

“EFECTO DE LA INMUNIZACIÓN INTRANASAL CON LA TOXINA Cry1Ac, EN CÉLULAS  
LINFOIDES DEL NALT”



---

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**



**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA**

***“EFECTO DE LA INMUNIZACIÓN INTRANASAL CON LA TÓXINA  
Cry1Ac, EN CÉLULAS LINFOIDES DEL NALT”***

**T E S I S**

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**BIÓLOGA**

**P R E S E N T A:**

**CINTHYA NALLELI ALVAREZ OVALLE**

**DIRECTOR DE TESIS:**

**DR. MARCO AURELIO RODRÍGUEZ MONROY**

**2013**

### *Agradecimientos*

A mi madre por darme la vida y por todo el esfuerzo brindado, porque gracias a ella realicé la mayor parte de la carrera, ya que sin su apoyo moral y económico no lo hubiera logrado, este logro es de ambas porque gracias a sus sacrificios pudo darme la mejor herencia que puedo tener y con la que me puedo defender en la vida. ¡Gracias mami!

A mi hermana por su entusiasmo para que lograra mis objetivos y por su apoyo para mi evaluación de inglés.

A mi pequeña familia que a estirones y jalones logramos lo que tanto queríamos, a mi pareja por el esfuerzo y apoyo que ha hecho para ayudarme a cuidar a nuestra hija, este logro también es tuyo pero principalmente a mi hija que a pesar de su demanda de atención también apoyó para que terminara este logro que es principalmente de ella.

No podía faltar mi tutor que sin más ni más, me adoptó como una hija más de laboratorio y fui la primera en hacerlo abuelo, gracias por el apoyo brindado, por los jalones de oreja y sobre todo por seguir apoyándome a pesar de que se nos presentaron obstáculos, pero la unión hace la fuerza, gracias Doctor Marco porque pocos padres de laboratorio son como usted.

Por último a mis amiguetos, por esos días de laboratorio que parecían no tener fin pero que siempre encontrábamos como hacerlo más liviano, por los momentos de risa, de llanto, de fiesta, de sueños que algunas veces parecían inalcanzables, por el gran golpe en el pastel el día de mi cumpleaños gracias; y aunque nuestros caminos se separaron aun seguimos juntos y espero así sea siempre aun me falta conocer a mis sobrinos postizos los adoro.

## *Índice*

<i>Tabla de Figuras.</i>	4
<i>Resumen.</i>	5
<i>Introducción.</i>	6
El sistema inmune común de mucosas.	6
Tejido linfoide asociado a la nariz (NALT).	7
Adyuvantes en mucosas.	10
La protoxina Cry1Ac como adyuvante.	10
<i>Objetivos.</i>	14
<i>Material y métodos.</i>	15
Obtención de la tCry1Ac.	15
Digestión de la pCry1Ac para obtener tCry1Ac.	16
Esquema de inmunización.	17
Obtención del NALT.	18
Obtención de linfocitos del NALT.	18
Obtención de los Pasajes Nasales.	18
Inmunotinción de linfocitos.	19
Citometría de flujo.	20
<i>Resultados.</i>	21
<i>Efecto de la tCry1Ac sobre las poblaciones.</i>	21
<i>Efecto de la TCry1Ac sobre los marcadores de activación.</i>	24
CD69.	24
CD25.	28
<i>Conclusiones.</i>	34
<i>Referencias.</i>	35

## **Tabla de Figuras.**

Figura 1. Analogía de Tejido Linfoide Asociado a la Nasofaringe y Anillo de Waldeyer en Humanos.	7
Figura 2. Comparación de poblaciones de linfocitos B del tejido del NALT y Pasajes Nasales.	21
Figura 3. Comparación de las poblaciones de linfocitos T CD4 de tejido NALT y Pasajes Nasales.	22
Figura 4. Comparación de poblaciones de linfocitos T CD8 del tejido del NALT y Pasajes Nasales.	23
Figura 5. Comparación de las poblaciones de linfocitos B con marcador de activación CD69 en el NALT y Pasajes Nasales.	25
Figura 6. Comparación de poblaciones de linfocitos T CD4 con marcador de activación CD69 en tejido NALT y Pasajes Nasales.	26
Figura 7. Comparación de poblaciones de linfocitos T CD8 con marcador de activación CD69 en el NALT y PN.	27
Figura 8. Comparación de poblaciones de linfocitos B con marcador de activación CD25 del NALT y Pasajes Nasales.	29
Figura 9. Comparación de poblaciones de linfocitos T CD4 con marcadores de activación CD25 en el NALT y Pasajes Nasales.	30
Figura 10. Comparación de las poblaciones de linfocitos T CD8 con marcador de activación CD25 en el NALT y Pasajes Nasales.	31

## **Resumen.**

La protoxina Cry1Ac (pCry1Ac), es un potente adyuvante mucosal y sistémico con efectos en la producción de anticuerpos en respuesta a proteínas y polisacáridos. A pesar de que se ha demostrado que pCry1Ac tiene características inmunogénicas y adyuvantes no se ha analizado si la toxina Cry1Ac (tCry1Ac) tiene los mismos efectos. Para ver los efectos adyuvantes de la tCry1Ac se inmunizaron por la vía intranasal 4 grupos de 6 ratones (pCry1Ac, tCry1Ac y CT respectivamente), además de un grupo testigo. El efecto de los diferentes tratamientos se realizó en células linfoides de células del NALT y NP y se analizaron mediante la técnica de citometría de flujo; obteniendo un aumento de la población en los sitios de los NP pero no hay diferencias significativas que nos digan que uno es mejor que el otro sin embargo podemos decir que la activación de los linfocitos ocurre de similar manera en los tres grupos inmunizados por lo que concluimos que la toxina es un potente adyuvante ya que incrementa la expresión de los marcadores de activación de CD25 y CD69.

## **Introducción.**

### ***El sistema inmune común de mucosas.***

El sistema inmunitario de las mucosas está compuesto de los tejidos linfoides vinculados con las superficies mucosas de los aparatos digestivo, respiratorio y urogenital. Las superficies mucosas constituyen la ruta de entrada de la mayoría de los agentes infecciosos. Por lo tanto, este sistema ha evolucionado dentro de un ambiente antigénico muy diferente del existente en el interior del cuerpo y por tal motivo, presenta varias características que lo hacen diferente del sistema linfoide sistémico.

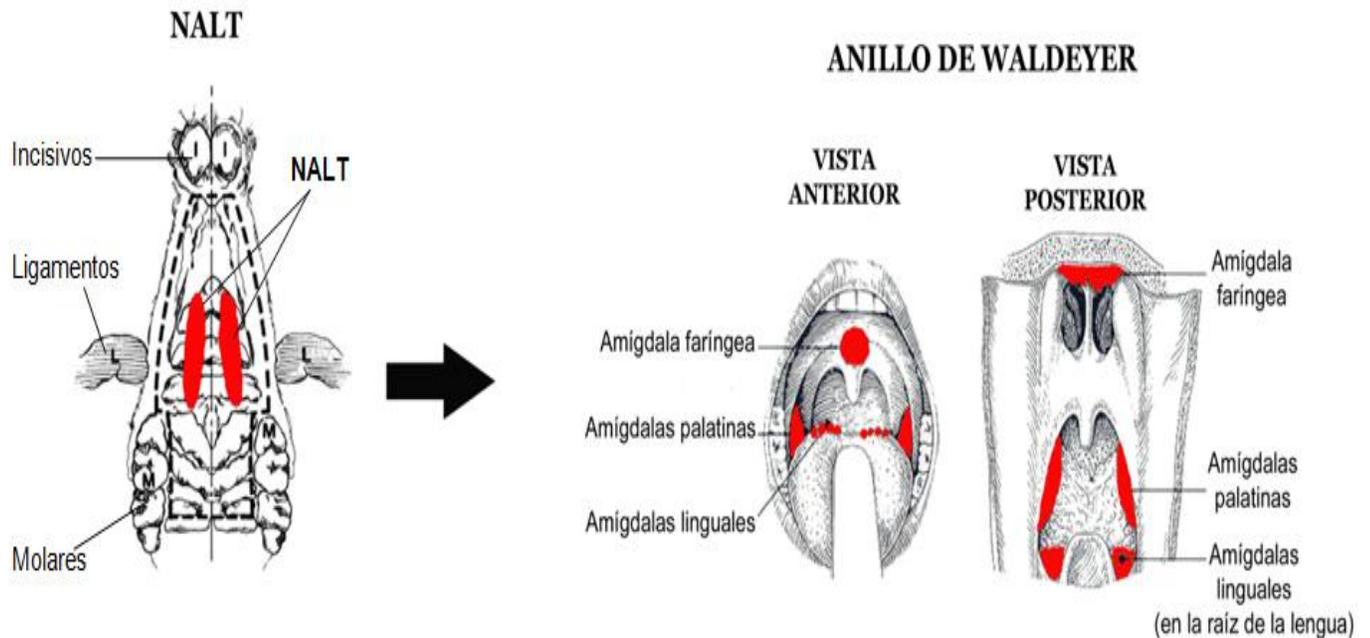
El sistema inmune común de mucosas se divide en sitios inductores, donde el antígeno se capta, endocita, procesa y se presenta a los linfocitos T y B, mientras que en los sitios efectores se lleva a cabo la respuesta inmune (1).

En cuanto a su organización el sistema inmune asociado a mucosas puede dividirse en tres compartimentos: 1) linfocitos intraepiteliales (IEL), 2) tejido linfoide difuso (lámina propia, LP) y 3) agregados linfoides organizados como las placas de Peyer (PP). Se piensa que la inducción de la inmunidad en las superficies mucosas ocurre en los agregados especializados de tejido linfoide denominados colectivamente como tejido linfoide asociado a las mucosas (MALT), formado principalmente en el: a) tracto respiratorio por el tejido linfoide asociado a los bronquios (BALT) y a la nasofaringe (NALT), por ejemplo, amígdala palatina, lingual y nasofaringe; b) en el tracto gastrointestinal por el tejido linfoide asociado al intestino (GALT), por

ejemplo, las PP, apéndice, nódulos linfáticos mesentéricos, nódulos linfoides aislados y linfocitos intraepiteliales (1).

### *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 humanos, las amígdalas son el tejido linfoide más conspicuo de la naso y orofaringe. En roedores se ha identificado un tejido linfoide asociado a la nasofaringe (2), que representa los tejidos linfoides orofaríngeos de las vías respiratorias altas, que se denomina NALT y se considera análoga al anillo de Waldeyer en los humanos (3- 4) (Figura 1).



**Figura 1.** En roedores se ha identificado un tejido linfoide 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 linfoide, que comprende las amígdalas linguales las amígdalas palatinas, y amígdalas nasofaríngeas, también llamadas adenoides).

El tejido linfoide 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 PP y BALT (5). 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) están presentes en el área de células T (5).

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 (6).

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 y/o 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). 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 (7).

El NALT y los PN se consideran como sitio inductor y efector respectivamente, y las diferencias fenotípicas y funcionales de las poblaciones linfocitarias entre estos compartimentos nasales no están establecidas claramente (8).

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 (8-15). 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 (16-20), además de requerir una menor cantidad de inmunógenos (13).

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 diversos sistemas de entrega de antígeno o el uso de adyuvantes.

#### ***Adyuvantes en mucosas.***

Existen pocos adyuvantes de la inmunidad de mucosas (21). Las toxinas de cólera (CT) (22-23) y la termolábil de *Escherichia coli* (LT) (24) tienen efectos adyuvantes cuando se coadministran o se conjugan con proteínas solubles que por sí solas no son inmunogénicas para las mucosas (25). Sin embargo, la aplicación de estas toxinas en humanos no es conveniente por su toxicidad y alto costo de producción. Las formas mutantes no tóxicas de LT y CT que mantienen parcialmente la adyuvanticidad también son excesivamente costosas (25-28).

#### ***La protoxina Cry1Ac como adyuvante.***

Es de gran importancia estudiar nuevos adyuvantes de mucosas que sean seguros y capaces de estimular la respuesta inmunitaria en las mucosas y a nivel sistémico. Con base a estudios previos del laboratorio se considera que

la protoxina Cry1Ac de *Bacillus thuringiensis* reúne las características deseables de un adyuvante para mejorar la eficacia vacunal, ya que ha demostrado que es altamente inmunogénica y tener efectos adyuvantes tanto a nivel sistémico como de mucosas. Además esta proteína ofrece ventajas adicionales ya que posee una gran estabilidad, no es tóxica para el hombre ni para vertebrados y sus costos de producción son bastantes económicos debido a que su gen ha sido clonado en *E. coli*. En reportes previos en el laboratorio, se ha evaluado la inmunogenicidad a nivel mucosa y sistémica que confiere pCry1Ac al aplicarla por distintas vías de inmunización en ratones BALB/C, obteniendo resultados alentadores que indican que la inmunización intranasal (in), rectal (r), vaginal, intraperitoneal (ip) y oral con pCry1Ac es capaz de inducir respuestas de anticuerpos en suero y en varias secreciones de mucosa vaginal, intestinal y de tracto respiratorio. También se confirmó que pCry1Ac posee efectos adyuvantes tan potentes como los de la toxina del cólera tanto a nivel mucoso como sistémico, cuando se evaluaron sus efectos en la respuesta de anticuerpos hacia diferentes antígenos de diferente naturaleza (proteínas y polisacáridos), se encontraron efectos adyuvantes en la respuesta de anticuerpos hacia el antígeno de superficie de hepatitis B, péptidos de VIH y polisacáridos de neumococos. Además se evaluó el potencial de esta proteína como acarreador vacunal de un polisacárido capsular 6B y de un epítipo de la toxina diftérica (29-35).

En 2004 se demostró que la protoxina Cry1Ac posee características adyuvantes protectoras al aplicarlo a un modelo de meningoencefalitis amibiana primaria en ratón BALB/C, esta enfermedad provocada por *Naegleria fowleri*, provoca la muerte al 100% de los ratones infectados en un

lapso no mayor de 7 días (32). Interesantemente se encontró que la administración intranasal de Cry1Ac sola protegió al 60% de los animales; mientras que al coadministrar intranasalmente la pCry1Ac con antígenos de *Naegleria fowleri* se incrementó a un 100 % de protección ante la infección, sugiriendo que la pCry1Ac activa mecanismos inmunes innatos y adquiridos por lo que se requieren más estudios para determinar los mecanismos involucrados en los efectos protectores conferidos por la pCry1Ac, la cual puede ser una herramienta valiosa para mejorar vacunas (32).

En 1999 se realizó la comparación del efecto TC y pCry1Ac vía intraperitoneal e intragástrica, en el antígeno de superficie de la Hepatitis B y albumina de suero bovino, a través de secreciones intestinales y de suero por medio de ELISA, obteniendo como resultado que por vía IP la pCry1Ac incrementa la respuesta de IgG y la TC incrementa la respuesta de IgA e IgM; el suero anti-BSA aumenta cuando es coadministrado con pCry1Ac por vía IP, además de incrementar la respuesta en las secreciones del intestino grueso y la TC incrementa levemente la respuesta de IgA e IgM, pero no afecta a la respuesta en el intestino delgado (36).

Sin embargo, es importante recalcar que todos estos estudios están dirigidos al efecto de la protoxina y se ha pasado de largo que en la industria agropecuaria, el fitomejoramiento genético vía introducción de genes Cry, que codifican para cristales proteicos insecticidas de la toxina Cry1Ac, constituye una alternativa para reducir el ataque de insectos en cultivos de interés comercial.

Motivo por el cual, este trabajo aporta nuevas evidencias sobre los efectos de la inmunización con la tCry1Ac, la cual es utilizada en diferentes plantas transgénicas de consumo humano. Por lo tanto consideramos importante caracterizar los efectos de la inmunización intranasal con la tCry1Ac en las poblaciones de linfocitos nasales y comparar sus efectos con la pCry1Ac y toxina de cólera.

## **Objetivos.**

- 1) Caracterizar las diferencias fenotípicas y funcionales de las poblaciones de linfocitos tanto del NALT como PN, en ratones normales BALB/c.
  - a. Establecer los porcentajes de las poblaciones de linfocitos B220+, CD4+ y CD8+ del NALT, mediante citometría de flujo.
  - b. Determinar el porcentaje de expresión de los marcadores de activación CD25 y CD69 en la superficie de linfocitos B220+, CD4+ y CD8+ del NALT, mediante citometría de flujo.
- 2) Caracterizar el efecto de la inmunización intranasal con la toxina Cry1Ac en las poblaciones de linfocitos tanto del NALT como PN, en ratones BALB/c.
  - a. Establecer los porcentajes de las poblaciones de linfocitos B220+, CD4+ y CD8+ del NALT de ratones inmunizados por la vía intranasal con la toxina Cry1Ac, mediante citometría de flujo.
  - b. Determinar el porcentaje de expresión de los marcadores de activación en la superficie de linfocitos B220+, CD4+ y CD8+ del NALT y PN de ratones inmunizados por la vía intranasal con la toxina Cry1Ac, mediante citometría de flujo.

## Material y métodos.

### Obtención de la tCry1Ac.

Se utilizaron células competentes TOP10 de *Escherichia coli*, donadas por el Dr. Donald Dean (Ohio State University, Columbus, USA) que expresan el plásmido pCry1Ac. Las cepas resistentes a la ampicilina 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 Tris Cl, 1 mM EDTA, pH 8), se incubaron durante 30 min a 37°C con 1 mg/ml de lisozima (Sigma, MO) y se lisaron por sonicación (Fisher Sonic Dismembrator Model 300). La fracción insoluble del lisado se lavó dos veces con TE/Tween-20 1%, dos veces con 0.5 M NaCl y una vez con agua bidestilada. La pCry1Ac se solubilizó disgregando la pastilla en buffer PCB 30 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 70 mM NaHCO<sub>3</sub>, 1 % (v/v) 2-mercaptoetanol, pH 9.6) e incubó durante 30 min a 37°C. Posteriormente se recuperó el sobrenadante por centrifugación a 16 000 g durante 10 min, se determinó la concentración de proteína por el método de micro Bradford y se analizó la pureza por SDS-PAGE en un gel al 7.5%. Una vez obtenida la pCry1Ac se eliminó 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 ameobocyte lysate). La proteína se almacenó a 4°C hasta ser usada.

### Digestión de la pCry1Ac para obtener tCry1Ac.

A partir de la concentración conocida de la protoxina purificada determinada por la prueba de cuantificación de micro de Bradford se procedió a digerir con tripsina (1:50 w/w) por una hora 37°C en agitación ligera 250 rpm. Se colocaron 3 ml de muestra en filtros (Amicon Ultra, MILLIPORE de 50kDa de apertura de malla), y se agregaron 30µl de PMSF (1:100) para obtener una concentración final 1 mM. Se centrifugaron 10 min. a 3000 rpm 4°C, se retiró el sobrenadante. Se agregó PBS1X completando un volumen de 3 ml en los filtros y centrifugó 10 min. a 3000 rpm 4°C (este procedimiento se repitió al menos 4 veces). Se concentró a un 1ml, centrifugando 10 min. a 3000 rpm 4°C la toxina purificada en PBS1X y se almacenó a 4° C para su uso posterior. Se determinó la concentración de proteínas por el método de micro Bradford y se verificó que la toxina mostrara una banda limpia a través de SDS-PAGE (geles de poliacrilamida).

### Esquema de inmunización.

En todos los experimentos se usaron ratones hembras BALB/C de 4-6 semanas. Los antígenos fueron administrados por la ruta i.n. Para la inmunización i.n., los ratones fueron ligeramente anestesiados con éter etílico. Cada grupo constó de 6 ratones a los cuales se les aplicaron tres dosis de antígeno a los días 1, 7 y 14, se sacrificaron el día 21 después de la primera inmunización. Los antígenos aplicados por la ruta intranasal a cada grupo se muestran en tabla 1:

Tabla 1. Esquema de inmunización por grupo y dosis a administrar.

GRUPO	ANTÍGENO	DÓISIS ( $\mu\text{g}$ )
CONTROL(-)	PBS	25
protoxina Cry1Ac	protoxina Cry1Ac	50
toxina Cry1Ac	toxina Cry1Ac	50
CT	CT	5

### Obtención del NALT.

El tejido del NALT se obtuvo removiendo el paladar blando (37). Los ratones anestesiados con éter se desangraron por punción cardiaca y fueron decapitados, fue removida 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 ajustó a 10<sup>6</sup> células por mililitro mediante el conteo de linfocitos en una cámara de Neubauer (37).

### 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, utilizando soluciones de 4ml de Percoll de 40% y 4ml 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 (37).

#### Inmunotinción de linfocitos.

La tinción de los linfocitos se llevó a cabo con los siguientes anticuerpos anti-ratón acoplados a fluorocromos (Becton Dickinson Technologies, Gaithersburg, MD), CD3, T CD8, T CD4 y CD45 para linfocitos B; se utilizó CD69 y CD25 como marcadores de activación para linfocitos B y T; para controles de isotipo IgG2a e IgG2b. 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 incubó en la oscuridad a 4°C por 30 min, al término de ese tiempo se lavó con PBA y se desechó con cuidado el sobrenadante, al paquete celular se le agregaron 400 µl de para-formaldehído al 1% y se guardaron en oscuridad a 4°C hasta su lectura por Citometría de flujo en las siguientes 24 horas (37).

### Citometría de flujo.

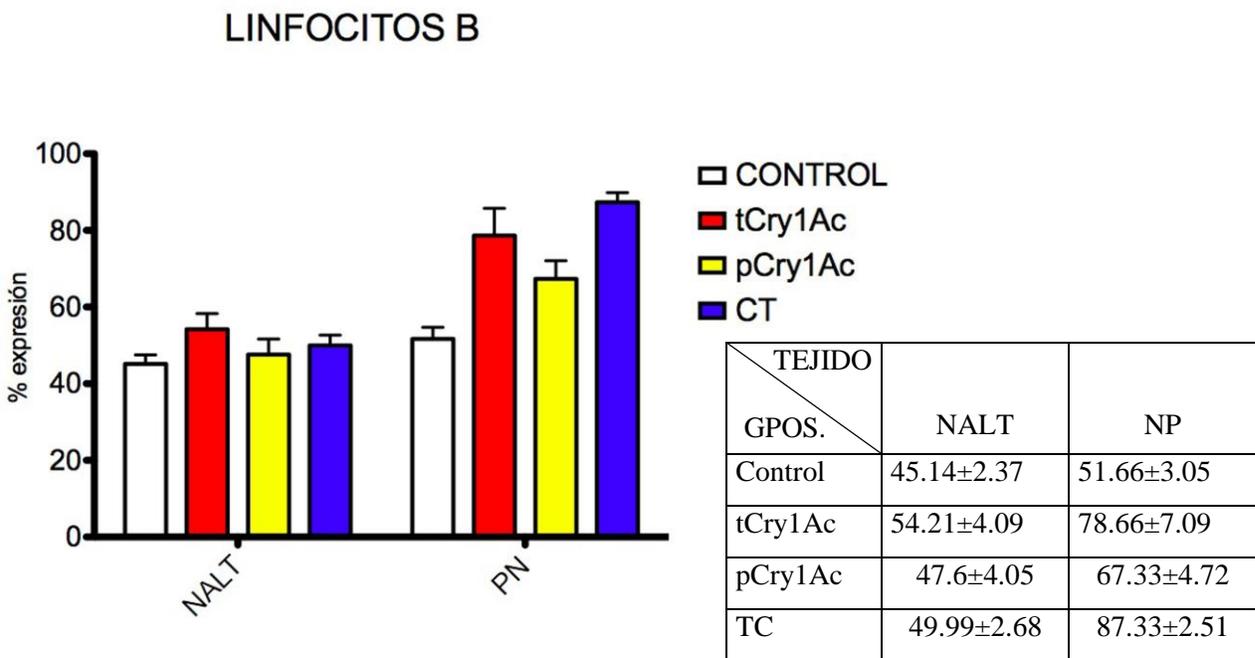
La adquisición de datos se llevó a cabo mediante citometría de flujo en un FACSCAN (Becton Dickinson, San Jose, CA) los eventos contados fueron un mínimo de 20,000. El análisis de resultados se realizó en un software para análisis de citometría de flujo (winMDI 2.8). Los resultados se presentaron como porcentajes de células positivas.

Todos los experimentos se realizaron por triplicado y se realizó la prueba estadística de Kruskal-Wallis para pruebas no paramétricas teniendo  $P < 0.05$  como significativo.

## Resultados.

### Efecto de la tCry1Ac sobre las poblaciones.

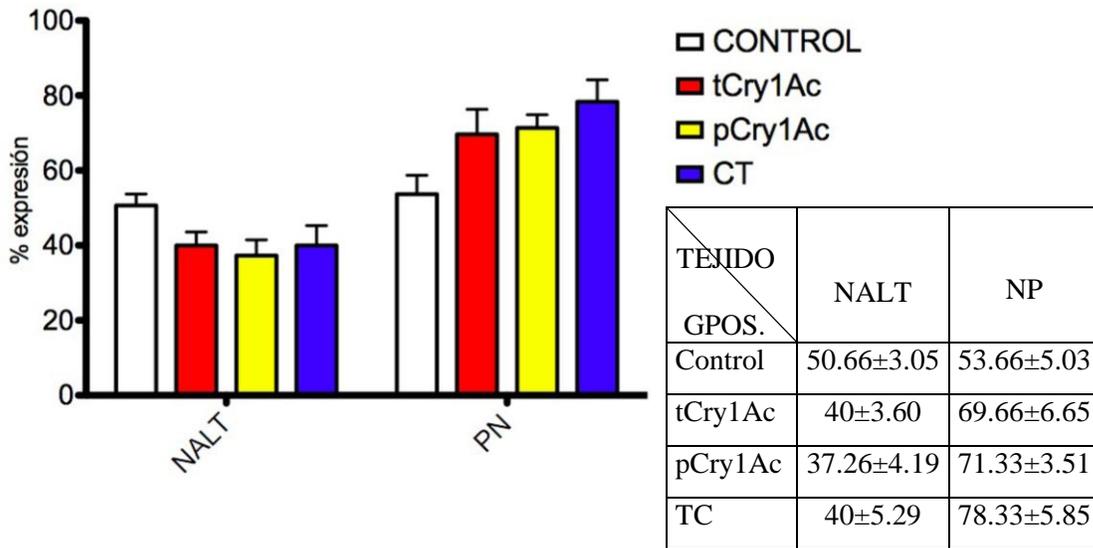
Se obtuvieron los promedios y desviación estándar de los grupos inmunizados en el NALT y pasajes nasales observando lo siguiente: en el análisis de los linfocitos B se observa que los valores de la población son similares en el sitio inductor pero en el grupo inmunizado con la tCry1Ac se encontró el valor más alto ( $54.21 \pm 4.09$ ) sin embargo no hay diferencias significativas con respecto a los grupos inmunizados con TC y pCry1Ac por el contrario en los pasajes nasales o sitio efector se observa un aumento de la población y a diferencia del NALT el valor que sobresale de este tejido es el de TC ( $87.33 \pm 2.51$ ) cabe resaltar que a pesar de que el valor de la TC es más alto, no hay diferencia significativa entre los grupos inmunizados con tCry1Ac y pCry1Ac (Fig. 2).



**Figura 2. Comparación poblaciones de linfocitos B del tejido del NALT y Pasajes Nasales.**

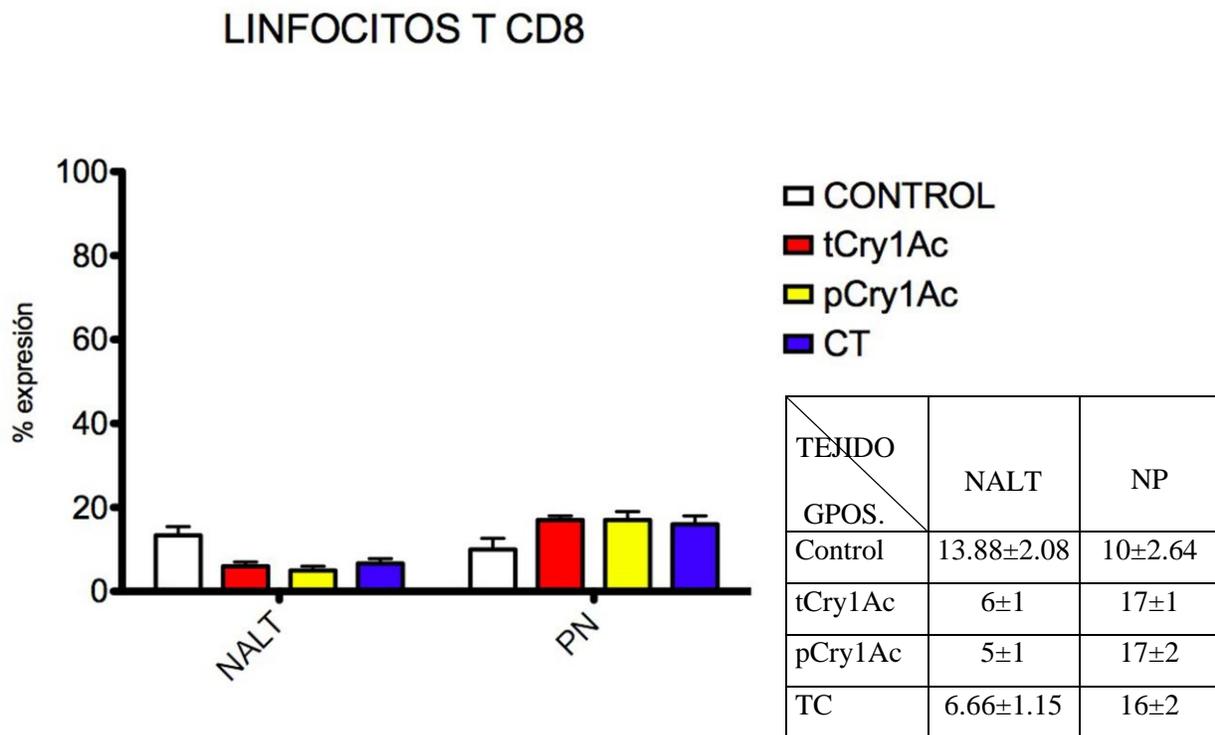
En cuanto a los linfocitos T CD4 en el sitio inductor observamos que los valores de la tCry1Ac y TC son iguales en cuanto a promedio ( $40\pm 3.06$  y  $40\pm 5.29$  respectivamente) sin embargo hay una disminución de la población comparada con el grupo control a diferencia de los pasajes nasales se observa un aumento de la población de los grupos inmunizados con TC, pCry1Ac y tCry1Ac siendo el valor más alto el de toxina de cólera ( $78.33\pm 5.85$ ) sin embargo con lo que respecta a la tCry1Ac y la pCry1Ac no hay diferencias significativas entre estas y la TC (Fig. 3).

LINFOCITOS T CD4



**Figura 3. Comparación de las poblaciones de linfocitos T CD4 de tejido NALT y Pasajes Nasales.**

Por último en el caso de los linfocitos T CD8 en el sitio inductor a diferencia de los resultados anteriores el tamaño de la población es más pequeño siendo el grupo que sobresale la TC ( $6.66 \pm 1.15$ ) cabe resaltar que en valores le sigue la tCry1Ac y pCry1Ac sin embargo no hay diferencias significativas, por otro lado en el sitio efector los valores de la población aumentan significativamente siendo el valor más elevado el de la tCry1Ac ( $16 \pm 2$ ) cabe resaltar que no hay diferencias significativas con los grupos inmunizados con pCry1Ac y TC (Fig. 4).



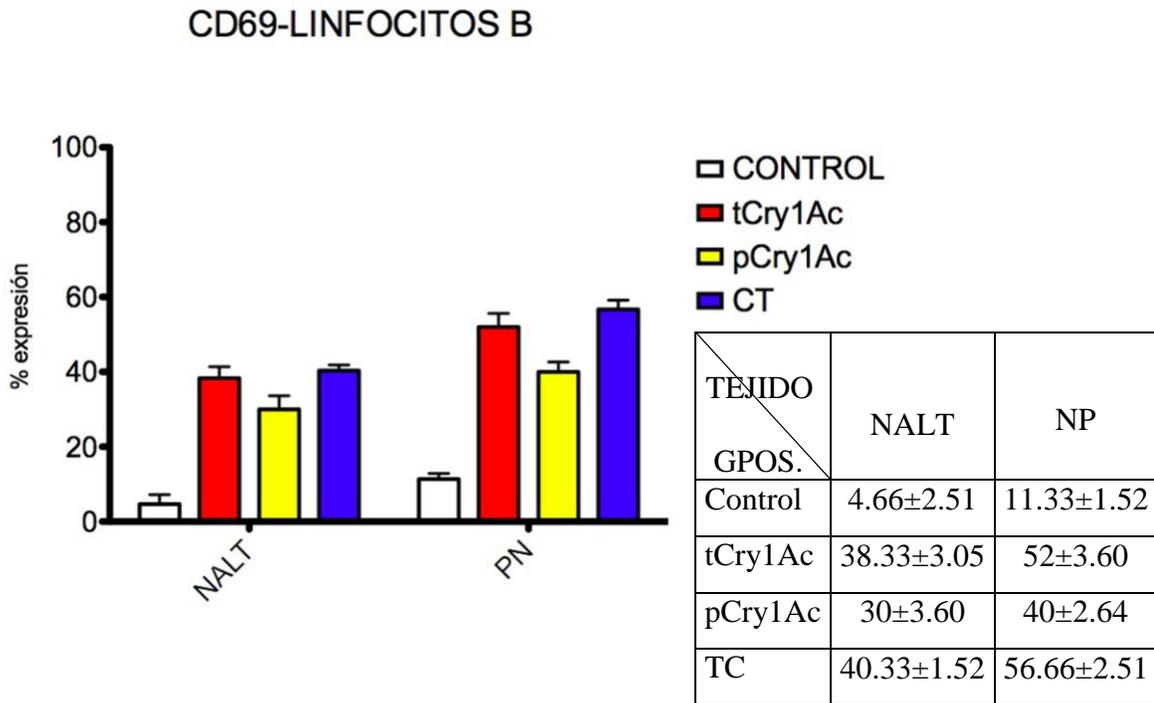
**Figura 4. Comparación de poblaciones de linfocitos T CD8 del tejido del NALT y Pasajes Nasales.**

## **Efecto de la TCry1Ac sobre los marcadores de activación.**

### **CD69.**

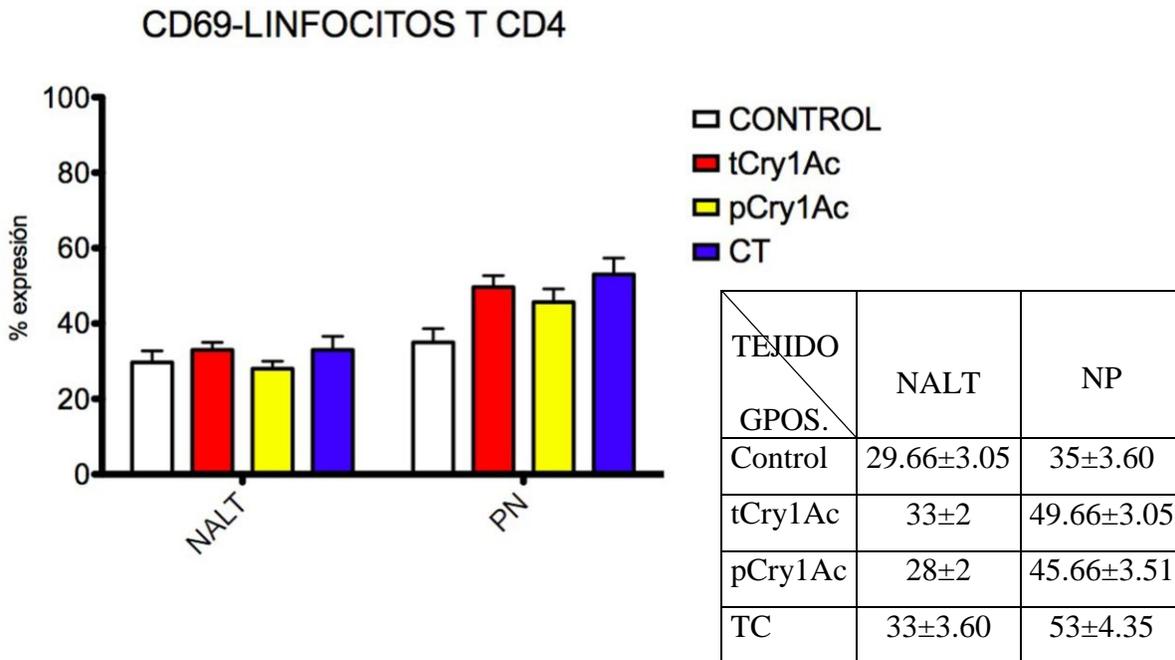
La activación tardía de linfocitos se evaluó mediante la expresión del marcador CD69, este marcador se expresa en la superficie de los linfocitos a partir de las 10 h hasta las 48h, después del estímulo para su activación (46, 47).

Para estudiar el efecto de la tCry1Ac sobre la expresión de los marcadores de activación en linfocitos del NALT y Pasajes Nasales analizados por citometría de flujo observamos que tanto en el sitio inductor como en el efector se presentan incrementos significativos de las poblaciones de los grupos inmunizados; en el NALT las células B del grupo control registraron los porcentajes más bajos de expresión de CD69 ( $4.66 \pm 2.51$ ) resultados posteriores a la inmunización la expresión de CD69 aumentó en los tres grupos y aunque el valor más alto fue el de TC no hay diferencias significativas entre la tCry1Ac y la pCry1Ac. Situación similar se obtuvo en el sitio efector obteniendo el mismo patrón pero con el valor más alto de la TC ( $56.66 \pm 2.51$ ) pero a diferencia del NALT en este sí hay diferencias ya que el valor de la pCry1Ac está por debajo de los valores de la tCry1Ac (Figura 5).



**Figura 5. Comparación de las poblaciones de linfocitos B con marcador de activación CD69 en el NALT y Pasajes Nasales.**

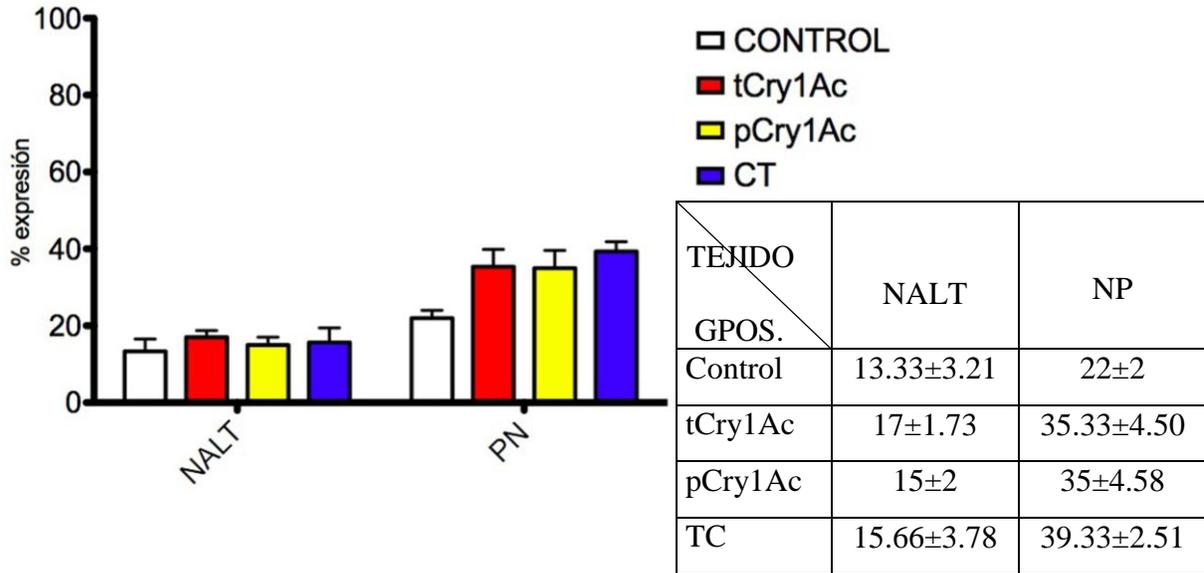
Las células T CD4 del NALT tienen un alto porcentaje de expresión pero no se registran cambios significativos entre los grupos inmunizados (tCry1Ac, pCry1Ac y TC) y el control (33±2, 28±2 y 33±3.6 respectivamente); por el contrario en los pasajes nasales se observa un aumento significativo de los grupos inmunizados con el control, cabe resaltar que el valor más alto es el de TC (53±4.35) si bien es cierto es el valor más alto pero no se observan diferencias significativas con respecto a los grupos inmunizados con la tCry1Ac y la pCry1Ac (Figura 6).



**Figura 6. Comparación de poblaciones de linfocitos T CD4 con marcador de activación CD69 en tejido NALT y Pasajes Nasales.**

Algo parecido ocurre con los linfocitos T CD8 en el sitio inductor el porcentaje de expresión de los linfocitos es muy similar teniendo el valor más alto el de la tCry1Ac ( $17 \pm 1.73$ ) pero no se observan diferencias significativas de los grupos; en lo que respecta a los pasajes nasales hay un aumento de la población en cuanto a la expresión de CD69 de los grupos inmunizados pero la TC es la que tiene mayor porcentaje de expresión ( $39.33 \pm 2.51$ ) sin embargo no se observa diferencias significativas con la tCry1Ac y la pCry1Ac (Figura 7).

CD69-LINFOCITOS T CD8

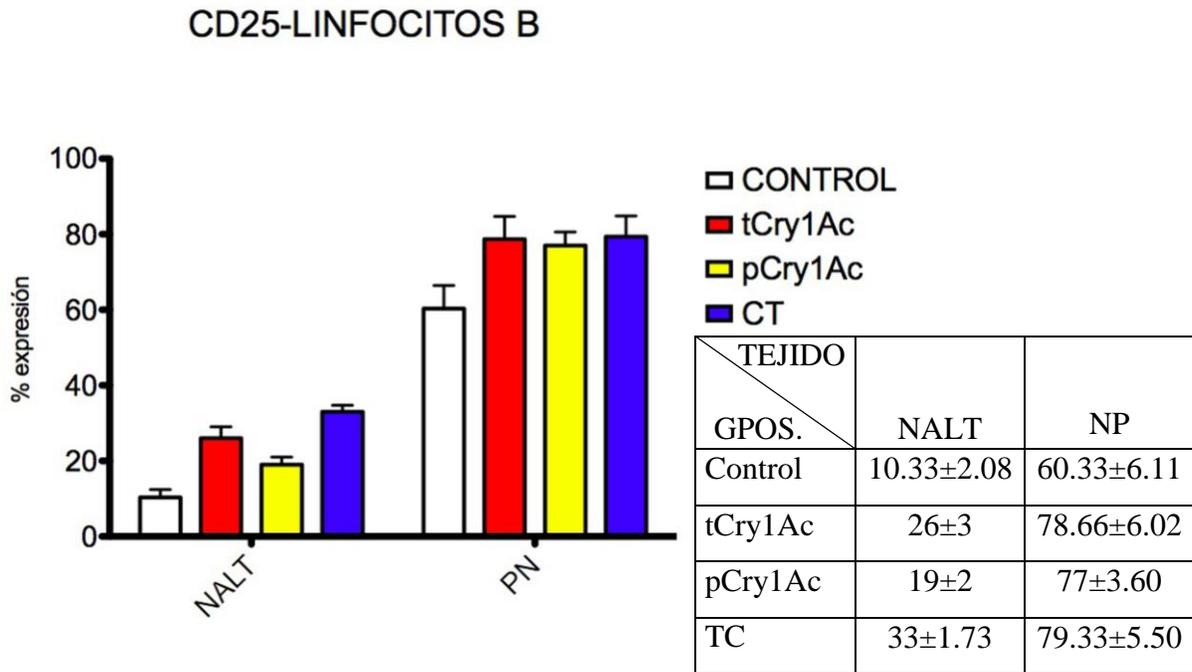


**Figura 7. Comparación de poblaciones de linfocitos T CD8 con marcador de activación CD69 en el NALT y PN.**

## **CD25.**

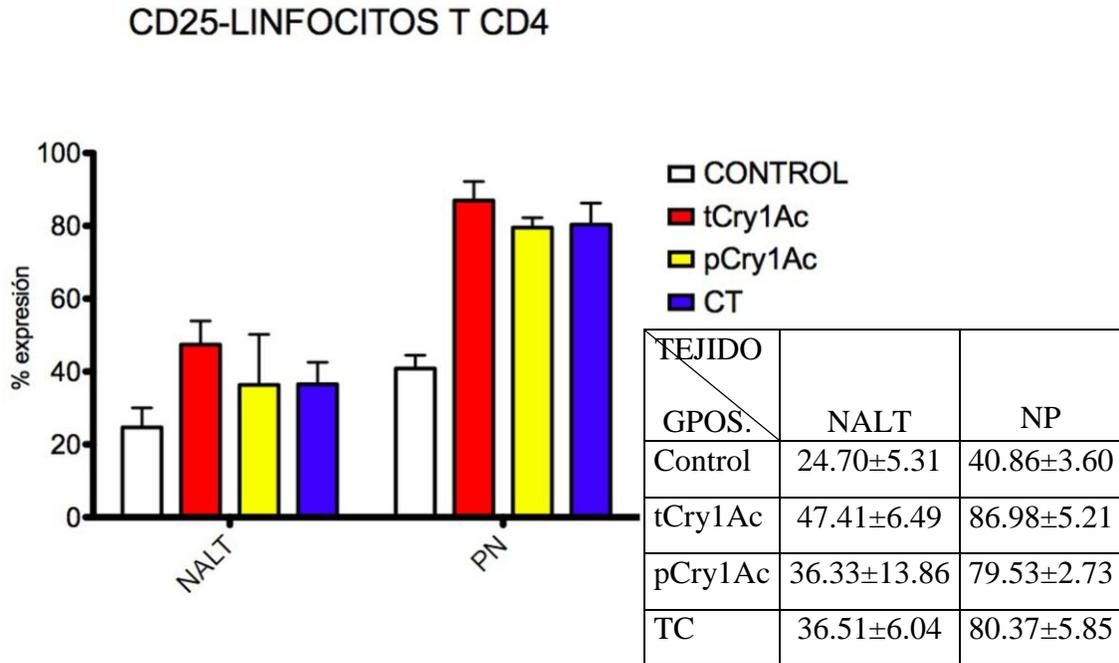
La activación tardía de linfocitos se evaluó mediante la expresión del marcador CD25, este marcador también es conocido como la cadena  $\alpha$  del receptor de la IL-2; cabe mencionar que los linfocitos expresan esta molécula en su superficie a partir de las 24 h hasta las 96 h, después del estímulo para su activación (46, 47).

Con respecto al NALT la expresión de CD25 en los grupos inmunizados la TC representa el mayor porcentaje de expresión de linfocitos B ( $33\pm 1.73$ ) con respecto al grupo control, sin embargo la tCry1Ac a pesar de que también se tiene un valor considerable en cuanto a la expresión de CD25 ( $26\pm 3$ ) se observa diferencia significativa con respecto a la TC. Como era de esperarse en el sitio efector se encontró un mayor número de células que expresaban a CD25 expresando mayor valor el de la TC ( $79.33\pm 5.50$ ) pero a diferencia del NALT en este no se observan diferencias significativas entre la tCry1Ac y pCry1Ac ( $78.66\pm 6.02$  &  $77\pm 3.60$ ) (Figura 8)



**Figura 8. Comparación de poblaciones de linfocitos B con marcador de activación CD25 del NALT y Pasajes Nasales.**

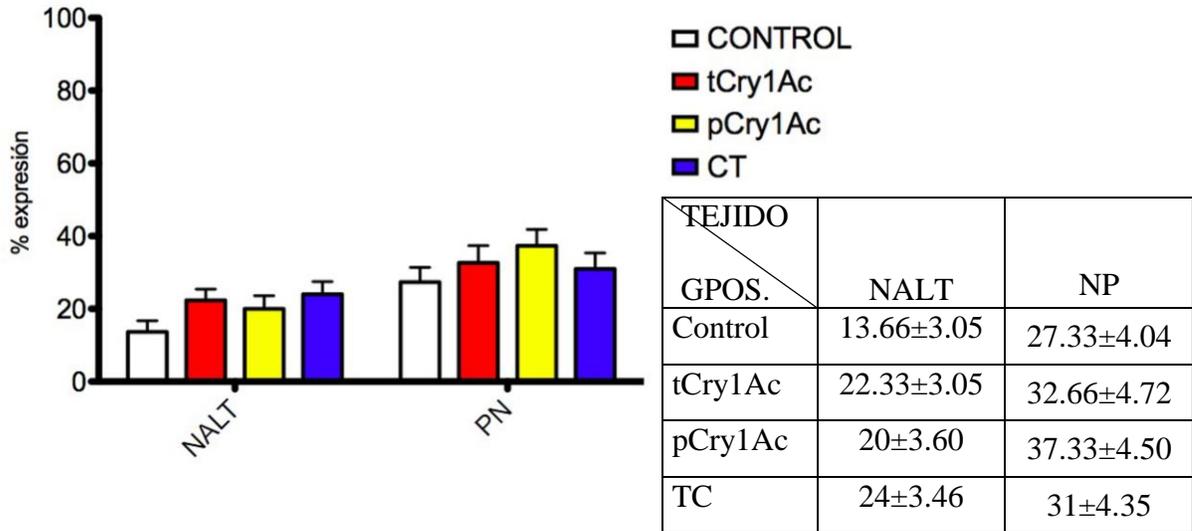
En lo que se refiere a las células T CD4 que expresan CD25 se observa que tanto el NALT como los pasajes nasales la expresión de este marcador aumenta casi al doble en la tCry1Ac con respecto del grupo control ( $47.41 \pm 6.49$  &  $24.70 \pm 5.31$  respectivamente) cabe destacar que los valores tanto de la pCry1Ac y TC no hay diferencias significativas pero con respecto a la tCry1Ac si se observa una diferencia con respecto a la TC. En pasajes nasales a pesar de que el comportamiento de expresión de la tCry1Ac con respecto al grupo control ( $86.98 \pm 5.21$  &  $40.86 \pm 3.60$ ) en cuanto a los demás grupos inmunizados no se observan diferencias significativas entre ellos (Figura 9).



**Figura 9. Comparación de poblaciones de linfocitos T CD4 con marcadores de activación CD25 en el NALT y Pasajes Nasales.**

Finalmente aunque los linfocitos CD8 presentan los porcentajes más bajos de poblaciones de NALT y pasajes nasales, el porcentaje de expresión de CD25 también se incrementa en ambos tejidos en los grupos inmunizados; pero en cuanto al NALT la TC es el grupo con mayor porcentaje de expresión ( $24 \pm 3.46$ ) sin embargo los grupos de tCry1Ac y pCry1Ac con respecto a la TC no se obtiene diferencias significativas. Por el contrario a pesar de que en los pasajes nasales el aumento del porcentaje de expresión es mayor en la pCry1Ac ( $37.33 \pm 4.50$ ) con respecto a los grupos de la tCry1Ac y TC no se observan diferencias significativas con respecto al grupo control (Figura 10).

CD25-LINFOCITOS T CD8



**Figura 10. Comparación de las poblaciones de linfocitos T CD8 con marcador de activación CD25 en el NALT y Pasajes Nasales.**

## **Discusión.**

Con los resultados obtenidos en este trabajo se presenta por primera vez el efecto de la tCry1Ac sobre las poblaciones linfocitarias del tejido linfoide asociado a la nasofaringe y pasajes nasales

A la fecha se contaba con el antecedente de los estudios realizados con la pCry1Ac desde el punto de vista inmunomodulador pero ya que en varios alimentos transgénicos lo que consume el humano es la tCry1Ac resultaba importante evaluar las propiedades inmunogenicas de esta proteína.

La tCry1Ac modifica considerablemente las poblaciones de linfocitos B, T CD4 y T CD8 tanto en el sitio inductor (NALT) como en el sitio efector (PN) de la mucosa nasal este efecto resulto ser igual que la TC y mayor que la pCry1Ac según lo reportado por Rodríguez (37). Es importante resaltar que con respecto a los linfocitos T CD4 se observa una disminución de las poblaciones celulares en el NALT y un incremento de estas poblaciones en los PN después de la inmunización con la tCry1Ac. Estos datos aunados al aumento de la expresión de CD69 podrían estar sugiriendo que hay una migración de las células del sitio inductor al sitio efector y concuerda con lo reportado por de la Fuente (49) donde sugiere que la expresión de CD69 juega un papel importante en la regulación de la migración de las células T.

Otro efecto importante es el aumento de la expresión de CD25 sobre todo en las células T CD4 y linfocitos B es importante recordar que la función principal de CD25 es la activación tardía de linfocitos, este marcador también

es conocido como la cadena  $\alpha$  del receptor de la IL-2; cabe mencionar que los linfocitos expresan esta molécula en su superficie a partir de las 24 h hasta las 96 h, después del estímulo para su activación (46, 47); nuestros datos corroboran lo reportado por Nieto (50, 51) donde menciona que inmunizando con la pCry1Ac como con la TC observa que hay respuestas inmunes de tipo Th1 y Th2 aunque con un alta predominancia hacia Th2, si tomamos en cuenta que nuestros resultados muestran un aumento importante en las células de los linfocitos T CD4 y B de manera indirecta corroboramos una respuesta humoral (Th2) y aunque si bien es cierto encontramos aumento de linfocitos T CD8 los valores son muy pequeños y concuerdan con lo que Nieto refiere a la combinación de estos dos tipos de respuesta (50, 51).

Tomando en conjunto todos nuestros resultados tanto en número de población tanto en el aumento de los marcadores de activación podemos sugerir una respuesta humoral (producción de anticuerpos) lo que concuerda con datos previos en el laboratorio donde Castillo (49) reporta que al inmunizar con la tCry1Ac había una alta producción de anticuerpos IgA e IgG en la mucosa nasal y al igual que Rojas (42) al inmunizar con la protoxina CrY1Ac define que el uso de esta protoxina induce respuesta Th2.

El análisis estadístico nos revela que en muchos de los casos no hay diferencias significativas al inmunizar con tCry1Ac, pCry1Ac y TC sin embargo como lo muestran las gráficas en la mayoría de los casos la respuesta ante la inmunización con la tCry1Ac fue mayor que con la Pcry1Ac e igual que con la TC lo que nos lleva a considerarla como un buen candidato para ser utilizado como adyuvante de mucosas sin las desventajas que presenta la TC

aunque aún queda por estudiar otros efectos que pudieran estar involucrados en su inmunogenicidad.

### **Conclusiones.**

La tCry1Ac es un potente adyuvante ya que provoca cambio en los porcentajes de las poblaciones de los linfocitos B, T CD4 y TCD8.

La tCry1Ac aumenta la expresión de los marcadores de activación CD69 y CD25 de manera indirecta favorece la respuesta Th2 acompañada con una producción de anticuerpos por lo que la proponemos como un adyuvante.

Además podemos decir que no hay diferencias significativas al inmunizar con TCry1Ac, pCry1Ac y TC en las poblaciones linfocitarias del NALT y PN.

## Referencias.

1. Czerkinsky C, Russell MW, Lycke N, Lindblad M and Holmgren J. Oral administration of a streptococcal antigen coupled to cholera toxin B subunit evokes strong antibody responses in salivary glands and extramucosal tissues. *Infect Immun* 1989; 57: 1072-1077.
2. Spit BJ, Hendriksen EG, Bruijntjes JP and Kuper CF. Nasal lymphoid tissue in the rat. *Cell Tissue Res* 1989; 255: 193-198.
3. Koornstra PJ, de Jong FI, Vlek LF, Marres EH and van Breda Vriesman PJ. The Waldeyer ring equivalent in the rat. A model for analysis of oronasopharyngeal immune responses. *Acta Otolaryngol* 1991; 111: 591-599.
4. 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.
5. Kuper CF, Koornstra PJ, Hameleers DM et al. The role of nasopharyngeal lymphoid tissue. *Immunol Today* 1992; 13: 219-224.
6. Csencsits KL, Jutila MA and Pascual DW. 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* 1999; 163: 1382-1389.

7. Asanuma H, Thompson AH, Iwasaki T et al. Isolation and characterization of mouse nasal-associated lymphoid tissue. *J Immunol Methods* 1997; 202: 123-131.
8. Bergquist C, Johansson EL, Lagergard T, Holmgren J and Rudin A. 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* 1997; 65: 2676-2684.
9. Imaoka K, Miller CJ, Kubota M et al. Nasal immunization of nonhuman primates with simian immunodeficiency virus p55gag and cholera toxin adjuvant induces Th1/Th2 help for virus-specific immune responses in reproductive tissues. *J Immunol* 1998; 161: 5952-5958.
10. Kiyono H and Fukuyama S. NALT- versus Peyer's-patch-mediated mucosal immunity. *Nat Rev Immunol* 2004; 4: 699-710.
11. Kurono Y, Yamamoto M, Fujihashi K et al. Nasal immunization induces *Haemophilus influenzae*-specific Th1 and Th2 responses with mucosal IgA and systemic IgG antibodies for protective immunity. *J Infect Dis* 1999; 180: 122-132.
12. Langermann S, Palaszynski S, Sadziene A, Stover CK and Koenig S. Systemic and mucosal immunity induced by BCG vector expressing outer-surface protein A of *Borrelia burgdorferi*. *Nature* 1994; 372: 552-555.

13. Wu HY and Russell MW. 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.
14. Yanagita M, Hiroi T, Kitagaki N et al. 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.
15. Zuercher AW. Upper respiratory tract immunity. *Viral Immunol* 2003; 16: 279-289.
16. Di Tommaso A, Saletti G, Pizza M et al. Induction of antigen-specific antibodies in vaginal secretions by using a nontoxic mutant of heat-labile enterotoxin as a mucosal adjuvant. *Infect Immun* 1996; 64: 974-979.
17. Hirabayashi Y, Kurata H, Funato H et al. Comparison of intranasal inoculation of influenza HA vaccine combined with cholera toxin B subunit with oral or parenteral vaccination. *Vaccine* 1990; 8: 243-248.
18. Muller CP, Beauverger P, Schneider F, Jung G and Brons NH. Cholera toxin B stimulates systemic neutralizing antibodies after intranasal co-immunization with measles virus. *J Gen Virol* 1995; 76 ( Pt 6): 1371-1380.

19. Wu HY, Nguyen HH and Russell MW. Nasal lymphoid tissue (NALT) as a mucosal immune inductive site. *Scand J Immunol* 1997; 46: 506-513.
20. Wu HY and Russell MW. Nasal lymphoid tissue, intranasal immunization, and compartmentalization of the common mucosal immune system. *Immunol Res* 1997; 16: 187-201.
21. Elson CO, Dertzbaugh M.T. In *Mucosal Immunology*, ed. Lamm M, Mc Ghee JR., Mestecky J., Strober W., Bienestock J., San Diego, CA: Academic Press; 1994: 817-838.
22. Elson CO and Ealding W. Cholera toxin feeding did not induce oral tolerance in mice and abrogated oral tolerance to an unrelated protein antigen. *J Immunol* 1984; 133: 2892-2897.
23. Lycke N, Karlsson U, Sjolander A and Magnusson KE. The adjuvant action of cholera toxin is associated with an increased intestinal permeability for luminal antigens. *Scand J Immunol* 1991; 33: 691-698.
24. Clements JD, Hartzog NM and Lyon FL. Adjuvant activity of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin and effect on the induction of oral tolerance in mice to unrelated protein antigens. *Vaccine* 1988; 6: 269-277.
25. Spangler BD. Structure and function of cholera toxin and the related *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. *Microbiol Rev* 1992; 56: 622-647.

26. Dickinson BL and Clements JD. Dissociation of Escherichia coli heat-labile enterotoxin adjuvanticity from ADP-ribosyltransferase activity. *Infect Immun* 1995; 63: 1617-1623.
27. Partidos CD, Pizza M, Rappuoli R and Steward MW. 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* 1996; 89: 483-487.
28. Yamamoto S, Kiyono H, Yamamoto M et al. A nontoxic mutant of cholera toxin elicits Th2-type responses for enhanced mucosal immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94: 5267-5272.
29. Moreno-Fierros L, Garcia N, Gutierrez R, Lopez-Revilla R and Vazquez-Padron RI. 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* 2000; 2: 885-890.
30. Moreno-Fierros L, Perez-Ordóñez I and Palomar-Morales M. Slight influence of the estrous cycle stage on the mucosal and systemic specific antibody response induced after vaginal and intraperitoneal immunization with protoxin Cry1Ac from Bacillus thuringiensis in mice. *Life Sci* 2002; 71: 2667-2680.

31. Moreno-Fierros L, Ruiz-Medina EJ, Esquivel R, Lopez-Revilla R and Pina-Cruz S. Intranasal Cry1Ac protoxin is an effective mucosal and systemic carrier and adjuvant of *Streptococcus pneumoniae* polysaccharides in mice. *Scand J Immunol* 2003; 57: 45-55.
32. Rojas-Hernandez S, Rodriguez-Monroy MA, Lopez-Revilla R, Resendiz-Albor AA and Moreno-Fierros L. Intranasal coadministration of the Cry1Ac protoxin with amoebal lysates increases protection against *Naegleria fowleri* meningoencephalitis. *Infect Immun* 2004; 72: 4368-4375.
33. Vazquez RI, Moreno-Fierros L, Neri-Bazan L, De La Riva GA and Lopez-Revilla R. *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac protoxin is a potent systemic and mucosal adjuvant. *Scand J Immunol* 1999; 49: 578-584.
34. Vazquez-Padron RI, Moreno-Fierros L, Neri-Bazan L, de la Riva GA and Lopez-Revilla R. Intra-gastric and intraperitoneal administration of Cry1Ac protoxin from *Bacillus thuringiensis* induces systemic and mucosal antibody responses in mice. *Life Sci* 1999; 64: 1897-1912.
35. Vazquez-Padron RI, Moreno-Fierros L, Neri-Bazán L, Martinez-Gil AF, de-la-Riva GA and Lopez-Revilla R. Characterization of the mucosal and systemic immune response induced by Cry1Ac protein from *Bacillus thuringiensis* HD 73 in mice. *Braz J Med Biol Res* 2000; 33: 147-155.
36. Vázquez RI, Moreno-Fierros L, Neri-Bazán L, De la Riva GA and López-Sevilla R. *Scand J Immunol* 1999;49:578-584.

37. Rodriguez-Monroy MA, Rojas-Hernandez S and Moreno-Fierros L. Phenotypic and functional differences between lymphocytes from NALT and nasal passages of mice. *Scand J Immunol* 2007; 65: 276-288.
38. Rodriguez-Monroy MA and Moreno-Fierros L. Strikin activation of NALT and Nasal Passages limphocytes induce by intranasal immunization with Cry1Ac protoxin. *Scandinavian Journal of Immunology* 2010; 71:159-168.
39. Wu HY, Nikolova EB, Beagley KW and Russell MW. Induction of antibody-secreting cells and T-helper and memory cells in murine nasal lymphoid tissue. *Immunology* 1996; 88: 493-500.
40. Moreno-Fierros L, Garcia N, Gutierrez R, Lopez-Revilla R, Vazquez-Padron RI. 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* 2000; 2:885–90.
41. Vazquez-Padron RI, Moreno-Fierros L, Neri-Bazan L, De la Riva GA, Lopez-Revilla R. Intra gastric and intraperitoneal administration of Cry1Ac protoxin from *Bacillus thuringiensis* induces systemic and mucosal antibody responses in mice. *Life Sci* 1999; 64:1897–912.

42. Rojas-Hernandez S, Rodriguez-Monroy MA, Lopez-Revilla R, Resendiz-Albor AA, Moreno-Fierros L. Intranasal coadministration of the Cry1Ac protoxin with amoebal lysates increases protection against *Naegleria fowleri* meningoencephalitis. *Infect Immun* 2004;72:4368–75.
43. Elson CO, Ealding W. Cholera toxin feeding did not induce oral tolerance in mice and abrogated oral tolerance to an unrelated protein antigen. *J Immunol* 1984;133:2892–7.
44. Moreno-Fierros L, Ruiz-Medina EJ, Esquivel R, Lopez-Revilla R, Pina-Cruz S. Intranasal Cry1Ac protoxin is an effective mucosal and systemic carrier and adjuvant of *Streptococcus pneumoniae* polysaccharides in mice. *Scand J Immunol* 2003;57:45–55.
45. Lycke N, Karlsson U, Sjolander A, Magnusson KE. The adjuvant action of cholera toxin is associated with an increased intestinal permeability for luminal antigens. *Scand J Immunol* 1991;33:691–8.
46. D’Alessio FR, Tsushima K, Aggarwal NR, West EE, Willett MH, Britos MF, Pipeling MR, Brower RG, Tudor RM, McDyer JF, King LS. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Tregs resolve experimental lung injury in mice and are present in humans with acute lung injury. *J. Clin. Invest.* 2009 119:2898–2913.
47. Wang M, Windgassen D, Papoutsakis ET. Comparative analysis of transcriptional profiling of CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells identifies novel immune response players in T-Cell activation. *BMC Genomics* 2008; 9:225.

48. De la Fuente H, Cibrian D, Sanchez-Madrid F. Immunoregulatory molecules are master regulators of inflammation during the response. *FEBS Letters* 2012; 2897-2905.

49. Castillo-Rodríguez O. Caracterización del efecto adyuvante de la toxina Cry1Ac. Tesis de Licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México 2012; p.p.53.

50. Nieto-Yáñez O de J. Efecto de la inmunización intranasal con toxina de cólera y extractos de *N. fowleri* en las poblaciones linfocitarias y la producción de citocinas en el NALT, pasajes nasales y ganglios cervicales en ratones BALB/c. Tesis de Maestría, Instituto Politécnico Nacional, 2012 p.p.65.

51. Nieto-Yáñez O de J. Caracterización de la respuesta inmune en el NALT después de la inmunización con pCry1Ac en la infección por *Naegleria fowleri* Tesis de Licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México, 2010 p.p.55.