



**UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

MAESTRIA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

**“Evaluación de la respuesta inmunitaria de ratones  
inmunizados con una vacuna de ADN con el gen *prn* de  
*Bordetella bronchiseptica*”**

TESIS  
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
MAESTRÍA EN CIENCIAS

PRESENTA:  
M.V.Z. CLAUDIA ELISA VALDEZ MIRAMONTES

TUTOR PRINCIPAL:  
DR. ANTONIO VERDUGO RODRIGUEZ.  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA, UNAM

COMITÉ TUTORAL:  
DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA, FES CUAUTITLAN, UNAM

DR. LUIS PADILLA NORIEGA  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS, UNAM

INVITADO ACADÉMICO  
DR. FRANCISCO BASURTO ALCÁNTARA  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA, UNAM

MÉXICO, DF, AGOSTO DE 2013



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **DEDICATORIA**

Este trabajo lo dedico a Dios.

A mis padres por darme el ejemplo de amor más grande y enseñarme el camino correcto.

A mis hermanos por estar siempre allí, a pesar de la distancia, por ser mi apoyo en los momentos de flaqueza.

A Lázaro Verdiguél por ser mi familia y apoyo incondicional durante estos años.

A mi por no desistir.

## AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo fue financiado por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) con el proyecto: IN 228710

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el otorgamiento de la beca para estudios de posgrado.

Al Dr. Francisco Basurto Alcántara por creer siempre en mi, por depositar en mi su confianza para continuar con el proyecto que creó y por su orientación en todo momento.

Al Antonio Verdugo Rodríguez por exigirme disciplina y perseverancia, y hacerme ver que el límite de lo posible e imposible es la voluntad.

Al Dr. Juan Antonio Montaraz Crespo por compartir conmigo sus conocimientos que fueron fundamentales para comprender la base de este trabajo.

Al Dr. Luis Padilla Noriega por sus valiosas aportaciones a este trabajo.

Al Dr. Angel Retana Reyes por sus útiles asesorías.

Al Dr. Alfredo Castañeda Ramírez por su disposición en todo momento para atender dudas y darme asesorías.

A las MVZ Mónica Nuncio y Ninnet Gómez por su apoyo en las técnicas de cultivo celular.

A las MVZ Diana González, Aideé y a la M. en C. Victoria Elizabeth Castellón Ahumada por su colaboración en la estandarización de la técnica de Western Blot.

Al Dr. José Alberto Cano que con su experiencia y disposición siempre aclaró mis dudas, y por su colaboración para facilitar la realización de las pruebas de ELISA

Al Sr. Raúl Hernández Aragón por su valioso apoyo en la preparación de reactivos y materiales.

Al Sr. Eduardo Miranda López por su colaboración en el cuidado de los ratones utilizados en este trabajo.

## CONTENIDO

RESUMEN  
ABSTRACT

<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	
1. Antecedentes históricos de <i>B. bronchiseptica</i>	2
2. Morfología y características de cultivo	3
3. Propiedades bioquímicas	4
4. Factores de virulencia.	5
5. Patogénesis e inmunidad.	15
6. Lesiones.	18
7. Manifestaciones clínicas.	19
8. Diagnóstico.	21
9. Transmisión y epidemiología.	22
10. Vacunas y bacterinas.	23
11. Vacunas de ADN	25
<b>II. JUSTIFICACIÓN</b>	31
<b>III. HIPÓTESIS</b>	33
<b>IV. OBJETIVO GENERAL</b>	35
<b>V. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.</b>	37

## **VI. MATERIAL Y MÉTODOS.**

1. Obtención y purificación del pBH7D46	40
2. Ensayo de restricción del pBH7D46.	41
3. Purificación para secuenciación del pBH7D46.	41
4. Extracción de proteínas de membrana externa de <i>B. bronchiseptica</i>	41
5. Extracción de proteínas totales de <i>B. bronchiseptica</i>	42
6. Cuantificación de proteínas.	43
7. Electroforesis de proteínas en gel de acrilamida.	43
8. Estandarización de la técnica de Western Blot.	43
9. Cultivo en células Hela	45
10. Ensayo de transfección con el pBH7D46	45
11. Extracción de proteínas totales de células Hela transfectadas con el pBH7D46	46
12. Precipitación de proteínas del sobrenadante con el pBH7D46.	46
13. Estandarización de la técnica de ELISA para detección de anticuerpos contra <i>B. bronchiseptica</i>	47
14. Metodología de la técnica de ELISA para detección de anticuerpos contra <i>B. bronchiseptica</i> .	48
15. Evaluación de los sueros para la determinación de la concentración de citocinas.	49
16. Manejo de ratones balb/c	49
17. Diseño experimental.	50
18. Análisis estadístico.	51

## **VII. RESULTADOS.**

1. Obtención del pBH7D46	54
2. Ensayo de restricción del pBH7D46	55
3. Mapa del pBH7D46	56
4. Purificación del pBH7D46.	57
5. Secuenciación	58
6. Evaluación bioquímica de la cepa p98.	59
7. Análisis de Western Blot.	63
8. Respuesta inmunitaria humoral a la vacunación en ratones.	66
9. Determinación de la concentración de citocinas post vacunación.	67

<b>VIII. DISCUSIÓN</b>	<b>72</b>
------------------------	-----------

<b>IX. CONCLUSIONES</b>	<b>81</b>
-------------------------	-----------

<b>X. PROSPECTIVAS</b>	<b>82</b>
------------------------	-----------

<b>XI. REFERENCIAS</b>	<b>83</b>
------------------------	-----------

## INDICE DE CUADROS Y FIGURAS

<b>Cuadro</b>	<b>Título</b>	<b>Página</b>
1	Pruebas bioquímicas para la identificación de <i>Bordetella bronchiseptica</i> .	4
2	Ventajas del uso de vacunas de ADN.	29
3	Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la pertactina de <i>B. bronchiseptica</i> P98 con la secuencia obtenida del inserto del pBH7D46.	61
4	Pruebas bioquímicas realizadas.	62

<b>Figura</b>	<b>Título</b>	<b>Página</b>
1	Fotografía del gel de agarosa con el pBH7D46.	57
2	Ensayo de restricción <i>in silico</i> del pBH7D46.	58
3	Fotografía del gel de agarosa con el pBH7D46 digerido con la enzima <i>EcoRV</i> .	58
4,5	Mapa del pBH7D46.	59
6	Fotografía del gel de agarosa con la purificación del pBH7D46.	60
7	Fotografía del gel de acrilamida con proteínas de membrana externa de <i>B. bronchiseptica</i> .	63
8	Reacción tipo Western Blot con las proteínas de membrana externa de <i>B. bronchiseptica</i> que reaccionaron con un anticuerpo monoclonal contra la pertactina y un conjugado anti ratón.	64
9	Fotografías de células Hela transfectadas.	65
10	Reacción tipo Western Blot con proteínas del sobrenadante del cultivo de células Hela transfectadas con el pBH7D46 y que reaccionaron con un anticuerpo monoclonal contra la pertactina y un conjugado anti IgG de ratón.	66
11	Reacción tipo Western Blot con proteínas totales del cultivo de	67

células Hela transfectados con el pBH7D46 y que reaccionaron con un anticuerpo monoclonal contra la pertactina y un conjugado anti IgG de ratón.

12	Evaluación de la respuesta inmunitaria humoral a la vacunación de los ratones.	68
13	Determinación de la concentración de IL-2 post vacunación.	69
14	Determinación de la concentración de INF $\gamma$ post vacunación.	70
15	Determinación de la concentración de IL-10 post vacunación.	71
16	Determinación de la concentración de IL-4 post vacunación.	72



## ABREVIATURAS UTILIZADAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AMP	Monofosfato de adenosina
Aa	Aminoácido
ARN	Ácido ribonucleico
ATP	Tri- Trifosfato de adenosina
BHI	Brain hearth infusion; Infusión cerebro corazón
Brk	Bordetella resistance killing; gen que confiere resistencia al complemento
Bvg	Bordetella virulence gene; gen regulador de la virulencia de Bordetella
BvgA	Proteína activadora del sistema bvg
BvgR	Proteína represora del sistema bvg
bvgS	Proteína sensora del sistema
BSA	Albumina sérica bovina
Bp	Pares de bases
<i>Bsc</i>	Locus de <i>B. bronchiseptica</i> que contiene 29 genes que codifican para el SSTIII
C-terminal	Extremo carboxilo terminal
CD4+	Cluster of differentiation 4; molécula que se expresa en la superficie de algunas células T y en las células dendríticas.
CD86	Cluster of differentiation 8; es una molécula que se expresa en la superficie de algunas células T, conocidos como citolíticas.
CD11b	Molécula expresada en la superficie de leucocitos, macrófagos y otros tipos celulares.
CMV	Citomegalovirus
Cm	centímetro
CyaA	Toxina adenilato ciclasa
FhaB	Gen que codifica para la proteína precursora de la hemaglutinina filamentosa
FhaC	Proteína accesoria que facilita la translocación de la hemaglutinina filamentosa a través de la membrana externa
<i>Fim</i>	Gen que codifica para las proteínas de la fimbria
GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; proteína secretada por macrófagos, células T, células endoteliales y fibroblastos.
GTP	Guanosín trifosfato
HTE	hamster tracheal epithelial cells
IFN	Interferón
IgG	Inmunoglobulina G
IL	Interleucina
JMP	Joint Monitoring Programme; programa computacional para analizar datos estadísticamente
kDa	Kilodalton
Km	Kanamicina
LB	Luria Bertani
LPS	Lipopolisacárido
Th1,Th2	Linfocitos T cooperadores del subgrupo 1 y 2
M	Molar
mA	Miliampere
µg	Microgramo.
mL	Mililitro.
Mm	Miligramo.
µl	Microlitro.

Mm	Milímetro.
Min	Minuto.
MANOVA	Análisis multivariado de la varianza.
MC3T3	Línea celular precursora de osteoblastos derivada de ratón.
MHC	Molécula de histocompatibilidad.
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Fosfato de sodio anhidro
Ng	Nanogramo
Nm	Nanómetro
N-termina	Extremo amino terminal
NFκB	Factor nuclear kappa B
NIH	National Institute of Health
pH	Potencial hidrogeniones
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PME	Proteínas de membrana externa
Prn	Pertactina
<i>prn</i>	Gen de pertactina
RGD	Arginina, glicina, ácido aspártico
RisA	Proteína Activadora del sistema ris
risAS	Genes del sistema de resistencia al estrés oxidativo intracelular
RisS	Proteína sensora del sistema ris
RTX	citotoxinas formadoras de poros
SDS	Dodecil-sulfato de sodio
SDS-PAGE	Gel de poliacrilamida con SDS
SPSS	Factor de necrosis tumoral
SSTIII	Sistema de secreción tipo III
SSAF	solución salina amortiguadora de fosfatos
TNF	Factor de necrosis tumoral
<i>vag</i>	<i>Virulence activated gene</i> ; gen activado de virulencia
Vag8	Proteína 8 del sistema vag
<i>Wbm</i>	Locus de <i>B. bronchiseptica</i> consistente en 12 genes requerido para la osíntesis del LPS
<i>Wlm</i>	Locus de <i>B. bronchispetica</i> que codifica para el antígeno O del LPS de <i>B. bronchiseptica</i>

## RESUMEN

*Bordetella bronchiseptica* es un bacilo corto, Gram negativo, aerobio y móvil. Es el agente causal de problemas respiratorios en diversas especies animales, incluyendo al hombre. Se han identificado factores de virulencia con los cuales *B. bronchiseptica* se adhiere y afecta al tracto respiratorio. La pertactina es una proteína que forma parte del Sistema de secreción tipo V y que genera inmunidad protectora. Se evaluó una vacuna de ADN (pBH7D46) que contiene el gen de la pertactina (*prn*) de *Bordetella bronchiseptica*. Se utilizaron 6 grupos de ratones Balb/C para evaluar las propiedades inmunogénicas de la vacuna de ADN al aplicarla por dos vías y dosis diferentes. Se determinó la respuesta humoral mediante la detección de anticuerpos, así como la concentración sérica de las citocinas IL-2, IL-4, IL-10, INF $\gamma$  mediante ELISA y se comparó contra la respuesta inmunitaria obtenida de ratones inoculados con una bacterina de *B. bronchiseptica* con adyuvante, así como con los testigos negativos. Se encontró que la respuesta de anticuerpos IgG fue menor en los ratones inmunizados con la vacuna de ADN que los vacunados con la bacterina ( $p < 0.05$ ). Al evaluar las dos vías de inmunización, se observó que los grupos inmunizados con la vacuna de ADN por vía intramuscular, indujeron significativamente la producción de anticuerpos IgG, mientras que los ratones inmunizados por vía intranasal se comportaron igual que el grupo testigo negativo ( $p < 0.05$ ). En los ratones inmunizados por vía intramuscular con la vacuna de ADN el título de anticuerpos seroconvirtió contra la pertactina entre el día 14 y el día 29, mientras que los inoculados por vía intranasal no desarrollaron anticuerpos aún con una segunda inmunización. El grupo vacunado con la dosis de 150  $\mu\text{g}$  de ADN por la vía IM no mostró diferencias significativas con respecto al grupo que recibió la dosis de 100  $\mu\text{g}$ , en las dos evaluaciones realizadas. Los resultados obtenidos con la prueba de ELISA para determinar la concentración de IL-2, INF $\gamma$ , IL-4 e IL-10 en el suero de los ratones inmunizados mostraron una respuesta mayor de IL-2 e INF $\gamma$  comparada con IL-4 ( $p < 0.05$ ) lo cual es sugerente de una respuesta por linfocitos tipo Th1. A diferencia de la producción de anticuerpos se pudo observar que los ratones inmunizados por vía intranasal mostraron síntesis de las citocinas evaluadas aunque en menor concentración ( $p < 0.05$ ) comparada con los inmunizados por vía intramuscular. Asimismo, los ratones inmunizados con la bacterina mostraron una concentración significativamente mayor de IgG sérica ( $p < 0.05$ ) comparado con los inmunizados con los vacunados con la vacuna de ADN por vía IM. Considerando que la vacuna de ADN pBH7D46 indujo la síntesis de IgG sérica anti-pertactina y aunado al perfil predominante de citocinas detectadas concluimos que ésta vacuna tiene potencial para contribuir al control de *B. bronchiseptica* en las vías respiratorias mediante una respuesta Th1.

## ABSTRACT

*Bordetella bronchiseptica* is a short bacillus, Gram negative, aerobic and mobile. It is the causative agent of respiratory problems in many animal species, including man. Virulence factors have been identified by which *B. bronchiseptica* adheres and affects the respiratory tract. The pertactin protein is secreted by the type V secretion system and generating protective immunity. We evaluated a DNA vaccine (pBH7D46) containing pertactin gene (*prn*) of *Bordetella bronchiseptica*. Six groups of balb/c mice were used to assess the immunogenic properties of the DNA vaccine when applied in two routes and different doses. Humoral response was determined by detection of antibodies as well as the serum concentration of cytokines IL-2, IL-4, IL-10, INF $\gamma$  by ELISA and compared to the immune response obtained in mice inoculated with *B. bronchiseptica* bacterin with adjuvant, as well as negative controls. We found that the IgG antibody response was lower in mice immunized with DNA vaccine vaccinated than in mice immunized with the bacterin ( $p < 0.05$ ). To evaluate the two routes of immunization was observed that the groups intramuscularly with the DNA vaccine induced significantly the IgG antibody production while mice immunized intranasally behaved like the negative control group ( $p < 0.05$ ). In mice immunized intramuscularly with the DNA vaccine the antibodies titer against pertactin seroconverted between day 14 to and day 29, whereas groups inoculated intranasally not yet developed antibodies to the second immunization. The group vaccinated with a dose of 150  $\mu$ g of DNA via IM showed no significant differences with respect to the group receiving a dose of 100  $\mu$ g, in the two evaluations. The results obtained with the ELISA assay to determine the concentration of IL-2, INF $\gamma$ , IL-4 and IL-10 in the serum of immunized mice showed a higher response of IL-2 and INF $\gamma$  compared with IL-4 ( $p < 0.05$ ) which is suggestive of a Th1-cell response. Unlike antibody production was observed that mice immunized intranasally showed synthesis of cytokines lesser concentration tested ( $p < 0.05$ ) compared to those immunized intramuscularly. Similarly, mice immunized with the bacterin showed a significantly higher serum IgG ( $p < 0.05$ ) compared to those immunized with immunized with the DNA vaccine intramuscularly. Considering that the DNA vaccine pBH7D46 induced serum anti-pertactin IgG synthesis and that the predominant cytokine profile detected, we conclude that this vaccine has the potential to help control *B. bronchiseptica* in the airways with a Th1 response.



## INTRODUCCIÓN

### ***Bordetella spp.***

Pertenece al género *Bordetella* del cual se han caracterizado nueve especies a la fecha de los cuales solo tres miembros incluyendo a *B. bronchiseptica*, *B. parapertussis* y *B. holmesii* han sido asociados con infecciones respiratorias en humanos y otros animales (1, 2). *Bordetella pertussis* es el agente etiológico de la Tos ferina, es altamente contagioso en niños. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que la tos ferina causa cada año en el mundo de 20 - 40 millones de casos y entre 200,000 y 400,000 fallecimientos. Se ha identificado como patógeno que afecta únicamente a humanos, no hay evidencia de que afecte a otras especies animales ni que haya algún reservorio natural para esta especie de *Bordetella* (3,4).

*B. avium* afecta principalmente pavos, aunque también se ha presentado en pollos y otras especies aviares, produce una enfermedad de las vías respiratorias superiores, altamente contagiosa, sobre todo en explotaciones comerciales, y de una importancia económica significativa, ya que las aves afectadas quedan predispuestas a infecciones secundarias (5).

*B. bronchiseptica* infecta una amplia variedad de hospederos y causa ocasionalmente enfermedades respiratorias en humanos; se asocia con personas que están inmunocomprometidas y en personas con VIH; también se han reportado como grupos susceptibles a infantes, e individuos en contacto cercano con animales (7).

*B. bronchiseptica*, *B. pertussis*, *B. parapertussis*, y *B. avium*, han sido referidas como especies “clásicas”, ya que fueron las primeras especies del género *Bordetella* en ser descritas y son de alto interés médico y veterinario, mientras que las demás especies se adicionaron en los últimos 15 años (6).

## **Historia**

En el año de 1540 se describió por primera vez la enfermedad que coincidía con los signos causados por *B. pertussis* en diario *Multons, The Mirror of Health*, pero hay evidencia de que ya se había descrito la enfermedad anteriormente por Nils Rosen von Rosen en Francia en el año de 1414 (8). Para 1906 se aisló por primera vez la bacteria por Bordet y Gengou, aunque ellos observaron el microorganismo microscópicamente desde 1900 (9,10).

*B. bronchiseptica* fue aislada por primera vez en la primera década del siglo XX por Ferry y McGowan. Posteriormente en el mismo siglo, se demostraron infecciones en animales y humanos causadas por *B. bronchiseptica* (11,12,13,14,15,16,17,18).

En 1930 el Dr. Eldering y Kendric aislaron una cepa con características muy similares a las de *B. pertussis* y posteriormente Bradford y Slavin la identificaron como *B. parapertussis* (19,20,21). Años más tarde fueron aisladas las demás especies de *Bordetella* que son *B. holmesii*, *B. hinzii*, *B. trematum*, *B. avium*, *B. petrii* y más recientemente identificada, *B. ansorpii* (6).

## ***Bordetella bronchiseptica***

### **Morfología**

*Bordetella bronchiseptica* es un bacilo gram negativo, pleomorfo, que puede ser cocoide u ovalado y en ocasiones con formas filamentosas. Tiene movilidad, debido a que posee un flagelo peritrico; su pared celular posee la estructura típica de las bacterias gram negativas. Mide alrededor de 0.5-1 X 1.5-4  $\mu\text{m}$  (22).

### **Características del cultivo**

*Bordetella bronchiseptica* puede recuperarse del tracto respiratorio de animales por raspado nasal o traqueal. Crece rápidamente en aerobiosis y a temperatura de 37°C en medios con pH ajustados a 7-7.2 (23).

Se puede usar agar McConkey con glucosa para su aislamiento en donde requiere de 48 h. de incubación, observándose colonias pequeñas, redondeadas, lisas y brillantes, y presentando una superficie lisa con un área central irregular. Las colonias alcanzan un margen de 2-3 mm (1). El agar sangre también puede usarse para su aislamiento, observándose colonias blancas y semitranslúcidas, luego de 48 h. de incubación, y presenta hemólisis y son muy brillantes (23).



## Propiedades bioquímicas

*Bordetella bronchiseptica* no desarrolla actividad fermentativa sobre carbohidratos, probablemente debido a que carece de genes que codifican para el catabolismo de algunos azúcares; sin embargo si posee los genes que codifican para rutas metabólicas de gluconeogénesis; no produce indol ni hidrógeno sulfurado (24). En el año de 1913, Torrey *et al* propusieron la clasificación de las cepas en dos grupos, basándose en la reducción de nitratos. Las cepas del grupo A no reducen los nitratos y los del grupo B reducen a nitritos (23). Es catalasa y lisina descarboxilasa positiva. En el cuadro 1 se enlistan las pruebas utilizadas para la identificación de *B. bronchiseptica* (25).

Cuadro 1 (22)

### Pruebas bioquímicas para la identificación de *B. bronchiseptica*

Prueba	Resultado
Morfología de colonias	Pequeñas, redondas, convexas, lisas, grises
Motilidad	Positiva
Flagelos	Perítricos
Agar McConkey	Positivo
Urea	Positiva
Lactosa	Positiva
Leche tornasolada	Alcalina
Glucosa	Negativa
Maltosa	Negativo
Gelatina	No se licúa
Catalasa	Positiva

## **Factores de virulencia**

*Bordetella spp.* produce un número de factores proteicos que juegan un papel importante en la interacción entre la bacteria y células hospederas, conduciendo al establecimiento de infección, patogénesis y transmisión (25).

Una cepa de *B. bronchiseptica*, denominada RB50, la cual fue aislada de cavidad nasal en conejos blancos Nueva Zelanda infectados naturalmente, ha sido ampliamente usada a lo largo de las últimas dos décadas para comprender los mecanismos de patogenicidad en modelos animales (26).

Los factores implicados en la adhesión a las células hospederas incluyen hemaglutinina filamentosa, pertactina, fimbria y lipopolisacárido, mientras que la producción de toxinas incluyen la hemolisina adhenilato ciclasa, toxina dermonecrótica y citotoxina traqueal. A continuación se describe brevemente cada uno de estos determinantes de virulencia, así como avances recientes en cuanto a su función.

### **Hemaglutinina filamentosa**

Es una molécula altamente inmunogénica de alto peso molecular (220 kDa) asociada a la membrana externa que desempeña una función fundamental en la infección de *B. pertussis*, *B. parapertussis* y *B. bronchiseptica*. En modelos de ratones, la hemaglutinina filamentosa es requerida para la colonización traqueal por *B. bronchiseptica*. La porción N-terminal (220kDa) de la hemaglutinina filamentosa es partida proteolíticamente desde una proteína precursora de 370 kDa codificada

por el gen *phaB* y secretada a través de la membrana citoplasmática por una ruta de señal *sec* dependiente (27). Esta translocación y secreción a través de la membrana externa requiere de una proteína accesoria específica llamada FhaC, la cual se desdobra en un dominio  $\beta$  barril transmembranal que facilita su secreción, sirviendo como poro específico para la hemaglutinina filamentosa en la membrana externa (29,30). Una vez en la superficie celular, aproximadamente 130 kDa del carboxilo terminal de FhaB es removido proteolíticamente por una proteasa identificada recientemente, llamada SphB1 (30,31).

Numerosos estudios han demostrado las funciones de la hemaglutinina filamentosa como adhesina ya que contiene diversos dominios de unión; estos dominios incluyen un dominio de unión a heparina que facilita su adhesión a polisacáridos sulfatados, dominios de reconocimiento a carbohidrato que promueven la adhesión a células del epitelio ciliado del tracto respiratorio y macrófagos, así como un dominio Arg-gly-asp (RGD), que estimula la adhesión a macrófagos y leucocitos; específicamente éste dominio ha sido asociado en adherirse a la integrina VLA-5 (por sus siglas en inglés *very late antigen*) la cual está presente en células epiteliales bronquiales. En adición hemaglutinina filamentosa ha sido mostrada por ser requerida para la colonización en tráquea de rata (32).

## **Lipopolisacárido**

Aunque las tres especies más estudiadas del género de *Bordetella*, son genéticamente muy relacionadas, ellas sintetizan moléculas de LPS diferentes. Las tres tienen un lípido A, aunque solamente *B. parapertussis* y *B. bronchiseptica* sintetizan antígeno O (33).

Como las endotoxinas de otras bacterias Gram negativas, los LPS de las especies de *Bordetella* son pirógenos, mitogénicos y tóxicos y pueden activar e inducir la producción del factor de necrosis tumoral en macrófagos (34,35).

El locus *wlb* el cual es bien conservado entre las especies de *Bordetella*, es requerido para la biosíntesis y ensamblaje lipídico. El locus *wbm* que permanece junto al locus *wlb* en *B. bronchiseptica* y *B. parapertussis* es requerido para el ensamblaje del antígeno O. La delección de *wbm* en *B. parapertussis* conduce a la pérdida de la expresión del antígeno O (36).

## **Flagelo**

Un sistema de trasducción de señales de dos componentes, llamado BvgAS, controla la transición fenotípica (Bvg+, Bvg- y Bvg i o fase intermedia) modulando la expresión de factores de virulencia críticos en la patogénesis de *Bordetella*. La fase Bvg+ en *Bordetella* es caracterizada por la expresión de factores de virulencia requeridos para la colonización del tracto respiratorio incluyendo adhesinas y toxinas. En contraste, la fase Bvg- de *B. bronchiseptica*, que probablemente facilita su sobrevivencia en el ambiente, es caracterizada

principalmente por la expresión de genes involucrados en la motilidad, incluyendo la flagelina y la represión específica de factores de virulencia típicos de la fase Bvg+(4).

La flagelina es el componente estructural del flagelo bacteriano y un potente mediador inflamatorio para muchos tipos celulares, con la habilidad de modular la respuesta inmune innata en el pulmón. Juega un rol en desafiar la respuesta inmune adaptativa, estimulando la secreción de quimiocinas y subsecuente migración y maduración de células dendríticas y modulación de la activación de células T *in vivo*. (37). Debido a que la expresión del flagelo en *Bordetella* es limitada a la fase Bvg-, se ha sugerido que estos apéndices bacterianos son importantes para la supervivencia en el ambiente (37).

Ratones y conejos infectados con *B. bronchiseptica* de campo no desarrollan respuestas inmune potentes contra la flagelina, sugiriendo que la expresión de la flagelina en el curso de la infección es rápidamente reprimida. En contraste, la infección con una cepa de *B. bronchiseptica* que expresa flagelina ectópicamente en la fase Bvg+ resulta en una fuerte respuesta de anticuerpos al flagelo y reduce la colonización traqueal por *B. bronchiseptica*, sugiriendo que la represión de la expresión de la flagelina es importante para el establecimiento de la infección (37).

## **Fimbria**

Como algunas bacterias gram negativas, *Bordetella* expresa estructuras proteínicas de superficie, celular, filamentosas llamadas fimbrias. Las subunidades mayores fimbriales que conforman los dos serotipos predominantes fimbriales, Fim2 y Fim3, están codificadas en el loci *fim2* y *fim3* respectivamente. Se han identificado algunos otros loci como *fimX*, *fimD* y *fimN* en *B. bronchiseptica* (38).

Los genes fimbriales están regulados positivamente por el sistema BvgAS y representa un paso crítico en la patogénesis bacteriana temprana. Aunque las fimbrias están implicadas en este proceso, no se ha podido establecer un rol definitivo para las fimbrias de *Bordetella* debido a la dificultad para construir mutantes que carezcan de su función, sin embargo muchos estudios sugieren que la fimbria media la adherencia de *Bordetella* al epitelio respiratorio vía las subunidades fimbriales mayores y a monocitos vía FimD (39,40,41).

Existen otros estudios que sugieren que la fimbria media la interacción con células epiteliales y macrófagos o monocitos, juegan papeles importantes en la adherencia, así como en la naturaleza y magnitud de la respuesta inmune del huésped a la infección por *Bordetella* (42).

## **Pertactina y otros autotransportadores**

*Bordetella* expresa algunas proteínas de superficie que pertenecen al sistema de secreción de autotransportadores, los cuales son regulados positivamente por el sistema BvgAS. La familia de autotransportadores incluye proteínas funcionalmente diferentes, incluyendo proteasas, adhesinas, toxinas, invasinas que parecen dirigir su propia exportación hacia la membrana externa. Esta exportación lo hacen a través de una vía Sec dependiente ya que utilizan la maquinaria Sec para atravesar la membrana interna; sin embargo, las proteínas no requieren de factores adicionales para transitar del periplasma hacia el exterior celular, como su nombre lo indica, dirigen su propia exportación. El extremo carboxilo terminal de la proteína dirige la secreción de la región amino terminal a través de la ME (43).

El primer miembro de la familia de autotransportadores en ser identificado y caracterizado fue la pertactina. Montaraz et al., en 1985 reportaron que *B. bronchiseptica* posee un antígeno proteico de 68 kDa. presente en la membrana externa de la bacteria y que posee actividad adenilato ciclasa, emplearon para ello dos anticuerpos monoclonales Bb07 y BB05. Los mismos investigadores encontraron una cepa de *B. bronchiseptica* incapaz de producir rinitis atrófica porcina, pero que colonizaba el tracto respiratorio y carecía del antígeno de 68 kDa, sugiriendo que este pudiera ser un marcador de virulencia (44). La pertactina madura es una proteína de 68 kDa que ha sido propuesta por tener un papel fundamental en la patogenicidad, debido a que contiene un motivo tripéptido arg-gli-asp (RGD), así como regiones ricas en prolina y repeticiones ricas en leucina, motivos comúnmente presentes en moléculas que forman interacciones

proteína-proteína involucradas en la adhesión a células eucarióticas (44). Estudios posteriores al descubrimiento de la pertactina, confirman sus propiedades inmunogénicas, así como su participación en la adhesión y su función como autotransportador del sistema de secreción tipo V (45).

La habilidad de la pertactina de funcionar como adhesina, ha sido probada *in vitro*, donde purificados de PRN pueden promover la adhesión a células CHO en cultivo celular y que la expresión de pertactina en *Salmonella* y *E. coli* puede incrementar la adherencia e invasividad de la bacteria a varios tipos celulares de mamíferos (43).

Hellwing et al., presentaron evidencia de que anticuerpos anti- pertactina son requeridos para una fagocitosis eficiente en *B. pertussis* por las células del hospedero (46). También se ha demostrado que la pertactina de *B. pertussis* induce inmunidad protectora en ratas expuestas a la bacteria vía intracerebral, en aerosol e intranasal(168,169). Igualmente se demostró que la protección contra *B. bronchiseptica* en la rinitis atrófica está correlacionada con la presencia de pertactina y anticuerpos maternos contra pertactina protegen lechones libres de patógenos específicos frente al desafío con la bacteria (170).

Otras proteínas de *Bordetella* con habilidad de autotransportadores incluyen TcfA, BrkA y Vag8. Todas estas proteínas muestran una similitud en la secuencia de aminoácidos en su C terminal y contienen uno o más motivos tripéptidos RGD. (47) Sin embargo sus funciones como potenciales adhesinas no han sido investigadas directamente, aunque una mutante de TcfA en una cepa de *B. pertussis* mostró decremento en la habilidad para colonizar la tráquea de ratones, comparándola con una cepa silvestre de *B. pertussis* (48).



### **Hemolisina adenilato ciclasa**

*B. bronchiseptica* secreta la toxina adenilato ciclasa, la cual tiene su máxima expresión en la fase Bvg+ y es sintetizada como un monómero de protoxina de 1,706 aa. Su actividad catalítica está localizada dentro de los 400 aa del dominio N terminal. (49,50) Los 1300 aa del dominio C terminal, median la liberación del dominio catalítico dentro del citoplasma de células eucariotas y poseen actividad hemolítica detectada en glóbulos rojos de ovejas. (50,51). De acuerdo a su secuencia de aminoácidos, se ha clasificado a esta toxina dentro de la familia de citotoxinas dependientes de calcio, formadoras de poros, conocida como toxinas RTX, las cuales contienen un arreglo de 9 repeticiones de aminoácidos, que están involucrados en la adhesión al calcio (52). Antes de que la protoxina adenilato ciclasa, pueda intoxicar a la célula huésped, debe ser activada por el producto del gen *CyaA*, el cual cataliza un residuo interno de lisina (53,54).

Se ha identificado a la glucoproteína de superficie eucariótica CD11b como el receptor para la toxina adhenilato ciclasa madura, la cual para ser secretada, requiere de un contacto cercano de la bacteria viva con la célula blanco (55). Esta toxina puede entrar a una gran variedad de tipos celulares en el hospedero; una vez adentro ésta es activada por calmodulina y cataliza la sobreproducción de AMP cíclico, a partir de ATP (56,57, 58). Un purificado de hemolisina adenilato ciclasa inhibe la quimiotaxis y generación de superóxidos en monocitos de sangre periférica y en neutrófilos *in vitro* (59). La hemolisina adhenilato ciclasa también induce apoptosis en cultivos de macrófagos murinos

(60). También se ha demostrado que inhibe la expresión de la molécula coestimuladora de superficie CD40 y la producción de IL-12 en células dendríticas derivadas de la médula ósea de ratones C57BL/6 infectados con *B. bronchiseptica* (61).

### **Citotoxina traqueal**

La actividad de esta toxina, ha sido estudiada *in vitro* usando células epiteliales de tráquea de hámster, produciendo daño mitocondrial. (62) También se ha observado que la toxina dispara la secreción de IL-1 en células HTE, incrementando así la concentración de óxido nítrico al adherirse a las células, sugiriéndose este mismo mecanismo en el hospedero (63).

### **Toxina dermonecrótica**

La toxina fue el primer factor de virulencia en ser descrito en *B. pertussis*. Esta toxina induce lesiones necróticas en ratones y otros animales de laboratorio al ser inoculados intradérmicamente y fue letal en ratones a dosis bajas cuando se administró intradérmicamente (64).

La toxina dermonecrótica es una toxina compuesta de un dominio amino terminal de adhesión a un receptor de 54 aa y un dominio enzimático carboxilo terminal de 300 aa (4).

Mediante estudios *in vitro* usando líneas celulares de osteoblastos se determinó que la toxina es internada por endocitosis dependiente de dinamina (64).

Asimismo se ha demostrado *in vitro* que la toxina dermonecrótica purificada de *B. bronchiseptica* induce dramáticos cambios morfológicos, estimula la replicación de ADN, e interfiere en la diferenciación y proliferación en células osteoblásticas MC 3T3 (64). Las evidencias sugieren que estos efectos son debidos a la activación de proteínas unidas a GTP( Rho), lo que resulta en fosforilación de tirosin quinasas de adhesión (p125) y paxilina, las cuales están involucradas en el desarrollo embrionario y locomoción celular y su activación conduce a alteraciones en el citoesqueleto (65,66).

### **Sistema de Secreción Tipo III**

El sistema de secreción tipo III ha sido identificado en distintas subespecies de *Bordetella* (67). Por medio de este sistema de secreción las bacterias Gram negativas pueden translocar proteínas efectoras directamente a la membrana plasmática o citoplasma de células eucarióticas a través de un aparato inyector (68). Estas proteínas efectoras después alteran las cascadas de señalización celular en el hospedero y otros procesos que promueven estrategias patogénicas de la bacteria. Este sistema de secreción fue primero identificado en *B. bronchiseptica* como un factor de virulencia activado por el sistema Bvg-AS. El locus del SST III de *Bordetella* llamado *bsc*, incluye 22 genes que codifican componentes del aparato de secreción, proteínas secretadas y supuestas chaperonas. Se ha demostrado que a través de estos mediadores se inducen citotoxicidad en cultivos de linear celular, defosforilación de proteínas celulares específicas del hospedero (67), y activación de proteínas quinasas mitógenas, que son RK1 y RK2 (69). Células dendríticas derivadas de médula ósea de ratones infectados por *B. bronchiseptica* disparan un incremento mediado por el SSTIII en

la expresión de superficie del MHC II y de moléculas coestimuladoras CD86 y CD40 (61). En *B. bronchiseptica* este sistema de secreción también previene la translocación del factor de transcripción NFκB al núcleo, aún en células estimuladas con TNFα, causando así la agregación aberrante del NFκB dentro del citoplasma de la célula huésped. El SST III probablemente induzca una forma necrótica de muerte celular dado que las células muertas morfológicamente asemejan necrosis más que apoptosis celular. A pesar de estos estudios, las proteínas efectoras del SSTIII y sus blancos celulares para inducir estos tipos de fenotipos son desconocidos a la fecha (67).

*In vivo*, el SST III en *B. bronchiseptica* contribuye a la colonización persistente en la tráquea en modelos murinos con la infección respiratoria (69).

### **Patogénesis e inmunidad**

Se han descrito cuatro pasos importantes relacionados a la infección y enfermedad debido a los patógenos del género de *Bordetella*:

- a) Adherencia.
- b) Evasión de la respuesta inmune.
- c) Daño local.
- d) Manifestaciones sistémicas.

La infección se inicia al adherirse la bacteria al epitelio ciliado del tracto respiratorio alto; entre los factores de virulencia que participan en este proceso se han descrito la hemaglutinina filamentosa, la fimbria, el LPS y la pertactina (70).

La bacteria puede interferir en el proceso de fagocitosis por neutrófilos al sintetizar la toxina hemolisina adenilato ciclasa la cual cataliza la producción de ATP a AMPc con lo que intoxica a las células (70).

El daño del tejido local de las células del epitelio ciliado puede ser debido a la citotoxina traqueal, a la toxina dermonecrótica o a la hemolisina adenilato ciclasa (70).

En estudios más recientes, donde se evaluó la función que tienen el sistema de secreción tipo III y la toxina hemolisina adenilato ciclasa, utilizando cocultivos de macrófagos infectados con *B. bronchiseptica* y esplenocitos vírgenes se demostró que estos factores de virulencia alteran las rutas de señalización celular asociadas con la interacción inicial hospedero-patógeno (71).

Esta disrupción conduce a la producción de citocinas inmunosupresoras y disminución sistémica de INF $\gamma$ . Siciliano A. *et. al.* mostraron que *B. bronchiseptica* tiene la habilidad de inhibir la proliferación celular CD4+ e inducir la producción significativa de IL-17, tanto *in vivo* como *in vitro*, conduciendo a la generación de una respuesta de T celular regulatoria inmunosupresiva (71).

Harvill y Piloni sugieren que la producción de IL 10 durante la infección temprana por *B. bronchiseptica* es capaz de inhibir la producción de INF $\gamma$  retrasando la eliminación bacteriana y facilitando así la persistencia de la bacteria en el tracto respiratorio bajo (73).

A su vez, en otro estudio realizado por Buboltz M *et. al.*, definieron más claramente el papel del Sistema de secreción tipo III (SSTIII) en un linaje hiper virulento de *B. bronchiseptica*, demostrando que está involucrado en el incremento de la virulencia de la cepa 1289 en comparación con la cepa RB50, debido a una sobrerregulación de los genes que codifican para el SSTIII de dicha cepa (74).

Las células epiteliales de las vías respiratorias juegan un papel clave en la respuesta inmune, debido a que una gran porción de éstas interactúa continuamente con patógenos. Las vías respiratorias están recubiertas por tejido epitelial y el parénquima pulmonar que comprende una delgada pared alveolar, especializada en el intercambio de aire. Contienen diferentes poblaciones de células inmunitarias especializadas. Una vez que un antígeno ingresa al tracto respiratorio medio, es captado por células dendríticas (que están localizadas en la superficie del epitelio de la mucosa bronquial o en los alveolos), para migrar a través de vasos linfáticos aferentes a nódulos linfáticos eferentes y presentar los péptidos antigénicos a células T vírgenes. Estas células T activadas, proliferan y migran a través de los vasos linfáticos eferentes y entran en vía sanguínea a través del ducto torácico para posteriormente terminar dentro de la mucosa bronquial a través de vénulas poscapilares en la lámina propia, a través de capilares pulmonares en el parénquima pulmonar, o diseminarse desde el torrente sanguíneo hacia el sistema inmune periférico (72).

Además de los anticuerpos séricos y secretorios, ya sean producidos por la infección o la inmunización, la respuesta inmune mediada por células, ocurre regularmente. (75). Estudios con un modelo de infección murino, indican que la

inmunidad celular juega un papel principal en la eliminación bacteriana, ya que se ha observado que regula la respuesta de anticuerpos y conduce a la producción de citocinas apropiadas que estimulan a células fagocíticas a eliminar la bacteria (78). En humanos una respuesta inmune celular ocurre poco tiempo después de una infección natural por *B. pertussis* (82). Gueirard y col. realizaron estudios de ratones inoculados intranasalmente con *B. bronchiseptica* y observaron que una respuesta de linfocitos Th1, así como niveles elevados de IgG2a e IgA son inducidos después de la infección, también sugieren que este tipo de respuesta es principalmente inducida por productos de los genes *vag* (76).

La IgA inducida por la infección por *B. bronchiseptica* reconoce al antígeno O, lo que es importante para la eliminación de esta bacteria en la tráquea. IgA puede mediar la protección contra patógenos bacterianos y virales a través de mecanismos como la neutralización y aglutinación de patógenos en la superficie de la mucosa. Un estudio demuestra que la IgA es necesaria para la protección en tráquea de ratones, ya que la transferencia pasiva de anticuerpos en una cepa de ratones de campo condujo a la reducción bacteriana mientras que en ratones *knock out* para la IgA no hubo tal reducción (77).

## **Lesiones**

La infección por *B. bronchiseptica* es la principal causa de la tos de la perreras en perros (82). Esta enfermedad es una traqueobronquitis caracterizada por congestión de la mucosa de la tráquea y bronquios y exudado mucoso y mucopurulento. Además, áreas desiguales de neumonía exudativa así como petequias y sufusiones en la superficie de la pleura pueden ser observadas. Aunque no se observan a menudo anomalías microscópicas en el tracto respiratorio. Sin embargo, en la mayoría de los perros infectados las muestras con cortes histológicos revelan traqueobronquitis (4).

Hay dos patrones microscópicos descritos en la patología de infecciones causadas por *B. bronchiseptica*. Uno consiste en áreas de degeneración epitelial y necrosis, las células están desorganizadas, con vacuolización y pinocitosis. La lámina propia está congestionada con infiltrado de pocos macrófagos y linfocitos. En el otro patrón un exudado mucopurulento está presente en el lumen de las vías respiratorias y edema de la lámina propia con un marcado infiltrado leucocitario polimorfonuclear. (4)

La infección complicada por neumonía está acompañada por congestión alveolar, exudado con leucocitos polimorfonucleares y macrófagos dentro de los espacios aéreos. Los linfonodos y tonsilas palatinas con frecuencia aparecen inmunológicamente reactivas y ocasionalmente presentan linfadenitis y tonsilitis (4).



## **Manifestaciones clínicas**

*B. bronchiseptica* causa infecciones respiratorias en diferentes mamíferos incluyendo ratones, ratas, cerdos, conejos, perros, zorros, hurones, ovejas, leopardos, caballos, y ocasionalmente humanos (13). Las más importantes y las mejores descripciones de infecciones naturales son en los perros y cerdos. Infecciones en animales de laboratorio también han provisto una amplia información para entender la patogénesis de *B. bronchiseptica* (13,14).

En cerdos la infección por *B. bronchiseptica* puede ser asintomática o estar asociada a enfermedades del tracto respiratorio alto caracterizado por estornudos y tos (84). Esto es seguido por una deformidad de la estructura ósea de la nariz (rinitis atrófica). La enfermedad en cerdos ocurre generalmente durante sus primeras semanas de vida. La mayoría de los casos ocurren entre las 3 y 8 semanas de edad, pero animales de 11 y 13 semanas de edad pueden llegar a desarrollar atrofias de las turbinas. Cerdos con rinitis atrófica tienen un acortamiento en el maxilar superior y una deformación en la estructura ósea de la jeta. En otros cerdos jóvenes el daño de la turbina no es persistente debido a la regeneración del hueso (154).

En perros que desarrollan traqueobronquitis infecciosa (tos de las perreras) es una enfermedad respiratoria altamente contagiosa (85). La enfermedad puede ser leve con tos seca, tos con moco acompañada con descarga ocular o nasal. Perros con la enfermedad grave frecuentemente presentan neumonía, náuseas y vómitos. La enfermedad dura entre 1 y 3 semanas y las muertes debidas a neumonías no son frecuentes (85).

En animales de laboratorio, brotes de enfermedades respiratorias han ocurrido en animales en instalaciones comerciales para los animales para la investigación y la enfermedad puede variar de secreción nasal, estornudos, pérdida de apetito y pérdida de peso (catarro en conejos) a una bronconeumonía y septicemia (13,86).

En 1910 McGowan estudió 13 trabajadores de laboratorio expuestos a diversos animales infectados con *B. bronchiseptica* (18). Si bien todos estos trabajadores habían presentado síntomas nasales, *B. bronchiseptica* fue aislado a partir de sólo uno de ellos. Este trabajador constantemente manipulada conejos y cobayos con síntomas crónicos graves nasales (catarro) a lo largo de un período de 18 meses. La enfermedad es insoluble y tenía las exacerbaciones agudas. Durante una exacerbación, un cultivo puro de *B. bronchiseptica* obtenido de una masa con exudado mucopurulento colgando en el paladar blando. En 1926 Brown describe una enfermedad similar a la ocasionada por *B. pertussis* en una niña de 5 años cuya enfermedad comenzó alrededor de 10 a 12 días después de que ella se había estado en contacto con un conejo con leve laringitis *B. bronchiseptica* fue aislada tanto de la niña como del conejo (11).

Más de la mitad de los casos recientes de *B. bronchiseptica* han sido en pacientes con VIH. La neumonía generalmente ocurre en pacientes con SIDA, así como en otros pacientes inmunocomprometidos. Otras manifestaciones respiratorias incluyen sinusitis y bronquitis (88).

El número de reportes de humanos infectados con *B. bronchiseptica* ha incrementado, en los últimos años, pero es poco conocida y estudiada la persistencia y prevalencia de estas infecciones en humanos. Hay pocos reportes de infecciones en individuos sanos, esto es debido al bajo índice de sospecha en el exámen clínico (90).

### **Diagnóstico**

En perros y animales de laboratorio, las manifestaciones de *B. bronchiseptica*, están asociadas a una traqueobronquitis, la cual es causada por algunos otros agentes virales y bacterianos, por lo que se debe hacer un aislamiento para dar un diagnóstico preciso (4).

Existen varias técnicas de laboratorio que se pueden usar para la identificación del agente bacteriano, estos incluyen: cultivo en un medio selectivo como el agar MacConkey a partir de una muestra de células epiteliales ciliadas del tracto respiratorio alto (91). En general, las técnicas usadas para la identificación de *B. pertussis*, se pueden usar para el diagnóstico de *B. bronchiseptica*, estas incluyen PCR y serología. *B. bronchiseptica* es inhibida por cefalexina y puede crecer en presencia de oxaciclina y metacilin (93).

En la práctica clínica, el diagnóstico de *B. pertussis* es realizado basándose en un diagnóstico positivo a la prueba de inmunofluorescencia directa, el cual puede tener reacción cruzada con el anticuerpo usado ya que puede reconocer epítopes de *B. bronchiseptica* (90). Dado que la identificación por PCR de *B. pertussis* está basada en reconocer la secuencia blanco *IS481*, ha generado resultados inespecíficos ya que estos elementos también son encontrados en

cepas de *B. bronchiseptica*, siendo esto otro método de diagnóstico inadecuado, ya que puede también generar reacción cruzada; por tal motivo, recientemente ha sido estudio de gran interés el obtener nuevas secuencias blanco para la detección de *B. pertussis* (89).

### **Transmisión y epidemiología**

Aunque la infección por *B. bronchiseptica* ha sido asociada con enfermedad respiratoria en al menos 18 mamíferos, se conoce poco acerca de su epidemiología (96).

La transmisión de animal a animal es directamente por contacto con secreciones respiratorias, fómites, y quizás por aerosoles (96). Porter y col. han demostrado que el organismo puede crecer en agua de lagos, lo que sugiere que esta bacteria puede ser un organismo de vida libre (97). Si este es el caso, entonces la múltiple transmisión entre especies animales puede ocurrir sin contacto directo.

Una dificultad para el estudio de la epidemiología de *B. bronchiseptica* en la investigación en animales de laboratorio, en perreras y en corrales es el alto porcentaje de infecciones asintomáticas con diseminación prolongada del organismo. En algunas colonias de cuyos, la incidencia de la infección asintomática, puede ser hasta del 20% (91). Los altos índices de infección asintomática también ocurren en colonias de conejos. (96)

## **Vacuna y bacterinas**

Los inmunógenos contra *B. bronchiseptica* pueden ser bacterinas que están elaboradas con cepas virulentas muertas administradas parenteralmente o vacunas de cepas vivas atenuadas que son administradas por vía intranasal, inducen un alto título de anticuerpos mas no siempre confieren un alto grado de protección (92).

La vacuna es administrada en cachorros de 6 a 8 semanas y revacunados 4 semanas después, posteriormente se hace un refuerzo anual.

En cerdos, un número de vacunas contra la rinitis atrófica están disponibles. Estas incluyen cepas de la bacteria no patógenas e inactivadas y en ocasiones en conjunto con cepas de *Pasteurella multocida*. No hay datos disponibles de su eficacia. Se sugiere la vacunación de los cerdos de los 3 a los 4 meses de edad (4).

Estudios en perros inoculados con vacunas comerciales de *B. bronchiseptica* viva atenuada han mostrado resultados contradictorios. Un estudio hecho por Jacobs y col., mostró protección parcial, mientras que otros estudios indicaron que las vacunas con *B. bronchiseptica* viva atenuada son inadecuadas y causan efectos adverso (98).

Las vacunas comerciales que son usadas para proteger contra *B. bronchiseptica* pueden inducir un alto título de anticuerpos; sin embargo, la cepa virulenta se ha aislado de cavidad nasal de poblaciones de animales vacunadas,

sugiriendo que la vacunación falla en proteger a los animales de la infección, y que el título de anticuerpos no es efectivo para eliminar la bacteria en los animales (94).

Se han reportado casos de infecciones en humanos que desarrollan síntomas de tos paroxística persistente después de la exposición a una vacuna de *Bordetella bronchiseptica* viva, siendo esto un riesgo de infección principalmente para pacientes inmunocomprometido (94).

Un programa efectivo de vacunación es crítico para limitar la diseminación y el impacto de *Bordetella*, tanto en la salud animal como humana, debido a que son patógenos respiratorios altamente transmisibles. Candidatos ideales para su uso como vacunas deben ser seguras, efectivas y fáciles de aplicarse. *B. bronchiseptica* es endémica en la mayoría de las poblaciones de mamíferos, una incidencia mayor es vista en perreras tanto como en granjas de cerdos donde vacunaciones intensivas son usadas para prevenir la enfermedad, además existe la necesidad de que la vacunación sea efectiva, que debe proveer una protección efectiva y duradera con una sola administración (98).

Se han reportado reacciones anafilácticas ocurridas por la vacunación parenteral de bacterinas de *B. bronchiseptica*. Recientemente se han observado aislamientos de *B. bronchiseptica* de pacientes humanos, que se contagiaron poco después de la vacunación de sus mascotas (100).

Los resultados indican que mientras la vacunación con *B. bronchiseptica* administrada intraperitonealmente induce una mayor respuesta

serológica de anticuerpos que aquellas inducidas por una infección intranasal. La vacunación con bacterias muertas provee menos protección en el tracto respiratorio alto que la inmunidad inducida por la infección. Esto sugiere que a falta de una respuesta de memoria local fuerte llevan la necesidad de repetir las vacunaciones, cuando se administran vía parenteral las vacunas muertas (98).

### **Vacunas de ADN**

El principio de usar ADN para transfectar células de mamíferos *in vivo* fue reportado hace más de 50 años (103). Estudios posteriores reportaron que el ADN viral inoculado en ratones, podía producir niveles significativos de proteínas virales (101). Esto fue confirmado por Wolff *et al.* en 1990, quien demostró que la inyección intramuscular de un plásmido que contenía un gen reportero, condujo a la expresión de la proteína reportera activa en el músculo esquelético de ratones, por más de 60 días después de la inoculación (109). La capacidad de expresar proteínas a partir de ADN plasmídico *in vivo* para permitir una respuesta inmune en el huésped, fue corroborada posteriormente, cuando Ulmer *et al.* demostraron que usando un modelo de influenza en ratones, a los cuales inocularon un plásmido codificando una proteína como marcador y usando un promotor capaz de funcionar en células mamíferas, puede ser captado por las células con la síntesis de la proteína codificada. El bajo monto de proteína producida, la aparente ausencia de transfección de CPAs profesionales por esta ruta hizo sorprendente el hecho que la inmunización intramuscular de ratones con el plásmido de DNA pudo inducir una respuesta inmunitaria protectora contra el desafío del virus de la influenza (101).

Posteriormente, han surgido numerosas publicaciones demostrando que diversos genes de antígenos de bacterias, virus, parásitos o de origen tumoral

pueden ser codificados en plásmidos y estos pueden inducir una respuesta inmunitaria protectora en diversos modelos animales (102).

La mayor parte de los estudios que se han realizado con vacunas de ADN, se han desarrollado solo en modelos preclínicos, debido a resultados muy variables en la respuesta inmunológica producida por éstas. Sin embargo, es en 2005, cuando se registraron las primeras vacunas de ADN para uso comercial. Por un lado en Canadá, fue registrada la vacuna contra la necrosis hematopoyética infecciosa del salmón del Atlántico, la cual codifica para una glicoproteína de este virus y es administrada intramuscularmente (111). En ese mismo año se registró en los Estados Unidos una vacuna de ADN que protege a los caballos de la viremia causada por el virus del Oeste del Nilo, la cual contiene un gen que codifica para proteínas de la cápside (112). Dos años después, se desarrolló una vacuna para proteger contra el melanoma en perros que codifica para la enzima tirosinasa humana, y actualmente se está evaluando su uso en caballos (113,114).

Las vacunas de ADN, también conocidas como vacunas genéticas, vacunas de ácidos nucleicos o vacunas de ADN desnudo, entre otros términos, emplean una metodología relativamente simple que ha abierto una nueva era en la inmunología, con un alto potencial como vacunas profilácticas y terapéuticas. Todo esto se debe a que combinan muchas de las características deseables de las vacunas tradicionales, pero ofrecen ventajas adicionales, como las siguientes:



**Cuadro 2** Ventajas del uso de vacunas de ADN (102).

Inmunogenicidad	<ul style="list-style-type: none"><li>• Puede producir respuestas celular y humoral.</li><li>• Dosis bajas eficaces.(µg)</li></ul>
Seguridad	<ul style="list-style-type: none"><li>• No tiene potencial de reversión a la virulencia como las vacunas vivas.</li></ul>
Estabilidad	<ul style="list-style-type: none"><li>• Producidos en alta concentración en bacterias y pueden ser purificados fácilmente.</li><li>• Más estables a temperatura ambiente que las vacunas convencionales.</li><li>• Duración de vida larga.</li><li>• Fácil de almacenar y transportar.</li><li>• No requiere de cadena fría</li></ul>

Existen al menos tres mecanismos de procesamiento y presentación del antígeno codificado por el plásmido de ADN, los cuales garantizan la inducción de una respuesta inmune: 1.estimulación directa mediada por células somáticas (miocitos, queratinocitos o cualquier célula MHC II negativa) 2. transfección directa de células profesionales presentadoras de antígeno (CPA) y 3. Presentación cruzada (*Cross-priming* en inglés), en el cual el plásmido transfecta una célula somática y/o CPA, y la proteína secretada es captada por otra CPA donde es procesada para su presentación a linfocitos T CD4+ (114).

La inducción de una respuesta inmune después de la administración de una vacuna de ADN, sólo será posible, si el plásmido que contiene el gen de

interés, se logra translocar al núcleo de la célula hospedera, y para poder llegar allí, debe superar algunos obstáculos (115). El primero es cruzar la membrana plasmática, esto es debido a que el ADN es un polianión que no puede interactuar con las membranas plasmáticas, que están cargadas negativamente. Algunos estudios soportan la idea de que este proceso se lleva a cabo mediante endocitosis de fase fluida, así como que hay algunos receptores membranales involucrados en la captura de oligonucleótidos, sin embargo, no se ha demostrado que alguno en específico sea trascendental, por lo que se plantea que el ADN plasmídico interactúa con varios receptores (115,116). El segundo obstáculo que debe evadir el ADN plasmídico es atravesar el citoplasma, ya que éste está compuesto de una red microfilamentos, microtúbulos y una variedad de organelos celulares que flotan en el citosol, esto aunado a la resistencia que genera el citoesqueleto y la presencia de altas concentraciones de proteínas, limita la difusión de moléculas grandes, como el ADN plasmídico (117). Sin embargo estudios usando algunos métodos de micro inyección y electroporación, han mostrado que el ADN plasmídico se asocia con proteínas como dineínas, mediante lo cual la red de microtúbulos ayuda al transporte de ADN plasmídico al núcleo (118,119). Sin embargo, se ha demostrado otra ruta para atravesar el citoplasma, estudios han demostrado que cuando marcan el ADN plasmídico, este se co-localiza con marcadores endosomales, confirmando que el plasmídico es ingresado a la célula por endocitosis (120,121). Existe un tercer obstáculo para el ADN plasmídico, que es atravesar la membrana nuclear. Muchos grupos han mostrado la importancia del desensamblaje de la membrana nuclear que tiene lugar durante la mitosis, y se sugiere que esto facilita la entrada al núcleo de moléculas mayores de 250 bp. (123). Se propone otro mecanismo para que el ADN plasmídico pueda translocarse

al núcleo, y esto es a través de complejos de poros que se forman en la membrana para facilitar el transporte de ciertas proteínas del citoplasma al núcleo, en éste caso, se ha podido demostrar que el ADN plasmídico se asocia con polipéptidos como factores de transcripción, los cuales contienen señales de localización nuclear (124).

Actualmente no existen en el mercado vacunas de ADN contra *B. bronchiseptica*.

Una serie de factores, tales como la antigenicidad, tamaño del gen, dosis y vías de inoculación, tipo de adyuvante y sistema de liberación del DNA influyen en la efectividad de dichos biológicos, razón por la cual diversos investigadores han propuesto el uso de estrategias alternativas para optimización de las vacunas génicas; tal es el caso de una vacuna que contiene un gen que codifica para la proteína G del virus sincitial respiratorio bovino en donde se probó que la vacunación intradérmica sin aguja confiere mayor protección que cuando se aplica por vía intramuscular o intradérmica con aguja, atendiendo a los niveles de excreción viral de los animales vacunados y que se desafiaron (105).

Otro ejemplo de esto, es el caso de una vacuna de rabia que codifica para glicoproteína, donde se demuestra que la inoculación de ratones por vía IM generó una mayor protección al desafío que los animales inoculados con el plásmido por la vía oral o la vía intradérmica con la pistola génica (*gene gun*). También se compararon 3 diferentes dosis: 200 µg, 100µg y 50 µg donde la dosis de 200 µg generó mayor título de anticuerpos que la dosis de 50 µg y una diferencia no significativa con dosis de 100 µg (158).

Aunado a esto se ha recurrido a medios mecánicos para su aplicación como el uso de la pistola génica y la electroporación *in vivo* (106).

## **II. JUSTIFICACIÓN**

Si bien, las vacunas de ADN representan una herramienta promisoría en la prevención de enfermedades, se requiere de optimizar estrategias para su aplicación que puedan inducir inmunidad protectora para determinar su potencial uso como inmunógeno en la prevención de enfermedades.

En este trabajo se propone profundizar en el estudio de mecanismos de respuesta inmune que genera este tipo de inmunógenos, así como el efecto que tiene la ruta y dosis de administración, a través del empleo de la vacuna de ADN pBH7D46 que contiene el gen *prn* de *Bordetella bronchiseptica*.

# **III. HIPÓTESIS**

La inmunización de ratones con la vacuna de ADN pBH7D46 que contiene el gen *prn* de *B. bronchiseptica* estimulará mecanismos inmunitarios celulares y humorales de diferente magnitud, utilizando diferentes estrategias de inmunización.



## **IV. OBJETIVO GENERAL**

Evaluar el efecto de la aplicación de la vacuna de ADN pBH7D46 en ratones, utilizando diferentes estrategias de inmunización, mediante la determinación de anticuerpos y citocinas, para identificar el tipo de respuesta inmunitaria generada por esta vacuna.

# **V. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.**

1. Determinación de la expresión de la proteína PRN en cultivos de células HeLa transfectadas con el pBH7D46.
2. Determinación de la respuesta humoral contra la Pertactina de *Bordetella bronchiseptica* en el suero de los ratones inmunizados con la vacuna de ADN pBH7D46 utilizando dos dosis y dos rutas de administración.
3. Determinación de las citocinas IL-2,IL-10, INF $\gamma$  e IL-4 en el suero de los ratones inmunizados con la vacuna de ADN pBH7D46 utilizando dos dosis y dos rutas de administración.

# **VI. METODOLOGÍA**

### **Obtención y purificación del plásmido pBH7D46.**

Se utilizó el método Maxi-prep de lisis alcalina descrito por Sambrook y col., con algunas modificaciones. Brevemente, se realizó un cultivo primario de *E. coli* transformadas en agar Luria Bertani (Ver Apéndice I) con kanamicina a una concentración de 50 µg/ml, de éste se tomaron 10 colonias y se inocularon en 30 ml de caldo LB con kanamicina (100 µg/ml), se incubó toda la noche en agitación orbital a 37°C. Se tomó 1 ml de éste y se resembró en 1 litro de caldo LB con Km, se incubó bajo las mismas condiciones. El cultivo se centrifugó durante 15 min., 4°C a 4100 rpm. Se desechó el sobrenadante y posteriormente se suspendió la pastilla en 36 ml de solución I (Apéndice I) y se agregaron 4 ml de lisozima (Apéndice I) recién preparada, después se agregaron 80 ml de solución II hecha en el momento (apéndice I), y posteriormente 40 ml de sol.III. Se centrifugó la mezcla durante 1 hora, 4°C, 4,000 rpm y se pasó el sobrenadante en un tubo graduado para agregar un volumen igual de fenol cloroformo. Se centrifugó por 5 min., 4°C, 12,000 rpm. Se tomó el sobrenadante y se agregaron 0.6 volúmenes de isopropanol, se centrifugó durante 15 min., 4°C, 10,000 rpm. La pastilla resultante se suspendió con etanol al 70% y se centrifuga. Este paso se repitió y el pellet final

se suspendió en 500 µl de agua bidestilada con un equipo Elix10 de la marca Milipore ®.

### **Ensayo de restricción del plásmido PBH7D46.**

Se analizó la secuencia del gen de *prn* reportada por Basurto *et al.* utilizando el software Vector NTI 10.0 ® de Invitrogen, posteriormente se realizó un ensayo de restricción *in silico* con la finalidad de corroborar que el inserto de la *prn* tuviese la dirección de lectura correcta; posteriormente se realizó este ensayo en el laboratorio. La enzima utilizada fue *EcoRV* de invitrogen ® y se siguió la metodología descrita por el fabricante ( Apéndice I).

### **Purificación y secuenciación del pBH7D46**

Con la finalidad de corroborar que el pBH7D46 elaborado en un trabajo previo por Basurto *et al.* (25) incluyera el gen de la pertactina, se purificó el plásmido con columnas de purificación Quiagen ® y se mandó a secuenciar utilizando el promotor T7 incluido en el PVAX1 (vector en el cual fue clonada la *prn*). La secuencia obtenida fue analizada en el *Genbank* de NIH para analizar homología con el gen de la pertactina de diferentes cepas.

## **Extracción de proteínas de la membrana externa de**

### ***B. bronchiseptica.***

Para comprobar la presencia de la Pertactina en la cepa utilizada en este trabajo, así como de tener un testigo positivo en los ensayos mediante Western Blot, se realizó una extracción de proteínas de membrana externa de *B. bronchiseptica* con la siguiente metodología, se realizó el cultivo primario en agar MacConkey a partir del cual se tomaron 5 colonias para inocularlas en 30 ml de caldo infusión cerebro corazón (BHI) e incubar en agitación orbital a 37°C durante 19 h.. De éste cultivo, se tomo 1 ml para resembrar en 200 ml de caldo BHI e incubar de la misma forma. El cultivo se centrifugó durante 15 min., 4°C, 5,000 rpm y la pastilla se lavó con 15 ml de una solución de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM. Se volvió a centrifugar con las mismas condiciones. Se desechó el sobrenadante y la pastilla se suspendió en 10 ml de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10Mm, se homogeneizó bien por inversión y se sonicó a 90 hertz, 45° de amplitud, 9 segundos de pulso y 9 de descanso, hasta aclarar. La muestra sonicada se centrifugó durante 10 min., 3,800 rpm a 4°C. Se tomó el sobrenadante y se centrifugó durante 30 min., 4°C, 35,000 rpm. La pastilla se suspendió en Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10Mm adicionado con 2% de tritón X-100 y se incubó durante una h. a 37 °C para después centrifugarlo durante 30 min., a 35,000 rpm, 4°C.

Se lavó con 1 ml de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10Mm y se centrifugó nuevamente, la pastilla resultante se suspende en 100 µl de SSAF (la cantidad dependerá del pellet obtenido).

#### **Extracción de proteínas totales de *Bordetella bronchiseptica*.**

Se realizó un cultivo bacteriano como describió en el apartado anterior, el cual se centrifugó durante 15 min., 4°C, 5,000 rpm. Se lavó la pastilla con 15 ml



de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10Mm y se centrifugó. La suspensión bacteriana se sonicó a 90 hertz con pulsos de 1 minuto hasta que la muestra clarificó. Se precipitó con 2 volúmenes de TCA al 10% y se centrifugó, la pastilla se lavó con Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10Mm y se centrifugó por 10 min., 4°C, 13,000 rpm. La pastilla resultante se suspendió en 100 µl de Tris 16 mM, pH 8.3.

### **Cuantificación de proteínas**

La determinación de concentración de proteínas se realizó por el método de Bradford (121), en donde previo a analizar las muestras en el espectrofotómetro (Pharma Biotech ®, Ultrospec 3000) a una longitud de onda de 595 nm, se realizaron diluciones del reactivo de Bradford con BSA al 1% para obtener una curva de referencia, para posteriormente realizar la cuantificación de las muestras, agregando 2 µl de la muestra en 98 µl de agua MiliQ y un ml de reactivo de Bradford en una cubeta del espectrofotómetro, se incubó 5 min. en oscuridad y se realizó la lectura.

### **Electroforesis de proteínas en gel de acrilamida-SDS al 12%**

La electroforesis se realizó en la cámara Mini-PROTEAN II (BIO-RAD®). Cada muestra se ajustó a una concentración de 70 µg por pozo, las cuales fueron previamente desnaturalizadas utilizando el buffer Laemmli para posteriormente separarlas por electroforesis a 60 V inicialmente y después a 70 V. Se utilizó el marcador de peso molecular preteñido *Precision Plus Protein Standards*® de Bio Rad®. (Detalles en apéndice I)

### **Estandarización de la técnica de Western Blot.**

Se realizó la estandarización de la técnica utilizando el testigo positivo (proteínas de membrana externa de *B. bronchiseptica*) como antígeno de captura. Como anticuerpo primario, se utilizó un anticuerpo monoclonal *BB05* que reconoce un antígeno de 68 kDa (pertactina) de *B. bronchiseptica* y fue donado por el Dr. Monataraz de la Facultad de Estudios Superiores Cuatitlán (44), así como un anticuerpo policlonal hecho en ratón a una dilución 1/100; como anticuerpo secundario un anti-ratón elaborado en cabra y acoplado a peroxidasa de rábano, a una dilución 1/1000. En el revelado se utilizó 4-cloro naftol.

Para realizar la inmunotransferencia de proteínas impresas en el gel de acrilamida a una membrana de nitrocelulosa, se utilizó una cámara de transferencia durante 16 h. a 22 V, 100 mA. Después de realizar la transferencia y luego de realizar cada incubación, la membrana fue lavada 4 veces: 2 veces con SSAF-T y 2 veces con SSAF. El bloqueo se llevó a cabo con leche descremada al 5% diluida con SSAF-T durante 5 h. a temperatura ambiente en agitación suave.

El anticuerpo *BB05* se utilizó a una dilución 1/50 y se diluyó con leche descremada al 5% durante 18 hrs a temperatura ambiente en agitación suave.

El anticuerpo secundario se utilizó a una dilución 1/3000 y se incubó durante 2 h. a temperatura ambiente en agitación suave.

Posteriormente la membrana se colocó en 100 ml de SSAF y se agregaron 60 mg 4-1- cloro naftol diluido en 20 ml de metanol frío, y 60 µl de peróxido de hidrógeno, se mantuvo en agitación a temperatura ambiente en oscuridad hasta que aparecieron las señales de reacción.

Una vez estandarizadas estas condiciones, se realizó un Western Blot para detectar la presencia de la pertactina en las proteínas del sobrenadante y las proteínas totales de células transfectadas con el pBH7D46.

### **Cultivo en células Hela**

Se realizó un cultivo de células Hela en frascos de cultivo de 25cm<sup>2</sup> con las siguientes condiciones:

- Medio DMEM (Gibco®).
- 1% glutamina (Gibco®).
- Suero Fetal Bovino 10% (Gibco®).
- Incubación a 37 °C

Se dejó incubando hasta que el cultivo alcanzara una confluencia del 80%, para realizar la transfección con el plásmido pBH7D46.

### **Ensayo de transfección con el pBH7D46.**

Una vez obtenida una confluencia del 80%, se cuantificaron las células Hela, en una cámara de Neubauer utilizando azul de tripano, para ajustar la concentración a  $2-6 \times 10^5$  células en 5 ml. Se realizó el ensayo de transfección utilizando el reactivo lipofectamina de Invitrogen ® siguiendo el manual del fabricante. Brevemente, se diluyeron 5 µg del pBH7D46 en 300 µl de medio DMEM (sin suero), en otro vial se diluyeron 30 µl de lipofectamina en 300 µl de DMEM. Posteriormente se combinaron las dos preparaciones, se

mezclaron gentilmente y se dejaron incubar por 30 minutos en hielo. Terminada la incubación, se agregaron 600  $\mu$ l de DMEM sin suero al tubo con los complejos. Se retiró el medio de las células y se reemplazó por 1.2 ml del complejo preparado.

Una vez transcurridas 5 h. de incubación, se agregó medio con 2X de la concentración normal de SFB y se incubó durante 3 días, removiendo el sobrenadante a las 24, 48 y 72 h. y se almacenó en congelación a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

### **Extracción de proteínas totales de células Hela transfectadas con el pBH7D46.**

Se extrajeron las proteínas de las células Hela transfectadas, con la siguiente metodología. Se retiró el medio y se lavó con SSAF, se agregó el buffer de lisis (Apéndice I) y se dejó incubar durante 5 min. Posteriormente se colectaron los detritus celulares con la ayuda de un scrapper.

### **Precipitación de proteínas del sobrenadante de células Hela transfectadas con el pBH7D46**

Las proteínas fueron obtenidas con ácido TCA de la siguiente manera:

1. Se agregó un volumen igual de ácido TCA al 20%
2. Se incubó 30 min. en hielo y se centrifugó a 12,000 rpm durante 10 min. a 4°C.
3. Se retiró el sobrenadante y se lavó la pastilla con etanol frío absoluto y se centrifuga a 13,000 rpm, 10 min. 4°C
4. Se retiró el sobrenadante por decantación y se dejó secar.

Se suspendió el pellet en Tris pH 8.3, 16  $\mu$ M.(Apéndice I)

## **Estandarización de la técnica de ELISA para detección de anticuerpos contra *Bordetella bronchiseptica***

### **Sensibilización de placas**

Se utilizaron PME, las cuales se extrajeron mediante la técnica antes mencionada y se sometieron a un tratamiento desnaturizante y sin desnaturizar para determinar cuál de los dos proporcionaba un mejor resultado.

Para evaluar con cuales condiciones se obtenía una mejor unión de antígeno a la placa de poliestireno de Thermo scientific®, se probaron dos soluciones amortiguadoras, SSAF pH 7.2 y amortiguador de carbonatos a pH 9.6 (Apéndice I), así como dos concentraciones de antígeno 2  $\mu$ l y 3  $\mu$ g. Se dejó incubando toda la noche a 4°C y al día siguiente se lavaron los pozos con 250  $\mu$ l de SSAF-T.

Para el proceso de desnaturización de antígeno se siguió el siguiente procedimiento: a una alícuota de 1,200  $\mu$ l de proteínas se le agregaron 240  $\mu$ l de SDS 10 %, 24  $\mu$ l  $\beta$ - mercaptoetanol y 936  $\mu$ l solución inhibidora de proteasas, y se calentaron a 90 °C durante 5 min. La finalidad de este procedimiento es desnaturizar las proteínas para un mejor reconocimiento antigénico.

Se utilizaron placas de 96 pozos y se incubó con el antígeno durante toda la noche a 4°C.

Después de cada incubación, a las placas se les realizaron 3 lavados con SSAF-T y se dejaron 5 min. en reposo entre cada lavado. Se evaluaron como agentes de bloqueo de sitios inespecíficos gelatina al 1% y BSA 1%, agregando 150  $\mu$ l por

pozo durante 2 h. a temperatura ambiente. También se evaluaron cuatro diluciones de anticuerpo primario que fueron 1/100, 1/200, 1/400 y 1/800, colocando 100 µl en cada pozo de la dicha dilución y se incubó durante una hora a 37°C. En la estandarización se utilizó suero obtenido de ratones inmunizados con una bacterina. Se utilizó un secundario un anti IgG de ratón elaborado en cabra y acoplado a peroxidasa de rábano de invitrogen ®, a una dilución 1/2000, agregando 100µl por pozo durante una hora. Como sustrato se utilizó ácido 2,2'-azino-bis-3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic (ABTS) y peróxido de hidrógeno y se incubó por 10, 20 y 30 min. para elegir el mejor tiempo.

El valor de absorbancia se analizó con la utilización de un lector de placas para ELISA (BIO-RAD®) a una longitud de onda de 405 nm.

### **Metodología de ELISA para determinación de la concentración de anticuerpos contra *Bordetella bronchiseptica***

De las condiciones evaluadas en el proceso de estandarización, se utilizaron las siguientes:

- a) 3 µg de antígeno de captura diluídos en buffer de fosfatos pH 7.2
- b) Dilución del anticuerpo primario de 1/400.
- c) Tiempo de incubación con el sustrato de 30 min. en oscuridad.
- d) Cada muestra se evaluó por triplicado para determinar el promedio de éstas.

## **Evaluación de los sueros para determinación de la concentración de citocinas por el método de ELISA tipo sándwich**

El suero obtenido de los ratones inmunizados se utilizó para detectar la concentración de IFN $\gamma$ , IL-2, IL-10 e IL-4, mediante pruebas de ELISA de captura con los estuches comerciales: Pierce #EM10012, #EMIL22, #EMIL42, #EM2IL102, siguiendo las instrucciones del fabricante.

### **Manejo de ratones balb/c**

Se obtuvieron 60 ratones hembra de 6 semanas de edad, lo cuáles se mantuvieron en el animalario del departamento de Microbiología e Inmunología de la FMVZ. Estos se colocaron en cajas de policarbonato de 50 cm de largo x 40 cm de ancho, con 20 cm de alto, recubiertas con un filtro a fin de minimizar las posibilidades de contaminación y propagación de agentes infecciosos con cama de viruta de madera esterilizada, marca Crigamex®, la cual se cambió cada tercer día. Cada caja fue identificada con su respectivo registro. Se les suministró alimento comercial de Purina® *ad libitum*. El agua se proporcionó a libre acceso un total de 20-45 ml por día. El manejo de los animales fue el siguiente:

- Se mantuvieron en un periodo de aclimatación durante 30 días.
- Se sacrificó un ratón por grupo tanto al inicio como al final del experimento, se hizo una disección para extraer las vías respiratorias bajas desde la tráquea hasta los pulmones y se realizaron cultivo con las muestras obtenidas, en agar McConkey y agar sangre, para descartar cualquier contaminación que pudiese interferir con los resultados



## **Diseño experimental**

Se formaron 6 grupos de 10 ratones en forma aleatoria y se identificó cada ratón con una muesca en la oreja izquierda para el grupo y en la oreja derecha para el número de individuo.

Los tratamientos en estudio fueron:

Grupo 1 100 µg de ADN plasmídico Intramuscular

Grupo 2 150 µg de ADN plasmídico Intramuscular

Grupo 3 100 µg de ADN plasmídico Intranasal

Grupo 4 150 µg de ADN plasmídico Intranasal

Grupo 5 testigo positivo (bacterina)

Grupo 6 testigo negativo (agua)

El adyuvante utilizado fue el carbopol 934® y se inmunizó con jeringas de insulina.

La asignación de los tratamientos a cada grupo fue en forma aleatoria. Este experimento corresponde a un diseño experimental denominado completamente aleatorizado (DCA), (159).

Los tratamientos, o vacunación se aplicaron al día 1 y al día 15 a partir del inicio del experimento.

### **Variable respuesta en estudio: muestras de suero**

Se realizó un sangrado a cada unidad experimental el cual se llevó a cabo los días 3 y 17 para la determinación de citocinas y 14 y 28 para la determinación de anticuerpos, los sangrados fueron realizadas en todos los ratones de la vena facial, obteniéndose una cantidad aproximada de 200  $\mu$ l de sangre por ratón. Las muestras para evaluación de citocinas se conservaron a -70°C y para anticuerpos a -20°C, hasta su utilización. Tras el último muestreo al día 29, los ratones fueron sacrificados por el método de dislocación cervical (162).

### **Análisis estadístico**

El análisis de las variables cuantitativas se realizó de manera descriptiva con los estadísticos: media, desviación estándar y estimación por intervalo de confianza al 95% para media. Asimismo, se determinó si las variables de título de anticuerpos y concentración de citocinas (INF  $\gamma$ , IL-2, IL-10 e IL-4) presentan distribución normal con el procedimiento de gráfica de cuantil normal (161).

Para el caso de medición de título de anticuerpos, a cada ratón se le hicieron dos observaciones: al día 14 y 28 de aplicado el tratamiento. Esto es lo que se conoce como un perfil y se obtuvieron 6 perfiles. Para realizar el análisis de perfiles se utilizó la prueba de Mauchly asociado al estadístico W para evaluar esfericidad de los resultados (158,159). Posteriormente se les realizó un análisis de varianza multivariado (MANOVA), en el cual se consideró como estadístico de prueba la lambda de Wilks ( $\Lambda$ ) con la aproximación a la distribución de F y  $\alpha= 0.05$  como nivel de significancia (160).

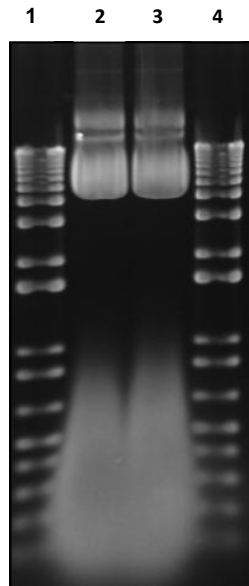
Para analizar la diferencia entre los 6 tratamientos en los tiempos 14 y 28 días, se realizó un análisis de la varianza, y para las variables de medición de anticuerpos y de citocinas se utilizaron contrastes de Bonferroni, con un nivel de significancia de  $\alpha = 0.05$  (159).

Para realizar la prueba de normalidad de las observaciones citada anteriormente se utilizó el paquete computacional JMP versión 5.0.1 (160), mientras que para los análisis de perfiles, y el de la varianza univariado y multivariado se utilizó el paquete computacional estadístico SPSS versión 16 (160).

# **VI. RESULTADOS.**

### Obtención y purificación del pBH7D46

Al cuantificar en un espectrofotómetro el producto obtenido de la extracción de ADN plasmídico mediante el método Maxi-prep de lisis alcalina, resultó en una concentración de 5898.3 ng/  $\mu$ l. En la fotografía del ADN plasmídico, se observa un patrón de bandeo característico de plásmidos, así como también se observa una gran cantidad de RNAs, por lo que para obtener una muestra más limpia, se incubó con RNasa.



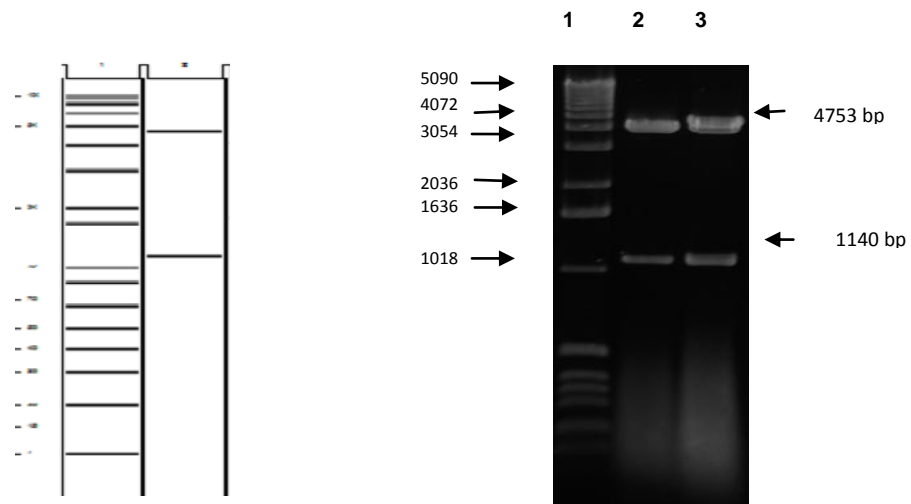
**Figura 1.** Fotografía de un gel de agarosa al 1% en TAE con el ADN plasmídico del pBH7D46.

En la foto se observan en el carril 2 y 3 ADN plasmídico del pBH7D46. En el carril 1 y 4 se observa el marcador de peso molecular 1kb ladder.

Se observan también una gran cantidad de RNAs, por lo que para obtener una muestra más limpia, se incubó con RNasa.

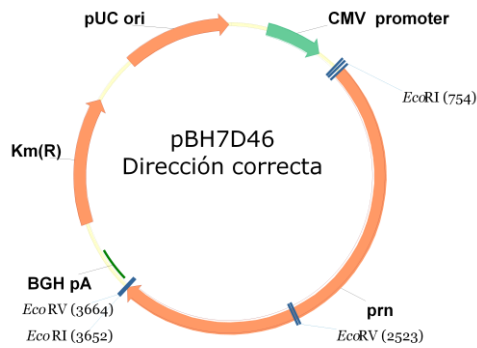
## Ensayo de restricción del pBH7D46

Con la finalidad de analizar las características moleculares del pBH7D46 (25), se realizó un ensayo de restricción *in silico*, y el patrón de bandeo coincidió con el observado en ensayo realizado en el laboratorio del pBH7D46 con la enzima *EcoRV*.

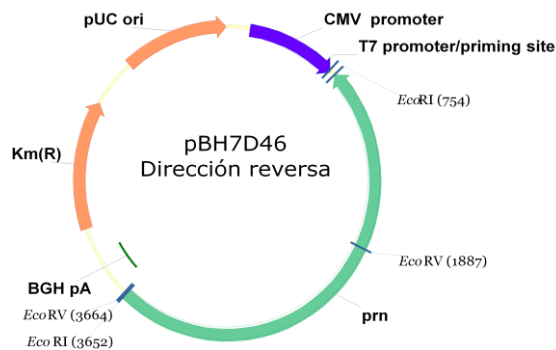


**Figura 2 y 3.** Ensayo de restricción *in silico* (2) y fotografía del gel de agarosa al 1% en TAE donde se observan los fragmentos resultantes de la digestión del pBH7D46 con la enzima *EcoRV*.

En el carril 2 y 3 se observan dos fragmentos, uno de 4753 pb y el otro de 1140 pb. En el carril 1 se observa el marcador de peso molecular 1kb ladder.



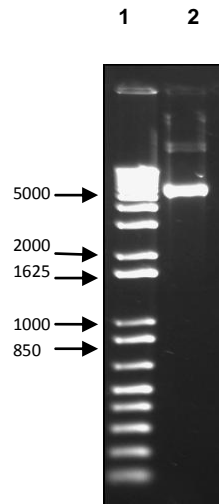
**Figura 4.** Mapa del pBH7D46. La construcción de este vector se hizo a partir del plásmido pVAX1 de Invitrogen. La figura muestra los sitios de corte para las enzimas de restricción *EcoRI* y *EcoRV* de las cuales *EcoRV* fue utilizada para corroborar que la dirección de lectura fuera correcta con respecto a la dirección de lectura del promotor del citomegalovirus humano (CMV).



**Figura 5.** Mapa del pBH7D46. La figura muestra los sitios de corte para las enzimas de restricción *EcoRV* y *EcoRI*, con la que se distingue un diferente patrón de digestión en caso de que el inserto estuviese en dirección incorrecta de lectura con respecto a la dirección de lectura del promotor del CMV.

## Purificación del pBH7D46

El plásmido fue purificado con columnas Quiagen® con la finalidad de realizar la secuenciación; en la fotografía el pBH7D46 se observó libre de RNAs.



**Figura 6.** Fotografía del gel de agarosa con el pBH7D46 purificado con de columnas de purificación Quiagen®.

La muestra obtenida por éste método se mandó a secuenciar parcialmente en un solo sentido y con la secuencia obtenida se determinaron los porcentajes de identidad con las secuencias de el gen de *prn* reportadas en el *Genbank*, en donde se detectó un 99% de identidad con la pertactina de la cepa P98 de *B. bronchiseptica*, que es la cepa de origen del inserto. A partir de la secuencia de nucleotidos, se obtuvo la secuencia de aminoácidos con el empleo de la página web: <http://web.expasy.org>.



En el cuadro 3, se muestra un alineamiento de aminoácidos de la pertactina de la cepa P98 con el producto de la secuenciación del pBH7D46.

(1)	DDASL-HGKYRALQRFWMAFFVLLRPFFPVPSRCGHGGRLLFTRHPMNMSLSRIVKAAP	-----PRN P98
(78)	DDASL-HGKYRALQRFWMAFFVLLRPFFPVPSRCGHGGRLLFTRHPMNMSLSRIVKAAP	--Secuencia inserto de PRN
(61)	LRRTTLAMALGXLGAAPAAYADWNNQSIKAGERQHGIHIKQSDGAGVRTATGTTIKVSG	-----PRN P98
(139)	LRRTTLAMALGALGAAPAAYADWNNQSIKAGERQHGIHIKQSDGAGVRTATGTTIKVSG	--Secuencia inserto de PRN
(121)	RQAQGVLLNPAAELRFQNGSVTSSGQLFDEGVRRFLGT	-----PRN P98
(199)	RQAQGVLLNPAAELRFQNGSVTSSG XLFXXKASXXGXX	--Secuencia inserto de PRN

**Cuadro 3.** Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la pertactina de *B. bronchiseptica* P98 con las secuencia obtenida del pBH7D46 con el promotor T7.

Los números entre paréntesis identifican la posición del aminoácido que se encuentra al inicio de la secuencia. Los sombreados en gris representan cambios en uno o más aminoácidos. Las “X” bases que no pudieron ser identificadas. Al realizar la comparación de secuencias, se detectó un 97% de homología de aminoácidos.

### **Evaluación bioquímica de una cepa de *Bordetella bronchiseptica*.**

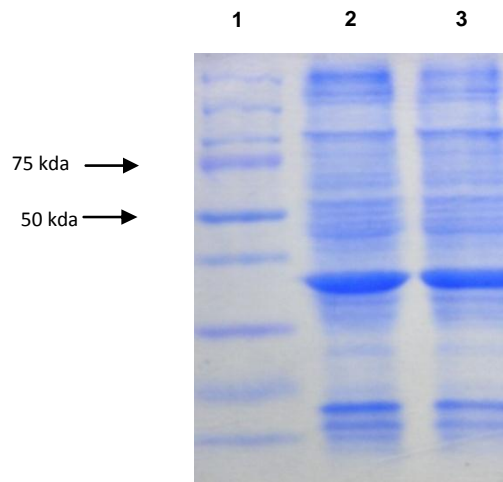
A partir de una cepa P98 de *B. bronchiseptica*, (donada por el Dr. Juan Antonio Montaraz de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán y obtenida de un aislamiento de campo de origen canino), se sembró en agar MacConkey y a partir de este cultivo se le realizaron las siguientes pruebas con la finalidad de comprobar la identidad y pureza de la cepa a trabajar.

**Cuadro 4**

<b>Prueba</b>	<b>Resultado</b>
Morfología de colonias	Pequeñas, redondas, convexas, lisas, grises
Agar McConkey	Positivo
Ureasa	Positiva
Leche tornasolada	Alcalina
Glucosa	Negativa
Nitratos	Negativo
Gelatina	Negativo
Oxidasa	Positiva
Catalasa	Positiva

### Extracción de proteínas de membrana externa de *B. bronchiseptica*

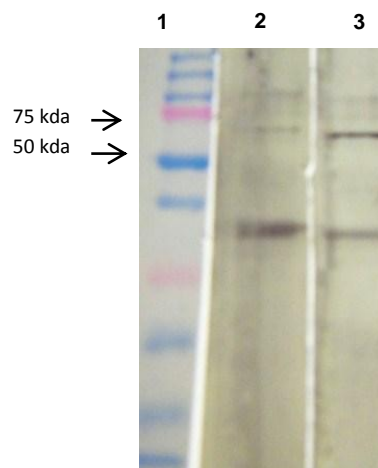
El extracto de PME de *B. bronchiseptica* fue analizado en el gel de acrilamida, en donde se observan bandas que podrían corresponder a la proteína de 68 kda, la pertactina



**Figura 7.** Fotografía de un gel de poliacrilamida al 12% (SDS PAGE) teñido con azul de Comassie. En la foto se observa la separación del extracto de proteínas de membrana externa de *Bordetella bronchiseptica* en los carriles 2 y 3. En el carril 1 se incluyó el marcador de peso molecular preteñido de BioRad®.

### **Análisis de PME de *B. bronchiseptica* mediante Western Blot**

Las PME transferidas a una membrana de nitrocelulosa, reaccionaron con el anticuerpo monoclonal *BBO5*, pudiéndose observar dos bandas de las cuales una corresponde con el peso de la pertactina.

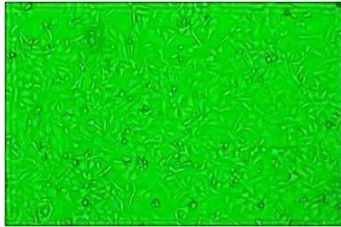


**Figura 8.** La fotografía corresponde a una membrana de nitrocelulosa con proteínas de *B. bronchiseptica* incubadas con el anticuerpo monoclonal *BB05*.

En los carriles 2 y 3 se pueden apreciar las bandas que corresponden al peso de la pertactina, 68 kda, así como una banda de aproximadamente 30 kDa y corresponde a una proteína que está en gran cantidad y que probablemente sea un dominio de degradación de la pertactina madura, ya que ésta se sintetiza como una proteína de 93 kDa antes de ser secretada a la membrana externa. El carril 1 corresponde al marcador de peso molecular preteñido.

## Ensayo de transfección de células Hela con el pBH7D46

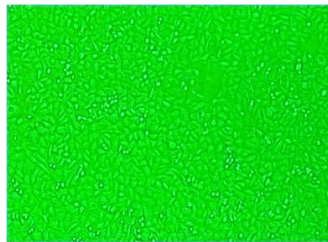
Luego de realizar la transfección de células Hela con el pBH7D46, estas se incubaron durante 3 días y se examinó en diferentes h. la viabilidad celular, así como la confluencia.



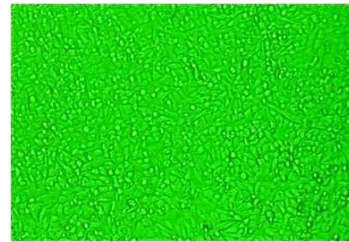
(a) Células Hela sin transfectar



(b) Células Hela transfectadas a las 24h.



(c) Células Hela transfectadas 48 h.



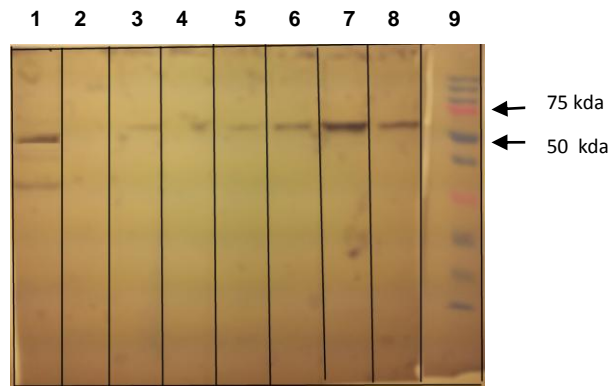
(d) Células Hela transfectadas 72 h.

**Figura 9.** Fotografías de células Hela transfectadas con el pBH7D46 tomadas con un microscopio de fluorescencia.

Se puede observar en las fotografías una reducción de confluencia a partir de las 24 h. (b), observándose un monoestrato al 80%, mientras que a las 48 h. (c) el crecimiento celular es evidente y disminuyen los espacios, y a las 72 h. (d) se observa un monoestrato celular al 100%.

## Western Blot con las proteínas de células transfectadas con el pBH7D46

El extracto de proteínas del sobrenadante y proteínas totales de las células Hela transfectadas con el pBH7D46, reaccionó con el anticuerpo monoclonal *BB05* contra la pertactina de *B. bronchiseptica*.



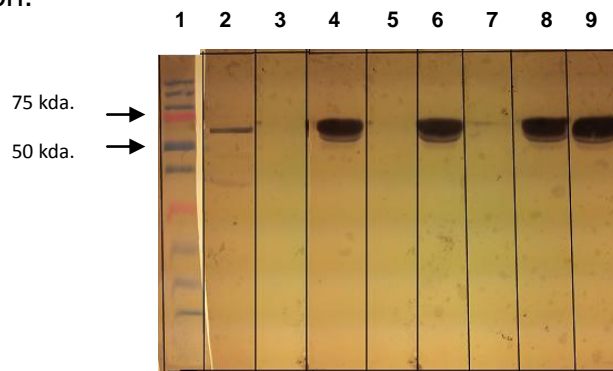
**Figura 10.** Fotografía de una membrana de nitrocelulosa en donde se muestra la reacción de Inmunoblot usando un anticuerpo monoclonal *BB05* contra la pertactina en sobrenadante de células Hela transfectadas con el pBH7D46. Carril 1: PME de *B. bronchiseptica*; Carril 2: sobrenadante de células Hela sin transfectar; carril 3, 5,7: sobrenadante de células Hela transfectadas a las 24,48 y 72 h. Usando lipofectamina; Carril 4,6,8: sobrenadante de células Hela transfectadas a las 24,48 y 72 h. usando carbopol; Carril 9: marcador de peso molecular preteñido.

Durante este ensayo se realizó la inmunodetección de la pertactina (utilizando extractos de membrana externa) como control positivo. La expresión de la pertactina fue se midió en diferentes tiempos post transfección con el pBH7D46.

En la figura 10 se pueden visualizar bandas que coinciden con el testigo positivo (proteínas de membrana externa) en peso molecular. La detección de ésta banda

se hizo evidente a partir de las 24 h. postransfección utilizando lipofectamina y se pudo detectar un aumento en la cantidad de proteína, percibiendo que a las 72 h. hubo una mayor cantidad comparado con las 24 y 48 h. postransfección.

Para comprobar la eficiencia del adyuvante utilizado en las vacunación, se realizó un ensayo *in vitro* transfectando el pBH7D46 en células Hela, agregando el copolímero Carbopol 934®. La detección de la banda que coincide con el testigo positivo se observa a partir de las 48 h. y se percibió un aumento a las 72 h. postransfección.



**Figura 11.** Fotografía de una membrana de nitrocelulosa en donde se muestra la reacción de Inmunoblot usando un anticuerpo monoclonal *BB05* contra la pertactina en células Hela transfectadas con el pBH7D46.

El Carril 1 corresponde a: marcador de peso molecular; Carril 2: preteñido proteínas de membrana externa de *Bordetella bronchiseptica*; Carril 3, células Hela sin transfectar; Carril 4,6,8: células Hela transfectadas a las 24,48 y 72 h. usando lipofectamina; carril 5,7, 9: células Hela transfectadas a las 24,48 y 72 h. usando carbopol;

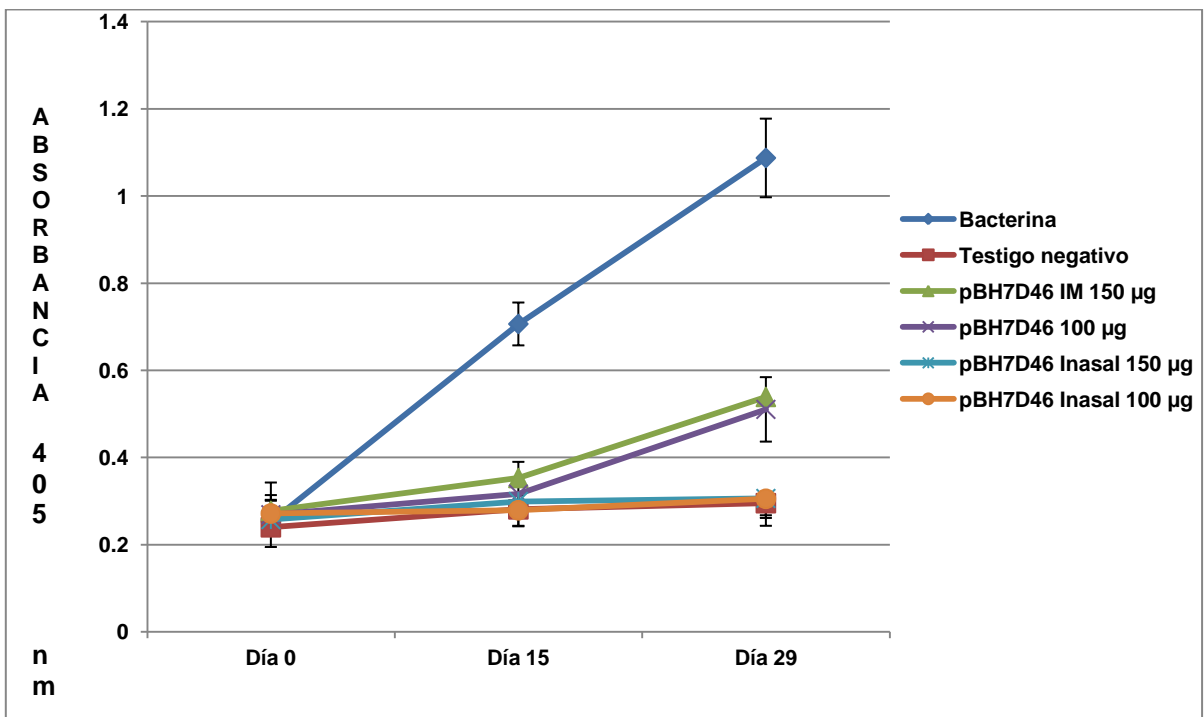
Este ensayo se realizó para evaluar la expresión de la pertactina en las células Hela transfectadas con el pBH7D46. Como en el ensayo anterior, se utilizaron proteínas de membrana externa como control. El patrón en la detección de la

pertactina fue muy similar al observado en el sobrenadante de las células transfectadas, con la diferencia de que se visualizó una mayor detección de la proteína que reaccionó con el anticuerpo *BB05*.



## Respuesta inmunitaria humoral a la vacunación de los ratones

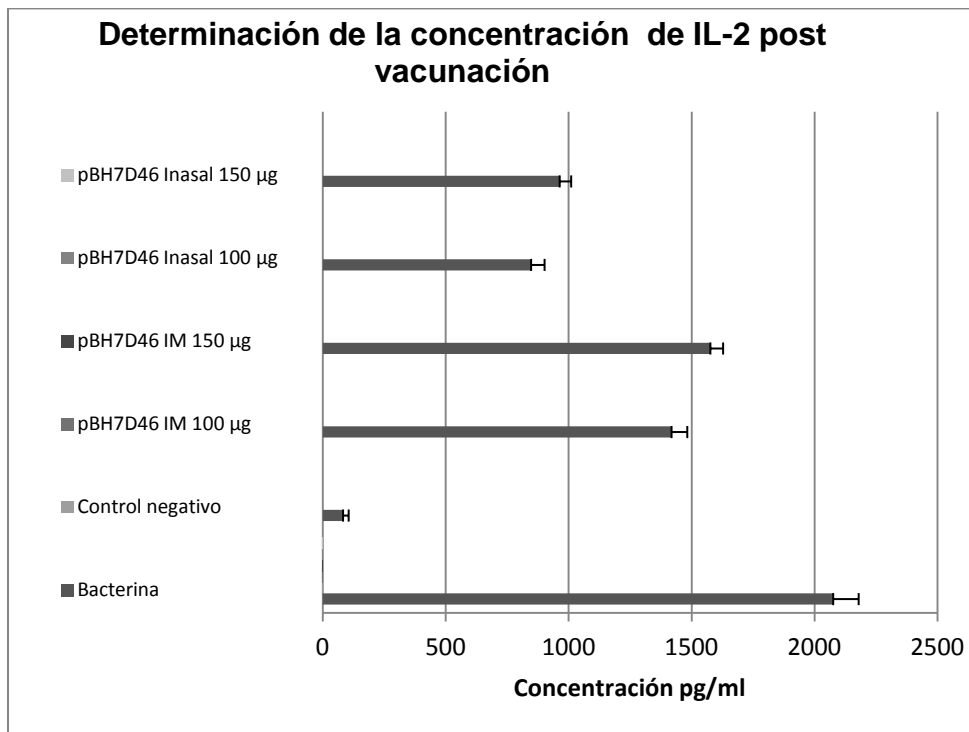
Al realizar la determinación de la concentración de anticuerpos IgG contra *B. bronchiseptica* en el suero de los animales inmunizados, luego del proceso de estandarización, se utilizó como antígeno de captura, 3 µg de proteínas de membrana externa por pozo, y el suero se utilizó a una dilución 1/400. Para la observación de los sueros, se contó con muestras de 8 individuos en cada día de muestreo por grupo de animales. Los tratamientos en estudio para los 6 grupos experimentales fueron: grupo 1.- 100 µg de ADN plasmídico Intramuscular, grupo 2.- 150 µg de ADN plasmídico Intramuscular, grupo 3.- 100 µg de ADN plasmídico Intranasal, grupo 4.-150 µg de ADN plasmídico Intranasal, grupo 5.- testigo positivo (bacterina) y grupo 6.- testigo negativo (agua).



**Figura 12.** Cinética de desarrollo de la respuesta inmunitaria humoral de los ratones vacunados con la vacuna pBH7D46, comparada con los ratones inoculados con una bacterina así como con los ratones inoculados con agua estéril.

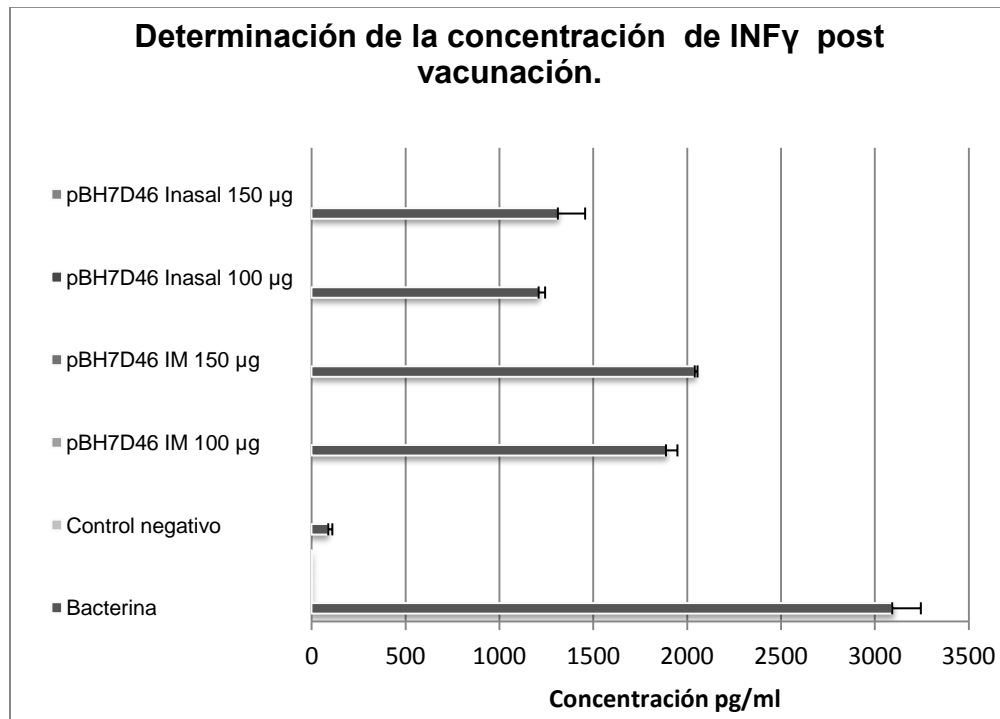
El grupo de ratones inmunizados con la bacterina de *B. bronchiseptica* mostraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en comparación a los cuatro grupos inoculados con la vacuna de ADN pBH7D46 y con el testigo negativo tras la primera y segunda vacunación. Mientras que los grupos inoculados por la vía intramuscular fueron diferentes significativamente ( $p < 0.05$ ) de los grupos inoculados por la vía intranasal y del grupo testigo negativo.

En las figuras 13,14,15 y 16 se muestran las curvas de los valores de absorbancia obtenidos en la evaluación de citocinas. El suero de los ratones fue colectado dos días después de la segunda vacunación para determinar la concentración de IL-2, INF- $\gamma$ , IL-10 e IL-4.



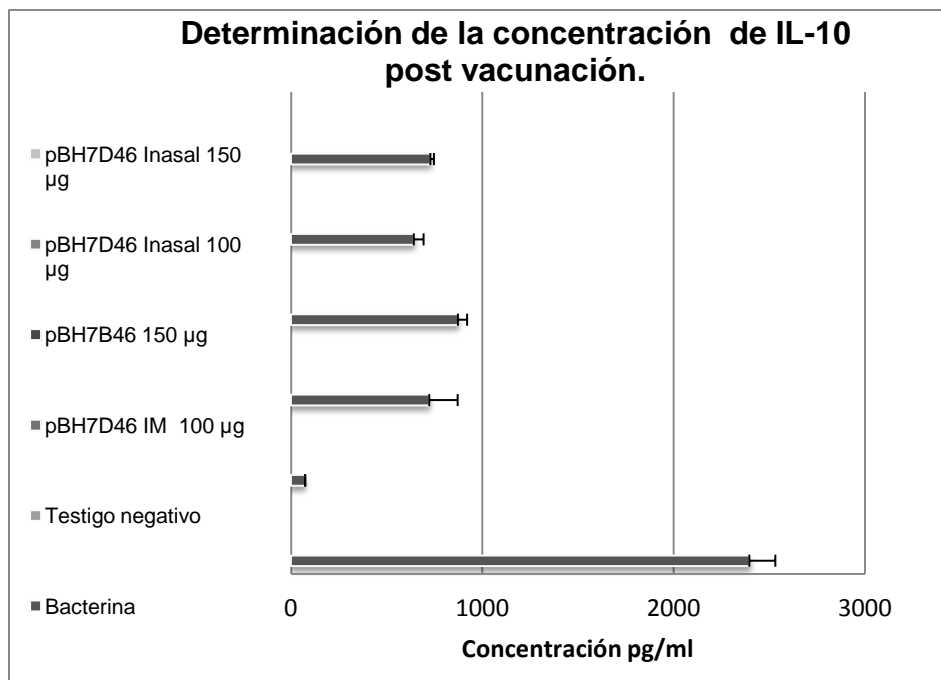
**Figura 13.** Producción de IL-2 en respuesta a la vacunación con la vacuna de ADN pBH7D46 comparada con los ratones vacunados con una bacterina de *B. bronchiseptica* y con el grupo de ratones sin inmunizar (testigo negativo).

El grupo de los ratones inmunizados con la bacterina mostró niveles significativamente más elevados ( $p < 0.05$ ) que los cuatro grupos inmunizados con el pBH7D46 y del grupo control negativo. El grupo inmunizado con la vacuna de ADN pBH7D46 por la vía intramuscular fue diferente significativamente al grupo inmunizado por la vía intranasal y al grupo testigo negativo ( $p < 0.05$ ).



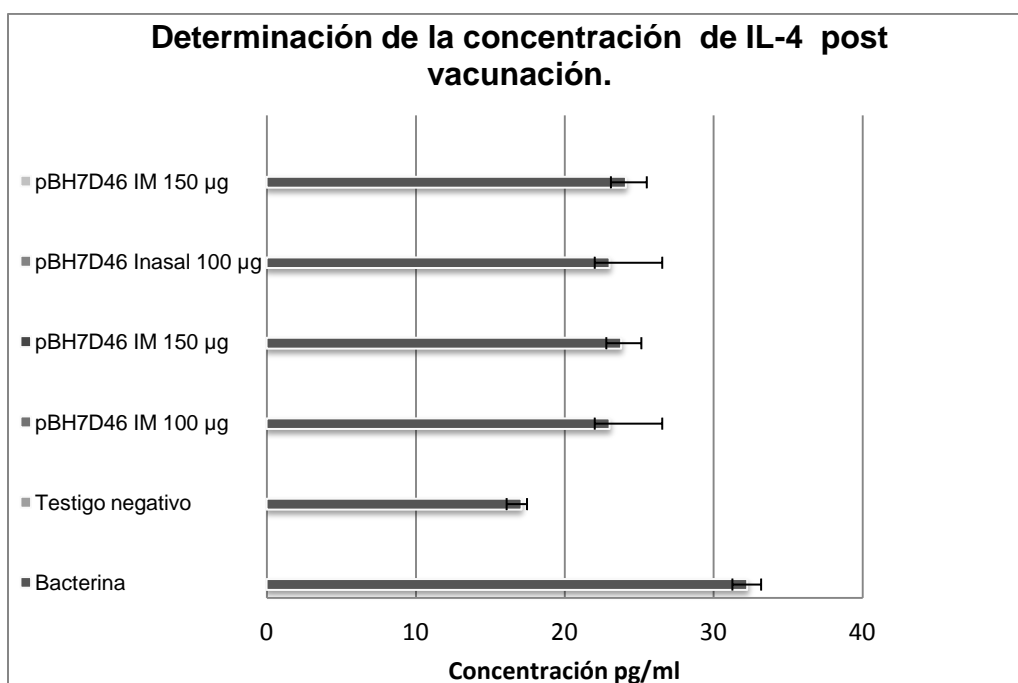
**Figura 14.** Producción de INF $\gamma$  en respuesta a la vacunación con la vacuna de ADN pBH7D46 comparada con los ratones vacunados con una bacterina de *B. bronchiseptica* y con el grupo de ratones sin inmunizar (testigo negativo).

El grupo de los ratones inmunizados con la bacterina mostró niveles significativamente más elevados ( $p < 0.05$ ) que los cuatro grupos inmunizados con el pBH7D46 y del grupo control negativo. El grupo inmunizado con la vacuna de ADN pBH7D46 por la vía intramuscular fue diferente significativamente al grupo inmunizado por la vía intranasal y al grupo testigo negativo ( $p < 0.05$ ).



**Figura 15.** Producción de IL-10 en respuesta a la vacunación con la vacuna de ADN pBH7D46 comparada con los ratones vacunados con una bacterina de *B. bronchiseptica* y con el grupo de ratones sin inmunizar (testigo negativo).

El grupo de los ratones inmunizados con la bacterina mostró niveles significativamente más elevados ( $p < 0.05$ ) que los cuatro grupos inmunizados con el pBH7D46 y del grupo control negativo. Los cuatro grupos inmunizados con la vacuna de ADN no mostraron ser diferentes significativamente entre ellos ( $p < 0.05$ ), pero si fueron diferentes del control negativo.



**Figura 16.** Producción de IL-4 en respuesta a la vacunación con la vacuna de ADN pBH7D46 comparada con los ratones vacunados con una bacterina de *B. bronchiseptica* y con el grupo de ratones sin inmunizar (testigo negativo).

Ninguno de los grupos inmunizados mostró diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) con el control negativo.



# **VIII. Discusión.**

En el presente trabajo se evaluó la respuesta inmunitaria humoral y celular en ratones inmunizados con una vacuna de ADN que contiene el gen *prn* de *B. bronchiseptica*. Con los resultados obtenidos se corroboró la expresión de la pertactina en células Hela transfectadas con el pBH7D46; también se demostró que esta vacuna de ADN es capaz de inducir la síntesis de anticuerpos IgG y un perfil predominante de IL-2 e INF $\gamma$  que son producidas por linfocitos Th1.

El suero obtenido de los ratones pertenecientes a los seis grupos experimentales, incluyendo los 2 grupos control, fueron evaluados por medio de la técnica de ELISA para determinar su reactividad contra la pertactina de *Bordetella bronchiseptica*. Se analizó si la vía y la dosis de administración de la vacuna de ADN tienen un efecto sobre la respuesta inmune inducida en los ratones. Los grupos que recibieron la vacuna por la vía Intramuscular, indujeron una mayor producción de anticuerpos IgG comparada con el grupo vacunado por la vía Intranasal, tras la primera y la segunda vacunación, también se pudo observar un incremento significativo de la primera a la segunda vacunación. El grupo inmunizado por la vía intranasal se comportó de manera similar al control negativo y no tuvo un incremento significativo luego de la segunda inmunización. Se ha comprobado que la respuesta inmune inducida por una vacuna de ADN está influenciada en gran medida por la ruta de administración, ya que influye en los mecanismos de interacción con la célula huésped y expresión del gen codificante (135). Existen varios estudios que han demostrado la eficacia de inmunización utilizando diferentes estrategias, y el resultado ha conducido a la activación de una



respuesta inmune de diferente magnitud y duración (131,132,133,134,135,136,137,138).

Otro aspecto a considerar en las inmunizaciones fue la dosis. En los grupos vacunados con la dosis de 150  $\mu$ g no se encontraron diferencias significativas con respecto a los de los grupos que recibieron dosis de 100  $\mu$ g, en ninguna de los dos tiempos evaluados. Existen reportes en donde se ha demostrado que la respuesta de mayor magnitud tras la inmunización con una vacuna de ADN, ha sido con la dosis más alta (140,141). Sin embargo en el caso de esta vacuna, el efecto de las dosis evaluadas no fue significativo, probablemente debido a que la diferencia del ADN plasmídico no fue suficiente para inducir una respuesta de IgG más elevada, como se ha mostrado en otros trabajos en los que han utilizado dosis desde 50, 100, y 200  $\mu$ g de ADN plasmídico (158).

Los resultados encontrados mediante la prueba de ELISA indicaron que tras la inmunización con la vacuna de ADN pBH7D46, se promovió una respuesta de anticuerpos IgG, aunque ésta fue menor significativamente que la inducida por la bacterina. Lo anterior probablemente es debido a que el número de antígenos que contiene la bacterina es mayor comparado con un solo antígeno que expresa la vacuna de ADN y que los antígenos de captura utilizados en las pruebas de ELISA fueron producto de un extracto de proteínas de membrana externa de *B. bronchiseptica* y no solamente de la pertactina. Sin embargo es importante resaltar que la pertactina, siendo un solo antígeno proteínico, fue capaz de inducir una respuesta humoral, que aunque fue menor que la inducida con la bacterina, es

posible que con este título de anticuerpos, se genere una respuesta de memoria y que posteriormente el título de anticuerpos se dispare frente al desafío con el agente infeccioso completo, como se ha observado con otros modelos de vacunas de ADN (166).

El isotipo de anticuerpo IgG es particularmente específico para unirse a determinantes antigénicos presentes en microorganismos infecciosos, conduciendo a la opsonización e incremento de la fagocitosis mediada por macrófagos y neutrófilos, lo cual contribuye a la destrucción del patógeno. Como se ha mencionado anteriormente, la adhesión de *Bordetella* a células epiteliales del tracto respiratorio es un evento clave durante la infección, y la pertactina es un factor de virulencia involucrado en este proceso. Estudios previos han sugerido que los anticuerpos que previenen la adherencia bacteriana al tracto respiratorio, bloquean el proceso de colonización (142,143).

Por otra parte, los anticuerpos IgG se diferencian en cuatro subclases: IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. La diferenciación a una subclase específica está determinada por el perfil de citocinas producido. Se ha podido demostrar que IFN  $\gamma$ , participa en la regulación de la síntesis de anticuerpos IgG2a del ratón y promueve la formación de receptores Fc $\gamma$ RI (147,153). Mientras que IL-4 e IL-5, se han identificado por participar en el cambio de clase de anticuerpos hacia IgG1(144,145). Así mismo se ha reportado que IL-10 y TGF $\beta$  por inducir la síntesis de IgG4(146).

Debido a estos antecedentes se decidió obtener un perfil de citocinas secretado tras la inmunización con la vacuna pBH7D46, para tener mayor evidencia del mecanismo de inmunidad inducido por ésta. Los resultados obtenidos con la prueba de ELISA para determinar la concentración de IL-2, INF $\gamma$ , IL-4 e IL-10 en el suero de los ratones inmunizados mostraron una respuesta elevada de IL-2 e INF $\gamma$ , en todos los grupos evaluados, aunque también se pudo detectar IL-10 en menor proporción. Estos resultados sugieren la estimulación de una respuesta predominante por linfocitos de tipo Th1; Qing-tian *et al.* observaron que al evaluar IL-10, IL-4, INF $\gamma$  y TNF $\alpha$ , en ratones Balb/c tras la inmunización con una vacuna ADN de *B. pertussis* codificando genes para pertactina, hemaglutinina filamentosa y la toxina de Pertussis, se indujo una respuesta celular predominantemente. También demostraron que cuando la vacuna se administró en combinación con un plásmido codificando para el factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos murino (GM-CSF) y posteriormente desafiando con proteínas homólogas purificadas, se observó un incremento significativo de tanto de la respuesta inmune celular como humoral (164). El presente trabajo es el primer estudio reportado en evaluar citocinas inducidas por la pertactina de *B. bronchiseptica*.

Específicamente se ha demostrado que INF $\gamma$  puede facilitar la interacción de células presentadoras de antígeno con linfocitos T y B por medio de la sobrerregulación de moléculas de histocompatibilidad de clase II, y también puede activar la diferenciación de células B que secretan isotipos IgG2a (143,153). Esto podría indicar que la respuesta de anticuerpos IgG observada en los ratones

inmunizados con la vacuna de ADN pBH7D46 fue principalmente de la subclase IgG2a, aunque no se descarta una participación de IgA, que también puede ser estimulada por INF $\gamma$  o IL-2 (156,157). Sin embargo en este trabajo no se contempló la detección IgA.

Al comparar la vía de administración, se pudo observar que la vía IM indujo una mayor concentración IL-2 e INF $\gamma$  comparada con la respuesta generada en ratones inmunizados por la vía intranasal. Mientras que no se pudo detectar la presencia de IL-4. Estos resultados son consistentes con el hallazgo de una mayor respuesta de anticuerpos IgG en los ratones inmunizados por la vía intramuscular, ya que probablemente a través ésta vía de administración, hubo una mejor captación del pBH7D46 por parte de células presentadoras de antígeno, las cuales pudieron expresar la pertactina y presentarla a linfocitos T CD4+. Se ha podido demostrar que existen pequeñas cantidades de células presentadoras de antígeno en el músculo, realizándose la presentación de antígeno principalmente en el bazo. A pesar de esto, la mayor parte de células transfectadas tras la inmunización intramuscular con una vacuna de ADN, son células musculares y queratinocitos, que aunque carecen del MHC de clase II así como de moléculas coestimuladoras (CD80 y CD86) que son necesarias para la activación de linfocitos T, desempeñan un papel importante mediante la síntesis y secreción de proteínas que aumentan la magnitud de la respuesta inmune (165,166).

Un hallazgo llamativo en estos resultados fue que se pudo detectar un incremento en IL-10, tras la inmunización de ratones con el pBH7D46 aunque en menor concentración que INF $\gamma$  e IL-2. Éste hallazgo en la detección de IL-10 pudo

ser resultado de la activación de macrófagos y linfocitos B. Hasta hace algunos años, IL-10 se consideraba una citocina que pertenecía al subgrupo de linfocitos Th2, pero actualmente es considerada una citocina con funciones inmunoregulatoras (Treg); esto podría explicar su detección en el suero de los ratones inmunizados con la vacuna de ADN pBH7D46 en el presente trabajo, ya que al activarse una respuesta celular tipo Th1, debió activarse también un mecanismo que regule y controle este perfil de citocinas (167).

*Bordetella bronchiseptica* ha sido clásicamente considerada un patógeno extracelular, en los cuales una respuesta tipo Th2 se asocia con protección. Sin embargo existe evidencia de que *Bordetella* puede sobrevivir dentro de varios tipos celulares, incluyendo macrófagos y células dendríticas por varios días (148,149,150,151, 152). Aunque aún no se ha esclarecido cuál es el mecanismo, la sobrevivencia intracelular de *B. bronchiseptica* puede contribuir a explicar la respuesta inmune celular tipo Th1 observada después de la infección con este microorganismo y que ha sido relacionada con inmunidad protectora. Varios estudios en modelos murinos indican que la inmunidad celular juega un papel determinante en la eliminación de *B. bronchiseptica* del organismo y que el aumento de efectividad de anticuerpos se da principalmente por células Th1 (76).

La detección de la pertactina en las células Hela transfectadas con el pBH7D46 que se realizó mediante la técnica de *Western Blot* pudo observarse tanto en el sobrenadante como en el extracto de proteínas totales de las células, y se hizo evidente utilizando lipofectamina a partir de las 24 hrs post transfección, y a las 48 h. utilizando Carbopol 934. Se eligió usar estos dos métodos para realizar el ensayo de transfección, por un lado la lipofectamina, debido a que el uso de éste tipo de liposomas catiónicos ha reportado tener una alta eficiencia (~50%) y reproductibilidad comparado con otros métodos de transfección (electroporación, microinyección directa, bombardeo de células y tejidos con microproyectiles, (124) así como también ha sido más eficiente al compararse con otros liposomas catiónicos comerciales (125). Sin embargo, a pesar de que se ha estudiado a profundidad los mecanismos por los cuales los lípidos catiónicos confieren buenos resultados como vehículos de transfección en cultivo celular, algunos estudios realizados en modelos *in vivo* han mostrado que es altamente citotóxica (126).

Por otra parte se comprobó la eficiencia *in vitro* del adyuvante utilizado en las inmunizaciones, el Carbopol 934®. Éste compuesto es un polímero de ácido acrílico que se ha estudiado ampliamente por su propiedad de adhesivo biológico debido que tiene capacidad de modular la liberación del antígeno; su efecto como adyuvante fue descrito hace algunos años (127,128) y ha sido usado en vacunas veterinarias contra diversas enfermedades (129,130).

La diferencia que pudo observarse en el ensayo de Western Blot con éstos dos tratamientos en el tiempo de detección de la proteína a las 24 h. con lipofectamina y a las 48 h. con Carbopol, probablemente se debió a que luego de que el plásmido fuera endocitado por las células y liberado a la ruta endosomal, se sometió a un cambio de pH, lo cual en el caso del carbopol, hizo más susceptible al ADN plasmídico a la degradación por DNAsas dependientes de pH, y por lo tanto, una menor cantidad de DNA pudo haber atravesado la membrana nuclear para permitir a la RNA polimerasa transcribir el gen de la pertactina y traducirlo en el ribosoma y por lo tanto lograr su detección hasta las 48 h. Esto podría deberse a que el carbopol es considerablemente menos efectivo como adyuvante cuando se somete a un pH ácido (es por eso que se debe preparar a un pH neutro) (154).

# **IX. CONCLUSIONES**



1. La vacuna de ADN elaborada con el vector pBH7D46 indujo la síntesis de anticuerpos IgG en los ratones inmunizados por la vía intramuscular, pero no en los ratones inmunizados por la vía intranasal.
2. El perfil predominante de citocinas inducidas por la vacuna de ADN pBH7D46 como IL-2, INF $\gamma$  fue de tipo Th1 en todos los grupos evaluados, aunque en mayor concentración utilizando la vía intramuscular.
3. Los grupos inmunizados con la vacuna pBH7D46 con dosis de 150  $\mu$ g no mostraron diferencias significativas con respecto a los grupos que recibieron dosis de 100  $\mu$ g en ninguno de los dos tiempos evaluados.
4. La aplicación de la bacterina indujo una mayor síntesis de anticuerpos IgG y de citocinas IL-2, IL-10 e INF $\gamma$ , en los dos tiempos evaluados.

#### Prospectiva

1. Evaluar otras estrategias de transfección del pBH7D46 *in vitro*.
2. Evaluar la capacidad de transfección *in vivo* e *in vitro* del pBH7D46 clonando además dentro de éste el gen que codifica para la hemaglutinina filamentosa.
3. Evaluar la respuesta inmune, tras la inmunización *in vivo* utilizando la pistola génica.
4. Realizar un ensayo de desafío con *B. bronchiseptica*, inmunizando por la vía intramuscular y utilizando dosis de 150 y 250  $\mu$ g de ADN plasmídico.
5. Incrementar los tiempos de evaluación de la respuesta inmunitaria en el suero de los animales inmunizados con el pBH7D46.

# **X. REFERENCIAS**



1. **Groisman EA.** Principles of Bacterial Pathogenesis. United States.: Academic Press, 2001.
2. **Mattoo S, Foreman-Wykert AK, Cotter PA, Miller JF.** Mechanisms of *Bordetella* pathogenesis. Front Biosci 2001; 6:E168-86.
3. **OMS.** <http://www.who.int/es/>
4. **Mattoo S., Cherry J.** Molecular Pathogenesis, Epidemiology, and Clinical Manifestations of Respiratory Infections Due to *Bordetella pertussis* and Other *Bordetella* Subspecies. Clinical Microbiology Reviewers 2005; 18: 326–382.
5. **Kerstens K, Hin KH, Hertle A, Segers P, Siegmann O, Ley J.** *Bordetella avium* sp. nov., Isolated from the Respiratory Tracts of Turkeys and Other Birds. International Journal of Systematic Bacteriology, 1984; 34: 56-70.
6. **Gross R, Keidel K, Smichitt K.** Resemblance and divergence: the “new” members of the genus *Bordetella*. Med Microbiol Immunol. 2010; 199:155–163
7. **Bjørnstad ON, Harvill ET.** Evolution and emergence of *Bordetella* in humans. Trend in microbiology 2005; 13:355-9.
8. **Lapin JH.** Whooping cough. Journal of School Health 1943; 10:265-266.
9. **Bordet J, Gengou O.** Le microbe de la coqueluche. *Annales de l'Institut Pasteur* 1906; 20:48–68.
10. **Holmes WH.** Bacillary and rickettsial infections: acute and chronic. New York.: Macmillan, 1940.
11. **Brown JH.** *Bacillus bronchisepticus* infection in a child with symptoms of pertussis. Bull. Johns Hopkins Hosp. 1926; 38:147–153.
12. **Ferry NS.** *Bordetella bronchisepticus*: the cause of distemper in dogs and a similar disease in other animals. Vet J. 1912; 68:376-391
13. **Goodnow RA.** Biology of *Bordetella bronchiseptica*. Microbiol. Rev. 1980; 44:722–738.

14. **McGowan JP.** Some observations on a laboratory epidemic, principally among dogs and cats, in which the animals affected presented the symptoms of the disease called “distemper.” *J. Pathol. Bacteriol.* 1911; 15:372–430.
15. **Rhea LJ.** The comparative pathology of the tracheal and bronchial lesions produced in man by *B. pertussis* (whooping-cough) and those produced in dogs by *B. bronchisepticus* (canine distemper). *J. Med. Res.* 1915; 32: 471–474.
16. **Salmaso S, Mastrantonio P, Tozzi AE, Stefanelli P, Anemona A, Giammanco A.** Sustained efficacy during the first years of life of 3-component acellular pertussis vaccines administered in infancy: the Italian experience. *Pediatrics* 2001; 108:E81.
17. **Torrey JC, Rahe AH.** Studies in canine distemper. *Med. Res. J.* 1912; 27:291–364.
18. **Woolfrey BF, Moody JA.** Human infections associated with *Bordetella bronchiseptica*. *Clin. Microbiol. Rev.* 1991; 4:243–255.
19. **Bradford WL, Slavin B.** An organism resembling *Hemophilus pertussis* with special reference to color changes produced by its growth upon certain media. *Am. J. Public Health* 1937; 27:1277–1282.
20. **Eldering G, Kendrick P.** *Bacillus parapertussis*: a species resembling both *Bacillus pertussis* and *Bacillus bronchiseptica* but identical with neither. *J. Bacteriol.* 1938; 35:561–572.
21. **Eldering G, Kendrick P.** A group of cultures resembling both *Bacillus pertussis* and *Bacillus bronchiseptica* but identical with neither. *J. Bacteriol.* 1937; 33:71.
22. **Nicolet J.** Compendio de Bacteriología Médica Veterinaria. España: Editorial Acribia, 1986.
23. **Molina González MG.** Aislamiento y caracterización de *Bordetella bronchiseptica* de origen canino (tesis de Maestría). Cuatitlán Izcalli (Estado de México) México: Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, 2001.
24. **Cottral GE.** Manual de métodos estandarizados en Microbiología veterinaria; México, D.F.: ediciones científicas La prensa mexicana, SA., 1986.

- 25. Basurto Alcántar FJ.** Elaboración de un inmunógeno experimental contra la bordeteliosis en perros (tesis de doctorado). Distrito Federal, México :Facultad de medicina veterinaria y zootecnia, UNAM, 2005.
- 26. Weiss AA, Hewlett EL.** Virulence factors of *Bordetella pertussis*. Annu Rev Microbiol. 1986; 40:661–686.
- 27. Gyles CL, Prescott JF, Songer G, Thoen CO.** Pathogenesis of bacterial infections in animal. Estados Unidos; Blackwell publishing, 2004 .
- 28. Guedin S, Willery E, Tommassen J, Fort E, Drobecq H, Locht C, Jacob-Dubuisson F.** Novel topological features of FhaC, the outer membrane transporter involved in the secretion of the *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin. J. Biol. Chem. 2000; 275:30202–30210.
- 29. Jacob-Dubuisson F, El-Hamel C, Saint N, Guedin S, Willery E, . Molle G, Locht C.** Channel formation by FhaC, the outer membrane protein involved in the secretion of the *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin. J. Biol. Chem. 1999;274:37731–37735.
- 30. Coutte L, Antoine R, Drobecq H, Locht C, Jacob-Dubuisson F..** Subtilisin-like autotransporter serves as maturation protease in a bacterial secretion pathway. EMBO J.2001; 20:5040–5048.
- 31. Coutte L, Willery E, Antoine R, Drobecq H, Locht C, Jacob-Dubuisson F.** Surface anchoring of bacterial subtilisin important for maturation function. Mol. Microbiol. 2005; 49:529–539.
- 32. Nicholson TL, Brockmeier SL, Loving CL.** Contribution of *Bordetella bronchiseptica* Filamentous Hemagglutinin and Pertactin to Respiratory Disease in Swine\_†. Infección and Inmunity 2009; 77:2136–2146
- 33. Preston A, Petersen BO, Duss JØ, Kubler-Kieb J, Menachem G, Li J.** Complete Structures of *Bordetella bronchiseptica* and *Bordetella parapertussis* Lipopolysaccharides. The journal of Biological Chemistry 2006; 281: 18135–18144
- 34. Ayme G, Caroff M, Chaby R, Haeffner-Cavaillon N, Moreau A, Muset M, Mynard MC, Roumiantzeff M, Schulz D, Szabo.** 1980. Biological activities of fragments derived from *Bordetella pertussis* endotoxin: isolation of a nontoxic, Shwartzman-negative sassing high adjuvant properties. Infect. Immun.1980; 27:739–745.

- 35. Watanabe M, Takimoto h, Kumazawa Y, Amano K.** Biological properties of lipopolysaccharides from *Bordetella* species. *J. Gen. Microbiol.* 1990; 136:489–493
- 36. Burns VC, Pishko EJ, Preston A, Maskell DJ, Harvill ET.** Role of *Bordetella* O antigen in respiratory tract infection. *Infect. Immun.* 2003; 71:86–94.
- 37. López-Boado YS, Cobb LM, Deora R.** *Bordetella bronchiseptica* Flagellin Is a Proinflammatory Determinant for Airway Epithelial Cells.. *Infection and Immunity* 2005;73:7525–7534
- 38. Kania SA, Rajeev S, Burns EH, Odom TF, Holloway SM, Bemis DA.** Characterization of fimN, a new *Bordetella bronchiseptica* major fimbrial subunit gene. *Gene* 2000;256:149–155.
- 39. Hazenbos WL, Geuijen CA, Van den Berg BM, Mooi FR, Van Furth R.** *Bordetella pertussis* fimbriae bind to human monocytes via the minor fimbrial subunit FimD. *J. Infect. Dis.* 1995; 171:924–929.
- 40. Hazenbos WL, Van den Berg BM, Geuijen CW, Mooi FR, Van Furth R.** Binding of FimD on *Bordetella pertussis* to very late antigen-5 on monocytes activates complement receptor type 3 via protein tyrosine kinases. *J. Immunol.* 1995; 155:3972–3978.
- 41. Mooi FR, Jansen WH, Brunings H, Gielen H, Van der Heide HG, Walvoort HC, Guinee PA.** Construction and analysis of *Bordetella pertussis* mutants defective in the production of fimbriae. *Microb. Pathog.* 1992; 12:127–135.
- 42. Olin P, Rasmussen F, Gustafsson L, Hallander HO, Heijbel H, Ad Hoc Group for the Study of Pertussis Vaccines.** Randomised controlled trial of two-component, three-component, and five-component acellular pertussis vaccines compared with whole-cell pertussis vaccine. *Lancet* 1997;350:1569–1577.
- 43. Gonzalez-Pedrajo B, Dreyfus G.** Sistemas de Secreción en las bacterias gramnegativas. *Mensaje Bioquímico* 2003; xxvi: 45-63.
- 44. Montaraz JA, Novotny P, Ivanyi J.** Identification of a 68- kilodalton protective protein antigen from *Bordetella bronchiseptica*. *Infect. Immun.* 1985; 47:744–751.
- 45. Everest P, Li J, Douce G, Charles I, De Azavedo J, Chatfield S, Dougan G, Roberts M.** Role of the *Bordetella pertussis* P.69/pertactin protein and the P.69/pertactin RGD motif in the adherence to and invasion of mammalian cells. *Microbiology* 1996; 142:3261–3268.

- 46. Hellwig, SM, Rodriguez ME, Berbers GA, Van de Winkel JG, Mooi FR.** Crucial role of antibodies to pertactin in *Bordetella pertussis* immunity. *J. Infect. Dis.* 2005; **188**:738–742.
- 47. Ayme G, Caroff M, Chaby R, Haeffner-Cavaillon N, Le Dur A, Moreau M, Muset M, Mynard MC, Roumiantzeff M, Schulz D, Szabo L.** Biological activities of fragments derived from *Bordetella pertussis* endotoxin: isolation of a nontoxic, Shwartzman-negative lipid A possessing high adjuvant properties. *Infect. Immun.* 1980; **27**:739–745.
- 48. Finn TM, Stevens LA.** Tracheal colonization factor: a *Bordetella pertussis* secreted virulence determinant. *Mol. Microbiol.* 1995; **16**:625–634.
- 49. Espino AR, Gascon LJ, Amor Trucios, I. Mongil Ruiz, F. Garcia Caballero, and C. de la Torre Cecilia.** 1992. Bacteremia caused by *Bordetella bronchiseptica* in the course of inflammatory tinea capitis. *An. Esp. Pediatr.* **36**:323–325. (In Spanish.)
- 50. Hewlett EL, Gordon VM, McCaffery JD, Sutherland WM, Gray MC.** Adenylate cyclase toxin from *Bordetella-pertussis*: identification and purification of the holotoxin molecule. *J. Biol. Chem.* 1989; **264**:19379–19384.
- 51. Glaser P, Ladant D, Sezer O, Pichot F, Ullmann A, Danchin A.** The calmodulin-sensitive adenylate cyclase of *Bordetella pertussis*: cloning and expression in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 1988; **2**:19–30.
- 52. Welch RA.** Pore-forming cytolysins of gram-negative bacteria. *Mol. Microbiol.* 1991; **5**:521–528.
- 53. Basar T, Havlicek V, Bezouskova S, Hackett M, Sebo P.** Acylation of lysine 983 is sufficient for toxin activity of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase: substitutions of alanine 140 modulate acylation site selectivity of the toxin acyltransferase CyaC. *J. Biol. Chem.* 2001; **276**:348–354.
- 54. Hackett M, Guo L, Shabanowitz J, Hunt DF, Hewlett EL.** Internal lysine palmitoylation in adenylate cyclase toxin from *Bordetella pertussis*. *Science* 1994; **266**:433–435.
- 55. Gray MC, Donato GM, Jones FR, Kim T, Hewlett EL.** Newly secreted adenylate cyclase toxin is responsible for intoxication of



target cells by *Bordetella pertussis*. Mol. Microbiol. 2005;53:1709–1719.

56. **Cahill ES, O'Hagan DT, Illum L, Redhead K.** Mice are protected against *Bordetella pertussis* infection by intranasal immunization with filamentous haemagglutinin. FEMS Microbiol. Lett. 1993;107:211–216.
57. **Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP.** Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. Science 1999; 284:1318–1322.
58. **Cotter PA, Miller JF.** Principles of bacterial pathogenesis. London, United Kingdom: Academic Press, 2001.
59. **Pearson RD, Symes P, Conboy M, Weiss AA, Hewlett EL.** Inhibition of monocyte oxidative responses by *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin. J. Immunol. 1987;139:2749–2754.
60. **Khelef N, Zychlinsky A, Guiso N.** *Bordetella pertussis* induces apoptosis in macrophages: role of adenylate cyclase-hemolysin. Infect. Immun. 1993; 61:4064–4071.
61. **Skinner JA, Reissinger A, Shen H, Yuk MH.** *Bordetella* type III secretion and adenylate cyclase toxin synergize to drive dendritic cells into a semimature state. J. Immunol. 2005; 173:1934–1940.
62. **Wilson R, Read R, Thomas M, Rutman A, Harrison K, Lund V, . Cookson B, Goldman W, Lambert H, Cole P.** Effects of *Bordetella pertussis* infection on human respiratory epithelium in vivo and in vitro. Infect. Immun. 1991;59:337–345.
63. **Heiss LN, Flak TA, Lancaster JR, McDaniel ML, Goldman WE.** Nitric oxide mediates *Bordetella pertussis* tracheal cytotoxin damage to the respiratory epithelium. Infect. Agents. Dis. 1993; 2:173–177.
64. **Horiguchi Y, Sugimoto N, Matsuda M.** Stimulation of DNA synthesis in osteoblast-like MC3T3-E1 cells by *Bordetella bronchiseptica* dermonecrotic toxin. Infect. Immun. 1993;61:3611–3615.
65. **Ilic D, Furuta Y, Kanazawa S, Takeda N, Sobue K, Nakatsuji N, Nomura S, Fujimoto J, Okada M, Yamamoto T.** Reduced cell motility and enhanced focal adhesion contact formation in cells from FAK-deficient mice. Nature 1995; 377:539–544.

66. **Rankin S, Rozengurt E.** Platelet-derived growth factor modulation of focal adhesion kinase (p125FAK) and paxillin tyrosine phosphorylation in Swiss 3T3 cells. Bell-shaped dose response and cross-talk with bombesin. *J. Biol. Chem.* 1994;269:704–710.
67. **Yuk MH, Harvill ET, Miller JF.** The BvgAS virulence control system regulates type III secretion in *Bordetella bronchiseptica*. *Mol. Microbiol.* 1998; 28:945–959.
68. **Kubori T, Matsushima Y, Nakamura D, Uralil J, Lara-Tejero M, Sukhan A, Galan JE, Aizawa SI.** Supramolecular structure of the *Salmonella typhimurium* type III protein secretion system. *Science* 1998; 280: 602–605.
69. **Yuk MH, Harvill ET, Cotter PA, Miller JF.** Modulation of host immune responses, induction of apoptosis and inhibition of NFkappaB activation by the *Bordetella* type III secretion system. *Mol. Microbiol.* 2000; 35:991–1004.
70. **Cherry JD, Brunell PA, Golden GS, Karson DT.** Report of the task force on *pertussis* and *pertussis* immunization. *Pediatrics.*1988; 81:939.
71. **Siciliano A, Skinner JA, Yuk M.** *Bordetella bronchiseptica* Modulates Macrophage Phenotype Leading to the Inhibition of CD4<sub>+</sub> T Cell Proliferation and the Initiation of a Th17 Immune Response. *J. Immunol.* 2006;177:7131-7138.
72. **Holt P, Strickland D, Wikstrom E, Jahnsen F.** Regulation of immunological homeostasis in the respiratory tract. *Nature* 2008; 8:142-151.
73. **Pilione M, Harvill E.** The *Bordetella bronchiseptica* Type III Secretion System Inhibits Gamma Interferon Production That Is Required for Efficient Antibody-Mediated Bacterial Clearance. *Infection and Immunity* 2006; 74:1043–1049
74. **Buboltz M, Nicholson T, Weyrich L, Harvill E.** Role of the Type III Secretion System in a Hypervirulent Lineage of *Bordetella bronchiseptica*. *Infection and Immunity* 2009; 77:3969–3977
75. **Ausiello CM, Lande R, Urbani F, Di Carlo B, Stefanelli P, Salmaso S, Mastrantonio P, Cassone A.** Cell-mediated immunity and antibody responses to *Bordetella pertussis* antigens in children with a

history of pertussis infection and in recipients of an acellular pertussis vaccine. J. Infect. Dis.2000; 181:1989–1995.

- 76. Gueirard P, Minoprio P, Guiso N.** Intranasal inoculation of *Bordetella bronchiseptica* in mice induces long-lasting antibody and T-cell mediated immune responses. Scand J Immunol.1996; 43:181-92.
- 77. Wolfe D, Kirimanjeswara G, Goevel E, Harvill E.** Comparative rol of immunoglobuline a in protective immunity against Bordetellae. Infection and Immunity. 2007; 75: 4416-4422
- 78. Mills KH, Barnard A, Watkins J, Redhead K.** Cell-mediated immunity to *Bordetella pertussis*: role of Th1 cells in bacterial clearance in a murine respiratory infection model. Infect. Immun. 1993; 61:399–410.
- 79. Wiertz EJ, Loggen HG, Walvoort HC, Kreeftenberg JG.** In vitro induction of antigen specific antibody synthesis and proliferation of CT lymphocytes with acellular pertussis vaccines, pertussis toxin and filamentous haemagglutinin in humans. J. Biol. Stand. 1989;17:181–190.
- 80. Mattoo S, Cotter PA, Miller JF.** Differential roles of *Bordetella* virulence factors as inducers and modulators of the host immune response. Proc. 100th Gen. Meet. Am. Soc. Microbiol; 2000; Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 2000:254.
- 81. Mahon BP, Brady MT, Mills KH.** Protection against *Bordetella pertussis* in mice in the absence of detectable circulating antibody: implications for long-term immunity in children. J. Infect. Dis. 2000; 181:2087– 2091.
- 82. Bemis DA, Kennedy JR.** An improved system for studying the effect of *Bordetella bronchiseptica* on the ciliary activity of canine tracheal epithelial cells. J. Infect. Dis. 1981; 144:349–357.
- 83. De Jong, M. F.** Diseases of swine 7th ed., Wolfe, Ames, Iowa, 1992
- 84. Gillespie JH, Timoney JF.** Hagan and Bruner’s infectious diseases of domestic animals. London, United Kingdom: Cornell University Press, 1981
- 85. Kontor EJ, Wegrzyn RJ, Goodnow RA.** Canine infectious tracheobronchitis: effects of an intranasal live canine parainfluenza-

- Bordetella bronchiseptica* vaccine on viral shedding and clinical tracheobronchitis (kennel cough). Am. J. Vet. Res. 1981;42:1694–1698.
86. **Smith T.** Some bacteriological and environmental factors in the pneumonias of lower animals with special reference to the guinea-pig. J. Med. Res. 1913; 29:291–323.
87. **Ner Z, Ross LA, Horn MV, Keens TG, MacLaughlin EF, Starnes VA, Woo MS.** *Bordetella bronchiseptica* infection in pediatric lung transplant recipients. Pediatr. Transplant 2005; 7:413–417.
88. **Dworkin MS, Sullivan PS, Buskin SE, Harrington RD, Olliffe J., MacArthur RD, Lopez CE.** *Bordetella bronchiseptica* infection in human immunodeficiency virus-infected patients. Clin. Infect. Dis. 1999; 28:1095–1099.
89. **Probert W, Nossoff A, Schrader K, Stanley K, Atwell J.** Identification and Evaluation of New Target Sequences for Specific Detection of *Bordetella pertussis* by Real-Time PCR. Journal of Clinical Microbiology 2008; 46:3228–3231
90. **Rath B, Wall J, Sokol D.** Persistent *Bordetella bronchiseptica* Pneumonia in an Immunocompetent Infant and Genetic Comparison of Clinical Isolates with Kennel Cough Vaccine Strains. Clinical Infectious Diseases 2008; 46:905–8
91. **Marcon MJ, Hamoudi AC, Cannon HJ, Hribar MM.** Comparison of throat and nasopharyngeal swab specimens for culture diagnosis of *Bordetella pertussis* infection. J. Clin. Microbiol. 1987; 25:1109–1110.
92. **Zhao Z, Xue Y, Tang X, Wu B, Cheng X, He Q, Zhang C, et al.** Immunogenicity of recombinant protective antigen and efficacy against intranasal challenge with *Bordetella bronchiseptica*. Vaccine 2009; 27: 2523–2528
93. **Mazengia E, Silva EA, Peppe JA, Timperi R, George H.** Recovery of *Bordetella holmesii* from patients with pertussis-like symptoms: use of pulsed-field gel electrophoresis to characterize circulating strains. J. Clin. Microbiol. 2000; 38:2330–2333.
94. **Gopinathan L, Kirimanjeswara GS, Wolfe DN, Kelley ML, Harvill ET.** Different mechanisms of vaccine-induced and infection-induced

immunity to *Bordetella bronchiseptica*. *Microbes and Infection* 2007; 9:442-448.

95. **Baskerville M, Wood M, Baskerville A.** An outbreak of *Bordetella bronchiseptica* pneumonia in a colony of common marmosets (*Callithrix jacchus*). *Lab. Anim.* 1983;17:350–355.
96. **Baker DG.** Natural pathogens of laboratory animals: their effects on research. Washington, D.C.:ASM Press, 2005.
97. **Porter JF, Parton R, Wardlaw AC.** Growth and survival of *Bordetella bronchiseptica* in natural waters and in buffered saline without added nutrients. *Appl. Environ. Microbiol.* 1991; 57:1202–1206.
98. **Mann P, Goebel E, Barbarich J, Pilione M, Kennett M, Harvill E.** Use of a Genetically Defined Double Mutant Strain of *Bordetella bronchiseptica* Lacking Adenylate Cyclase and Type III Secretion as a Live Vaccine. *Infection and immunity* 2007;75:3665–3672
99. **Berkelman R.L.** Human illness associated with use of veterinary vaccines, *Clin. Infect. Dis.* 2003; 37:407–414.
100. **Chest.** Unusual Infections. *Clin. Microbiol.rev.*; 2007.
101. **Ulmer JB, Donnelly JJ, Parker SE, Rhodes GH, Felgner PL, Dwarki VJ, Gromkowski SH, Deck RR, DeWitt CM, Friedman A, et al.** Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. *Science* 1993; 259: 1745–1749.
102. **Shedlock DJ, Weiner DB.** DNA vaccination: antigen presentation and the induction of Immunity. *Journal of Leukocyte Biology* 2000;68:793-806
103. **Liu MA.** DNA vaccines: an historical perspective and view to the future. *Immunological Reviews* 2010; 239: 62–84.
104. **Alvarado A, Tenorio V.** Promesas y limitaciones de las vacunas génicas. *Revista Mexicana de ciencias Farmaceuticas* 2006;37:26: 34.
105. **Schrijver RS, Langedijk JP, Keil GM, Middel WG, Manis-Veldkuis, M, Van Oirschot JT.** Immunization of cattle with BHV-1

vector vaccine or a DNA vaccine both coding for the G protein of BRSV. *Vaccine*. 1997;15: 1908-1916.

106. **Alvarado A, Tenorio V.** Promesas y limitaciones de las vacunas génicas. *Revista Mexicana de ciencias Farmaceuticas* 2006;37:26-34.
107. **Ito Y.** A tumor-producing factor extracted by phenol from papillomatous tissue (shope) of cottontail rabbits. *Virology* 1960; 12: 596–601.
108. **Cohen J.** Naked DNA points way to vaccines. *Science* 1993; 259, 1691–1692.
109. **Wolff JA, Malone RW, Williams P, Chong W, Acsadi G, Jani A, Felgner PL.** Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science* 1990; 247:1465–1468.
110. **Lorenzen N, LaPatra SE.** DNA vaccines for aquacultured fish. *Rev. Sci. Tech.* 2005; 24:201–213.
111. **Meeusen NT, Walker J, Peters A, Pastoret PP, Jungersen G.** **Current** Status of Veterinary Vaccines. *Clinical Microbiology reviews* 2007; 20: 489–510
112. **Bergman PJ, McKnight J, Novosad A, Charney S, Farrelly J, Craft D et al.** Long-term survival of dogs with advanced malignant melanoma after DNA vaccination with xenogenic human tyrosinase:a phase I trial. *Clin Cancer Res*2003; 9:1284-90.
113. **Lembcke LM,** Stephen AK, Blackford JT, Trent DJ. Development of Immunologic Assays to Measure Response in Horses Vaccinated with Xenogeneic Plasmid DNA Encoding Human Tyrosinase. *Journal of Equine Veterinary Science* 2012;32:607-615.
114. **Faurez F, Dory D, Le Moigne V, Gravier R, Jestin A.** Biosafety of DNA vaccines: New generation of DNA vectors and current knowledge on the fate of plasmids after injection. *Vaccine* 2000; 28:3888–3895.
115. **Lehmann MJ, Sczakiel G.** Spontaneous uptake of biologically active recombinant DNA by mammalian cells via a selected DNA segment. *Gene Ther* 2005;12:446–51.

116. **Wheeler M, Cortez-Gonzalez X, Frazzi R, Zanetti M.** Ex vivo programming of antigen-presenting B lymphocytes: considerations on DNA uptake and cell activation. *Int Rev Immunol.* 2006;25:83–97.
117. **Luby-Phelps K.** Cytoarchitecture and physical properties of cytoplasm: volume, viscosity, diffusion, intracellular surface area. *Int Rev Cytol;* 2000; 192:189–221.
118. **Vaughan EE, Dean DA.** Intracellular trafficking of plasmids during transfection is mediated by microtubules. *Mol Ther.*2006;13:422–8.
119. **Vaughan EE, Geiger RC, Miller AM, Loh-Marley PL, Suzuki T, Miyata N, et al.** Microtubule acetylation through HDAC6 inhibition results in increased transfection efficiency. *Mol Ther.*2008; 16:1841–7
120. **Trombone AP, Silva CL, Lima KM, Oliver C, Jamur MC, Prescott AR, et al.** Endocytosis of DNA-Hsp65 alters the pH of the late endosome/lysosome and interferes with antigen presentation. *PLoS ONE*2007;2:e923.
121. **Coelho-Castelo AA, Santos RR, Bonato VL, Jamur MC, Oliver C, Silva CL.** B-lymphocytes in bone marrow or lymph nodes can take up plasmid DNA after intramuscular delivery. *Hum Gene Ther.* 2003;14:1279–85.
122. **Ludtke JJ, Sebestyen MG, Wolff JA.** The effect of cell division on the cellular dynamics of microinjected DNA and dextran. *Mol Ther* 2002;5:579–88.
123. **Hebert E.** Improvement of exogenous DNA nuclear importation by nuclear localization signal-bearing vectors: a promising way for non-viral gene therapy? *Biol. Cell* 2003;95:59–68.
124. **Garcia-Chaumont C, Seksek O, Grzybowska J, Borowski E, Bolard J.** Delivery systems for antisense oligonucleotides. *Pharmacological Therapy.* 2000; 87, 255-277.
125. **Blanton JR, Bidwell CA, Sanders DA, Sharkey CM, McFarland DC, Gerrard DE, Grant AL.** Plasmid transfection and retroviral transduction of porcine muscle cells for cell-mediated gene transfer. *J. Anim. Sci.* 2000. 78:909–918.
126. **Rocha A, Ruiz S, Coll JM.** Estudios sobre translocación de complejos DNA-liposomas a través de membranas celulares para

mejorar la transfección en células eucariontes (Revisión). *Invest. Agr.: Prod. Sanid. Anim.* 2002;17:1-2.

127. **Diamantstein T, Wagner B, Beyse I, Odenwald MV, Schulz G.** Stimulation of humoral antibody formation by polyanions. I. The effect of polyacrylic acid on the primary immune response in mice immunized with sheep red blood cells. *European Journal of Immunology* 1971; 1: 335–340.
128. **Oka T.** Influenza vaccine: enhancement of immune response by application of carboxyl vinylpolymer. *Vaccine* 8, 573-576.
129. **Gualandi G, Losio I NM, Muratori G, Foni E.** The ability by different preparation of porcine parvovirus to enhance humoral immunity in swine and guinea pigs. *Microbiology*.1988; 11:363-367.
130. **Mumford JA, Wilson H, Hannant D.** Antigenicity e immunogenicity of equine influenza vaccines containing carbomer adjuvant. *Epidemiology e infection* 1994; 112: 421-437.
131. **Kirman, J. R., and Seder, R. A.** DNA vaccination: the answer to stable, protective T-cell memory? *Curr. Opin. Immunol.* 2003; 15, 471–476.
132. **Ulmer, JB, Deck RR, Dewitt CM, Donnhly JI, Liu MA.** Generation of MHC class I-restricted cytotoxic T lymphocytes by expression of a viral protein in muscle cells:antigen presentation by non-muscle cells. *Immunology* 1996; 89, 59–67.
133. **Torres CA, Iwasaki A, Barber BH, Robinson HL.** Differential dependence on target. site tissue for genegun and intramuscular DNA immunization. *J. Immunol.* 1997 158:4529–4532.
134. **Corr M, Von Damm A, Lee DJ, Tighe H.** In vivo priming by DNA injection occurs predominantly by antigen transfer. *J. Immunol.* 1999;163, 4721–4727
135. **Turing, T.** The immunology of cutaneous DNA immunization. *Curr. Opin. Mol. Ther.* 1999; 1:216–225.
136. **Trimble C, Lin CT, Hung CF, Pai S, Juang J, He L, Gillisonc M., Pardollc D, Wub L, Wu TC.** Comparison of the CD8 T cell responses and anti-tumor effects generated by DNA vaccine administered through gene gun, biojector and syringe *Vaccine* 2003; 21:4036–4041.



137. **Ito K, Shinohara N, Kato S.** DNA immunization via intramuscular and intradermal routes using a gene gun provides different magnitudes and durations on immune response. *Mol. Immunol.* 2003; 39:847–854.
138. **Dileo J, Miller TE, Chesnoy S, Huang L.** Gene transfer to subdermal tissues via a new gene gun design *Hum. Gene Ther.* 2003;14, 79–87.
139. **Hynes JR.** Particle-mediated DNA vaccine delivery to the skin. *Expert Opin. Biol. Ther.* 2004; 4:889–900.
140. **Wang R, Doolan DL, Le TP, Hedstrom RC, Coonan KM, Charoenvit Y, et al.** Induction of antigen-specific cytotoxic T-lymphocytes in humans by a malaria DNA vaccine. *Science* 1988; 282:476–480.
141. **Pavlenko M, Roos AK, Lundqvist A, Palmborg A, Miller AM, Ozenci V, et al.** A phase I trial of DNA vaccination with a plasmid expressing prostate-specific antigen in patients with hormonerefractory prostate cancer. *Br. J. Cancer* 2004; 91:688–694.
142. **Van den Berg BM, Beekhuizen H, Mooi FR, Van Furth R.** Role of antibodies against *Bordetella pertussis* virulence factors in adherence of *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* to human bronchial epithelial cells. *Infect Immun* 1999;67:1050–5.
143. **Tuomanen EI, Zapiain LA, Galvan P, Hewlett EL.** Characterization of antibody inhibiting adherence of *Bordetella pertussis* to human respiratory epithelial cells. *J Clin Microbiol* 1984;20:167–70.
144. **Killar L, MacDonald G, West J, Woods A, Bottomly K.** Cloned Ia restricted T cells that do not produce IL4/BSF-1 fail to help antigen specific B cells. *J. Immunol.* 1987;138:1674–79.
145. **Coffman RL, Seymour BWP, Lebman DA, Hiraki DD, Christiansen JA, Shrader B, et al.** The role of helper T cell products in mouse B cell differentiation and isotyperegulation. *Immunol. Rev.* 1988;102:5–28.

146. **Akdis CA, Blesken T, Akdis M, Wuthrich B, Blaser K.** Role of interleukin 10 in specific immunotherapy. *J Clin Invest* 1998;102: 98–106.
147. **Mahon BP, Ryan MS, Griffin F, Mills KH.** Interleukin-12 is produced by macrophages in response to live or killed *Bordetella pertussis* and enhances the efficacy of an acellular pertussis vaccine by promoting induction of Th1 cells. *Infect Immun* 1996; 64:5295-5301.
148. **Banemann A, Gross R.** Phase variation affects long-term survival 7046 SCHNEIDER ET AL. *INFECT. IMMUN.* of *Bordetella bronchiseptica* in professional phagocytes. *Infect. Immun.* 1997; 65: 3469–3473.
149. **Forde CB, Parton R, Coote JG.** Bioluminescence as a reporter of intracellular survival of *Bordetella bronchiseptica* in murine phagocytes. *Infect. Immun.* 1998; 66:3198–3207.
150. **Guzman CA, Rohde M, Bock M, Timmis KN.** Invasion and intracellular survival of *Bordetella bronchiseptica* in mouse dendritic cells. *Infect. Immun.* 1994;62:5528–5537.
151. **Savelkoul PHM, Kremer B, Kusters JG., van der Zeijst BAM, Gaastra W.** Invasion of HeLa cells by *Bordetella bronchiseptica*. *Microb. Pathog.* 1993; 14:161–168.
152. **Schipper H, Krohne G, Gross R.** Epithelial cell invasion and survival of *Bordetella bronchiseptica*. *Infect. Immun.* 1994; 62: 3008–3011.
153. **Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS.** Cellular and molecular immunology. 4th ed. Philadelphia.: Saunders, 2000.
154. **Lloyd J.** Adjuvant compositions and medicinal mixtures comprising them. United States Patent 3869546. 1975 diciembre 22.
155. **Montaraz J.A.** *Bordetella bronchiseptica*: su relación con la rinitis atrófica. *Ciencia Veterinaria* 1987;4:203-223.
156. **Coffman RL, Shrader B, Carty J, Mosmann TR, Bond MW..** A mouse T cell product that preferentially enhances IgA production. I. Biological characterisation. *J. Immunol.* 1987;139:3685-3690.

- 157. Murray PD, Swain SL, Kagnoff MP.** Regulation of the IgM and IgA anti-dextran B1355S response: synergy between IFN- $\gamma$ , BCGF II and IL-2. *J. Immunol.* 1985;135:4015-4020.
- 158. Kaur M, Saxena A.** Rabies DNA vaccine encoding lysosome-targeted glycoprotein supplemented with Emulsigen-D confers complete protection in preexposure and postexposure studies in BALB/c mice. *FASEB.* 2010;24:173-83.
- 159. Kuehl R.** Diseño de experimentos: principios estadísticos de diseño y análisis de investigación. México: International Thompson Editores, 2001.
- 160. SPSS Inc.** (Programa de computación). Versión 16.0. Estados Unidos , 2007.
- 161. JMP TM.** (Programa de computación). Versión 5.0.1a. Estados Unidos, 2002.
- 162.** Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio. NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-062-ZOO1999, Fecha de publicación: 22 agosto de 2001.
- 163. Abdelnoor AM.** Plasmid DNA Vaccines. *Current Drug Targets - Immune, Endocrine & Metabolic Disorders* 2001; 1:79-92.
- 164. Li QT, Zhu YZ, Chu JY, Dong K, He P, Feng CY, Hu BY, Zhang SM, Guo XK.** Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor DNA prime-protein boost strategy to enhance efficacy of a recombinant pertussis DNA vaccine. *Acta Pharmacol Sin.* 2006;27:1487-94.
- 165. Robinson HL, Torres CA.** DNA vaccines. *Semin Immunol* 1997;9: 271-83.
- 166. Klinman DM, Sechler JM, Conover J, Gu M, Rosenberg AS.** Contribution of cells at the site of DNA vaccination to the generation of antigen-specific immunity and memory. *J Immunol*, 1998; 160: 2388-92.
- 167. Marek J, Akdis CA.** T-cell Subset Regulation in Atopy. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2011; 11:139–145.

- 168. Shain RD, Brenan MJ, Li ZM, Made BD, Manclark CR.** Characterization of the protective capacity and immunogenicity of the 69 kD outer membrane protein of *Bordetella pertussis*. J Exp. Med.1990;171:63-73.
- 169. Charles IG, Li JL, Roberts M, Beesley K, Romanos M, Pickard DJ et al.** Identification and characterization of a protective immunodominant B cell epitope of pertactin (p.69) from *Bordetella pertussis*. Eur J Immunol 1991; 21(5):1147-1153.
- 170. Kobisch M, Novotny P.** Identification of 68- kilodalton outer membrane protein as the major protective antigen of *Bordetella bronchiseptica* by using specific-pathogen-free piglets. Infect. Immun. 1990; 2:352-357.

# **ANEXO I**

# Soluciones y reactivos

## Medios de cultivo

### Medio Luria Bertani

Reactivo	Cantidad
Bacto triptona	10 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	5 g
1 N NaOH	1 ml
Bacto agar (solo en caso de ser necesario)	10 a 15 g

Modo de preparación: disolver en agua destilada cada uno de los componentes en 800 ml , agitar hasta disolver totalmente y aforar a 1000 ml.

Esterilizar en autoclave a 15 lbs. 15 min..

## **Soluciones para extracción de plásmido por el método de lisis alcalina**

### **Solución I**

50 mM glucosa

25 Mm Tris-Cl (pH 8)

10 Mm EDTA (pH 8)

Esterilizar en autoclave durante 15 min. a 10 libras de presión. Conservar a 4°C.

### **Solución II**

0.2 N NaOH (de una solución 10 N)

1 %SDS

### **Solución III**

5 M acetato de potasio 60 ml

Ácido acético glacial 11.5 ml

Agua MiliQ 28.5 ml

### Ensayo de restricción con *EcoRV* y *EcoRI*

Reactivo	Cantidad
Agua MQ estéril	11.5 $\mu$ l
Buffer de enzima	1.5 $\mu$ l
ADN	1 $\mu$ l
Enzima	1 $\mu$ l

Se incubó la mezcla por una hora a 37 °C y se analizó el peso de los fragmentos liberados en un gel de agarosa al 1%.

### Reactivos utilizados en el protocolo de transfección.

#### Buffer de lisis

Reactivo	Cantidad para 10 ml
Tritton 100X 1%	0.1 g
Dioxicolato de Sodio 0.2%	0.02 g
Dodecilsulfato sódico 0.1%	0.01 g



### Tris pH 8.3, 16 $\mu$ M.

Primero se hacen 100 ml de una solución 0.1 M de tris (1.21 g de Tris base y ajustar pH con HCl a a 8.3). De ésta solución se toman 16 ml para aforar a 100 ml con agua MiliQ estéril.

### Soluciones utilizadas en la extracción de proteínas

#### Solución salina amortiguadora de fosfatos $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 10 mM pH 7.2

Reactivo	Cantidad
$\text{NaH}_2\text{PO}_4$ Fosfato de sodio anhidro 1.9 mM	0.23 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$ Fosfato de sodio dibásico anhidro 8.1 mM	1.15 g
$\text{NaCl}$ 154 Mm	9 g

Agregar 900 ml de agua destilada, ajustar el pH con ácido clorhídrico. Aforar a 1000 ml, esterilizar y guardar en refrigeración.

### Reactivos para cuantificación de proteínas

#### Reactivo de Bradford

Reactivo	Cantidad
----------	----------

Etanol 95%	5ml
Azul de comassie G-20	10 mg
Ac. Fosfórico 85%	10 ml
Agua MiliQ	Cbp. 100ml

Se mezcla el etanol con el azul de Comassie, se añade el ácido fosfórico y se afora a 100 ml. Se filtra con un filtro Whatman #1 y se guarda en un frasco ámbar y conservar en refrigeración. Todo se prepara en oscuridad.

#### **Preparación de BSA al 1%**

Primero se prepara una solución stock con 100 mg de BSA en 1 ml de SSAF estéril. A partir de ésta se toman 10  $\mu$ l para diluir en 990  $\mu$ l de SSAF y con éstas realizar las diluciones para la curva estándar.

### Curva de BSA

Tubo	BSA	SSAF	BRADFORD
1	2	98 $\mu$ l	1 ml
2	4	96 $\mu$ l	
3	6	94 $\mu$ l	
4	8	92 $\mu$ l	
5	10	90 $\mu$ l	
6	12	88 $\mu$ l	

Una vez realizadas las diluciones, se incuba 5 min. en oscuridad y se lee en el espectrofotómetro a 595 nm y graficar la densidad óptica contra la concentración de albúmina.

Para realizar las lecturas de las muestras de proteínas de membrana externa, utilizar 5  $\mu$ l de la muestra, 95  $\mu$ l de SSAF y 900  $\mu$ l de reactivo de Bradford.

## Preparación de geles de acrilamida con duodecil sulfato de sodio al 12%

### (SDS-PAGE)

#### Preparación del gel separador (15 ml)

Reactivo	Cantidad
Agua destilada	4.9 ml
Acrilamida 30%	6 ml
Tris 1.5 M Ph 8.8	3.8 ml
SDS 10%	.15 ml
Persulfato de amonio 10%	.15 ml
TEMED	.006 ml

**Procedimiento:** Se agregan las sustancias en orden y por último se añade el TEMED y el persulfato de amonio, agitando rápidamente y colocándolo entre los vidrios, dejando espacio en la parte superior para colocar un sello de agua con la finalidad de que el gel polimerice de manera uniforme. Se deja un poco de poli-acrilamida en un tubo para tener como control de polimerización.

### Preparación del gel concentrador (5ml)

Reactivo	Cantidad
Agua destilada	3.4 ml
Acrilamida 30%	.83 ml
Tris 1.5 M Ph 8.8	.63 ml
SDS 10%	.05 ml
Persulfato de amonio 10%	.05 ml
TEMED	.005 ml

Se sigue el mismo procedimiento antes mencionado para el gel concentrador, tomando en cuenta que se debe retirar antes el agua de los vidrios y colocar el peine, para poder colocar el gel concentrador.

## Soluciones para ELISA

### Solución amortiguadora de fosfatos pH 7.2

Reactivo	Cantidad
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> Fosfato de sodio anhidro 1.9 Mm	0.23 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> Fosfato de sodio dibásico anhidro 8.1 Mm	1.15 g
NaCl 154 Mm	9 g

Agregar 900 ml de agua destilada, ajustar el pH con ácido clorhídrico. Aforar a 1000 ml, esterilizar y guardar en refrigeración.

### Solución amortiguadora de citratos 0.05 M, pH 4

Se elabora a base de dos soluciones: A y B

Solución A	
Ácido cítrico monohidratado	11.48 g
Agua destilada	500 ml

Solución B	
Citrato sódico tribásico dihidratado	14.7 g
Agua destilada	500 ml

Mezclar 330 ml de sol. A con 235 ml de solución B y aforar a 1000 ml de agua destilada. Conservar en refrigeración.

**SSAF-T 10 Mm pH 7.2, 0.05% de Tween 20**

Para preparar SSAF-T se agregan 0.5 ml de Tween 20 por cada litro.

Solución cromógeno	
Ácido 2,2-azino-bis-3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic (ABTS)	1.5 g
Solución citrato	10 ml

Solución sustrato	
Peróxido de hidrogeno al 30%	5 µl
Agua destilada	120µl

