



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA

**CARACTERIZACIÓN DE LA RESPUESTA
INMUNE EN EL NALT DESPUÉS DE
LA INMUNIZACIÓN CON pCry1Ac
EN LA INFECCIÓN POR
*Naegleria fowleri***

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

BIÓLOGO

PRESENTA

OSCAR DE JESUS NIETO YAÑEZ

DIRECTOR DE TESIS: DR. MARCO AURELIO RODRIGUEZ MONROY

LOS REYES, IZTACALA

DICIEMBRE, 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.

RECONOCIMIENTO A LOS APOYOS RECIBIDOS.

Para la realización de esta tesis se contó con el apoyo de una beca otorgada por el Dr. Marco Aurelio Rodríguez Monroy a través del proyecto PAPIIT IN219310 y beca del proyecto PE203607 de PAPIME por parte de la Dra. Leticia Moreno Fierros.

Este trabajo fue revisado por el siguiente jurado

Dra. Patricia Bonilla Lemus.
M. en C. Arturo Calderón Vega.
Dr. Marco Aurelio Rodríguez Monroy.
M. en C. Ricardo Ortiz Ortega.
M. en C. Ma. de los Ángeles Sanabria Espinoza.

La realización de este proyecto se hizo en el Laboratorio de Inmunidad de Mucosas de la Unidad de Biomedicina (UBIMED) de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, U.N.A.M., bajo la tutoría del Dr. Marco Aurelio Rodríguez Monroy.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, en particular a la F.E.S. Iztacala, que atendió mis solicitudes y necesidades de apoyo para la realización de mis estudios.

Al Dr. Marco Aurelio Monroy por todo el tiempo, la paciencia, la confianza, por darme la oportunidad de trabajar con él, por el conocimiento que me regaló; gracias por este trabajo.

A la Dra. Leticia Moreno Fierros, por la oportunidad de pertenecer a su equipo de trabajo, por la confianza por todos los conocimientos que me fueron brindados en su laboratorio.

A la Dra. Patricia Bonilla Lemus, M. en C. Arturo Calderón Vega, Dr. Marco Aurelio Rodríguez Monroy, M. en C. Ricardo Ortiz Ortega y a la M. en C. Ma. de los Ángeles Sanabria Espinoza; por las revisiones, los consejos y por su tiempo.

DEDICATORIA

Quiero aprovechar un breve espacio para agradecer a Dios todas las circunstancias que en las que tuve que estar para poder llegar hasta este punto de mi vida.

*Le dedico este trabajo con un cariño muy especial **a mi Madre**, por todo su esfuerzo y paciencia en cada día, por sacrificar tanto en los momentos más difíciles y adversos, por creer siempre en mí, por creer que soy mejor y diferente que el resto del mundo, por todos esos desvelos junto a mí y por ser fuerte... Pero parece que ya paso lo fuerte del ciclón, ahora solo tenemos que seguir caminado juntos, juntos como siempre. A David y Julia (mis hermanos) y a Zayra (mi hijita hermosa) que siempre están ahí quitándome el sueño, aprendiendo, jugando, sorprendiéndome y siendo mejor cada día. A Diana que es como un ángel del que siempre aprendo algo, que me hace la vida más amena, más agradable, más placentera, simplemente la vida es mejor contigo. A mis amigos Omar y Gustavo por tantos años de una amistad incomparable, inmejorable y sorpréndete. A Daniel porque mas que mi sobrino es mi Amigo. A Marco Rodríguez por tanto apoyo, por tanta confianza, por creer en mí, por tu peculiar forma de ser porque siempre me sorprendes con algo inesperado, por ser mi maestro en lo académico y en lo cotidiano de la vida. A Margarita Canales (mi madre académica) por su apoyo incondicional, por el cariño y confianza que siempre me demuestra. A mis amigos de la calle: Pepe, Beto, Omar, Gerardo (el pato), Toño (el borrego), Tito y Brian; por todos los días de desastre que valoro mucho porque han sido inolvidables. A todos y cada uno de los integrantes de la familia García Rubio por siempre tener un lugar para mí en su hogar. A mis compañeros de laboratorio Conchis, Alfredo Medina y Lucio; que formamos parte de la banda de los "Conchis". Espero que no se me olvide nadie.*

Índice General

Índice de Figuras.	I
Lista de Abreviaturas.	II
Resumen.	1
Introducción. Aspectos generales del sistema inmune común de mucosas.	3
Tejido linfoide asociado a la nariz (NALT).	5
Modo de acción de los adyuvantes de mucosas.	9
Cry1Ac Como Adyuvante.	12
Naegleria fowleri y enfermedad producida.	14
Infecciones En Humanos.	16
Antecedentes.	17
Objetivos.	20
Objetivo general.	20
Objetivos particulares.	20
Material y métodos.	20
Cultivo de las amibas.	20
Reactivación de la virulencia.	21
Obtención del extracto total.	21
Obtención de la protoxina Cry1Ac.	22
Esquema de inmunización.	23
Obtención de muestras.	23
Obtención del NALT.	24
Obtención de linfocitos del NALT.	25
Inmunotinción de linfocitos.	25
Citometría de flujo.	26
Obtención de los Pasajes Nasales.	26
Análisis de citocinas.	27
Análisis estadístico.	28
Resultados.	29
IL-10.	31
IL-4.	33
IL-5.	35
IL-6.	36
IL-12.	36
TNF- α .	37
IFN- γ .	38
IL-2.	40
MCP-1.	41
Discusión.	47
Conclusiones.	51
Referencias.	52

Índice de Figuras

Fig.1. Comparación del NALT y anillo de Waldeyer	5
Fig.2. Valores de citocinas de los tratamientos de Cry1Ac y extracto más Cry1Ac, en muestras de suero y lavados nasales de ratón Balb/c, en los diferentes tiempos, por medio de citometría de flujo.	30
Fig.3. Determinación de la producción de citocinas en lavados nasales al tiempo de 24 h, mediante citometría de flujo.	31
Fig.4. Determinación de la producción de citocinas en muestras de suero al tiempo de 24 h, mediante citometría de flujo	34
Fig.5. Determinación de la producción de citocinas en lavados traqueobronquiales al tiempo de 24 h, mediante citometría de flujo.	39
Fig.6. Fig. 6. Análisis de los cambios en poblaciones linfocitarias del NALT y NP.	43
Fig.7. Análisis de la expresión del marcados de activación CD69 en poblaciones linfocitarias del NALT y NP	44
Fig.8.. Análisis de la expresión del marcados de activación CD25 en poblaciones linfocitarias del NALT y NP	46

Lista de abreviaturas

APC: Aloficocianina. Del inglés Allophycocyanin.
BALT: Tejido linfóide asociado a bronquios. Del inglés bronchial-associated lymphoid tissue.
BSA: Albúmina de suero bovino. Del inglés bovine serum albumin.
CT: Toxina de cólera. Del inglés cholera toxin.
Cy5: Cianina-5. Del inglés Cyanine-5.
DC: Células dendríticas. Del inglés dendritic cells.
FITC: Isotiocianato de fluoresceína. Del inglés fluorescein isothiocyanate.
GALT: Tejido linfóide asociado a intestino. Del inglés gut-associated lymphoid tissue.
HEV: Vénulas endoteliales altas. Del inglés high endothelial venules.
IgA: Inmunoglobulina A.
IgAs: Inmunoglobulina A de secreción.
IgG: Inmunoglobulina G.
i.n.: Intranasal.
IL-4: Interleucina 2.
IL-4: Interleucina 4.
IL-5: Interleucina 5.
IL-6: Interleucina 6.
IL-10: Interleucina 10.
IL-12p70: subunidad p70 de la Interleucina-12.
IFN γ : Interferón gama.
LCR: líquido cefalorraquídeo
LT: Toxina termolábil. Del inglés heat-labile toxin.
MAP: meningoencefalitis amibiana primaria.
MALT: Tejido linfóide asociado a mucosas. Del inglés mucosal-associated lymphoid tissue.
MCP-1: Proteína quimiotáctica de monocitos-1. Del inglés Monocyte chemotactic protein-1
NALT: Tejido linfóide asociado a la nariz. Del inglés nasal-associated lymphoid tissue.
NK: Asesinas naturales. Del inglés natural killers.
NP: Pasajes nasales. Del inglés nasal passages.
PBA: Amortiguador de fosfatos con azida de sodio. Del inglés phosphate buffered with sodium azide.
PBS: Amortiguador de fosfatos en solución salina. Del inglés phosphate-buffered saline.
PCB: Amortiguador carbonatado de fosfatos. Del inglés phosphate-carbonate buffer.
pCry1Ac: Protoxina Cry1Ac.
PE: Ficoeritrina. Del inglés Phicoeritrin.
PP: Placas de Peyer. Del inglés Peyer's patches.
RPMI-1604: Medio Roswell Park Memorial Institute-1640
SDS-PAGE: Electroforesis en geles de poliacrilamida-duodecil sulfato de sodio. Del inglés Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis.
TNF α : Factor de necrosis tumoral alfa. Del inglés Tumor necrosis factor-alpha.

RESUMEN

La protoxina Cry1Ac, es un potente adyuvante mucosal y sistémico con efectos en la producción de anticuerpos. En un modelo de meningoencefalitis amibiana primaria (MAP) en ratón, se demostró que Cry1Ac protege contra la infección producida por *N. fowleri*, sin embargo no se ha caracterizado cuales son los mecanismos que desencadena para conferir protección. El modelo de la MAP, representa una buena oportunidad para explicar los efectos inmunoprotectores de la protoxina, sobre todo en el NALT ya que es a través de las vías respiratorias altas que se da el ingreso de la amiba al organismo para desencadenar la enfermedad. El NALT se considera un tejido importante para la generación de la inmunidad mucosal hacia antígenos inhalados, capaces de diseminar células efectoras a sitios mucosales distintos. La inmunización i.n. con Cry1Ac más el extracto amibiano: i) indujo diferencias fenotípicas y funcionales en las poblaciones de linfocitos que residen en el NALT y PN; ii) incrementó la proporción de linfocitos que expresan los marcadores de activación CD25 y CD69 en ambos tejidos nasales; iii) aumentó la proporción de células T que producen IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10; iv) provocó una producción de citocinas TH1 aunque en menor grado que las TH2. En base a estos resultados se considera que la inmunización intranasal con la protoxina Cry1Ac más extracto amibiano produce a tiempos cortos una respuesta mixta TH1 y TH2, que puede ser la responsable de la inmunoprotección conferida contra la MAP. Además

de que contribuyen a explicar la potente inmunogenicidad de Cry1Ac administrada por la vía i.n. y de sustentar que Cry1Ac es una herramienta valiosa para caracterizar la inducción de las respuestas inmunes.

CARACTERIZACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE EN EL NALT DESPUÉS DE LA INMUNIZACIÓN CON pCry1Ac EN LA INFECCIÓN POR *Naegleria fowleri*.

Nieto-Yáñez, O. J., Rodríguez-Monroy, M. A.
Lab. 9 UBIMED, UNAM FES Iztacala. Av. de los Barrios No. 1 Col. Los Reyes Iztacala,
Tlalnepantla, Edo. México. C.P. 54090.

INTRODUCCIÓN

ASPECTOS GENERALES DEL SISTEMA INMUNE COMÚN DE MUCOSAS.

El sistema inmune está dividido en dos compartimentos: el sistémico, compuesto por la médula ósea, el bazo y los nódulos linfoides; y el mucoso, el cual integra tejido linfoide asociado a las superficies mucosas y a las glándulas secretoras externas (Staats *et al.*, 1994). Las superficies mucosas están asociadas con los tractos gastrointestinal, genitourinario y respiratorio. Cada compartimiento está asociado tanto con la respuesta inmune humoral como con la respuesta mediada por células, sin embargo, la naturaleza de la respuesta inmune inducida en cada compartimiento es diferente. Los anticuerpos de la respuesta sistémica son principalmente del isotipo IgG, que actúa neutralizando patógenos en el sistema circulatorio. En contraste, los anticuerpos que predominan en las mucosas son IgA

de secreción (IgAs), cuya función principal es la de prevenir la entrada de patógenos dentro del organismo a través de las superficies mucosas (Lamm, 1997). La inmunidad sistémica no puede prevenir la entrada de organismos patógenos a las superficies mucosas, por lo tanto, el desarrollo de una respuesta inmune local es esencial para la prevención de muchas enfermedades infecciosas.

El sistema inmune de mucosas puede ser dividido en sitios inductivos, donde los antígenos son encontrados, endocitados y presentados a los linfocitos B y T y los sitios efectores donde los anticuerpos son secretados (Tomasi, 1994). Los principales sitios inductivos son: a) el tejido linfoide asociado a intestino (GALT) formado por las placas de Peyer (PP), el apéndice, nódulos linfáticos mesentéricos, pequeños nódulos linfáticos solitarios y linfocitos intraepiteliales; b) el tracto respiratorio, formado por el tejido linfoide asociado a bronquios (BALT) y el tejido linfoide asociado a nasofaringe (NALT) y c) el tejido linfoide asociado al tracto genitourinario, que es el menos caracterizado. Estos tejidos linfoides altamente especializados en conjunto reciben el nombre de tejido linfoide asociado a mucosas o MALT (Tomasi, 1994). El tejido linfoide asociado a mucosas más estudiado son las placas de Peyer del intestino delgado, ya que existen diferencias funcionales entre los diferentes tejidos, las placas de Peyer sirven como modelo para el estudio de la funcionalidad del tejido linfoide asociado a mucosas (Sabbaj *et al.*, 1997).

TEJIDO LINFOIDE ASOCIADO A LA NARIZ (NALT).

Como se mencionó, el MALT en el tracto respiratorio no se restringe a los pulmones. Desde la boca y nariz se pueden observar varios grupos de células inmunocompetentes. En los seres humanos, las amígdalas son el tejido linfóide más conspicuo de la naso y orofaringe. En roedores se ha identificado un tejido linfóide asociado a la nasofaringe (Spit *et al.*, 1989), que representa los tejidos linfoides orofaríngeos de las vías respiratorias altas, que se denomina NALT y se considera análogo al anillo de Waldeyer en los humanos (Koorstra *et al.*, 1991; van der Ven & Sminia, 1993) (Fig. 1.).

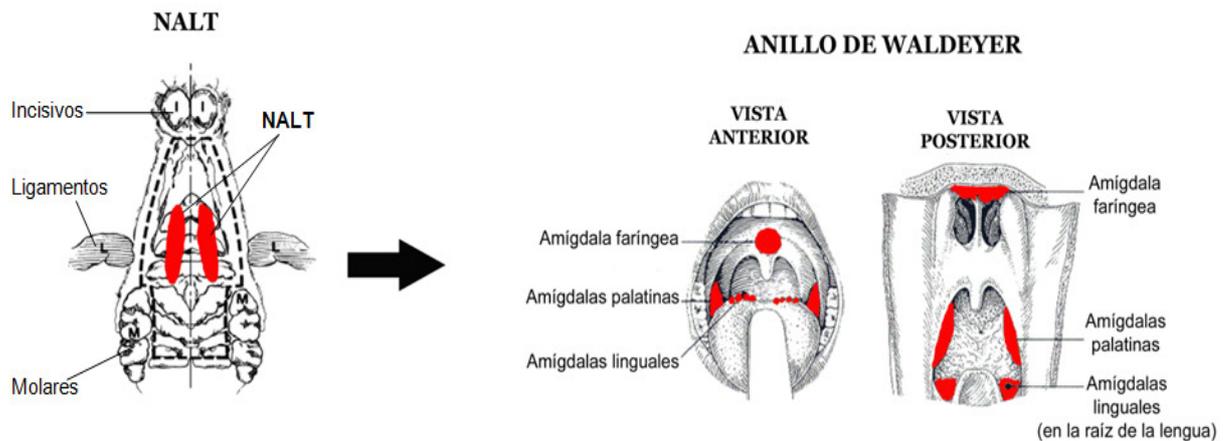


Fig. 1. En roedores se ha identificado un tejido linfóide asociado a la nasofaringe, se denomina NALT y representa los tejidos linfoides orofaríngeos de las vías respiratorias altas. Esta estructura se considera análoga al anillo de Waldeyer en los humanos (anillo de tejido linfóide, que comprende las amígdalas linguales las amígdalas palatinas, y amígdalas nasofaríngeas, también llamadas adenoides).

El tejido linfóide asociado a la nariz (NALT) es un órgano que está situado en el piso de la cavidad nasal justo a la entrada del ducto nasofaríngeo. Al igual que el

BALT y las PP, el NALT está inmediatamente debajo del epitelio, en este caso el nasal. El epitelio del NALT consiste en un gran número de células ciliadas, pocas células caliciformes y numerosas células M. Las células M se presentan solas o en grupos y microscópicamente son idénticas a las que se presentan en las placas de Peyer y BALT (Kuper *et al.*, 1992). El epitelio anterior al NALT está infiltrado principalmente con linfocitos T, donde la mayoría pertenecen a los cooperadores. Ocasionalmente se encuentran células dendríticas (DC).

El NALT está compuesto por una red reticular poco definida, donde los linfocitos, macrófagos y DC están presentes. Los linfocitos están organizados en áreas foliculares (área de células B) e interfoliculares (área de células T). Existen vasos linfáticos y sanguíneos. La mayoría de los vasos linfáticos están en la base de las áreas de células B y T. Se presentan numerosas vénulas endoteliales altas (HEV) que están presentes en el área de células T (Kuper *et al.*, 1992).

Aunque el NALT no debe ser el único sitio que contribuye significativamente a la estimulación de los precursores mucosos efectores de las vías aéreas, su importancia se debe probablemente a su proximidad a la lámina propia nasal, lo que fortalece la idea de que esta estructura única es un tejido importante para estudiar procesos inmunológicos con antígenos introducidos por vía intranasal (Csencsits *et al.*, 1999).

A pesar de su importante función desde el punto de vista inmunológico de esta mucosa, poco se sabe sobre el sistema inmune nasal. Tanto el fenotipo como las funciones de las diferentes poblaciones de linfocitos nasales aún no están bien caracterizados. Por lo que es importante la generación de conocimiento sobre este tejido para comprender la respuesta inmune bajo condiciones normales o patológicas (por ejemplo, la resistencia y susceptibilidad a infecciones, alergias, anergia y autoinmunidad) así como para el diseño de nuevas inmunoterapias e intervenciones profilácticas.

Por otra parte, pocos estudios se han dedicado a la caracterización de la población de linfocitos localizada en el tejido difuso alrededor del NALT, que se ha denominado como linfocitos de los pasajes nasales (NP) (Kuper *et al.*, 1992). Los NP incluyen el tracto nasal y varias partes de la nariz tales como los cornetes nasales, tabique y paredes laterales, además de linfocitos de estructuras linfoides menos organizadas a lo largo del ducto lagrimal, lámina propia y el epitelio nasal (Asanuma *et al.*, 1997).

El NALT y los NP se consideran como sitio inductor y efector respectivamente, a pesar de que las diferencias fenotípicas y funcionales de las poblaciones linfocitarias entre estos compartimentos nasales no están establecidas claramente.

Un aspecto importante, relacionado con el NALT es que la inmunización intranasal es muy eficiente para inducir respuestas inmunes humorales y celulares en la mucosa respiratoria y en sitios mucosos distantes tales como el tracto genital y el intestino (Bergquist *et al.*, 1997; Imaoka *et al.*, 1998; Kiyono *et al.*, 2004; Kurono *et al.*, 1999; Langermann *et al.*, 1994; Wu & Russell, 1993; Yanagita *et al.*, 1999; Zuercher, 2003). También se ha demostrado que esta ruta de inmunización es más efectiva que la oral y la vaginal para inducir respuestas generalizadas a nivel de mucosas y sistémicas (Di Tommaso *et al.*, 1996; Hirabayashi *et al.*, 1990; Muller *et al.*, 1995; Wu *et al.*, 1997; Wu & Russell, 1997), además de requerir una menor cantidad de inmunógenos (Wu & Russell, 1993).

Se considera que el NALT es un tejido importante para la generación de la inmunidad mucosal hacia antígenos inhalados, capaces de diseminar células efectoras a sitios mucosales distintos.

Por tal motivo, se considera que una mayor comprensión de las diferencias fenotípicas y funcionales entre los sitios inductores del NALT y de los sitios efectores, como los pasajes nasales podría facilitar el desarrollo de vacunas nasales. Aunque la inmunización intranasal puede lograr la inducción de respuestas inmunes antígeno específicas a nivel local y sistémico, además de conferir inmunidad

protectora, generalmente se requiere emplear alguna estrategia para incrementar las respuestas en mucosas, como el uso de adyuvantes.

MODO DE ACCIÓN DE LOS ADYUVANTES DE MUCOSAS.

La fisiología del sistema inmune común de mucosas ha sido tomada como base para el desarrollo de vacunas que protejan a los individuos contra toxinas y agentes infecciosos que tienen contacto con las superficies mucosas. Debido a que la inmunización parenteral es poco efectiva para lograr una buena estimulación en estos sitios, y que la producción de anticuerpos secretorios es inducida por la estimulación directa del MALT (Czerkinsky *et al.*, 1999), la administración de los antígenos vacúnales en diversos sitios mucosos parece ser lo más adecuado para lograr buenas respuestas.

La inmunización de mucosas ofrece diversas ventajas en comparación con la inmunización parenteral; quizá la más importante es que puede lograr la inducción de ambos tipos de inmunidad: sistémica y de mucosas (McGhee *et al.*, 1999; Baldrige *et al.*, 2000). Otras ventajas son la disminución del riesgo de probables efectos colaterales al evitar el ingreso directo de antígenos a la circulación sistémica, la facilidad de aplicación y la posibilidad de administrar vacunas múltiples (Kalambaheti *et al.*, 1998).

A pesar de estas ventajas, la única vacuna que se aplica en alguna mucosa es la que protege contra la poliomielitis (Sabin) (Staats *et al.*, 1994), esto se debe principalmente a la baja absorción de las vacunas comerciales disponibles, lo que obliga a que su aplicación se realice por alguna ruta sistémica. Otras limitantes de la inmunización en mucosas es que con frecuencia las respuestas son ineficientes o de corta duración, se requiere de múltiples administraciones e incluso puede inducirse tolerancia inmunológica, por lo que debe hacerse uso de adyuvantes específicos. El desarrollo de vacunas que induzcan inmunidad protectora en las mucosas dependerá del mejoramiento en la administración de los antígenos a los tejidos linfoides inductores y del descubrimiento de nuevos adyuvantes (Chen, 2000).

Para facilitar la inmunización en las superficies mucosas se han desarrollado una serie de estrategias que incluyen el uso de bacterias atenuadas o virus recombinantes (Czerkinsky *et al.*, 1999) como acarreadores de antígenos heterólogos o que expresan genes que codifican para antígenos vacúnales, la microencapsulación de antígenos en microesferas biodegradables (Gupta *et al.*, 1998), la incorporación de antígenos en liposomas (Wilschut *et al.*, 1994; White *et al.*, 1995), el uso de complejos inmunoestimuladores (ISCOM's) (Stewart-Tull, 1996) y el empleo de vacunas de DNA (McCluskie y Davis, 1999).

El objetivo de utilizar todos estos vehículos es lograr una adecuada captación del antígeno por parte de los tejidos inductores, pero aún cuando esto suceda, queda pendiente lograr una respuesta eficiente y para ello es necesario el empleo de adyuvantes. Estas sustancias son capaces de mejorar la respuesta inmune en diferentes formas: a) pueden incrementar la inmunogenicidad de antígenos poco inmunogénicos; b) pueden ser usados para incrementar la velocidad y duración de la respuesta inmune; (c) modular la avidéz, especificidad, isotipo o distribución de las subclases de anticuerpos; d) pueden estimular la inmunidad mediada por células; e) promover la inducción de inmunidad en mucosas; f) incrementar la respuesta inmune en individuos seniles o inmaduros inmunológicamente; g) además pueden disminuir la dosis de antígeno y reducir los costos de las vacunas (Singh y O'Hagan, 1999).

Existen muchas sustancias que han mostrado su capacidad como adyuvantes vacúnales pero la mayoría de ellos son útiles solamente para la inmunización parenteral. Entre los escasos adyuvantes de mucosas conocidos hasta ahora están la interleucina-12 (IL-12) (Elson y Dertzbaugh, 1999), el monofosforil lípido A (Baldrige *et al.*, 2000), muramil dipéptido (MDP) (Singh y O'Hagan, 1999), las secuencias inmunoestimuladoras CpG (McCluskie y Davis, 1999) y algunas toxinas bacterianas (Elson y Dertzbaugh, 1999).

De estas últimas, las más estudiadas son la toxina del cólera (CT) de *Vibrio cholerae* y la enterotoxina termolábil (LT) de *Escherichia coli* (Williams *et al.*, 1999). CT y LT tienen efectos adyuvantes en las respuestas sistémicas y mucosas cuando se coadministran o se conjugan con proteínas solubles que no son inmunogénicas en mucosas (Wilson *et al.*, 1989; Kalambaheti *et al.*, 1998; Tochikubo *et al.*, 1998; Johansson *et al.*, 1998); no obstante, su aplicación en humanos no es factible por su toxicidad (McGhee *et al.*, 1999). Para resolver este problema se han diseñado mutantes no tóxicas que conserven su adyuvancia, como LT-G192, LT-K63 y LT-R72 (Douce *et al.*, 1999; Ryan *et al.*, 1999). Sin embargo, su eficacia no ha sido probada aún en humanos. De lo anterior resalta la importancia de estudiar nuevos adyuvantes mucosos, que no sean tóxicos para humanos, que sean estables, de bajos costos y que puedan aplicarse por vías mucosas.

CRY 1Ac COMO ADYUVANTE

La proteína pCry1Ac de *Bacillus thuringiensis* reúne estas características; ya que presenta alta resistencia a la proteólisis, es estable a pH alcalino, no es tóxica para vertebrados y sus costos de producción son bajos (Höfte y Whiteley, 1989; Ge *et al.*, 1990).

Además, recientemente se demostró que pCry1Ac recombinante, clonada a partir de *Bacillus thuringiensis* es altamente inmunogénica (Vázquez-Padrón *et al.*, 1999a; Moreno-Fierros *et al.*, 2000) y posee efectos adyuvantes tanto a nivel sistémico como de mucosas, ya que incrementa la respuesta de anticuerpos específicos contra proteínas como la albúmina sérica bovina (BSA) y el antígeno de superficie de la hepatitis B (Vázquez-Padrón *et al.*, 1999b); o contra polisacáridos tales como el polisacárido capsular PC6B de neumococo y contra la vacuna pulmovax (P23) (Moreno-Fierros *et al.*, 2003).

Los efectos adyuvantes de pCry1Ac son comparables con los producidos por la toxina del cólera, que es considerada como el más potente inmunógeno y adyuvante de mucosas. Se ha descrito que cuando CT se coadministra con proteínas solubles no inmunogénicas su efecto es incrementar las respuestas de IgA en mucosas y de IgG sistémicas. Sin embargo, varios informes apoyan la hipótesis de que los efectos adyuvantes de CT y de pCry1Ac no son universales ya que las propiedades adyuvantes de ambas proteínas dependen de la ruta de inmunización, del antígeno coadministrado, del isotipo y del sitio analizado (Vázquez-Padrón *et al.*, 1999b; Wilson *et al.*, 1989).

Además de lo anterior, Rojas-Hernández *et al.*, (2004) observaron que la Cry1Ac (pCry1Ac) es capaz de conferir inmunidad protectora, en el modelo experimental en

ratón de la meningoencefalitis amibiana primaria (MAP), una enfermedad fatal y aguda, producida por la amiba de vida libre *Naegleria fowleri* cuya ruta de entrada es la mucosa nasal (Martinez *et al.*, 1973; Jarolim *et al.*, 2000).

***Naegleria fowleri* Y ENFERMEDAD PRODUCIDA.**

Las amibas de los géneros *Naegleria*, *Acanthamoeba*, *Balamuthia* y *Sappina* son protozoos de vida libre, anfizóicos, oportunistas y ubicuos en la naturaleza. Estas amibas han sido aisladas de suelos, agua y en muestras de aire de todo el mundo. Las infecciones humanas debidas a estas amibas incluyen cerebro, piel, pulmones y ojos. Estas infecciones se han incrementado significativamente durante los últimos 30 años. La epidemiología, protozoología, patología y características clínicas de estas infecciones difieren enormemente (John, 1993).

La mayoría de las enfermedades infecciosas en el hombre involucran la interacción de los patógenos con las superficies mucosales. Una de estas enfermedades es la MAP una infección del sistema nervioso central, provocada por *Naegleria fowleri* una amiba de vida libre que infecta a través del epitelio olfatorio. De ahí viaja a través de los plexos nerviosos hasta llegar al cerebro donde provoca la enfermedad, la cual se caracteriza por ser aguda y rápidamente mortal (Jarolim *et al.*, 2000). La inoculación intranasal de *N. fowleri* en ratones provoca la MAP de una forma muy similar a la que se presenta en el humano (Carter, 1970).

La especie *N. fowleri* es una amiba de vida libre que también puede invadir al ser humano y animales. El trofozoíto es el estadio invasivo, su periodo de incubación varía de dos días a tres semanas, dependiendo del tamaño del inóculo y de la virulencia de las amibas. La inhalación de agua, o más raramente, de aire conteniendo amibas, pone en contacto a estos microorganismos con el neuroepitelio olfatorio por donde penetran directamente a la cavidad craneal a través del nervio olfatorio, constituyéndose de esta manera la ruta de diseminación de las amibas a otras partes del encéfalo y del espacio subaracnoideo vascular (Martinez y Visvesvara, 1997).

El género *Naegleria* consta de tres estadios durante su ciclo de vida en el ambiente (Page, 1988):

- Trofozoíto, o forma vegetativa, que es la fase del ciclo en la que se alimenta y reproduce.
- Quiste, que es la forma de resistencia.
- Flagelado, estadio transitorio que no se alimenta, ni se multiplica y después de un tiempo regresa a la fase trófica.

Infecciones en Humanos.

La MAP es una enfermedad aguda, rápidamente progresiva y fatal que tiene como agente causal a *Naegleria fowleri*. Debido a que la invasión es muy rápida, hay necrosis hemorrágica de gran parte del encéfalo (Martinez, 1985, Martinez *et al.*, 1994).

Los signos y síntomas de la MAP consisten en presión intracraneal elevada (náusea, vómito en proyectil y fotofobia), cefalea intensa, irritación de la mucosa nasal, fiebre, datos de irritación meníngea (rigidez de nuca) y encefalitis. El curso clínico se caracteriza por confusión mental, en algunos casos crisis convulsivas; pérdida del apetito, visión doble y/o borrosa, trastornos del gusto, del olfato y alucinaciones, coma profundo, y finalmente la muerte. La mayoría de los pacientes mueren dentro de la primera o segunda semana después de la aparición de los primeros síntomas, dependiendo del manejo y resistencia del paciente, así como de la virulencia de las amibas (Martínez y Visvesvara, 1997).

El cuadro clínico es muy parecido a la meningitis bacteriana; sin embargo, en la infección por *Naegleria* existe el antecedente de que los pacientes, en su mayoría jóvenes y previamente sanos, nadaron en algún cuerpo de agua, así como el hecho de encontrar escaso exudado purulento y ausencia de bacterias en el líquido cefalorraquídeo (LCR). El diagnóstico se confirma con el aislamiento de amibas en

forma de trofozoíto (nunca quistes, ni flagelados) del LCR o del tejido de biopsia cerebral. Los únicos fármacos de elección contra *N. fowleri* son principalmente el antimicótico Anfotericina B y la azitromicina y, pero solamente son efectivos cuando se administra al inicio de la infección (Martinez, 1985; Martínez y Visvesvara, 1997; John, 1993).

ANTECEDENTES

N. fowleri produce una enfermedad aguda y fatal en el sistema nervioso central que provoca la muerte de las personas de 3-7 días después de la exposición a la amiba (Martinez y Visvesvara, 1997). Existen varios reportes donde se ha intentado inducir inmunidad contra *N. fowleri* en el modelo de ratón, pero estos estudios han sido enfocados al análisis de la respuesta de anticuerpos sistémicos (John, 1993). Los esquemas de inmunización usados para inducir protección contra el reto intranasal con *N. fowleri* en ratón incluyen diferentes antígenos (extractos totales de *N. fowleri*, amibas vivas, amibas fijadas y sobrenadantes de medio de cultivo), diferentes rutas de inmunización (i.n., i.p., e i.v.), y diferentes dosis (Czerkinsky *et al.*, 1989; Spit *et al.*, 1989; Koornstra *et al.*, 1991; Kuper *et al.* 1992; van der Ven *et al.* 1993); sin embargo, los resultados han sido muy variados, en la mayoría se ha logrado solamente una protección parcial (John, 1993). Por lo tanto, es necesario desarrollar nuevas estrategias para lograr inducir una inmunidad protectora total

contra la meningoencefalitis experimental. Se ha reportado que la pCry1Ac de *Bacillus thuringiensis* es altamente inmunogénica (Vázquez-Padrón *et al.*, 1999a; Moreno-Fierros *et al.*, 2000), además de presentar efectos adyuvantes tanto a nivel sistémico como en mucosas (Moreno-Fierros *et al.*, 2003); además pCry1Ac tiene ventajas adicionales sobre otros adyuvantes mucosales, no es tóxica para vertebrados y sus costos de producción son bajos (Höfte y Whiteley, 1989; Ge *et al.*, 1990). pCry1Ac puede ser considerado un candidato para el desarrollo y mejoramiento de vacunas contra microorganismos que invaden a través de las superficies mucosas. En el trabajo realizado por Rojas *et al.*, en el 2004, reportaron que la pCry1Ac es capaz de incrementar la protección en ratones inmunizados por la ruta i.n. con extractos totales de *N. fowleri* más pCry1Ac hasta un 100% en el modelo de la meningoencefalitis en ratón. Se encontraron evidencias relevantes que sugieren que pCry1Ac estimula la inmunidad innata, ya que cuando se inmunizaron ratones por la ruta i.n. solamente con pCry1Ac, se logró inducir un 60% de protección, que fue el mismo porcentaje que se indujo inmunizando con el extracto solo. Por otra parte se observó un efecto adyuvante de pCry1Ac en la producción de anticuerpos IgA e IgG tanto en secreciones nasales de ratones inmunizados por la ruta i.n. y sacrificados siete días después de la última inmunización; como en secreciones traqueo-bronquiales de ratones inmunizados con extracto más pCry1Ac que fueron retados con la dosis letal de amibas y que fueron sacrificados a tiempos

tempranos (1-4 días) de la infección, además en ratones que sobrevivieron a la infección y fueron sacrificados 60 días después del reto con las amibas. También se encontró que la coadministración tanto i.n. como i.p. de pCry1Ac con extracto induce una alta respuesta de anticuerpos IgG1 en sueros y en lavados traqueo-bronquiales que podría indicar indirectamente que pCry1Ac induce un tipo de respuesta TH2. Este tipo de respuesta se caracteriza entre otras cosas por una producción importante de citocinas antiinflamatorias las cuales juegan un papel crucial para que se lleve a cabo la comunicación entre células inmunes e inflamatorias. Estas citocinas pueden promover el crecimiento, diferenciación y activación celular. Estas moléculas efectoras son producidas transitoriamente y controlan localmente la amplitud y duración de la respuesta. De este modo se pueden conocer y evaluar las principales características biológicas de las interleucinas involucradas en la respuesta inmune innata y adaptativa. Las citocinas características de la respuesta TH2 son la IL-10, IL-6, IL-5, e IL-4 (Hernández-Urzúa *et al.*, 2001; Feghali *et al.*, 1997). Estas evidencias sugieren que tanto la inmunidad innata como la inmunidad adquirida participan en la defensa del huésped contra la infección contra *N. fowleri*, aunque se requieren estudios posteriores para tratar de elucidar los mecanismos inmunológicos implicados en la inmunidad inducida por pCry1Ac contra la infección por *N. fowleri* (Rojas-Hernández *et al.*, 2004).

OBJETIVOS

Objetivo General

Caracterizar la respuesta inmune inducida por la inmunización intranasal con la pCry1Ac en el NALT y Pasajes Nasales en el modelo experimental de la meningoencefalitis amibiana primaria.

Objetivos Particulares

1. Caracterizar el efecto de la inmunización con pCry1Ac sola o coadministrada con extracto amibiano sobre la producción de citocinas en muestras de lavados nasales y traqueobronquiales, a través de citometría de flujo.
2. Determinar los cambios en el porcentaje de las poblaciones de linfocitos del NALT y NP después de la inmunización con pCry1Ac sola o coadministrada con extracto amebiano, mediante citometría de flujo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Cultivo de las amibas.

Se trabajó con la cepa ATCC30808 de *Naegleria fowleri* (donada por el laboratorio de Conservación y Mejoramiento del Ambiente CyMA de la ENEP Iztacala), la cual

se cultivó a 37°C en medio bactocasitona al 2% (Difco, Le Pont de Claix, France) suplementado con suero fetal bovino al 10% (GIBCO, Grand Island, NY).

Reactivación de la virulencia.

Las amibas se cosecharon en la fase logarítmica de crecimiento, se congelaron 10 min a 10°C para despegarlas de la caja de cultivo y se lavaron por centrifugación 3000 a rpm por 10 min con solución de fosfatos (PBS). La virulencia de la amiba se reactivó inoculando intranasalmente 10^5 trofozoítos de *N. fowleri* en ratones machos Balb/c. Cuando los ratones estaban moribundos fueron sacrificados, se les diseccionó para obtener el cerebro y la amiba se recuperó de secciones de cerebro en medio axénico. Las amibas se pasaron por ratón al menos en seis ocasiones.

Obtención del extracto total. Las amibas se cosecharon como se mencionó anteriormente y se lavaron con PBS, posteriormente a la pastilla celular se le agregó 1 ml de ácido Peroxi-hidroxi-mercuriobenzóico 5mM como inhibidor de proteasas. Las amibas se lisaron con un ciclo de sonicación de 10 s a 100 W de amplitud (Ultrasonic Processor). El extracto resultante se almacenó a -70°C para su uso posterior. La concentración de proteínas se determinó por la técnica de Bradford y el patrón de proteínas se examinó por electroforesis SDS-PAGE.

Obtención de la protoxina Cry1Ac.

Se utilizaron células competentes TOP10 resistentes a ampicilina que contiene el plásmido pCry1Ac. Las células se cultivaron en medio LB suplementado con 100 µg/ml de este antibiótico a 37°C con agitación constante (~300 rpm). A las 48 h de cultivo las bacterias se cosecharon por centrifugación (7000 g por 7 min), se resuspendieron en buffer TE (10 mM TrisCl, 1 mM EDTA, pH 8), se incubaron durante 30 min a 37°C con TE más 1 mg/ml de lisozima (Sigma, MO) y sacarosa al 15% para posteriormente lisar por sonicación (Fisher Sonic Dismembrator Model 300). La fracción insoluble del lisado se lavó tres veces con TE/Tween-20 1%, cinco veces con 0.5 M NaCl y dos veces con agua bidestilada. La pCry1Ac se solubilizó disgregando la pastilla en buffer PCB (30 mM Na₂CO₃, 70 mM NaHCO₃, DTT 10mM, pH 9.6) e incubando durante 30 min a 37°C. Posteriormente se aclaró por centrifugación a 11 000 rpm durante 10 min, se determinó la concentración de proteína por el método de Bradford y se analizó la pureza por SDS-PAGE en un gel al 7.5%. Una vez obtenida la pCry1Ac se eliminaron los restos de endotoxina que pudiera tener al pasarla por una columna de Polimixina (Affi-Prep® Polymyxin Matriz BIO-RAD 156-0010) para posteriormente verificar la ausencia de restos de endotoxina con la prueba de detección semicuantitativa de endotoxina Sigma E-TOXATE® (Limulus ameocyte lysate). La proteína se almacenó a 4°C hasta ser usada (Rodríguez-Monroy *et al.* 2010).

Esquema de inmunización.

En todos los experimentos se usarán ratones machos Balb/c de 4-6 semanas. Los antígenos serán administrados por la ruta i.n. Para la inmunización i.n., los ratones serán ligeramente anestesiados con éter etílico. Se realizaron tres grupos experimentales y dos grupos control. Cada grupo constó de 12 ratones a los cuales se les aplicaron cuatro dosis de antígeno a los 7, 14, 21 y 28 días. Los antígenos aplicados a cada grupo fueron: a) 100 µg de extracto total; b) 100 µg de extracto más 50 µg pCry1Ac y c) 50 µg pCry1Ac. A un grupo control se le administró 20 µl de PBS y a otro grupo control se le retó intranasalmente administrándole 5×10^4 trofozoítos de *N. fowleri*. Los doce ratones de cada grupo fueron retados con las amibas vivas siete días después de la última inmunización y sacrificados a diferentes tiempos (4, 8, 12 y 24 h), para obtener muestras de suero, lavados traqueobronquiales y lavados nasales. De igual forma siete ratones de cada grupo fueron retados con las amibas vivas después de la última inmunización y sacrificados para los ensayos de obtención de linfocitos de NALT y NP (Rojas-Hernandez *et al.*, 2004).

Obtención de muestras.

Se obtuvieron muestras de suero, lavados traqueo-bronquiales y lavados nasales de ratones inmunizados por la ruta i.n. con extracto más pCry1Ac, extracto solo y

pCry1Ac sola, a diferentes tiempos (4, 8, 12 y 24 h); retados y sacrificados siete días después de la última inmunización.

a) Suero. La sangre de los ratones se obtuvo por punción cardiaca y se centrifugó a 2,000 rpm/10min/4°C para obtener el suero, el cual se almacenó a -20°C (Rojas-Hernández *et al.*, 2004).

b) Secreciones. Las secreciones traqueo-bronquiales se obtuvieron extirpando la tráquea junto con los pulmones; con una jeringa se pasará 1 ml de medio RPMI desde la tráquea a través de los pulmones, el medio trasudado se colectó, se centrifugaron a 2,000 rpm/10 min/4°C y se almacenaron a -70°C. Las muestras nasales se obtuvieron cortando la cabeza del ratón y pasando 1 ml de medio RPMI a través de la tráquea hacia la cavidad nasal con la ayuda de una cánula, el medio se colectó a partir de las narinas del ratón en una caja Petri. El contenido de la cavidad nasal se centrifugó a 2,000 rpm/10 min/4°C para después almacenarse a -70°C (Rojas-Hernández *et al.*, 2004).

Obtención del NALT.

El tejido del NALT se obtuvo removiendo el paladar blando, tal como se describe en Rodríguez-Monroy *et al.*, 2007. Los ratones anestesiados con éter se desangraron y fueron decapitados, se removió la mandíbula inferior y la lengua. Se separó con mucho cuidado el paladar. Se lavó la muestra con medio RPMI-1640.

Obtención de linfocitos del NALT

El paladar del ratón, conteniendo el NALT, se colocó en una caja de Petri con 10 ml de medio RPMI-1640 se realizó un raspado suave con una espátula para separar el NALT del paladar. El NALT se disgregó con el embolo de una jeringa y se recuperó la suspensión celular, la cual se filtró en tela de organza de 10 × 10 cm con una abertura de 0.1mm y se colocó en tubos cónicos de 15 ml. La suspensión celular se centrifugó por 10 min a 1500 rpm a 4°C al cabo de los cuáles se desechó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en 1 ml de medio RPMI-1640. Finalmente se ajustaron a 10⁶ células por mililitro mediante el conteo de linfocitos en una cámara de Neubauer (Rodríguez-Monroy *et al.*, 2007).

Inmunotinción de linfocitos

La tinción de los linfocitos se llevó a cabo con los siguientes anticuerpos anti-ratón (Becton Dickinson Technologies, Gaithersburg, MD) obtenidos de PharMingen (San Diego, CA) de fluorocromos conjugados biotinilados. Para realizar la tinción de linfocitos T se utilizó CD3 FITC y Cy5, para linfocitos T CD8 PE, PE-Cy5 para linfocitos T CD4 y APC para linfocitos B; se utilizaron CD69 y CD25 como marcadores de activación para linfocitos B y T; para controles de isotipo IgG2a PE, IgG2b FITC. Se hicieron diluciones de los anticuerpos 1:100 con buffer de fosfatos con albúmina sérica bovina pH 7.4 (PBA) (10 mg/ml) y se colocaron 10 µl por cada

millón de células, se incubaron en la oscuridad a 4°C por 30 min, al término de ese tiempo se lavaron con PBA y se desechó con cuidado el sobrenadante, al paquete celular se le agregaron 400 µl de para-formaldehído al 1% y se guardó en oscuridad a 4°C hasta su lectura por Citometría de flujo en las siguientes 24 horas (Rodríguez-Monroy *et al.*, 2007).

Citometría de flujo.

La adquisición de datos se llevó a cabo mediante citometría de flujo en un FACSCAN (Becton Dickinson, San Jose, CA) los eventos contados fueron un mínimo de 50,000. El análisis de resultados se realizó en un software para análisis de citometría de flujo (winMDI 2.8). Los resultados se presentaron como porcentajes de células positivas.

Obtención de los Pasajes Nasales

Los linfocitos de los NP se obtuvieron de la porción de la cavidad nasal que queda después de la disección del NALT y que comprende las fosas nasales, septum y paredes laterales. Una vez retirado el NALT, se disgregaron estos componentes haciendo cortes con tijeras en una caja de Petri con 3 ml de medio RPMI-1640 con 1320 unidades/mg de colagenasa. Después de disgregar el tejido, se transfirieron a

tubos cónicos de 15 ml y se incubaron durante 30 min a 37°C. Después de la incubación las células se lavaron y resuspendieron en 10 ml de medio de cultivo. Las células se pusieron en un gradiente de densidad de Percoll, preparado con soluciones de 4ml de Percoll de 40% y de 75%. Después se centrifugó a 2000 rpm durante 25 min (a temperatura ambiente), las células linfoides nasales se recuperaron de la interface (zona) entre las soluciones de Percoll al 40% y 75%. Una vez obtenido el paquete celular, se realizaron las mismas tinciones utilizadas con los linfocitos del NALT (Rodríguez-Monroy *et al.*, 2010).

Análisis de citocinas

Para el análisis de las citocinas in vivo se utilizaron sueros de ratones del grupo control, del grupo inmunizado con pCry1Ac (50 µg) más extracto amebiano, del grupo a inmunizado con extracto amebiano solo (100 µg) y del grupo inmunizado con pCry1Ac sola (50 µg). La determinación de las citocinas IFN γ , TNF α , IL-12p70, MCP-1, IL-6, e IL-10; se utilizó el BD CBA Mouse Inflammation Kit (BD Biosciences Pharmingen San Diego, CA), se mezclaron 25 µl de muestras con 25 µl de las perlas que contienen cada una de las citocinas más 25 µl de agente de detección PE y se incubaron por dos horas a temperatura ambiente, pasado este lapso se centrifugaron a 1500 rpm por 5 min a 4° C, las pastilla se resuspendieron

con 300 μ l de Wash buffer 1x y se analizaron las muestras en el citómetro de flujo FACScalibur usando el CB BDA Software (Rodríguez-Monroy *et al.*, 2010).

Análisis estadístico. Todos los experimentos se realizaron por triplicado. El análisis estadístico fue realizado con la técnica no paramétrica Mann-Whitney U-test, con una $P < 0.05$

RESULTADOS

La inmunización intranasal con extracto más pCry1Ac aumentó considerablemente la producción de citocinas TH2.

El mejor tratamiento para inducir la producción de citocinas fue el de extracto más pCry1Ac. Por otra parte cabe resaltar que fue en las muestras de lavados nasales donde se observó un mayor incremento en la producción de citocinas (Fig. 2).

Las células T cooperadoras CD4, tienen subgrupos que producen distintas citocinas en respuesta a la estimulación antigénica. Esta estimulación puede provocar que una población de células llamada T_H0, se diferencien a dos subgrupos llamados T_H1 y T_H2. Las células del subgrupo T_H1 producen citocinas (TNF- α , IL-2, IFN- γ , IL-12 y MCP-1) que están relacionadas con la inmunidad mediada por células para la eliminación de microorganismos y promueve la respuesta inflamatoria. Las células T_H2 producen citocinas (IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10) que principalmente estimulan a las células B para la producción de anticuerpos, suprime la inmunidad mediada por células e interviene en la reacción anti-inflamatoria (Feghali, 1997; Hernández-Urzúa *et al.*, 2001; Kennet, 2002).

Se realizó la determinación de citocinas a diferentes tiempos (4, 8, 12 y 24h) y se observó que solo en el tiempo de 24h había una diferencia significativa en la

producción de estas citocinas, motivo por el cual, se decidió analizar solamente este tiempo (Fig. 2).

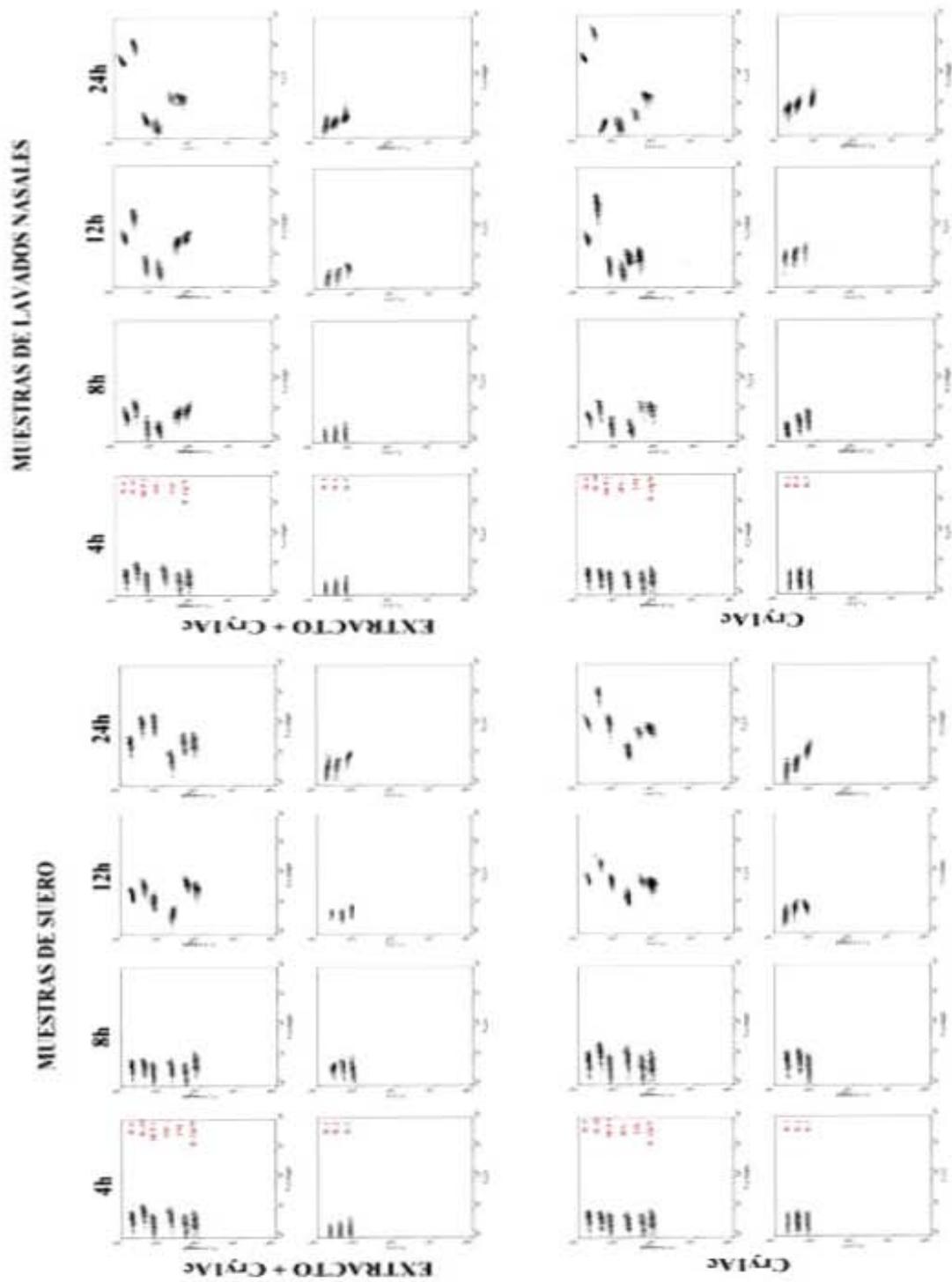


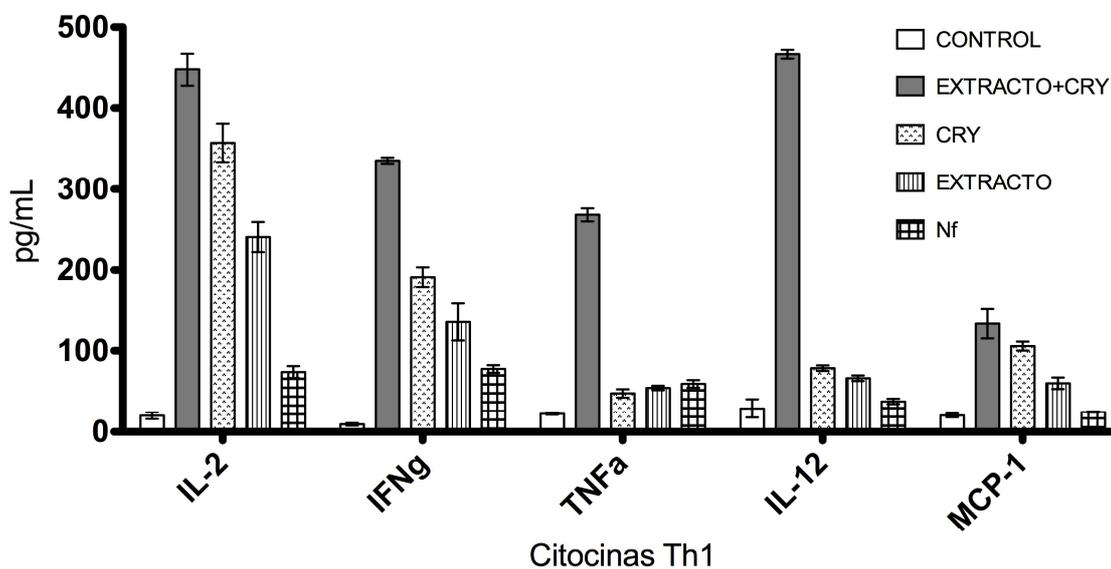
Fig.2. Valores de citocinas de los tratamientos de Cry1Ac y extracto más Cry1Ac, en muestras de suero y lavados nasales de ratón Balb/c, en los diferentes tiempos, por medio de citometría de flujo.

Las citocinas que se evaluaron fueron las siguientes:

IL-10

Citocina producida por células T CD4 del subtipo TH2 y algunas células B activadas, macrófagos y queratinocitos. Inhibe la producción de citocinas (TNF, IL-1 e IL-2) por los macrófagos en la activación de células T. El efecto neto de estas acciones es inhibir la inflamación mediada por células T, para funcionar como un inmuno-regulador y mantener el equilibrio de la respuesta inflamatoria y evitar un daño tisular. Tiene efecto en las células B para aumentar la IgG1 e IgG4; en ratones están involucradas en procesos humorales y favoreciendo la fagocitosis, respectivamente (Feghali *et al.*, 1997). En los resultados obtenidos, se puede observar que la IL-10 es la citocina de la que se obtuvieron los niveles más elevados en las muestras de lavados nasales (Fig. 3) con respecto a las de suero (Fig. 4) y lavados traqueo-pulmonares (Fig. 5); se incrementó de manera considerable en los tres diferentes tratamientos. En las muestras de los lavados nasales fue el tratamiento con pCry1Ac más extracto en donde se encontró el valor más elevado con 980 pg/ml, el tratamiento con pCry1Ac sola produjo 826 pg/ml mientras que el grupo inmunizado con extracto solo, registró 673 pg/ml. En las muestras de suero, los tratamientos con pCry1Ac más extracto y pCry1Ac sola registraron los valores más altos con 677 pg/ml y 413 pg/ml, respectivamente (Figs. 3-5).

DETERMINACIÓN DE CITOCINAS Th1 EN LAVADOS NASALES



DETERMINACIÓN DE CITOCINAS Th2 EN LAVADOS NASALES

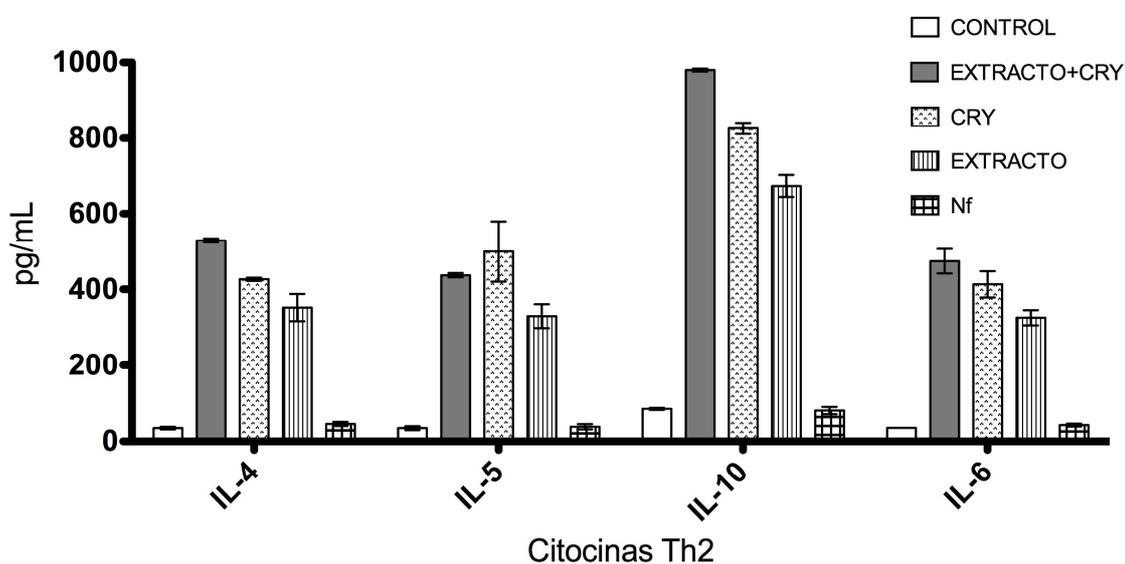
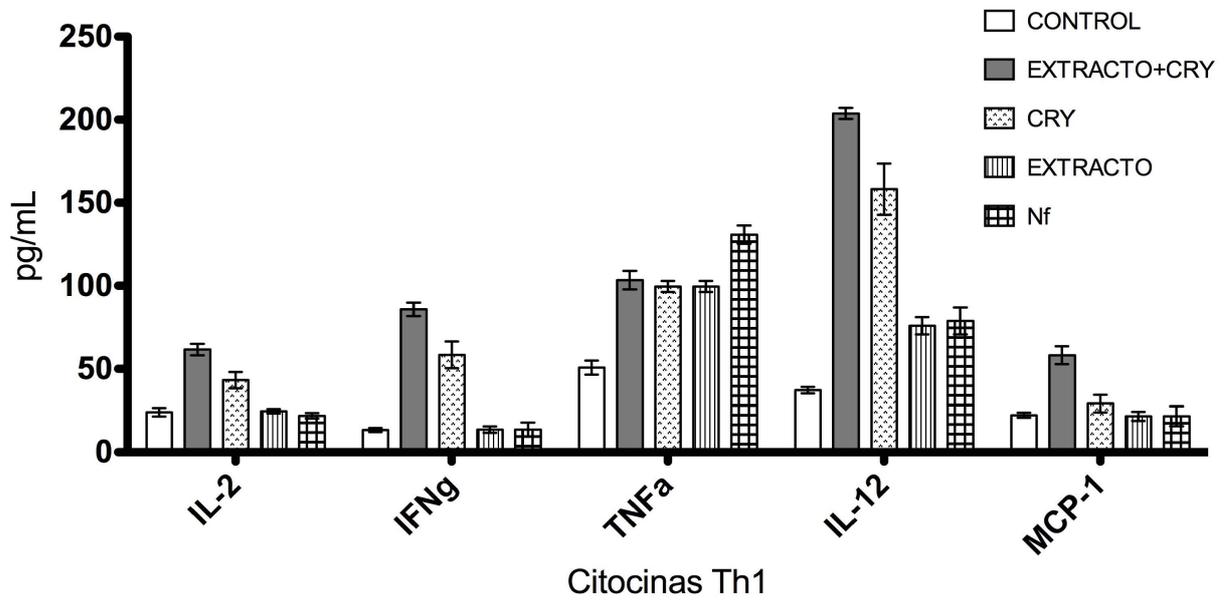


Fig. 3. Determinación de la producción de citocinas en lavados nasales al tiempo de 24 h, mediante citometría de flujo.

IL-4

Su principal función es en la regulación de reacciones alérgicas. La principal fuente celular de IL-4 son las células T CD4, específicamente subtipo TH2. En ratones inhibe el “switching” para IgG2a e IgG3. Es antagónico recíproco del IFN- γ , inhibe la activación de los macrófagos. Tiene efectos muy similares a los de la IL-10, es el principal factor de proliferación autocrino y de desarrollo de células TH2 secretoras de IL-4 e IL-5 (Hernández-Urzúa *et al.*, 2001). Los niveles de esta citocina mostraron un incremento en las muestras de lavados nasales y es en el tratamiento de extracto más pCry1Ac en donde se registró el valor más elevado con 528 pg/ml, seguido del tratamiento con pCry1Ac sola con un valor de 426 pg/ml. De igual manera se observó un incremento en las muestras de suero en el tratamiento de extracto más pCry1Ac con un valor de 341 pg/ml, le sigue el tratamiento con pCry1Ac sola que registró un valor de 292 pg/ml. En las muestras de lavados traqueo-pulmonares el valor más elevado se obtuvo con el tratamiento de extracto más pCry1Ac con un valor de 241 pg/ml, le sigue el tratamiento con pCry1Ac sola que registró 115 pg/ml (Figs. 3-5).

DETERMINACIÓN DE CITOCINAS Th1 EN SUERO



DETERMINACIÓN DE CITOCINAS Th2 EN SUERO

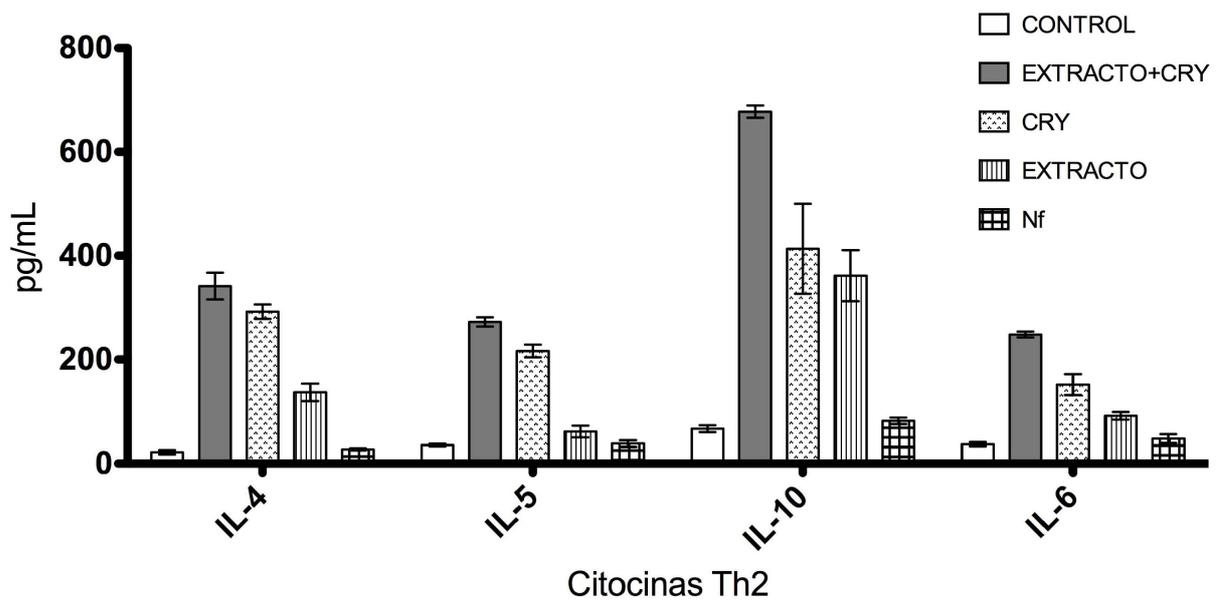


Fig. 4. Determinación de la producción de citocinas en muestras de suero al tiempo de 24 h, mediante citometría de flujo

IL-5

Es producida principalmente por células TH2 y los mastocitos activados. La principal acción de la IL-5 es estimular la proliferación y diferenciación de los eosinófilos. Su actividad se complementa con la IL-4 y la IL-10. En ratón también actúa como un coestimulador de proliferación de células B activadas por el antígeno. Puede tener sinergismo con la IL-2 e IL-4, para estimular la proliferación y diferenciación de células B, aumenta la síntesis de inmunoglobinas, específicamente del subgrupo IgA (Feghali *et al.*, 1997; Hernández-Urzúa *et al.*, 2001). Esta citocina mostró un incremento considerable con los tratamientos de extracto más pCry1Ac y pCry1Ac sola en las tres tipos de muestras. En los lavados nasales, el tratamiento con pCry1Ac sola registró el valor de 499 pg/ml y el tratamiento de extracto más pCry1Ac un valor de 436 pg/ml, estos dos fueron los valores más altos de la IL-5. En el suero se registraron valores elevados con el tratamiento de extracto más pCry1Ac con 272 pg/ml y con el tratamiento de pCry1Ac sola que registró un valor de 216 pg/ml. En los lavados traqueo-bronquiales el incremento de esta citocina fue mínimo con respecto a los otros tipos de muestra, siendo el tratamiento con pCry1Ac sola donde se registro el valor mas alto (168 pg/ml) (Figs. 3-5).

IL-6

Sintetizada por los fagocitos mononucleares, células endoteliales, fibroblastos y otras células en respuesta a IL-1 y el TNF- α . Actúa sobre células B como factor de proliferación para células B activadas. Actúa como el factor de proliferación de células plasmáticas (Hernández-Urzúa *et al.*, 2001). En las muestras de lavados se registraron los valores más elevados, el valor más alto que fue el tratamiento con tratamiento con extracto más pCry1Ac (474 pg/ml) y en segundo lugar se encuentra el tratamiento con pCry1Ac sola con 413 pg/ml. En las muestras de suero, de igual manera fue el tratamiento de extracto más pCry1Ac en el se obtuvo el registro más alto con 248 pg/ml seguido por el tratamiento de pCry1Ac sola con 151 pg/ml. En las muestras de lavados traqueo-bronquiales el incremento de esta citocina fue escaso comparación con las otras dos muestras (Figs. 3-5).

IL-12

Actúa sobre las NK por lo que se puede considerar un mediador de inmunidad innata. Aumenta la actividad citolítica de NK y es un factor de crecimiento para éstas. Muestra un fuerte sinergismo con IL-2. Estimula diferenciación de células T CD4 al subtipo TH1. Promueve el desarrollo de células LTC CD8. Es el más potente activador de NK induce la transcripción de IFN- γ por estas mismas (Feghali *et al.*, 1997; Murphy and Reineret, 2002). Esta citocina mostró un incremento

considerable y fue la citocina TH1 que más se elevó en las tres diferentes muestras. El valor más alto se registró en las muestras de lavados nasales con el tratamiento de extracto más pCry1Ac con 467 pg/ml, con los otros tratamientos el incremento fue muy bajo. En las muestras de suero se observó un incremento considerable en el tratamiento de extracto más pCry1Ac con 203 pg/ml, seguido por el tratamiento de pCry1Ac sola con pg/ml. En los traqueo-bronquiales el incremento de esta citocina se registró en el tratamiento de extracto más pCry1Ac con 103 pg/ml (Figs. 3-5).

TNF- α

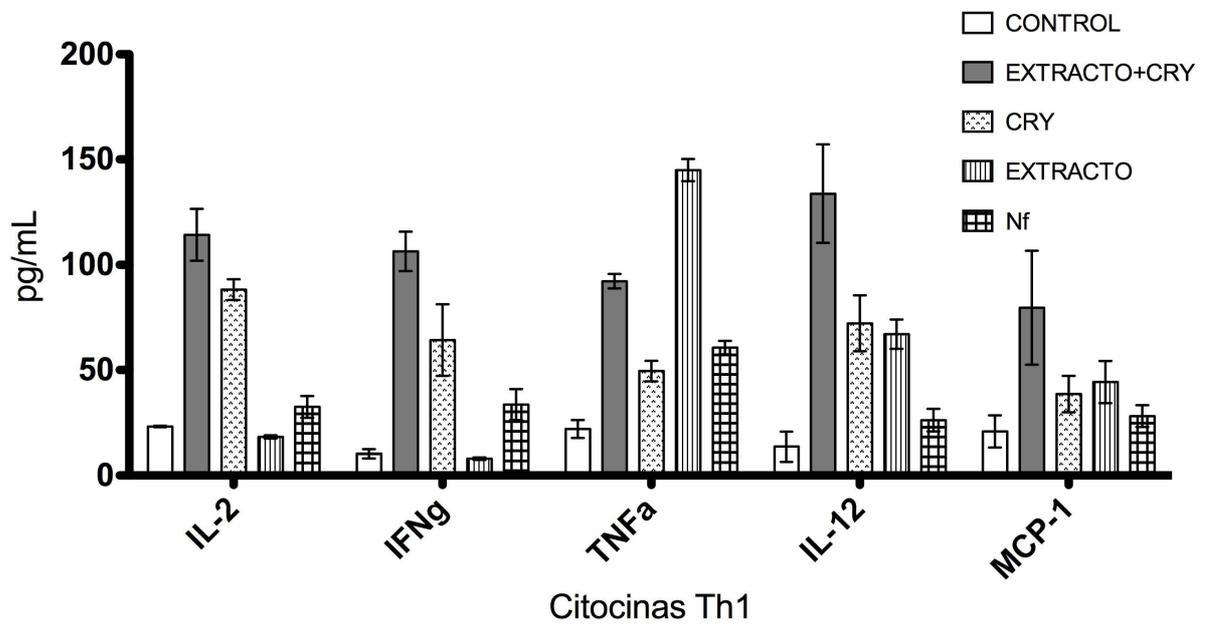
Es el principal mediador de respuestas frente a bacterias Gram-negativas y otros agentes. La principal fuente de TNF- α son los macrófagos activados, aunque las células T activadas, NK y mastocitos pueden secretarla. Contribuye a la acumulación de leucocitos en los lugares de inflamación y estimula a los macrófagos y otras células para producir citocinas, como IL-1, IL-6, TNF- α y las quimiocinas. Es mediador de la inmunidad innata y adquirida, siendo un importante nexo entre la respuesta inmunitaria específica y la inflamación aguda (Feghali *et al.*, 1997; Hernández-Urzúa *et al.*, 2001). Los niveles de TNF- α se incrementaron en las tres muestras con el tratamiento de extracto más pCry1Ac donde se observa un gran aumento, en las muestras de lavados nasales es donde se obtuvo el mayor registro de esta citocina con 268 pg/ml, en lavados treque bronquiales el valor más elevado

fue con el tratamiento con extracto solo, que registró 144 pg/ml mientras que en las muestras de suero el valor más elevado fue de 103 pg/ml con el tratamiento extracto más pCry1Ac (Figs. 3-5).

IFN- γ

Producido por células T CD4 (TH0 y TH1) y todas las CD8 y NK. Activa macrófagos, induce la capacidad de matar microorganismos fagocitados. Induce un estado antiviral y es antiproliferativo. Aumenta la expresión de MHC-I y MHC-II. Promueve la activación y diferenciación de células T CD4 al subtipo TH1 e inhibe la diferenciación del subtipo TH2. En ratones promueve células B “switching” para IgG2a e IgG3. Estimula la actividad citolítica de las NK y la maduración de LTC CD8. Promueve reacciones inflamatorias ricas en TH1 y macrófagos (Feghali *et al.*, 1997; Hernández-Urzúa *et al.*, 2001; Murphy and Reiner *et al.*, 2002). Esta citocina mostró un incremento considerable en las muestras de lavados nasales y traqueo-bronquiales con el tratamiento extracto más pCry1Ac, en las muestras de lavados nasales se registró un valor de 335 pg/ml con el mismo tratamiento y 191 pg/ml con el tratamiento de pCry1Ac sola. Con los lavados traqueo-bronquiales esta citocina registró un valor de 106 pg/ml. En el suero el valor más alto fue 85 pg/ml con el tratamiento de extracto más pCry1Ac (Figs. 3-5).

DETERMINACIÓN DE CITOCINAS Th1 EN TQB



DETERMINACIÓN DE CITOCINAS Th2 EN TQB

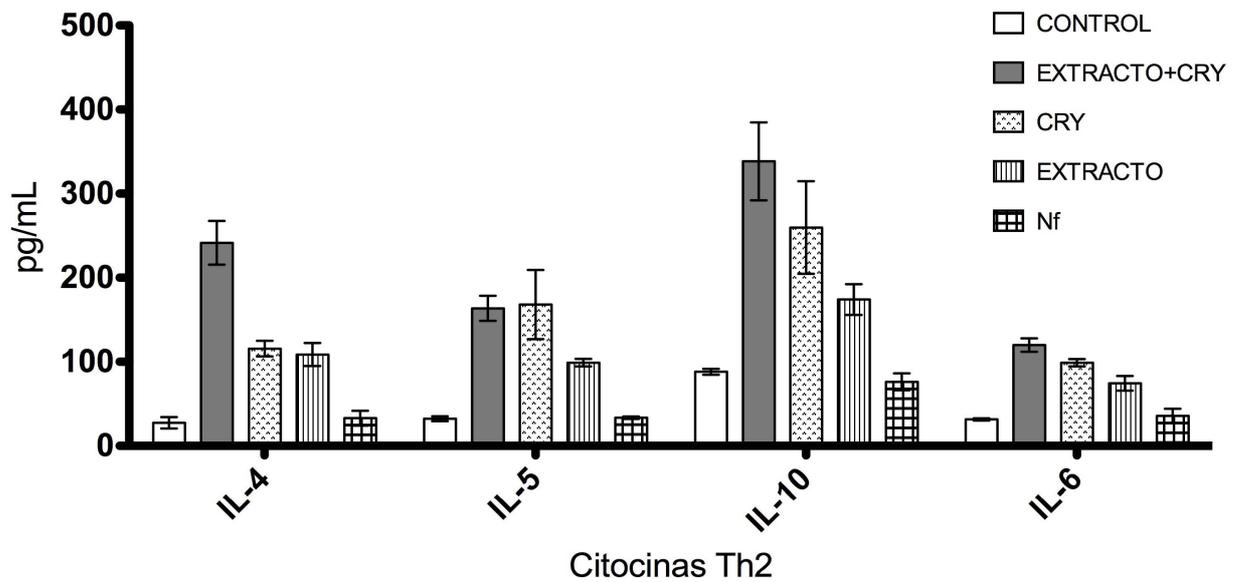


Fig. 5. Determinación de la producción de citocinas en lavados traqueobronquiales al tiempo de 24 h, mediante citometría de flujo.

IL-2

Es la principal citocina responsable de la progresión de los linfocitos desde la fase G1 a la S del ciclo celular. Es producida por las células T CD4 y en menor cantidad por las CD8, después de la activación por antígeno. Actúa sobre la misma célula que la produce, por lo que funciona como factor de proliferación autocrino y puede ser paracrino actuando sobre las células T (CD4 y CD8) cercanas. La IL-2 estimula la proliferación de células NK y aumenta su capacidad citolítica. Por otra parte puede actuar en las células B como factor de proliferación y como un estímulo de síntesis de anticuerpos (Feghali *et al.*, 1997; Hernández-Urzúa *et al.*, 2001). Esta citocina mostró un incremento considerable en las muestras de lavados nasales y fue con el tratamiento de extracto más pCry1Ac donde se registró el valor más elevado con 447 pg/ml, en el tratamiento de pCry1Ac se obtuvo un valor de 357 pg/ml, en las muestras de lavados traqueo-bronquiales esta citocina también mostró un incremento, sobre todo en el tratamiento de extracto más pCry1Ac con un valor de 114 pg/ml y con el tratamiento de pCry1Ac sola, se registró 88 pg/ml. En las muestras de suero se registraron valores muy bajos en comparación con las otras dos muestras, ya que el valor más elevado fue el obtenido con el tratamiento de extracto más pCry1Ac con 61 pg/ml (Figs. 3-5).

MCP-1

En el proceso de la inflamación, los macrófagos activados sintetizan y liberan moléculas que atraen a los monocitos a la zona de inflamación y aumentan la expresión de las moléculas de adhesión en monocitos, induciendo la migración del torrente sanguíneo para convertirse en macrófagos tisulares y en células endoteliales de vasos sanguíneos para su extravasación a tejidos. Es secretado por macrófagos activados y células T, se libera en la fase temprana de la infección (Hernández-Urzúa *et al.*, 2001; Murphy and Reineret, 2002). Esta quimiocina mostró sus niveles más altos en las muestras de lavados nasales con el tratamiento de extracto más pCry1Ac con un valor de 133 pg/ml y le siguió el tratamiento con pCry1Ac sola con 105 pg/ml. En los lavados traqueo-pulmonares se registró un valor de 79 pg/ml con el tratamiento de extracto más pCry1Ac. Los valores en las muestras de suero fueron muy pequeños por ejemplo, el valor más alto fue de 58 pg/ml se registró en el tratamiento de extracto más pCry1Ac (Figs. 3-5).

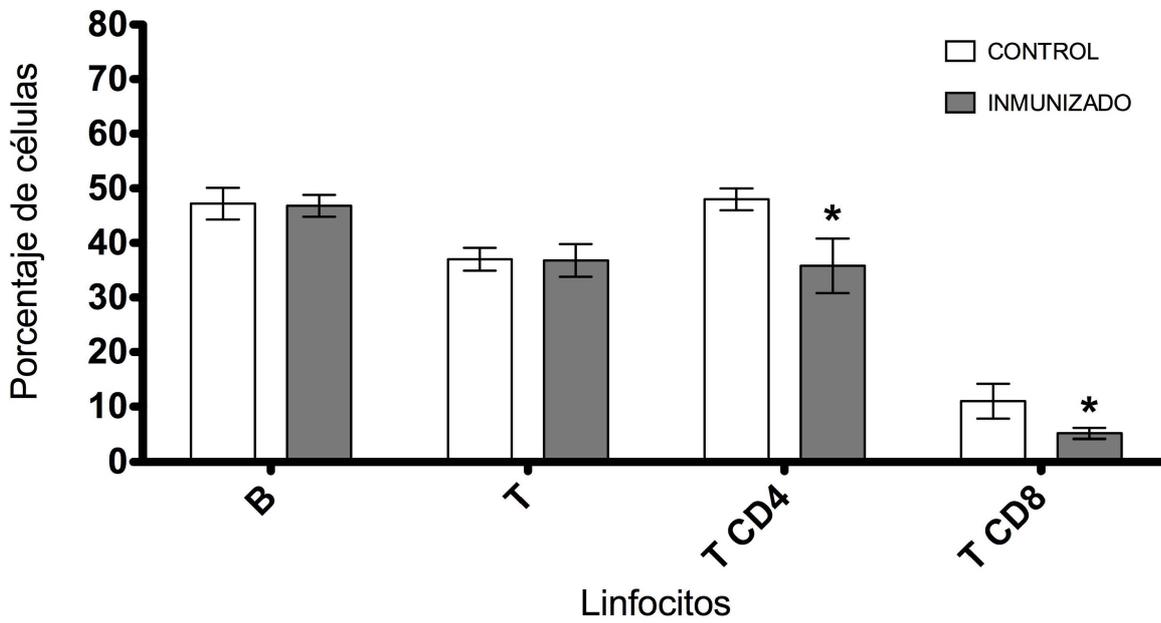
Las poblaciones linfocitarias el NALT y PN se modifican después de la inmunización intranasal con pCry1Ac más extracto.

La inmunización con extracto amibiano más pCry1Ac fue la que mostró un mayor efecto en el incremento de la producción de citocinas, por lo que solo se usó este tratamiento para observar los cambios en las poblaciones linfocitarias de NALT y

PN. Los porcentajes de las poblaciones linfocitarias se modificaron cuando se inmunizó con la pCry1Ac. Los porcentajes de linfocitos B en el NALT no presentaron diferencias significativas, mientras que los porcentajes de linfocitos B en los PN aumentaron significativamente después de la inmunización de 52.2 a 69.2 %. Las poblaciones de células T CD3 en el NALT y en los PN presentaron diferencias significativas después de la inmunización. Las poblaciones de linfocitos T CD4 en el NALT presentaron una disminución de 48 a 35.8 %, mientras que en los NP los linfocitos registraron un incremento de 49 a 67.8 %. Los linfocitos T CD8 también mostraron modificaciones después de la inmunización, en el NALT también se observó un decremento significativo de 11 a 5 % pero en los NP se encontró que estos linfocitos tenían un incremento de 7.6 a 16.6 % (Fig. 6).

La activación temprana de linfocitos se valoró con el marcador CD69. Los linfocitos B en el NALT incrementaron significativamente la expresión de este marcador activación de 2.3 a 29.2 % y en los PN también se puede observar un incremento que fue de 12.9 a 40.6 %. Los linfocitos T CD4 no mostraron diferencias significativas en el NALT, pero en los PN si se encontraron diferencias después de las inmunización que fue de 38.3 a 56.2 %. Para los linfocitos T CD8 no se registraron diferencias en el NALT y en los PN (Fig. 7).

CAMBIOS EN LAS POBLACIONES DE LINFOCITOS DEL NALT



CAMBIOS EN LAS POBLACIONES DE LINFOCITOS DE PN

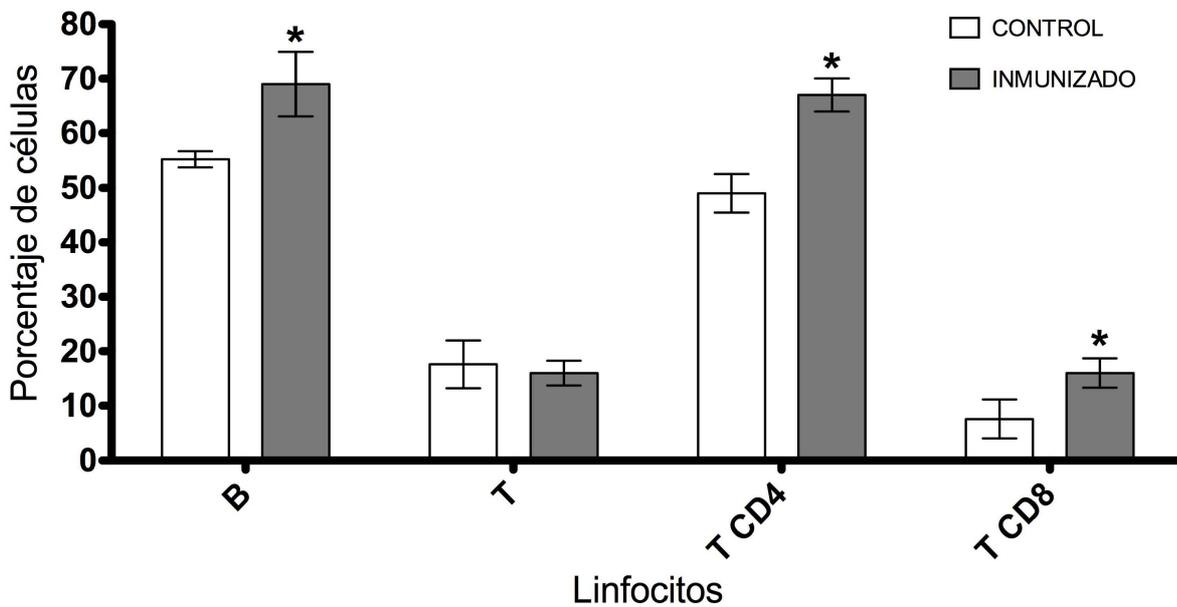
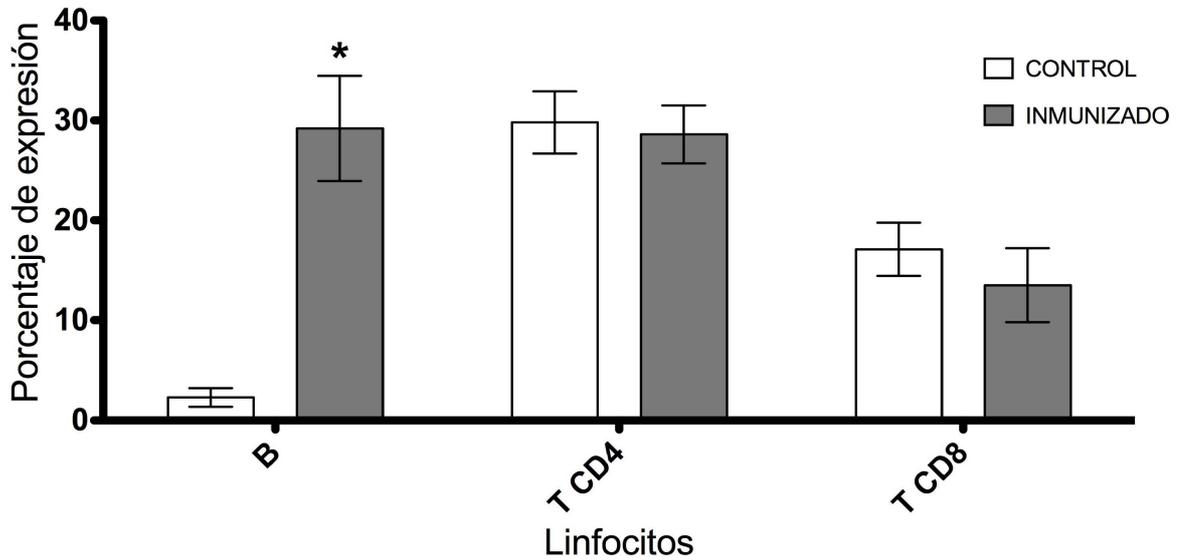


Fig. 6. Análisis de los cambios en poblaciones linfocitarias del NALT y NP.

EXPRESIÓN DEL MARCADOR DE ACTIVACIÓN CD69 EN LINFOCITOS DEL NALT



EXPRESIÓN DEL MARCADOR DE ACTIVACIÓN CD69 EN LINFOCITOS DE PN

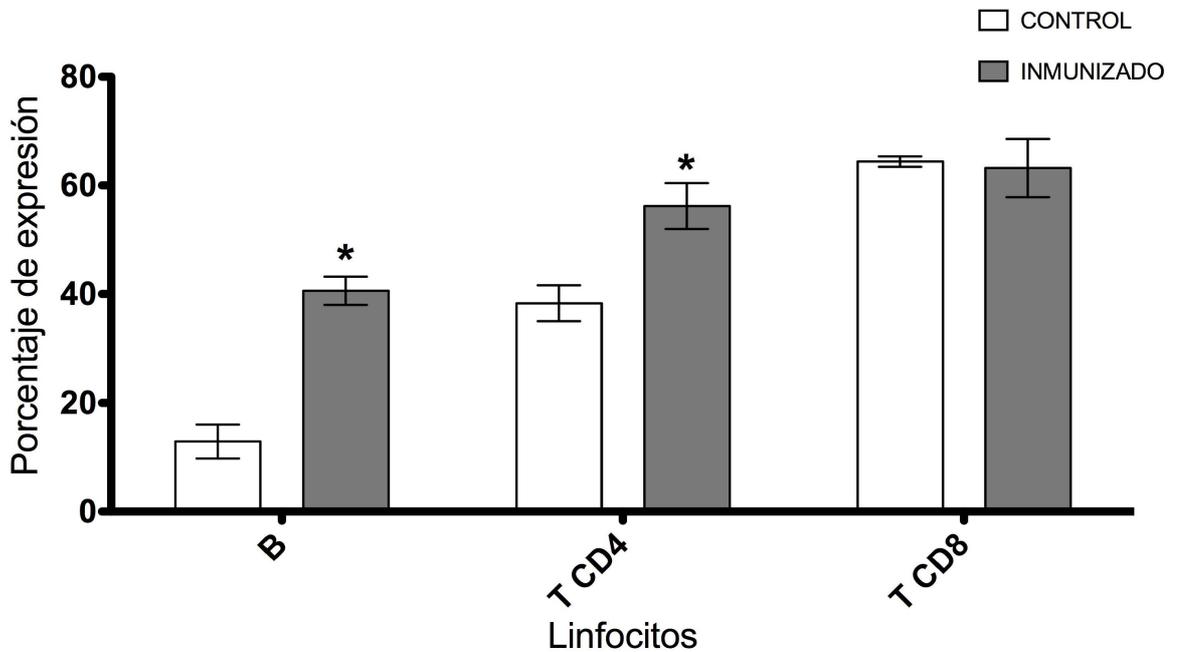
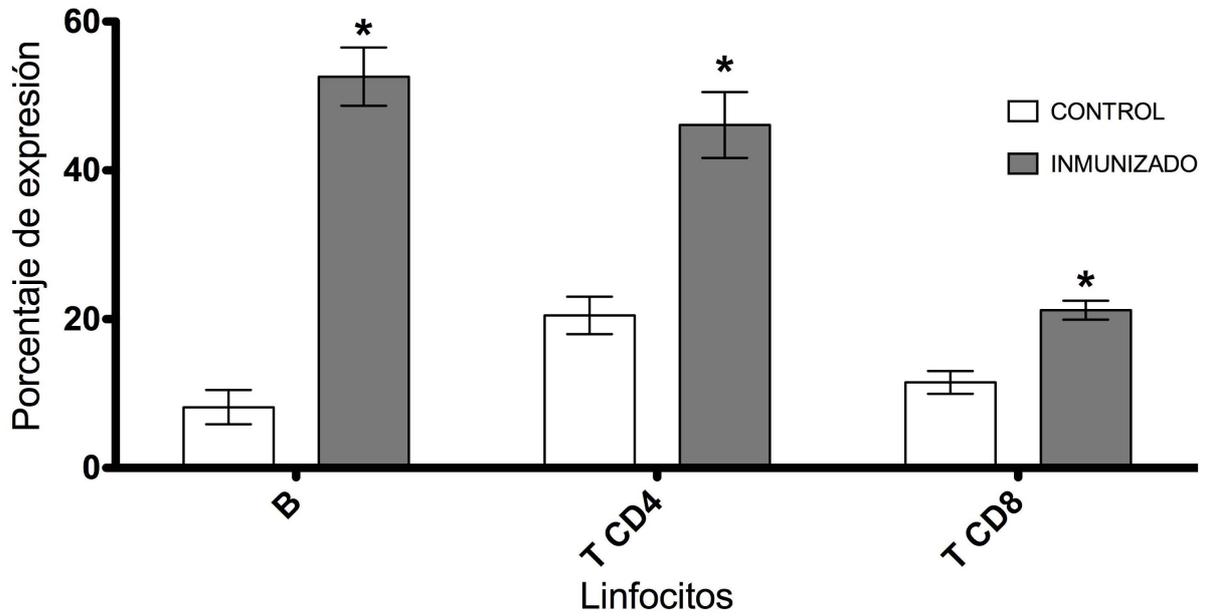


Fig. 7. Análisis de la expresión del marcados de activación CD69 en poblaciones linfocitarias del NALT y NP.

La activación tardía de los linfocitos se evaluó con el marcador CD25. Los linfocitos B en el NALT presentaron diferencias significativas ya que se registró un gran incremento en la activación que fue de 8.2 a 52.6 %, en los PN también se registraron diferencias significativas con un incremento en la activación de estos linfocitos que fue de 25.5 a 54.9 %. Para los linfocitos T CD4 se observa un aumento que fue de 20.5 a 46.1 %, de igual manera en los PN hay un aumento de 38.4 a 76.6 %. Con los linfocitos T CD8 del NALT se encontró un incremento de 11.5 a 21.2 % y de igual manera se observó un incremento significativo en los PN de 58.8 a 73.9 % (Fig. 8).

EXPRESIÓN DEL MARCADOR DE ACTIVACIÓN CD25 EN LINFOCITOS DEL NALT



EXPRESIÓN DEL MARCADOR DE ACTIVACIÓN CD25 EN LINFOCITOS DE PN

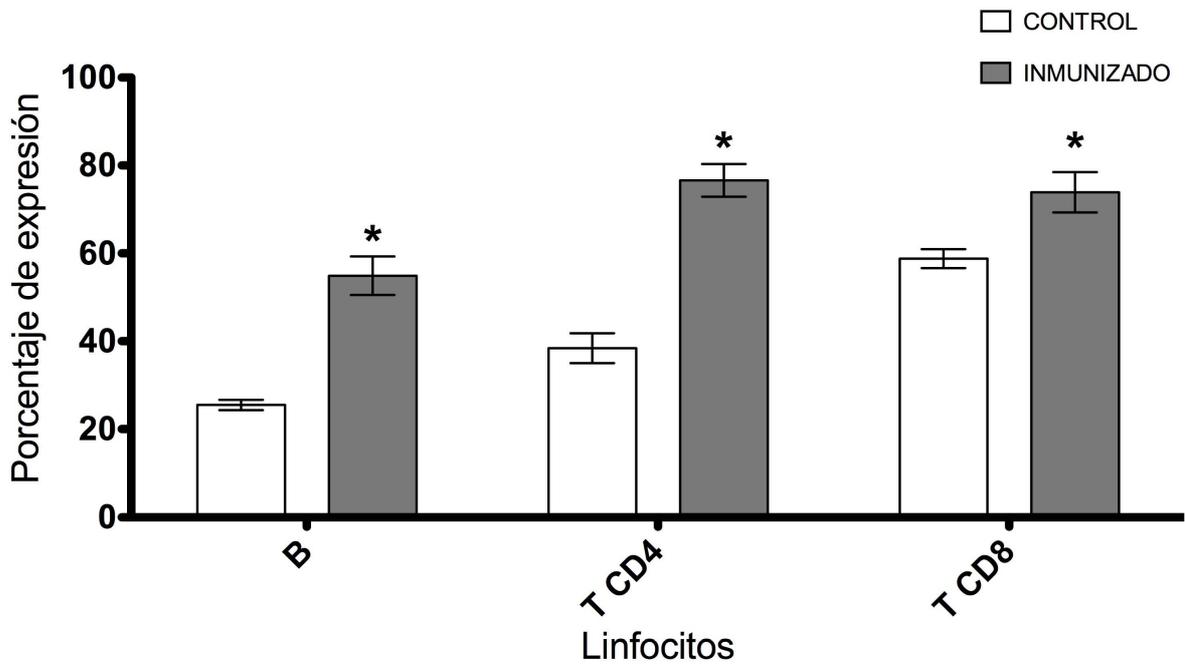


Fig. 8. Análisis de la expresión del marcados de activación CD25 en poblaciones linfocitarias del NALT y NP.

DISCUSIÓN.

El resultado más importante de este trabajo es que se logró elucidar uno de los posibles mecanismos por los cuales la pCry1Ac confiere inmunidad protectora contra la infección producida por *N. fowleri*. Se ha demostrado que pCry1Ac tiene propiedades inmunogénicas y de adyuvante al igual que CT (Moreno-Fierros *et al.*, 2000, 2002, 2003; Vazquez-Padron *et al.* 1999b, 2000) y existen evidencias de que este tipo de proteínas de origen bacteriano aumentan predominantemente esta respuesta Th2 (Elson y Dertzbaugh, 1994; Holmgren *et al.*, 2003; Ryan *et al.*, 2001; Xu-Amano *et al.*, 1993, 1994). Al parecer la inmunización con la pCry1Ac induce producción de citocinas relacionadas con una respuesta de tipo Th2, durante la infección con *N. fowleri*. Se propone lo anterior debido a la elevada producción de citocinas como IL-10, IL-4, IL-5 e IL-6 en las muestras de lavados traqueobronquiales, lavados nasales y suero; se ha reportado que estas citocinas están involucradas en respuestas inmunológicas de tipo Th2, que promueven la diferenciación de células en células secretoras de anticuerpos y desarrollar una respuesta humoral (Feghali, 1997; Kennet, 2002; Oh, 2005.). Lo anterior concuerda con lo propuesto por Rojas *et al.*, (2004) quienes utilizaron el modelo experimental de la MAP en ratón, midiendo anticuerpos del subtipo IgG1 sugiere que la protección brindada por la pCry1Ac se da a través de una respuesta humoral, que como se sabe, está inducida por células Th2. De igual manera Rodríguez-Monroy

(2010) encontró un incremento de células secretoras de anticuerpos en el NALT después de la inmunización con la pCry1Ac. Existen otros adyuvantes proteicos de origen bacteriano como la toxina de cólera que también puede inducir respuestas humorales y además es capaz de inducir la expresión de citocinas como IL-10, IL-4 e IL-6 (Lavelle, *et al.*, 2004).

Otro dato sobresaliente en este trabajo es que la inmunización con la pCry1Ac también incremento la expresión de citocinas como IL-12, INF- γ y TNF- α , estas citocinas están involucradas en una respuesta de tipo Th1, que esta relacionadas con una respuesta proinflamatoria y con la inmunidad innata (Feghali, 1997; Kennet, 2002). Lo anterior podría deberse a que durante la infección de *N. fowleri* existe una reacción inflamatoria aguda y eficaz que estaría complementada por una respuesta humoral importante. Existen reportes de que la inmunización intranasal con diferentes antígenos en presencia de toxina de cólera como adyuvante puede generar la producción de citocinas Th1 y Th2 (INF- γ e IL-4) en un tipo de respuesta combinada (Lavelle *et al.*, 2004; Hornquist *et al.*, 1993; Pacheco *et al.*, 2000; Schafeller *et al.*, 1997; Yanigata *et al.*, 1999).

La citocina de la que se registró un mayor incremento fue de la IL-10 esta citocina es producida por principalmente por células Th2 y células B, esto podría deberse a que está relacionada con el favorecimiento de una respuesta inmunitaria humoral, inhibiendo citocinas Th1, también se sabe que esta citocina está directamente

involucrada en la regulación de respuesta inmunológica (Feghali, 1997; Hernández-Urzúa *et al.*, 2001; Kennet, 2002). La pCry1Ac muestra un comportamiento semejante a la toxina de cólera que genera una gran producción de IL-10 ya que tiene un papel importante en la supresión de ciertas citocinas (Lavelle *et al.*, 2004), la regulación en la respuesta inmunológica es de gran importancia, por ejemplo una respuesta inflamatoria descontrolada y prolongada puede causar un gran daño en los tejidos del individuo (Sacks *et al.*, 2002).

El cambio de las poblaciones de linfocitos B y T en el NALT y PN podría deberse a que el sistema inmune de mucosas puede dividirse en compartimentos inductores y efectores, el NALT es una región típicamente inductora y los pasajes nasales son considerados como sitios efectores. Sin embargo, el efecto de la inmunización intranasal sobre el fenotipo y las funciones de las diferentes subpoblaciones celulares que residen en estos compartimentos nasales, aún no están bien caracterizadas sobre todo ante estímulos inmunogénicos como la inmunización intranasal con extracto más pCry1Ac.

La inmunización intranasal con extracto más pCry1Ac, dio como resultado cambios en los fenotipos y funcionalidad de las poblaciones de linfocitos tanto del NALT como de NP, cuando se comparan los porcentajes de poblaciones de estos compartimentos nasales, de los grupos control e inmunizado. En estudios previos se ha reportado que pCry1Ac induce respuestas específicas de células B IgA⁺ e

IgG+ en NALT y PN, aunque los porcentajes son menores en el NALT que en NP, en estos trabajos al inmunizar con CT, que al igual que pCry1Ac es una toxina bacteriana, se puede inducir una diferenciación de linfocitos B a células secretoras de anticuerpos, lo que puede explicar la gran activación de linfocitos B (Asanuma *et al.*, 1998; Heritage *et al.*, 1997).

CONCLUSIONES.

- La inmunización intranasal con la pCry1Ac más extracto produce cambios en las poblaciones linfocitarias del NALT y pasajes nasales.
- La inmunización intranasal de la pCry1Ac más extracto produce un incremento en el perfil de expresión de los marcadores de activación CD25 y CD69, en células B y células T CD4 y T CD8.
- La producción de las citocinas pro-inflamatorias IL-2, TNF, INF e IL-12 al igual que las citocinas anti-inflamatorias IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10 se incrementó después de la inmunización intranasal con la pCry1Ac más extracto.
- IL-10 e IL-12 fueron las citocinas que mostraron un mayor incremento al inmunizar intranasalmente con la pCry1Ac más extracto.
- La inmunización intranasal con la pCry1Ac más extracto produce a tiempos cortos (24h) una respuesta mixta TH1 y TH2.

REFERENCIAS

- **Asanuma, H., Thompson, A.H., Iwasaki, T.** (1997) Isolation and characterization of mouse nasal-associated lymphoid tissue. *J Immunol Methods*; **202**: 123-131.
- **Asanuma H, Aizawa C, Kurata T and Tamura S.** (1998) IgA antibody-forming cell responses in the nasal-associated lymphoid tissue of mice vaccinated by intranasal, intravenous and/or subcutaneous administration. *Vaccine*; **16**: 1257-1262.
- **Baldrige, J., Yorgensen, J., Ward R., and Ulrich, T.** (2000). Monophosphoryl lipid A enhances mucosal and systemic immunity to vaccine antigens following intranasal administration. *Vaccine*. 18:2416-2425.
- **Bergquist, C., Johansson, E.L., Lagergard, T., Holmgren, J. and Rudin, A.** (1997) Intranasal vaccination of humans with recombinant cholera toxin B subunit induces systemic and local antibody responses in the upper respiratory tract and the vagina. *Infect Immun*; **65**: 2676-2684.
- **Carter, R. F.** (1970). Description of a *Naegleria* sp. isolated from two cases of primary amoebic meningo-encephalitis, and of the experimental pathological changes induced by it. *J. Pathol.* 100:217-244.
- **Chen, H.** (2000). Recent advances in mucosal vaccine development. *J. Controlled. Release.* 67:117-128.
- **Csencsits, K.L., Jutila, M.A. and Pascual, D.W.** (1999) Nasal-associated lymphoid tissue: phenotypic and functional evidence for the primary role of peripheral node addressin in naive lymphocyte adhesion to high endothelial venules in a mucosal site. *J Immunol*; **163**: 1382-1389.
- **Czerkinsky, C. F., Anjuere, J. R., McGhee, A., George-Chandy, J., Holmgren, M. P., Kieny, K., Fujiyashi, J. F., Mestecky, V., Pierrefite-Carle, C., and Sun, J.B.** (1999). "Mucosal immunity and tolerance: relevance to vaccine development." *Immunol. Rev.* 170:197-222.
- **Di Tommaso, A., Saletti, G., Pizza, M.** (1996) Induction of antigen-specific antibodies in vaginal secretions by using a nontoxic mutant of heat-labile enterotoxin as a mucosal adjuvant. *Infect Immun*; **64**: 974-979.
- **Douce, G. V., Giannelly, M., Pizza D., Lewis P., Everest R., and Dougan, G.** (1999). Genetically detoxified mutants of heat-labile toxin from *Escherichia coli* are able to act as oral adjuvant. *Infect. Immun.* 67(9):4400-4406.
- **Elson, C. O., and Dertzbaugh, M. T.** (1999). Mucosal adjuvant. In: Ogra P.L., J. Mestecky, M.E. Lamm, W. Strober, J. Bienenstock and J.R. McGhee (eds). *Handbook Mucosal Immunology*. 2^a edition, Academic Press, Inc., San Diego, pp 817-838.
- **Feghali, C.A. and Wright, T.M.** (1997) Cytokines in acute and chronic inflammation. *Frontiers in Bioscience*, d12-26, January 1.
- **Ge, A. Z., Pfister, R. M., and Dean, D. H.** (1990). Hyperexpression of a *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin-encoding gene in *Escherichia coli*: properties of the product. *Gene* 93:49-54.
- **Gupta, R. K., Chang, A. C., and Siber, G. R.** (1998). Biodegradable polymer microspheres as vaccine adjuvant and delivery systems. *Dev. Biol. Stand.* 92:63.
- **Heritage PL, Underdown BJ, Arsenault AL, Snider DP and McDermott MR.** (1997) Comparison of murine nasal-associated lymphoid tissue and Peyer's patches. *Am J Respir Crit Care Med*; 156: 1256-1262.
- **Hernández-Urzúa, M.A. and Alvarado-Navarro, A.** (2001) Interleucinas e inmunidad innata. *Rev. Biomed*; 12:272-280.
- **Hirabayashi, Y., Kurata, H., Funato, H.** (1990) Comparison of intranasal inoculation of influenza HA vaccine combined with cholera toxin B subunit with oral or parenteral vaccination. *Vaccine*; **8**: 243-248.
- **Hofte, H., and Whiteley, H.** (1989). Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol. Rev.* 53:242-255.
- **Holmgren, J., Czerkinsky, C., Eriksson, K., and Mharandi, A.** (2003). Mucosal immunization and adjuvants: a brief overview of recent advances and challenges. *Vaccine*. 21:89-95.

- **Hornquist, E. and Lycke, N.** (1993) Cholera toxin adjuvant greatly promotes antigen priming of T cells. *Eur. J. Immunol.* 23, 2136–2143
- **Jarolim, K. L., McCosh, J. K., Howard, M. J., and John, D. T.** (2000). A light microscopy study of the migration of *Naegleria fowleri* from the nasal submucosa to the central nervous system during the early stage of primary amebic meningoencephalitis in mice. *J. Parasitol.* 86:50-55.
- **Johansson, E. L., Rask, C., Fredriksson, M., Eriksson, K., Czerkinsky, C., and Holmgren, J.** (1998). Antibodies and antibody-secreting cells in the female genital tract after vaginal or intranasal immunization with cholera toxin B subunit or conjugates. *Infect. Immun.* 66: 514-520.
- **John, D. T.** (1993). Parasitic protozoa. 2nd edition. Edited by Julius P. Kreier and John R. Baker. Academic Press Inc., U.S.A.
- **Kalambaheti, T., Chaisri, U., Srimanote, P., Pongponratn, E., and Chaicumpa, W.** (1998). Immunogenicity and protective role of three formulations of oral cholera vaccine. *Vaccine*.16: 201-207.
- **Kiyono, H. and Fukuyama, S.** NALT- versus Peyer's-patch-mediated mucosal immunity. *Nat Rev Immunol* 2004; 4: 699-710.
- **Koornstra, P.J., de Jong, F.I., Vlek, L.F., Marres, E.H. and van Breda Vriesman, P.J.** (1991) The Waldeyer ring equivalent in the rat. A model for analysis of oronasopharyngeal immune responses. *Acta Otolaryngol* ; 111: 591-599.
- **Kuper, C.F., Koornstra, P.J., Hameleers, D.M.** (1992) The role of nasopharyngeal lymphoid tissue. *Immunol Today*; 13: 219-224.
- **Lamm, M. E.** (1997). Interaction of antigens and antibodies at mucosal surfaces. *Annu. Rev. Microbiol.* 51:311-340.
- **Langermann, S., Palaszynski, S., Sadziene, A., Stover, C.K. and Koenig S.** (1994). Systemic and mucosal immunity induced by BCG vector expressing outer-surface protein A of *Borrelia burgdorferi*. *Nature*; 372: 552-555.
- **Lavelle, C., Jarnicki, A., McNeela, Edel. Armstrong, M. E., Higgins, S.C., Leavy, O. and Mills, K.H.G.** (2004) Effects of cholera toxin on innate and adaptive immunity and its application as an immunomodulatory agent. *Journal of Leukocyte Biology*:75, 756-763.
- **Martínez, A. J., Duma, R. J., Nelson, E. C., and Moretta, F. L.** (1973). Experimental *Naegleria* meningoencephalitis in mice. Penetration of the olfactory mucosal epithelium by *Naegleria* and pathologic changes produced: a light and electron microscopy study. *Lab. Invest.* 29:121-133.
- **Martínez A. J.** 1985. Free-living Amebas: Natural history prevention, diagnosis, pathology and treatment of disease. CRC Press, Boca Raton, Florida. U.S.A. 156 p.
- **Martínez AJ., Guerra AE., García J., Cespedes G., Gonzalez J. y Visvesvara G.** (1994). Granulomatous amebic encephalitis: a review and report of a spontaneous case from Venezuela. *Acta Neuropathol.* 87:430.
- **Martínez, A. J., and Visvesvara, G. S.** (1997). Amphizoic and opportunistic amebas. *Brain Pathol* 7:583-598.
- **McCluskie, M. J., and Davis, H. L.** (1999). Mucosal immunization with DNA vaccines. *Microb. Infecc.* 1:685-698.
- **McGhee, J. R., Czerkinsky, C., and Mestecky, J.** (1999). Mucosal vaccines: "an overview." In: Ogra P.L., J. Mestecky, M.E. Lamm, W. Strober, J. Bienenstock and J.R. McGhee (eds). *Handbook Mucosal Immunology*. 2^a edition, Academic Press, Inc., San Diego, pp 741-757.
- **Moreno-Fierros, L., García, N., Gutierrez, R., Lopez-Revilla, R., and Vazquez-Padrón, R. I.** (2000). Intranasal, rectal and intraperitoneal immunization with protoxin Cry1Ac from *Bacillus thuringiensis* induces serum, intestinal, vaginal and pulmonary responses in Balb/C mice. *Life Sciences.* 64:1079-1089.
- **Moreno-Fierros, L., Ruiz-Medina, E. J., Esquivel, R., López-Revilla, R., and Piña-Cruz, S.** (2003). Intranasal Cry1Ac protoxin is an effective mucosal and systemic carrier and adjuvant of *Streptococcus pneumoniae* polysaccharides in mice. *Scand. J. Immunol.* 57:45-55.
- **Muller, C.P., Beauverger, P., Schneider, F., Jung, G. and Brons, N.H.** (1995). Cholera toxin B stimulates systemic neutralizing antibodies after intranasal co-immunization with measles virus. *J Gen Virol*; 76 (Pt 6): 1371-1380.

- **Murphy, K. M. and Reiner, S. T.** The lineage decisions of helper T cells. Nature publishing 2002.
- **Oh, Y.H., Jeong, S.R., Kim, J.K., Song, K.J., Kim, K., and Shin, H.J.** Cytopathic changes and pro-inflammatory cytokines induced by *Naegleria fowleri* trophozoites in rat microglial cells and protective effects of an anti-Nf α 1 antibody. *Parasite immunology*, 2005, 27, 453-459.
- **Pacheco, S. E., Gibbs, R. A., Ansari-Lari, A., Rogers, P.** (2000) Intranasal immunization with HIV reverse transcriptase: effect of dose in the induction of helper T cell type 1 and 2 immunity. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 16, 2009–2017.
- **Page FC.** 1988. A new Key to Freshwater and soil Gymnamoebae. Freshwater Biological Association Scientific Publication, Londres. 122pp.
- **Rodriguez-Monroy MA, Rojas-Hernandez S, Moreno-Fierros L.** Phenotypic and functional differences between lymphocytes from NALT and nasal passages of mice. *Scand J Immunol* 2007;65:276–88.
- **Rodriguez-Monroy MA, Moreno-Fierros L.** Striking activation of NALT and Nasal Passages lymphocytes induced by intranasal with Cry1Ac protoxin. *Scand J Immunol* 2010;71:645–68.
- **Rojas-Hernandez, S., Rodriguez-Monroy, M. A., Lopez-Revilla, R., Resendiz-Albor, A. A., and Moreno-Fierros, L.** (2004). Intranasal coadministration of the Cry1Ac protoxin with amoebal lysates increases protection against *Naegleria fowleri* meningoencephalitis. *Infect. Immun.* 72:4368-4375.
- **Rojas-Hernandez, S., Jarillo-Luna, A., Rodríguez-Monroy, M. A., Moreno-Fierros, L., and Campos-Rodriguez, R.** (2004). Immunohistochemical characterization of the initial stages of *Naegleria fowleri* meningoencephalitis in mice. *Parasitol. Res.* 94:31-36.
- **Ryan, E. J., McNeela, E., Murphy, G. H., Stewart H., O'Hagan, D., Pizza, M., Rappuoli, R., and Mills, K. H. G.** (1999). Mutants of *Escherichia coli* heat-labile toxin act as effective mucosal adjuvants for nasal delivery of an acellular pertussis vaccine: differential effects of the nontoxic AB complex and enzyme activity on Th1 and Th2 cells. *Infect Immun.* 67:6270-6280.
- **Ryan, E. J., Daly, L. M., and Mills, K. H. G.** (2001). Immunomodulators and delivery systems for vaccination by mucosal routes. *Trends Biotech.* 19: 293-304.
- **Sabbaj, S., Kiyono, H., and McGhee, J. R.,** (1997). Mucosal immunization for enteric diseases current practice and future prospects. *Bio. Drugs.* 7:134-157.
- **Sacks, D. and Sher, A.** Evasion of innate immunity by parasitic protozoa. Nature publishing, 2002. 3;7; 1041-1046.
- **Schaffeler, M. P., Brokenshire, J. S. and Snider, D. P.** (1997) Detection of precursor Th cells in mesenteric lymph nodes after oral immunization with protein antigen and cholera toxin. *Int. Immunol.* 9, 1555–1562.
- **Schuster, F. L., and Dunnebacke, T. H.** (1977). Ultrastructural observations of experimental *Naegleria* meningoencephalitis in mice: Intracellular inclusions in amoebae and host cell. *J. Protozool.* 24:489-497.
- **Singh, M., and O'Hagan, D.** (1999). Advances in vaccine adjuvants. *Nat. Biotechnol.* 17(11): 1075-1081.
- **Spit, B.J., Hendriksen, E.G., Bruijntjes, J.P. and Kuper, C.F.** Nasal lymphoid tissue in the rat. *Cell Tissue Res* 1989; 255: 193-198.
- **Staats, H. F., Jackson, R. J., Marinaro, M., Takahashi, I., Kiyono, H., McGhee, J. R.** (1994), Mucosal immunity to infection with implications for vaccines development. *Curr. Opin. Immunol.* 6:572-583.
- **Stewart-Tull, D. E. S.** (1996). The use of adjuvants in experimental vaccine: IV ISCOMS. In: Robinson A., G. Farr and C. Wiblin (eds). *Methods in Molecular Medicine: Vaccine Protocols.* Humana Press Inc., pp 153-155.
- **Tochikubo, K., Isaka, M., Yasuda, Y., Kozuka, S., Matano, K., Miura, Y., and Tuniguchi, T.** (1998). Recombinant cholera toxin B subunit acts as an adjuvant for the mucosal and systemic responses of mice to mucosally co-administered bovine serum albumin. *Vaccine.* 16:150-155.
- **Tomasi, T. B.** (1994). Overview of the mucosal immunity. Academic Press, Inc. San Diego, in: Ogra P. L. (Eds). Pp. 1-8.
- **van der Ven, I., and Sminia, T.** The development and structure of mouse nasal-associated lymphoid tissue: an immuno- and enzyme-histochemical study. *Reg Immunol* 1993; 5: 69-75.

- **Vázquez-Padrón, R. I., Moreno-Fierros, L., Neri-Bazan, L., De la Riva, G. A., and Lopez-Revilla, R.** (1999a). *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac protoxin is a potent systemic and mucosal adjuvant. *Scand. J. Immunol.* 46:578-584.
- **Vázquez-Padrón, R. I., Moreno-Fierros, L., Neri-Bazan, L., De la Riva, G. A., and Lopez-Revilla, R.** (1999b). Intragastric and intraperitoneal administration of Cry1Ac protoxin from *Bacillus thuringiensis* induces systemic and mucosal antibody response in mice. *Life Science.* 64:1897-1912.
- **White, W. I., Cassattt, D. R., Madsen, J., Burke, S. J., Woods, R. M., Wassef, N. R., Alving, C. R., and Koenig, S.** (1995). Antibody and cytotoxic T-lymphocyte responses to a single liposome-associated peptide antigen. *Vaccine.* 13:111-1122.
- **Williams, N. A., Hirst T. R., and Nashar, T. O.** (1999). Immune modulation by the cholera-like enterotoxins: from adjuvant to therapeutic. *Immunology Today.* 20:95-101.
- **Wilschut, J., de Haan, A., Geerligts, H. J., Huchshorn, J. P., van Scharrenburg, V. J. M., Palache, A. M., Renegar, K. B., and Small, P. A.** (1994). Liposomes as a mucosal adjuvant system: an intranasal liposomal influenza subunit vaccine and the role of IgA in nasal anti-influenza immunity. *J. Liposome. Res.* 4:301-314.
- **Wilson, A. D., Stokes, C. R., and Bourne, F. J.** (1989). Adjuvant effect of cholera toxin on the mucosal immune response to soluble proteins. *Scand. J. Immunol.* 29: 739-745.
- **Wu, H.Y. and Russell, M.W.** Induction of mucosal immunity by intranasal application of a streptococcal surface protein antigen with the cholera toxin B subunit. *Infect Immun* 1993; **61**: 314-322.
- **Wu, H.Y., Nguyen, H.H. and Russell, M.W.** Nasal lymphoid tissue (NALT) as a mucosal immune inductive site. *Scand J Immunol* 1997; **46**: 506-513.
- **Wu, H.Y. and Russell, M.W.** Nasal lymphoid tissue, intranasal immunization, and compartmentalization of the common mucosal immune system. *Immunol Res* 1997; **16**: 187-201.
- **Xu-Amano, J. H., Kimono, H., Jackson, R. J., Staats, H. F., Fujihashi, K., Burrows, P. D., Elson, C. O., Pillai, S., and McGhee, J. R.** (1993). Helper T cell subsets for immunoglobulin A responses: oral immunization with tetanus toxoid and cholera toxin as adjuvant selectively induces Th2 cells in mucosa associated tissues. *J. Exp. Med.* 178:1309-1320.
- **Xu-Amano, J. H., Jackson, R. J., Fujihashi, K., Kimono, H., Staats, H. F., and McGhee, J. R.** (1994). Helper Th1 and Th2 cell responses following mucosal or systemic immunization with cholera toxin. *Vaccine.* 12:903-911.
- **Yanagita, M., Hiroi, T., Kitagaki, N.** Nasopharyngeal-associated lymphoreticular tissue (NALT) immunity: fimbriae-specific Th1 and Th2 cell-regulated IgA responses for the inhibition of bacterial attachment to epithelial cells and subsequent inflammatory cytokine production. *J Immunol* 1999; **162**: 3559-3565.
- **Zuercher, A.W.** Upper respiratory tract immunity. *Viral Immunol* 2003; **16**: 279-289.