy5 e IgE en ratones sensibilizados. En el primer cuadro a la izquierda se observa la expresión de IgE, siendo mayor la expresión en el grupo de Ova+CT con respecto a los demás grupos sensibilizados. En el cuadro de en medio se ve la expresión de Ly6-G Cy5 observándose una expresión importante en los grupos de OVA sola o con Alum, CT, a diferencia del control y el de Cry1Ac. Y en el cuadro de la derecha la colocalización de ambas observándose un incremento muy marcado en el de OVA+CT con respecto al control y al de Cry1Ac

Respuesta de anticuerpos anti OVA de las subclases IgG1 e IgG2a en los ratones inmunizados

Los efectos de la administración intranasal de OVA con Cry1Ac, CT y Alum en la respuesta específica de anticuerpos de las subclases IgG (IgG1 e IgG2a) se analizaron por ELISA indirecto en sueros obtenidos a la cuarta semana después de la última inmunización. Se observa que los ratones control y los ratones inmunizados con OVA sola no presentan anticuerpos anti OVA de ningún isótopo. En cambio los ratones inmunizados intranasalmente con OVA más Cry1Ac mas ova producen niveles moderados de anticuerpos IgG1 anti ova, que son significativamente más bajos a los inducidos en los otros grupos positivos alum combinado con OVA vía intraperitonealmente, y OVA con CT intranasalmente, que producen un alto nivel de IgG1 anti- OVA.

Interesantemente al analizar la respuesta de anticuerpos IgG2a se observó tanto que en los grupos de Cry1Ac- OVA como de CT- OVA y OVA-Alum se inducen niveles moderados similares de anticuerpos, aunque menores en magnitud con respecto a la respuesta IgG1 observada en los grupos OVA-CT y OVA-Alum .

Al analizar la respuesta de anticuerpos IgE anti OVA se detectaron niveles muy bajos en general. El grupo administrado con OVA presento niveles bajos comparables a los detectados en el grupo OVA+Cry1Ac, mientras que en el grupo OVA+CT se detectaron niveles ligeramente más altos, en tanto que en el grupo OVA+Alum se detectó una respuesta de IgE ligeramente mayor a la inducida en el resto de los grupos.

Tabla 6.1 Respuesta de anticuerpos Anti-OVA en ratones inmunizados

Inmunización	Anti-OVA Ab (ELISA)		
	Suero IgG1	Suero IgG2a	Suero IgE
Contol	0.12	0.10	0.048
OVA	ND	ND	0.132
OVA/Cry1Ac	0.379	0.443	0.112
OVA/Alum	0.875	0.356	0.194
OVA/CT	0.972	0.335	0.167

Ratones fueron inmunizados intranasalmente con Cry1Ac (5µg) combinada con OVA (100µg) en PBS 10µl en los días 0y 7. Dos semanas después de la primera inmunización en la semana 4, anti-ova subclases IgG y IgE Ab fue evaluado por ELISA. El suero de los Ab fue analizado por titulos y fueron comparados con los grupos tanto positivos CT/ OVA, Alum/OVA y el grupo negativo OVA.

Datos representan media \pm SD de absorbancia Ab medurados por ELISA en cada grupo de cinco ratones.

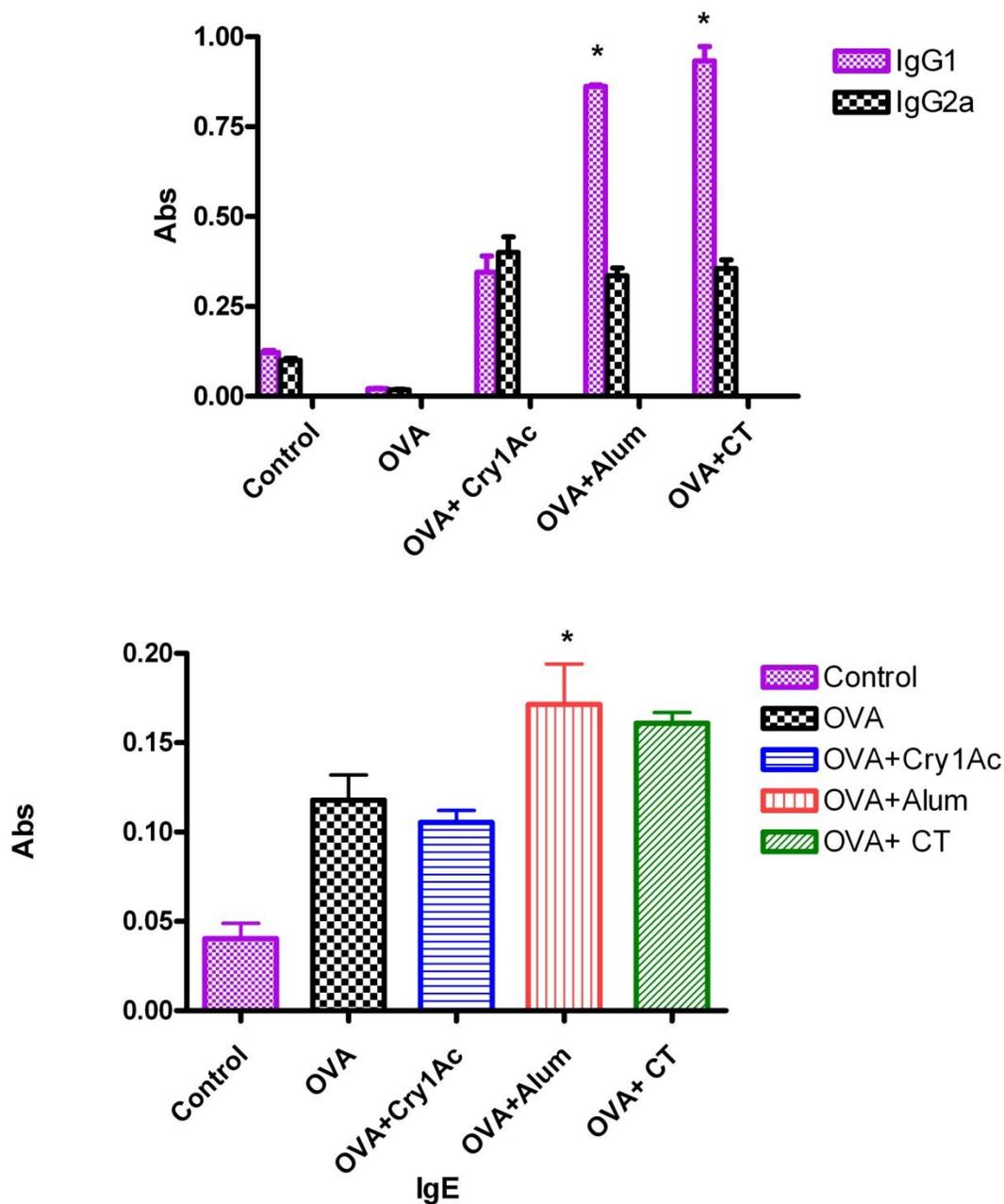


Fig. 6.1 Absorbancia de las subclases de anticuerpo IgG1/IgG2a e IgE en sueros. El suero fue obtenido de ratones BALB/c normales e inmunizados y se llevo a la cuantificación de estas por ELISA. Donde se observa un incremento considerable de la subclase IgG1 en los grupos de OVA+CT y con Alum con respecto a los otros grupos control y OVA sola donde no hubo una respuesta hacia la subclase IgG1, Mientras Ova con Cry1Ac produce niveles más homogéneos entre las dos subclases de anticuerpos IgG1/IgG2a con respecto a los demás grupos. Mientras con la IgE Aunque no se detectaron niveles considerables en ninguno de los grupos si se observa que En los grupos de OVA con Alum y CT se ve un pequeño cambio a diferencia del control y del de OVA con Cry1Ac.

Estos resultados nos indican en los grupos OVA+Alum y OVA+ CT se indujo una respuesta dominante Th2 caracterizada por la inducción de altos niveles de IgG1, y la respuesta moderada de IgG2a. Mientras el grupo OVA+ Cry1Ac presentó una respuesta mezclada Th1/Th2 más balanceada presentando respuesta moderadas de IgG1 e IgG2a.

Respuesta de citocinas en ratones inmunizados.

Es bien sabido que cuando los ratones son sensibilizados con algún alérgeno se producen respuestas Th2 dominantes caracterizadas por la producción de citocinas IL-4 y IL-13 principalmente. Al analizar la respuesta de estas citocinas por ELISA, se observo que en los ratones inmunizados con OVA+Cry1Ac se detectaron niveles significativamente menores en la IL-4 tanto en los sueros como en el BAL, mientras que los grupos inmunizados con OVA+Alum y OVA+CT presentan valores mas similares entre si, de la IL-4 que en los animales control, mientras que el grupo OVA presentó niveles más altos de esta y fueron comparados con los grupos tanto positivos OVA +CT, OVA +Alum y el grupo negativo OVA.

Mientras que la IL-13 se presentaron valores significativamente mucho mayores a los de la de IL-4, pero muy homogéneos tanto en suero como en el BAL.

Más homogéneos entre los grupos de OVA sola, OVA +Cry1Ac y OVA + Alum, tanto en los sueros como en el BAL, con respecto al grupo control y el OVA + CT en el cual en este último se detectaron niveles ligeramente más bajos, con respecto a los grupos OVA sola, OVA +Cry1Ac y OVA + Alum.

Tabla 6.2 Niveles de citocinas IL-4, IL-13 en ratones inmunizados.

Trat./pg/ml	Suero IL-4	BAL IL-4	Suero IL-13	BAL IL-13
Control	361	608	1914	2117
OVA	582	1240	8725	9323
OVA+Cry1Ac	448	716	7950	7403
OVA+Alum	584	1291	8519	8241
OVA+CT	440	1324	6038	6453

El suero y el BAL fue analizado por Elisa y fueron comparados con los grupos tanto positivos CT/ OVA, Alum/OVA y el grupo negativo OVA.

Datos representan media \pm SD de cada grupo, cada grupo de cinco ratones. Y los valores se presentan en pg/ml.

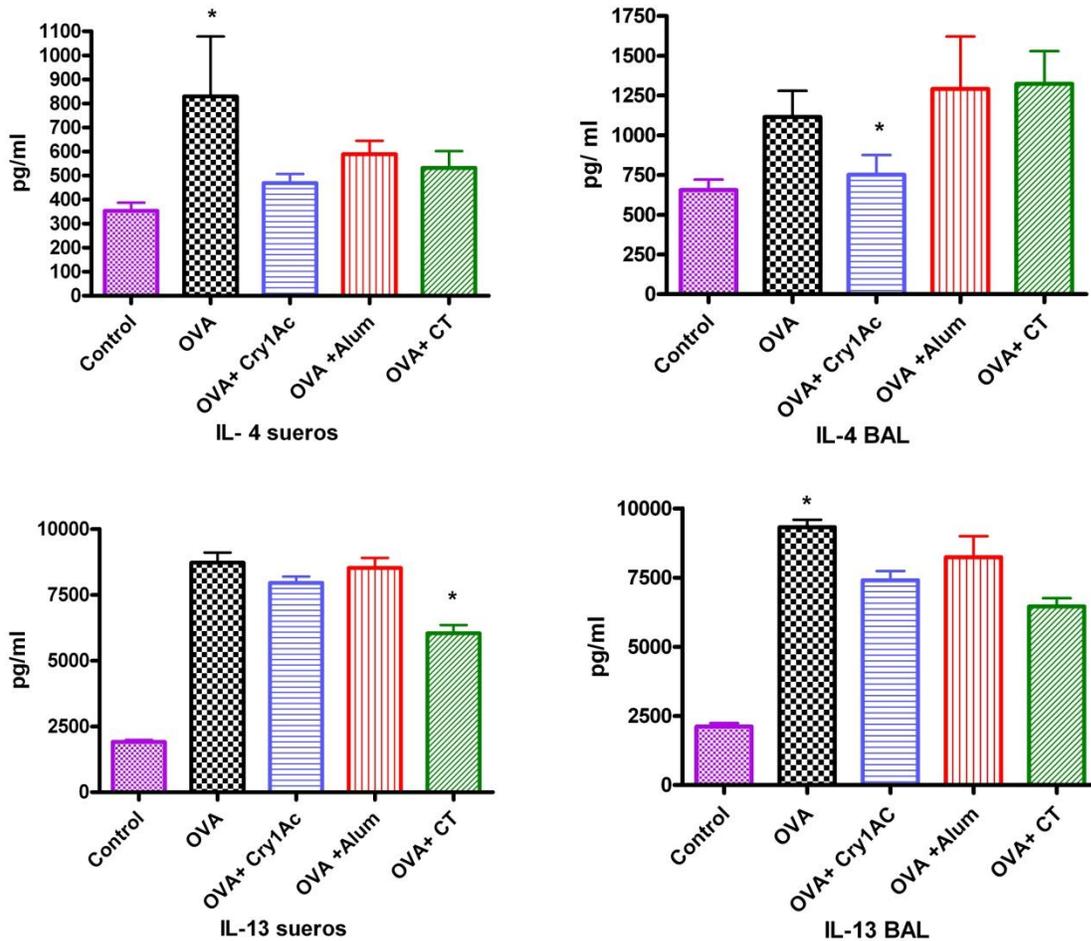


Fig.6.2 Diferencias en los niveles de de citocinas IL-4, IL-13. Tanto el suero como el BAL fueron Obtenidos de ratones BALB/c normales e inmunizados y se llevo a la cuantificación de estas citocinas por un KIT por ELISA. Donde se ve un incremento en general de las dos citocinas tanto en sueros como En el BAL. Donde en la IL-4 OVA sola presento una mayor diferencia significativa con respecto al control y a los otros grupos inmunizados que fueron más homogéneos. Tanto en el BAL la IL-4 fue distinto los grupos de OVA con Alum y CT presentaron valores mas homogéneos entre si y con una diferencia significativa hacia los grupos control y el de OVA con Cry1Ac. Mientras la IL-13 presenta niveles fueron significativamente mucho mayores a los de la de IL-4, pero muy homogéneos tanto en suero como en el BAL.

Y se ha reportado que tanto la IL-4, IL-5, e IL-13 juegan un papel importante en la patofisiología del pulmón, en observaciones se han identificado IL-4 y IL-5 en la regulación de la función de los mastocitos y eosinófilos que subyacen en el desarrollo de la inflamación de las vías respiratorias. También la IL-4 es un factor crítico para la regulación de las células T CD4, y desempeña un papel esencial junto con la IL-13 en el cambio de isotipo IgE en las células B. IL-4 también tiene el potencial en el mantenimiento de la respuesta inflamatoria en la regulación y producción de eosinófilos. Por lo contrario la IL-5 regula el crecimiento, la diferenciación y la activación de eosinófilos y proporciona una señal fundamental para el reclutamiento de leucocitos durante la inflamación alérgica en pulmón. Sin embargo, hay

pruebas contradictorias acerca de la importancia comparativa de estas citocinas y células en los acontecimientos que inician los cambios estructurales y funcionales de las vías respiratorias en respuesta a aeroalérgenos, esto fue reflejado por el balance entre citocinas Th1 y Th2. En este caso OVA/Cry1Ac, induce la proliferación de citocinas Th1 y Th2 en donde se analizaron las citocinas: IFN γ , TNF α , IL-5, IL-2; donde se utilizó el BD CBA Mouse TH1 TH2 Kit (BD Biosciences Pharmingen San Diego, CA), en el cual no se detectaron cambios significativos en ninguna de las citocinas, en ninguno de los grupos inmunizados y el grupo control (datos no mostrados).

Ya que en esta investigación hemos demostrado en un modelo murino de alergia usando OVA que la protoxina Cry1Ac no parece potenciar la respuesta alérgica. Donde los alérgenos específicos IgE no son esenciales para el desarrollo de aerealergeno induciendo daño pulmonar y en las vías aéreas respiratorias.

Discusión.

En esta investigación hemos demostrado usando un modelo murino de alergia hacia OVA que la protoxina Cry1Ac no parece potenciar la respuesta alérgica. Ya que en general se encontró que la aplicación intranasal de OVA + Cry1Ac no indujo alteraciones pulmonares como las provocadas por la coadministración de OVA+ CT o de OVA+ Al(OH)₃ (Alum) que se utilizaron como controles positivos de modelo de alergia, más bien en general los efectos de la coadministración de la protoxina Cry1Ac fueron comparables a los inducidos por la aplicación de OVA sola o a los presentes en los animales controles sin tratamiento. Esta conclusión la basamos en las siguientes evidencias: 1) por la administración intranasal de la protoxina Cry1Ac con OVA no se incrementaron de manera significativa la proporción de linfocitos B y granulocitos que expresen IgE en pulmón, mientras que . En los grupos de OVA sola o coadministrada con Alum o CT si se presentó un incremento en estas poblaciones. Además al analizar por inmunofluorescencia los cortes de pulmón de los animales tratados se confirmó el incremento significativo de granulocitos IgE+ especialmente en los animales tratados con OVA + CT o Alum. 2) Todos los tratamientos provocaron un incremento en la proporción de granulocitos en pulmón sin embargo la coadministración de la protoxina Cry1Ac provocó incrementos similares en la proporción de neutrófilos y menores en la proporción de eosinófilos a los registrados por la administración de OVA sola, mientras que con CT se incrementó significativamente la proporción de eosinófilos con respecto al grupo OVA sola. 3) El análisis histológico de los cortes de pulmones teñidos con Orceína -Giemsa de los ratones inmunizados

con OVA+ Cry1Ac confirmó que no se producen cambios histopatológicos asociados a una reacción alérgica como los encontrados en los grupos administrados con OVA +Alum y OVA +CT en los que se aprecia un claro infiltrado inflamatorio. 4) Al analizar por citometría de flujo las poblaciones de linfocitos de pulmón, se encontró un incremento significativo en la proporción de linfocitos T DPsCD4+CD8+ en pulmón por efecto de la aplicación de OVA +CT y OVA + Alum, que no había sido previamente descrito como un cambio provocado en modelos de alergia. Interesantemente en el grupo de OVA +Cry no se incrementó significativamente la proporción de esta subpoblación de linfocitos T DPs en pulmón por lo que sugerimos que esta es otra evidencia que apoya que la protoxina Cry1Ac no favorece las reacciones alérgicas como lo hace el Alum y la CT. 5) Al analizar las respuestas de anticuerpos anti OVA se encontró que Cry1Ac tiene un efecto adyuvante hacia OVA, sin embargo con Cry1Ac se indujo un patrón mezclado de anticuerpos IgG1 e IgG2a, en contraste con el patrón Th2 polarizado inducido en los grupos coadministrados con CT y Alum en donde fueron significativamente más altas las respuestas de IgG1.6) Por otra parte el nivel de IgE registrado en el grupo de OVA +Cry fue similar al registrado en el grupo de OVA sola mientras que en los grupos Alum y CT fue significativamente mayor. 6) Al analizar los niveles de citocinas IL-4 e IL-13 en suero y lavado bronqueoalveolar se encontró que todos los tratamientos provocaron incrementos significativos en los niveles de estas citocinas con respecto a los controles no tratados sin embargo un resultado no esperado fue el hecho de que la administración de OVA sola fue el tratamiento que provocó los incrementos mayores de IL-4 en suero y de IL-13 en BAL.

Por otra parte es importante mencionar que aun cuando las evidencias arriba mencionadas sugieren que la coadministración de protoxina Cry1Ac con OVA no parece favorecer la respuesta alérgica si produce activación de células presentadoras de antígeno en pulmón y BAL ya que se incrementó la expresión de moléculas coestimuladoras B7-1 (CD80) y B7-2 (CD86) en células CD11b+ y CD11c+, que posiblemente sean macrófagos y células dendríticas. El incremento en la expresión de moléculas coestimuladoras en células presentadoras de antígeno inducido por la protoxina Cry1Ac puede explicar un posible mecanismo por el que esta proteína tiene un efecto adyuvante, ya que otros adyuvantes como la toxina del cólera y otros productos de origen microbianos que se unen a receptores tipo Toll como el LPS, peptidoglicanos, glicolípidos, CpGs, etc tienen también actividad adyuvante e inducen la expresión de moléculas coestimuladoras en células presentadoras de antígeno (Lavelle 2005). Sin embargo es importante mencionar que también existen evidencias que sugieren que la expresión moléculas coestimuladoras expresadas por las DCs, y macrófagos alveolares pueden estar involucradas en la respuesta y el mantenimiento de las respuestas

inflamatorias en pulmón en el asma alérgica. Por ejemplo en personas alérgicas se ha encontrado que tienen una mayor proporción de macrófagos alveolares que expresan CD80 que los sujetos control. (*Holmgren, Czerkinsky et al. 2003*) También se ha descrito que en pacientes con asma atópica se elevan significativamente los niveles de expresión CD86. (*Busse and Lemanske 2001*).

Otro hallazgo importante es que particularmente en los grupos positivos de alergia OVA+Alum y OVA+CT se presentaron dos poblaciones de células B (B220+hi y B220+low) en pulmón, mientras que los grupos control, OVA solo y OVA+Cry presentaron exclusivamente linfocitos B B220+hi. Los linfocitos B B220+ low podrían corresponder a células plasmáticas o plasmablastos que se sabe presentan disminución en la expresión de este marcador. Este aumento de las poblaciones de células B B220 hi y low ha sido investigado por la sensibilización por rutas intraperitoneal o oral. (*fischer et al 2005*). Todos los tratamientos incrementaron la proporción de linfocitos B en pulmón aunque el cambio fue mayor en los grupos OVA+ Alum y OVA+ CT. Otro resultado interesante fue la presencia de un porcentaje alto de linfocitos CD3+B220+ que probablemente corresponden a linfocitos T activados ya que aunque B220 es un marcador usado para identificar linfocitos B, se sabe que las células T activadas también pueden incrementar su expresión. Interesantemente en general todos los grupos presentaron proporciones similares de linfocitos T B220+ de alrededor del 20% lo que indica que la mucosa pulmonar como otras mucosas presenta células T activadas. Para tratar de caracterizar a las poblaciones atípicas de linfocitos T CD3+ DP CD4+CD8+ que se encontraron elevadas especialmente en los grupos de alergia (OVA+Alum y OVA +CT) decidimos realizar también un análisis de B220+ y CD4+ en la región total de linfocitos. Inesperadamente mediante este análisis se encontró que los grupos control, OVA sola y OVA+Cry presentaban principalmente linfocitos CD4+ y linfocito B tanto B220 hi como low, aunque en el grupo OVA + Cry además de éstas poblaciones se apreciaba también una población de células CD4+B220+ que representaba el 6%. En contraste en los grupos OVA+Alum y OVA +CT se presentó un marcado incremento en la proporción de células CD4+B220+low que posiblemente correspondan a linfocitos T. Sin embargo mediante este análisis fue más evidente la presencia de células B220+ hi y low en los controles en en OVA

sola y en OVA+ Cry que en los grupos OVA Alum y OVA+ CT lo que sugiere que en estos dos últimos grupos existen células B220+ low que no son células T (ya que no expresan CD3) además de células CD4+B220+ mientras que en los controles, OVA sola y OVA+Cry solo existen células T CD3+ B220+low que no son CD4+ y células B B220+ hi. Aunque se requieren estudios adicionales para caracterizar con más detalle estos cambios en las poblaciones de linfocitos T y B que no habían sido previamente descritos en modelos de alergia. Consideramos particularmente interesante el incremento en células T CD3+ DP CD4+CD8+ observado en los grupos positivos de alergia OVA+Alum y OVA+CT porque podrían estar relacionadas con los cambios patológicos que ocurren en el pulmón durante la alergia. Aunque se conoce poco de la función de estas células T DP en base a las funciones propuestas, que se describen abajo, proponemos que participan en el proceso inflamatorio asociado a la reacción alérgica.

Las células T DP son bien conocidas en el timo donde, donde son precursoras de células T en etapas tempranas de la maduración. Los precursores de células T se localizan en la corteza externa del timo y se identifican como triple-negativas porque carecen de expresión de marcadores CD3, CD4 y CD8. Estas células inicialmente expresan CD3 pero como aún no expresan CD4 o CD8 se llaman dobles negativas. Estas células pasan a través de etapas DP, en las cuales estas células inmaduras expresan tanto CD4 como CD8, y finalmente pasan al estado de SP (del inglés single positive), y entonces migran del timo y entran a los órganos linfoides secundarios. Las células T maduras CD4+CD8- pueden interactuar con células presentadoras de antígeno MHC clase II y exhibir funciones cooperadoras/inductoras mientras que las células T CD4-CD8+ reconocen antígenos en el contexto MHC clase I y se asocian con funciones citotóxicas/supresoras. Eventualmente la estimulación antigénica induce la proliferación y diferenciación de estas células T maduras CD4+ y CD8+ hacia células efectoras con la habilidad de participar en respuestas inmunes hacia patógenos. Sin embargo se conoce muy poco en relación a las características fenotípicas y funcionales de las células T DP circulantes en sangre periférica o extra-tímicas aunque existen evidencias sugieren que podrían diferir de aquellas del timo. Las células T DP CD4+CD8+ de sangre periférica e intestinales han sido descritas en varias especies incluyendo en humanos pero su función y características inmunofenotípicas todavía no son claramente comprendidas. Varios

investigadores han reportado la presencia de células T DP circulantes en sangre, tanto en individuos sanos [13, 14] como en enfermos. [15–22] (Parel and Chizzolini 2004). Se ha hipotetizado que la existencia en sangre periférica de esta rara no convencional población de linfocitos resulta de la liberación prematura de linfocitos T inmaduros CD4+CD8+ del timo a la periferia, donde su maduración hacia células funcionalmente competentes (SP del inglés single positive) continua. Sin embargo en infecciones virales por HIV y Epstein Barr, el porcentaje de células T DP se incrementa a un 20% de los linfocitos circulantes sugiriendo que podrían ser células efectoras. De acuerdo con esta hipótesis en humanos y en animales se ha observado que las células T DP tienen actividad antiviral, indicando que éstas células se comportan como células efectoras antígeno específico en vez de cómo células inmaduras del timo [2, 4, 24]. Además la mayoría de las células T DP tienen un fenotipo de memoria y son capaces de producir niveles de citocinas mayores que sus contrapartes SPs. También en un estudio reciente (Pahar, Lackner et al. 2006) describieron que las células T DP son abundantes en la lámina propia intestinal de macacos rhesus normales, además estas células presentan un fenotipo activado de memoria, y eran capaces de producir niveles mayores de citocinas y quimiocinas en respuesta a la estimulación con mitógenos en comparación con linfocitos T CD4. Por otra parte por la alta expresión de CCR5, su activación y fenotipo de memoria estas células T DP intestinales podrían ser un blanco importante para la infección y replicación por HIV. En base a estos resultados se sugiere que la mayoría de las células T DP de sangre periférica y de la lámina propia son células efectoras y de memoria que son activadas para responder rápidamente hacia sus antígenos que reconocen y que podrían ser importantes en regular las respuestas inmunes, lo cual las distinguiría de las células DP inmaduras encontradas en el timo.

Usualmente las células T DP están presentes en número bajos en sangre periférica (2–6%), aunque se han reportado incrementos en su frecuencia en varias condiciones patológicas aunque también en individuos aparentemente sanos. Las células T DP representan una población heterogénea. Existen fuertes evidencias que indican que células T CD4 efectoras diferenciadas terminalmente in vivo pueden adquirir la cadena alfa de correceptor CD8. De forma recíproca, la activación in vitro de linfocitos TCD8+ resulta en la expresión de niveles

bajos de CD4. Sin embargo de forma particularmente intrigante una subpoblación de linfocitos T DP que expresan altos niveles tanto de CD4 como del heterodímero CD8 alfa beta ha sido identificada en enfermedades autoinmunes y en desórdenes inflamatorios crónicos. Aunque no se ha demostrado, se ha especulado que las células T CD4^{hi}CD8^{hi} podrían estar involucradas con autoreactividad debido a una selección tímica defectuosa. Se han descrito incrementos transitorios o persistentes en los números de células Ts DP en sangre periférica de pacientes con infecciones virales, enfermedades de la colágena, y en condiciones neoplásicas aunque se sabe poco de la especificidad antigénica, de la restricción por MHC y de su función. (Parel y Chizzolini 2004)

Dado que nosotros encontramos incremento en las poblaciones de células T DP solo en los pulmones de los grupos que presentaron procesos inflamatorios asociados a la reacción alérgica nos inclinamos a pensar que la función de estas células está involucrada en estos procesos inflamatorios, sin embargo no podemos descartar que el posible papel que estas células T DP desempeñan en pulmón se relacione más bien con inducción de respuestas regulatorias que son inducidas solo en estos grupos de alergia como una respuesta del organismo para controlar la severa reacción inflamatoria inducida. En apoyo con la posible función regulatoria de las células T DP en mucosa intestinal existen evidencias que sugieren este papel. En el epitelio murino intestinal se han descrito células T DP que expresan el homodímero CD8 $\alpha\alpha$ (en vez del heterodímero más común CD8 $\alpha\beta$), se ha propuesto que estas células juegan un papel regulatorio en la prevención de la enfermedad inflamatoria intestinal. Das G, Augustine MM, Das J, et al. En mucosa nasal se ha propuesto que las células T DN están relacionados con las células T regulatorias, que participan de manera importante en la regulación de la respuesta inmune contra antígenos nasales, además estas células pueden diferenciarse en células Th1 o Th2, de acuerdo a la estimulación antigénica, la presencia de células DN en NALT ha sugerido que este tejido puede representar un sitio de maduración extratímica de linfocitos T, y en este caso podrían estar también presentes también células T DP que podrían desempeñar funciones regulatorias. Marco 2007 Dado que en la mucosa respiratoria del pulmón es muy importante evitar las respuestas inflamatorias que podrían comprometer la vida del individuo es por lo tanto probable que las células T DP participen en la regulación de estas respuestas.

Por otra parte nuestros resultados están de acuerdo con otros estudios que también muestran que las reacciones alérgicas se producen tras un gran reto por las vías respiratorias de los

ratones, ya que una alta sensibilización fue observada en ratones con extracto de proteína del mani (PE) más CT en la producción de IgE específica y secreción de citocinas Th2. Además las reacciones alérgicas son evidentes en el BAL y en el suero de los ratones sensibilizados, aunque se ha demostrado que la IL17 puede inhibir la activación de las células Th2 y la producción de IL-4, IL-5 e IL-13 (*Schnyder-Candrian et al.*, 2006). En un estudio previo se encontró que la inmunización intranasal con Cry1Ac indujo la activación de linfocitos en NALT y pasajes nasales, indujo altas respuestas de células productoras de anticuerpos e incremento preferentemente la proporción de linfocitos T que producen citocinas Th2. Mientras que en este trabajo la administración de OVA/Cry1Ac, indujo la producción tanto de citocinas Th1 y Th2, sin que se observara una polarización hacia pronunciada si predominaron la tendencia hacia Th2, pero es importante mencionar que en los grupos inmunizados con OVA sola o OVA+CT la magnitud y polarización de las respuestas hacia la producción de citocinas Th2 fue significativamente mayor que en el grupo OVA+Cry.

Se han demostrado que la exposición de granjeros de un spray de Bt provoca el incremento de anticuerpos IgG e IgE. (Bernstein I.L. 1999) sugiriendo el potencial alérgico de las proteínas Cry. En contraste en este estudio la administración de OVA/ Cry1Ac indujo una respuesta específica de anticuerpos mezclada IgG1 e IgG2a y una respuesta mucho menor de IgE total con respecto a la administración de OVA con Alum o con CT que presentaron respuestas predominantemente Th2. Aunque nuestros resultados no son comparables con el estudio que sugieren el potencial alérgico de las proteínas Cry en general nuestros datos indican que la protoxina Cry1Ac no favorece el desarrollo de reacciones alérgicas cuando es coadministrada con OVA. Sin embargo es importante mencionar que en dicho estudio la exposición fue a las esporas totales de BT que contienen cristales de proteínas Cry mas no a la protoxina soluble purificada como se hizo en este trabajo. Para caracterizar mejor el potencial alérgico de Cry1Ac consideramos importante realizar estudios posteriores evaluar si la toxina Cry1Ac y la protoxina Cry1Ac administradas solas en forma repetida por las vías oral o intranasal son potencialmente alérgicas.

Conclusiones.

Las conclusiones de este trabajo aportaron evidencias novedosas que indican que los efectos de la administración intranasal de la protoxina Cry1Ac en el modelo murino de alergia con OVA no parece potenciar las respuestas alérgicas.

1. Los resultados de citometría y el análisis inmunohistológico indican que a diferencia de los grupos con OVA, Alum y CT, en el grupo OVA +Cry No se incrementan la proporción de linfocitos B IgE+ Ni de granulocitos IgE+ en los pulmones.
2. Aun cuando Cry provoca un incremento de citocinas Th2 en suero, este es mucho menor a las respuestas que se dan en OVA, CT, Alum.
3. Los datos confirman el efecto adyuvante de Cry1Ac ya que se incrementaron las respuestas específicas de anticuerpos IgG1 e IgG2a. Sin embargo a diferencia de CT y Alum que inducen respuestas Th2 polarizadas Cry1Ac induce respuestas mezcladas
4. La administración de OVA+Cry Induce la expresión de moléculas coestimuladoras B7-1 (CD80) y B7-2 (CD86) en células presentadoras de antígeno de pulmón lo que podría ayudar a explicar su efecto adyuvante.
5. Particularmente en los grupos OVA+CT y OVA +Alum en pulmón Se presenta un incremento en poblaciones de células T doble positivas CD4+/CD8+ lo que sugiere que pudieran estar asociadas con la inflamación asociada al proceso alérgico o a la regulación de la inflamación.

Apendice 1
REACTIVOS.

Amortiguador de fosfatos-salina (PBS)

PBS	10X	1X	5X
NaCl	80 g	8 g	40 g
KCl	2 g	0.2 g	1 g
KH ₂ PO ₄	2 g	1.15 g	5.75 g
Na ₂ HPO ₄	11.46 g	0.2 g	1 g
H ₂ O	aforar a 1000 ml		

Disolver en agua bidestilada y aforar a la cantidad correspondiente. Almacenar a 4°C

PBA (Solución de Albúmina-Azida de sodio)

Albúmina de suero bovino	0.5 g
Azida de sodio	0.01% (0.01 gm en 100 ml H ₂ O)
PBS aforar a	100 ml

Disolver en agua bidestilada y aforar a la cantidad correspondiente. Almacenar a 4°C

PBS-Tween

REACTIVO

1 litro

PBS 10X

100 ml

Tween 20

0.5 ml

Disolver en agua bidestilada y aforar a la cantidad correspondiente. Almacenar a 4°C

AMORTIGUADOR DE LISIS

Solución Hemolisante

Solución A

Cloruro de amonio (NH₄Cl, 0.16 M) 0.87 gm
Agua 100 ml

Solución B

Tris base (0.17M) 2.05 gm
Agua 100 ml

Tomar 8 partes de la solución A + 2 partes de la solución B
Ajustar pH a 7.4 (Usar HCL 14 N),

Almacenar a 4° C

Poner 2 ml a la pastilla de células y 1 ml de RPMI 1X 5' Adicionar 8 ml de PBS frío y centrifugar

FIJADOR FACS (PARA CITOMETRIA)

Formaldehído 1 ml

PBS 1X 99 ml

2ª opción

Paraformaldehido 1 gm

PBS 1X 100 ml

Disolver el paraformaldehido en 80 ml de PBS calentando a 60°C y agregar unas gotas de NaOH 1 N dejar enfriar a ajustar el pH a 7.4 con HCl 1 N aforar a 100 ml

Fijador de Zinc (ZSF)

Primera elección para inmuno-histoquímica
USAR FRESCO

Tris base 0.1 M 0.121 gm (0.242 gm p/200ml)

Acetato de calcio 0.05 gm (0.1 gm)

Agua destilada 80 ml (160 ml)

Mezclar y ajustar a pH 7.2-7.4

Aforar a 100 ml (200 ml)

Adicionar:

Acetato de Zinc 0.5 gm (1 gm)

Cloruro de Zinc 0.5 gm (1 gm)

Fijar con un volumen de 20 veces mayor con respecto a la muestra por 24 horas en bloques de tejido no mayores de 2 cm., al cambiar fijador nuevo cortar la muestra a bloques más pequeños y dejar 48 hrs. más.

Este fijador tiene poco poder de penetración por lo que para intestino hay que poner bloques de tejido no mayores de 0.5 cm.

Excelente para hígado y bazo pues no endurece el tejido.

Este fijador permite usar concentraciones muy diluidas de anticuerpos.

	100 ml	200 ml	500 ml	1000 ml
Agua destilada	100 ml	200 ml	500 ml	1000 ml
Tris	1.21	2.42		12.1
Acetato calcio	0.05	0.10	0.250	0.500
Acetato de Zinc	0.5	1.0	2.5	5.0
Cloruro de Zinc	0.5	1.0	2.5	5.0

Guardar en frasco ámbar y refrigerar si se hace un día antes.

Paraformaldehido al 4%

Paraformaldehido (Sigma) 4 gm
PBS o H₂O 80 ml

Calentar a 60° C con agitación, al alcanzar la temperatura adicionar unas gotas de NaOH al 1 M acuoso hasta que se disuelva el paraformaldehido y dejar enfriar.

Ajustar el pH con HCL 1 N o NaOH según el caso hasta ajustar a pH 7.4 y aforar a 100 ml.

Guardar a 4° C no usar después de 15 días de elaborado.

DESCALCIFICACION

Después de fijado el tejido lavar con agua mínimo por 1 hr. Para eliminar el fijador, colocar la muestra en un mínimo de 20 volúmenes en la solución descalcificante y hacer cambios cada 24 ó 48 hrs. Hasta que el hueso esté con consistencia de tejido blando.

Por lo que el tiempo puede variar para cada tejido. Después:

Lavar profusamente con agua corriente mínimo 24 hrs. de preferencia con agua Mili Q para eliminar las sales totalmente.

SOLUCION DESCALCIFICANTE

EDTA AL 7% (100 ml)

EDTA sódico 7 gm
Agua destilada 80 ml

Mezclar y poner en agitación, adicionar NAOH 1 N hasta que se disuelva el EDTA

Ajustar el pH con HCL 1 N a 7.4 **y aforar a 100 ml**

En tejidos descalcificados es importante eliminar completamente las sales de EDTA pues se interfiere con el proceso de inclusión y tinción.

Los tiempos se determinan dependiendo del tamaño de la muestra. Aumentar tiempos según el tamaño del bloque. NO dejar más de 1 hr en alcohol absoluto pues se endurece y contrae el tejido. Los tiempos en parafina son mínimos, se pueden quedar por mucho más tiempo siempre y cuando la parafina esté entre 58-60° C . Tiempos prolongados en parafina pueden afectar para inmunohistoquímica.

SOLUCIONES PARA PEGAR LAS MUESTRAS

SILANIZAR

(3-aminopropyl) triethoxysilane (Sigma A-3648) 3ml

Acetona 97 ml

Guardar en frasco ámbar y a 4° C

Lavar las laminillas en alcohol absoluto (en caso de laminillas reusadas)

Dejar secar al aire libre

Bañar las laminillas en Silano 5'

escurrir e incubar a 60° C por 24 horas

LISINAR

Poli-lysina (Sigma P-8960) 10 ml

Agua Mq 90 ml

Guardar en refrigeración **NO más de 15 días ya preparada**

Dejar las laminillas 10' escurrir e incubar a 60° C por 24 hrs.

RUYTER (después del corte, para pegar el corte en la laminilla)

Solución A:

Agua destilada 80 ml

Albúmina glicerinada 20 gotas

Adicionar la albúmina al agua destilada

Solución B:

Acetona 20 ml

Benzoato de metilo 20 gotas

Disolver el benzoato en la acetona

Adicionar sol. A a sol. B (en ese orden) gota a gota **MUY LENTAMENTE**, pues de no hacerlo se forma precipitado.

Filtrar. Guardar a 4°C

Preparación de colorantes.

Solución de Eritrosina (I.C.45345)

Eritrosina 0.30gm

Tris 0.5 pH 10.5 100ml

Disolver y guardar en frasco ámbar. Dura 1 mes aproximadamente.

Tris 0.5 Ph10.5

P.M. 121.1 gm =1M ▲ 60.55gm en 1000ml ▲ 6.06 gm en 100ml de agua

Para preparar 300 de solución de eritrosina.

Eritrosina 0.9 gm

Tris 0.5gm 300ml.

Hematoxilina de Harris.

Hematoxilina 5gm

Alcohol 70% 50ml

Alumbre de amonio o potasio 100gm

Oxido de mercurio rojo 2.5 gm

Agua destilada 1000ml.

Disolver la hematoxilina en el alcohol, y el alumbre de potasio en el agua destilada bajo calor, cuando este disuelto mezclar ambas soluciones y poner a hervir lo mas rápido posible (limite el calor a menos de 1 minuto y agite). Retirar del calor y agregar el rojo oxido muy lentamente. Recalentar a fuego lento hasta que tome color púrpura retirar del fuego y coloque el recipiente en otro con agua fría hasta que enfríe. La adición de 2-4 ml de acido acético glacial por 100ml de solución incrementa la precisión de la tinción nuclear. Filtrar y guardar en frasco ambar, se puede usar en cuanto se enfríe, dura varios meses.

Orceína.

Orceina sintética 0.2 gm

Alcohol 70% 100ml

Acido clorhídrico concentrado 0.6ml

Estable por muchos meses.

Giemsa.

Colorante de giemsa 1gm

Alcohol metílico 66 ml

Glicerina 66ml

Disolver el colorante en glicerina Calentar 60° por 2horas Adicionar el alcohol.

Lista de Abreviaturas.

Ab	Anticuerpo.
ABTS	2,2'-Azino-bis-(3-Ethylbenzthiazoline-6-Sulfonic Acid)
Ag	Antígeno.
AHR	hiperreactividad aérea o bronquial.
Al(OH)₃	Hidróxido de aluminio.
APC	Células presentadora de Antígeno.
BAL	Lavado bronquio alveolar.
BALT	Tejido linfóide asociado a bronquios. Del inglés bronchial-associated lymphoid tissue.
BSA	Albúmina de suero bovino. Del inglés bovine serum albumin.
Bt	<i>Bacillus thuringiensis</i>
CT	Toxina de cólera. Del inglés cholera toxin.
DC	Células dendríticas. Del inglés dendritic.
DP	Doble positivas.
E. coli	<i>escherichia coli</i>
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético.
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
FITC	Isotiocianato de fluoresceína. Del inglés fluorescein isothiocyanate.
i.n.	Intranasal.
i.p.	Intraperitoneal.
IFN-γ	Interferón gama.
IgA	Inmunoglobulina A.
IgE	Inmunoglobulina E.
IgG1	Subclase de Inmunoglobulina G.
IgG2A	Subclase de Inmunoglobulina G.
IL	Interleucina.
LPS	Lipopolisacárido
LT	Toxina termolábil. Del inglés heat-labile toxin.
mAb	Anticuerpos monoclonales. Del inglés monoclonal antibodies.
MHCII	Moléculas de histocompatibilidad II
NaCl	Cloruro de sodio.
NALT	Tejido linfóide asociado a la nariz. Del inglés nasal-associated lymphoid tissue.

OVA	Ovoalbumina.
OH	Alcohol.
PAF	Factor activador de plaquetas
PBA	Amortiguador de fosfatos con azida de sodio. Del ingles phosphate buffered with sodium azide.
PBS	Amortiguador de fosfatos en solucion salina. Del ingles phosphate buffered saline.
PBS-T	Amortiguador de fosfatos en solución salina-Tween 20. Del inglés phosphate-buffered saline-Tween 20.
PCB	Amortiguador carbonatado de fosfatos. Del inglés phosphate-carbonate buffer.
pCry1Ac	Protoxina Cry1Ac.
PE	Ficoeritrina. Del inglés Phicoeritrin.
r.	Rectal.
Rpm	Revoluciones por minuto.
RPMI-1640	Medio Roswell Park Memorial Institute-1640.
TLR	Receptor Toll-like. Del inglés toll-like receptors.
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa. Del inglés Tumor necrosis factor-alpha.
VCAM-1	Molécula de adhesión celular vascular-1. Del inglés vascular cell adhesion molecule.

Referencias.

1. Adel-Patient, K., Ah-Leung, S., Bernard, H., Durieux-Alexandrenne, C., Creminon, C., & Wal, J.M. (2007). Oral sensitization to peanut is highly enhanced by application of peanut extracts to intact skin, but is prevented when CpG and cholera toxin are added. *International Archives of Allergy Immunology*, 143, 10_20.
2. Adel-Patient, K., Bernard, H., Ah-Leung, S., Creminon, C., & Wal, J.M. (2005) Peanut- and cow's milk- specific IgE, Th2 cells and local anaphylactic reaction are induced in Balb/c mice orally sensitized with cholera toxin. *Allergy*, 60, 658_664.
3. Bernstein I.L, Bernstein J.A., Miller M. et al (1999) Immune Responses IN Farm Workers after Exposure to Bacillus Truringiensis Pesticides. *Environ Health perspect* 107 :575-582.
4. Brewer, J. P., A. B. Kisselgof, et al. (1999). "Genetic variability in pulmonary physiological, cellular, and antibody responses to antigen in mice." *Am J Respir Crit Care Med* **160**(4): 1150-6.
5. Bromander, A., J. Holmgren, et al. (1991). "Cholera toxin stimulates IL-1 production and enhances antigen presentation by macrophages in vitro." *J Immunol* **146**(9): 2908-14.
6. Busse, W. W. and R. F. Lemanske, Jr. (2001). "Asthma." *N Engl J Med* **344**(5): 350-62.
7. Campbell, A. M., I. Vachier, et al. (1998). "Expression of the high-affinity receptor for IgE on bronchial epithelial cells of asthmatics." *Am J Respir Cell Mol Biol* **19**(1): 92-7.
8. Cates, E. C., B. U. Gajewska, et al. (2003). "Effect of GM-CSF on immune, inflammatory, and clinical responses to ragweed in a novel mouse model of mucosal sensitization." *J Allergy Clin Immunol* **111**(5): 1076-86.
9. Clements, J. D., N. M. Hartzog, et al. (1988). "Adjuvant activity of Escherichia coli heat-labile enterotoxin and effect on the induction of oral tolerance in mice to unrelated protein antigens." *Vaccine* **6**(3): 269-77.
10. Connell, T. D. (2007). "Cholera toxin, LT-I, LT-IIa and LT-IIb: the critical role of ganglioside binding in immunomodulation by type I and type II heat-labile enterotoxins." *Expert Rev Vaccines* **6**(5): 821-34.
11. Czerkinsky, C., F. Anjuere, et al. (1999). "Mucosal immunity and tolerance: relevance to vaccine development." *Immunol Rev* **170**: 197-222.
12. De Heer, H. J., H. Hammad, et al. (2004). "Essential role of lung plasmacytoid dendritic cells in preventing asthmatic reactions to harmless inhaled antigen." *J Exp Med* **200**(1): 89-98.
13. Dickinson, B. L. and J. D. Clements (1995). "Dissociation of Escherichia coli heat-labile enterotoxin adjuvant activity from ADP-ribosyltransferase activity." *Infect Immun* **63**(5): 1617-23.
14. Eriksson, K. and J. Holmgren (2002). "Recent advances in mucosal vaccines and adjuvants." *Curr Opin Immunol* **14**(5): 666-72.
15. Esquivel-Perez, R. and L. Moreno-Fierros (2005). "Mucosal and systemic adjuvant effects of cholera toxin and Cry1Ac protoxin on the specific antibody response to

- HIV-1 C4/V3 peptides are different and depend on the antigen co-administered." Viral Immunol **18**(4): 695-708.
16. Fischer R, McGhee J R., L.V. Hough.(2005) Oral and Nasal Sensitization promote Distinct Immune Responses and Lung Reactivity in Mouse Model of peanut Allergy. Am J Pathology **167**:1621-1630
 17. Garlisi, C. G., A. Falcone, et al. (1995). "T cells are necessary for Th2 cytokine production and eosinophil accumulation in airways of antigen-challenged allergic mice." Clin Immunol Immunopathol **75**(1): 75-83.
 18. Hamelmann, E., K. Takeda, et al. (1999). "Role of IgE in the development of allergic airway inflammation and airway hyperresponsiveness--a murine model." Allergy **54**(4): 297-305.
 19. Herz, U., A. Braun, et al. (1998). "Various immunological phenotypes are associated with increased airway responsiveness." Clin Exp Allergy **28**(5): 625-34.
 20. Hodge, L. M., M. Marinaro, et al. (2001). "Immunoglobulin A (IgA) responses and IgE-associated inflammation along the respiratory tract after mucosal but not systemic immunization." Infect Immun **69**(4): 2328-38.
 21. Hofte, H. and H. R. Whiteley (1989). "Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*." Microbiol Rev **53**(2): 242-55.
 22. Hogan, S. P., K. I. Matthaei, et al. (1998). "A novel T cell-regulated mechanism modulating allergen-induced airways hyperreactivity in BALB/c mice independently of IL-4 and IL-5." J Immunol **161**(3): 1501-9.
 23. Holmgren, J., C. Czerkinsky, et al. (2003). "Mucosal immunisation and adjuvants: a brief overview of recent advances and challenges." Vaccine **21 Suppl 2**: S89-95.
 24. Holt, P. G., D. H. Strickland, et al. (2008). "Regulation of immunological homeostasis in the respiratory tract." Nat Rev Immunol **8**(2): 142-52.
 25. Itakura, M., A. Tokuda, et al. (2001). "Blockade of secondary lymphoid tissue chemokine exacerbates *Propionibacterium acnes*-induced acute lung inflammation." J Immunol **166**(3): 2071-9.
 26. Jones, H. P., L. M. Hodge, et al. (2001). "The pulmonary environment promotes Th2 cell responses after nasal-pulmonary immunization with antigen alone, but Th1 responses are induced during instances of intense immune stimulation." J Immunol **167**(8): 4518-26.
 27. Jungsuwadee, P., G. Dekan, et al. (2002). "Recurrent aerosol antigen exposure induces distinct patterns of experimental allergic asthma in mice." Clin Immunol **102**(2): 145-53.
 28. Kuiper, H. A., G. A. Kleter, et al. (2001). "Assessment of the food safety issues related to genetically modified foods." Plant J **27**(6): 503-28.
 29. Lavelle, E. C. (2005). "Generation of improved mucosal vaccines by induction of innate immunity." Cell Mol Life Sci **62**(23): 2750-70.
 30. Leofrancois and Puddington(2006). Intestinal and Pulmonary Mucosal T cells: Local Heroes Fight to Maintain The Status Quo. Annu. Rev. Immunol. **24**:681-704.
 31. Lindell DM, Berlin AA, Schaller MA, Lukacs NW.(2008) *B cell antigen presentation promotes Th2 responses and immunopathology during chronic allergic lung disease.* PLoS One.**3**:e3129.

32. Lycke, N. and J. Holmgren (1986). "Strong adjuvant properties of cholera toxin on gut mucosal immune responses to orally presented antigens." Immunology **59**(2): 301-8.
33. Lycke, N., U. Karlsson, et al. (1991). "The adjuvant action of cholera toxin is associated with an increased intestinal permeability for luminal antigens." Scand J Immunol **33**(6): 691-8.
34. Marinaro, M., H. F. Staats, et al. (1995). "Mucosal adjuvant effect of cholera toxin in mice results from induction of T helper 2 (Th2) cells and IL-4." J Immunol **155**(10): 4621-9.
35. Mojtavavi, N., G. Dekan, et al. (2002). "Long-lived Th2 memory in experimental allergic asthma." J Immunol **169**(9): 4788-96.
36. Moreno-Fierros, L., N. Garcia, et al. (2000). "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 Infect **2**(8): 885-90.
37. Moreno-Fierros, L., R. Lopez-Revilla, et al. (2002). "Differences between the large and small intestine in the immunodominant amoebic proteins recognized by IgG and IgA antibodies in BALB/c mice." Scand J Immunol **55**(5): 458-69.
38. Moreno-Fierros, L., E. J. Ruiz-Medina, et al. (2003). "Intranasal Cry1Ac protoxin is an effective mucosal and systemic carrier and adjuvant of *Streptococcus pneumoniae* polysaccharides in mice." Scand J Immunol **57**(1): 45-55.
39. Mosmann, T. R. and R. L. Coffman (1989). "TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties." Annu Rev Immunol **7**: 145-73.
40. Oriss, T. B., M. Ostroukhova, et al. (2005). "Dynamics of dendritic cell phenotype and interactions with CD4+ T cells in airway inflammation and tolerance." J Immunol **174**(2): 854-63.
41. Oumouna, M., R. Datta, et al. (2006). "Poly(ADP-ribose) polymerase-1 inhibition prevents eosinophil recruitment by modulating Th2 cytokines in a murine model of allergic airway inflammation: a potential specific effect on IL-5." J Immunol **177**(9): 6489-96.
42. Pahar, B., A. A. Lackner, et al. (2006). "Intestinal double-positive CD4+CD8+ T cells are highly activated memory cells with an increased capacity to produce cytokines." Eur J Immunol **36**(3): 583-92.
43. Parel, Y. and C. Chizzolini (2004). "CD4+ CD8+ double positive (DP) T cells in health and disease." Autoimmun Rev **3**(3): 215-20.
44. Partidos, C. D., M. Pizza, et al. (1996). "The adjuvant effect of a non-toxic mutant of heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli* for the induction of measles virus-specific CTL responses after intranasal co-immunization with a synthetic peptide." Immunology **89**(4): 483-7.
45. Persson, C. G. (2002). "Con: mice are not a good model of human airway disease." Am J Respir Crit Care Med **166**(1): 6-7; discussion 8.
46. Prasad, S. S. and Y. I. Shethna (1975). "Enhancement of immune response by the proteinaceous crystal of *Bacillus thuringiensis* var *thuringiensis*." Biochem Biophys Res Commun **62**(3): 517-23.

47. Rojas-Hernández, S., M. A. Rodríguez-Monroy, et al. (2007). "Nitric oxide production and nitric oxide synthase immunoreactivity in *Naegleria fowleri*." Parasitol Res **101**(2): 269-74.
48. Rodríguez-Monroy and Moreno-Fierros (2010) "Striking Activation of NALT and Nasal Passages Lymphocytes Induced by Intranasal Immunization with Cry1Ac protoxin" Scand J Immunol **71**(3): 159-168
49. Ryan, E. J., L. M. Daly, et al. (2001). "Immunomodulators and delivery systems for vaccination by mucosal routes." Trends Biotechnol **19**(8): 293-304.
50. S. Silva Martínez et al. (2005) Reparación de un gel a partir de desechos de aluminio y su uso en la eliminación de arsénico en agua para consumo humano Rev. Int. Contam. Ambient. **21** (4) 171-181
51. Schnyder-Candrian, S., Togbe, D., Couillin, I., Mercier, I., Brombacher, F., Quesniaux, V., et al. (2006). Interleukin-17 is a negative regulator of established allergic asthma. Journal of Experimental Medicine, **203**, 2715_2725.
52. Siegel, J. P. (2001). "The mammalian safety of *Bacillus thuringiensis*-based insecticides." J Invertebr Pathol **77**(1): 13-21.
53. Simecka, J. W., R. J. Jackson, et al. (2000). "Mucosally induced immunoglobulin E-associated inflammation in the respiratory tract." Infect Immun **68**(2): 672-9.
54. Tomkinson, A., C. Duez, et al. (2001). "A murine IL-4 receptor antagonist that inhibits IL-4- and IL-13-induced responses prevents antigen-induced airway eosinophilia and airway hyperresponsiveness." J Immunol **166**(9): 5792-800.
55. Torres, R., C. Picado, et al. (2005). "[Use of the mouse to unravel allergic asthma: a review of the pathogenesis of allergic asthma in mouse models and its similarity to the condition in humans]." Arch Bronconeumol **41**(3): 141-52.
56. Tsitoura, D. C., R. H. DeKruyff, et al. (1999). "Intranasal exposure to protein antigen induces immunological tolerance mediated by functionally disabled CD4+ T cells." J Immunol **163**(5): 2592-600.
57. Unger, W. W., F. Hauet-Broere, et al. (2003). "Early events in peripheral regulatory T cell induction via the nasal mucosa." J Immunol **171**(9): 4592-603.
58. van Ginkel, F. W., R. J. Jackson, et al. (2000). "Cutting edge: the mucosal adjuvant cholera toxin redirects vaccine proteins into olfactory tissues." J Immunol **165**(9): 4778-82.
59. Van Rijt S. L. et al (2002). Allergen- induced accumulation of airway dendritic cells is supported by an increase in CD31 hi Ly-6C neg bone marrow precursors in a mouse model of asthma, The American Society of Hematology, Vol 100 No 10 3663-3671.
60. Vázquez, R. I., L. Moreno-Fierros, et al. (1999). "Bacillus thuringiensis Cry1Ac protoxin is a potent systemic and mucosal adjuvant." Scand J Immunol **49**(6): 578-84.
61. Vázquez-Padrón, R. I., J. González-Cabrera, et al. (2000). "Cry1Ac protoxin from *Bacillus thuringiensis* sp. kurstaki HD73 binds to surface proteins in the mouse small intestine." Biochem Biophys Res Commun **271**(1): 54-8.
62. Vazquez-Padron, R. I., L. Moreno-Fierros, et al. (2000). "Characterization of the mucosal and systemic immune response induced by Cry1Ac protein from *Bacillus thuringiensis* HD 73 in mice." Braz J Med Biol Res **33**(2): 147-55.

63. Wikstrom, M. E., E. Batanero, et al. (2006). "Influence of mucosal adjuvants on antigen passage and CD4+ T cell activation during the primary response to airborne allergen." J Immunol **177**(2): 913-24.
64. Williams, N. A., T. R. Hirst, et al. (1999). "Immune modulation by the cholera-like enterotoxins: from adjuvant to therapeutic." Immunol Today **20**(2): 95-101.
65. Wise, J. T., T. J. Baginski, et al. (1999). "An adoptive transfer model of allergic lung inflammation in mice is mediated by CD4+CD62LlowCD25+ T cells." J Immunol **162**(9): 5592-600.
66. Yamamoto, S., H. Kiyono, et al. (1997). "A nontoxic mutant of cholera toxin elicits Th2-type responses for enhanced mucosal immunity." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(10): 5267-72.