



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

LA PROTOXINA CryIAc DE Bacillus thuringiensis HD73 COMO ACARREADOR Y ADYUVANTE DE POLISACARIDOS DE Streptococcus pneumoniae

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G O
P R E S E N T A
EDGAR JOSUE RUIZ MEDINA

MEXICO, D.F.

294269 JUNIO DE 2001



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.

Este trabajo fue realizado en la Unidad de Biotecnología y Prototipos de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala de la U.N.A.M., y en el Departamento de Biología Celular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del I.P.N., bajo la tutoría de la Dra. Leticia Moreno Fierros. Durante su realización Edgar Josué Ruiz Medina fue becario de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (PAPIIT IN209198 y PAPIIT IN207800). Este trabajo fue apoyado por CONACYT 34834-M, PAPIIT IN209198 y PAPIIT IN207800.

⁵El sabio que escuchare *estas parábolas* se hará más sabio; y al que las entendiere le servirán de timón. ⁶Atinará su significación y la interpretación de ellas, comprenderá los dichos de los sabios y sus enigmas. ⁷El temor del Señor es el principio de la sabiduría. Los insensatos desprecian la sabiduría y la doctrina. (Pr 1:5-7).

¹⁰Si entrare la sabiduría en tu corazón y se complaciere tu alma en la ciencia, ¹¹el *buen* consejo será tu salvaguardia, y la prudencia te conservará, ¹²librándote de todo mal camino y de los hombres de lengua perversa. (Pr 2:10-12).

⁵Procura adquirir la sabiduría, veas de alcanzar la prudencia, y no te olvides ni apartes de las palabras de mi boca. ⁶No abandones la sabiduría, porque ella será tu protectora: ámalala y ella será tu salvación. ⁷El principio de la sabiduría es *trabajar por* adquirirla. Y así, a costa de cuanto posees, procura adquirir la prudencia; ⁸aplica todos tus esfuerzos para alcanzarla; y ella te ensalzará: te llenará de gloria cuando la estreches en tus brazos. ⁹Añadirá adornos graciosos a tu cabeza, y ceñirá tus sienes con esclarecida diadema. (Pr 4:5-9).

DEDICATARIAS

A mi Mami Isabel Medina Méndez, por que gracias a tu amor he realizado una de las metas de mi vida, terminar mis estudios profesionales, pero el merito no es todo mío, sino también tuyo, por tu esfuerzo, tenacidad y fe depositadas en mi, también te estas titulando hoy junto conmigo.

Gracias por enseñarme a luchar y siempre dar la cara de frente a la vida. Por brindarme amor, apoyo y comprensión y por sobre todas las cosas me otorgaste la vida.

Es necesario no fingir que filosofamos, sino filosofar realmente; no necesitamos, en efecto, aparentar que estamos sanos, sino estarlo verdaderamente.

Epicuro

A mis Abuelitos Francisca Méndez Díaz y Manuel P. Medina Jiménez por su enorme cariño y apoyo, y sobre todo por su amor.

No es posible concebir hoy en día la cultura separada del conocimiento científico que ha pasado a ocupar, al lado de las humanidades, un sitio central en el pensamiento abstracto y en la vida cotidiana de las personas. El valor de la Ciencia reside en su sólida forma de vida, dedicada a la verdad, al descubrimiento desinteresado y a la experimentación, así como en sus efectos más buenos que malos, sobre nuestras vidas.

E. J. R. M.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Leticia Moreno Fierros por todo su apoyo incondicional durante la realización de este trabajo y que con su gran capacidad de investigación y trabajo me ha iniciado y apoyado en este complejo pero inquietante mundo del conocimiento.

Al Dr. Rubén López Revilla por su forma *sui géneris* de percibir la ciencia ampliamente, y por su enorme e invaluable experiencia en el campo de la investigación.

A los compañeros del laboratorio de Inmunidad en Mucosas de la FES Iztacala.

A los habitantes del laboratorio 17 del Departamento de Biología Celular del CINVESTAV.

A Leticia Neri Bazán por que tantas personas nos hemos beneficiado con sus conocimientos.

A mi maestra-mamá M. en C. Leticia Verdín por creer en mi, por su apoyo incondicional y por que gracias a ella me desarrolle mejor como estudiante.

A la Dra. Sara Rodríguez, del Departamento de Bioquímica del Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez", por ser la mejor de las maestras que me han impartido clases a lo largo de la carrera.

A mis Mejores Amigos de la Secundaria 164 que son como los Hermanos que nunca tuve. Oscar A. Solorio Aguirre ("Socorro") y Alejandro Reséndiz ("Cachi") por su amistad invaluable e insustituible de tantos años, su compañía en las buenas y en las malas, su apoyo y consejos que me han ayudado tanto, por escuchar y soportarme. Muchísimas gracias por darme algo de ustedes.

A mis Amigos del Instituto Juventud por que a su lado he pasado los mejores momentos de mi vida. A mi super amiga Mónica Vidal Hernández (por tu amistad invaluable e insustituible, por escuchar y apoyarme en mis dediciones, por tus consejos y por soportarme, mil gracias), a mi hermanita R. Berenice Vallejo Espinosa (la hermana que nunca tuve), los hermanos Ivonne y Mario Vargas (por sus consejos), Luis Padilla (por ser tú), Hugo Santos (por tu amistad), Heidi A. Rivas (por tus sabios consejos). A todos ustedes mil gracias por los momentos inolvidables que pasamos juntos.

A mis Amigos y Compañeros de la Universidad por su amistad. Agustín Fragoso ("La V... Gorda"), Saúl Ramírez ("La Grandota"), Rubén Costa Rica, Jaime Gonzáles ("Chaparro") Marco A. Godinez ("Tapachuli"), Karla Abbadie ("Fly"), Alicia Arriaga ("Lala"), Gabriela Osorno.

A las Niñas que nunca me dejaban en paz. Raquel Guzmán, Mitzi, Lucia y Ester, por su sutileza, por escucharme y porque siempre han estado de alguna manera al tanto de mi vida. Muchas gracias por su amistad.

A la banda de la FES Iztacala por todas esas vivencias en la Universidad, prácticas de campo y cualquier evento que lo ameritará. Agustín, Manolo, Jaime, Javier, Andrés, Gabriel, Oscar, Sergio.

Al Psicólogo Celso Serra Padilla, por escucharme y por su amistad.

A mis demás familiares.

Finalmente a la Universidad Nacional Autónoma de México por haberme brindado la oportunidad de conocer y valorar las posibilidades de estudio de la vida, y de la fuerza creadora de la naturaleza.

La protoxina Cry I Ac de *Bacillus thuringiensis* HD73 como acarreador y adyuvante de polisacáridos de *Streptococcus pneumoniae*

INDICE

DEDICATORIAS	II
AGRADECIMIENTOS	IV
TITULO	VII
INDICE	VIII
INDICE DE FIGURAS	XI
INDICE DE TABLAS	XII
INDICE DE DIAGRAMAS	XIII
ABREVIATURAS	XIV
RESUMEN	I
INTRODUCCIÓN	3
Inmunidad en Mucosas	3
Inmunización en Mucosas y el Uso de Adyuvantes	5
ANTECEDENTES	8
La Protoxina CryIAc de <i>Bacillus thuringiensis</i> como Adyuvante de Mucosas	8
Infección por <i>Streptococcus pneumoniae</i> y Desarrollo de Vacunas	9
JUSTIFICACIÓN	13
OBJETIVO GENERAL	14
OBJETIVOS PARTICULARES	15
Evaluar el Efecto Acarreador y Adyuvante de CryIAc en la Respuesta de Anticuerpos anti-BSA	15
Evaluar el Efecto Acarreador y Adyuvante de CryIAc para la Inducción de Respuestas de Anticuerpos anti-PSC6B	15
Determinar si CryIAc tiene Efecto Adyuvante en la Respuesta de Anticuerpos anti-Pulmovax	16

MATERIALES Y MÉTODOS	21
Inmunógenos	21
Obtención de CryIAc	21
Conjugación de CryIAc con BSA	22
Conjugación de CryIAc con PSC6B	23
Contenido de Proteínas	23
Determinación de Carbohidratos	24
Electroforesis en Geles de Poliacrilamida	24
Antisueños	25
Inmunoblot de Proteínas	25
Cromatografía en Sephacryl S300HR	26
Inmunizaciones	26
Administración Oral e Intranasal de CryIAc Conjugada o Coadministrada con BSA	26
Administración Intranasal de CryIAc Conjugada o Coadministrada con PSC6B	26
Coadministración Intranasal de CryIAc o CT con Pulmovax	27
Obtención de Muestras	28
Análisis de la Respuesta de Anticuerpos	29
Ensayo Inmunoenzimático anti-BSA	30
Ensayo Inmunoenzimático anti-PSC6B	30
Ensayo Inmunoenzimático anti-Pulmovax	31
Análisis Estadístico	31
RESULTADOS	32
Inducción con IPTG y Obtención de CryIAc	32
Conjugación de CryIAc con BSA	33
Efecto de la Administración Oral e Intranasal de CryIAc Conjugada o Coadministrada con BSA en la Respuesta de	37

Anticuerpos anti-BSA	
Conjugación de CryIAc con PSC6B	45
Efecto de la Administración Intranasal de CryIAc	48
Conjugada o Coadministrada con PSC6B en la Respuesta de Anticuerpos anti-PSC6B	
Efecto de la Coadministración Intranasal de CryIAc o CT con Pulmovax en la Respuesta de Anticuerpos anti-Pulmovax	53
DISCUSIÓN	57
Inducción con IPTG y Obtención de CryIAc	57
Conjugación de CryIAc con BSA	57
Efecto de la Administración Oral e Intranasal de CryIAc	58
Conjugada o Coadministrada con BSA en la Respuesta de Anticuerpos anti-BSA	
Conjugación de CryIAc con PSC6B	67
Efecto de la Administración Intranasal de CryIAc	68
Conjugada o Coadministrada con PSC6B en la Respuesta de Anticuerpos anti-PSC6B	
Efecto de la Coadministración Intranasal de CryIAc o CT con Pulmovax en la Respuesta de Anticuerpos anti-Pulmovax	74
CONCLUSIONES	79
BIBLIOGRAFÍA	80

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Aspecto de los cultivos de <i>E. coli</i> JM103 (pOS9300) al microscopio electrónico de transmisión	32
Figura 2. Cuerpo de inclusión en una célula de <i>E. coli</i> JM103 (pOS9300) inducida con IPTG	33
Figura 3. Electroforesis de CryI Ac purificada	33
Figura 4. Polimerización con glutaraldehído y entrecruzamiento de proteínas	35
Figura 5. Electroforesis del conjugado CryI Ac-BSA	36
Figura 6. Inmunoblot del conjugado CryI Ac-BSA	36
Figura 7. Anticuerpos séricos anti-BSA	39
Figura 8. Anticuerpos anti-BSA en lavados traqueobronqueales	40
Figura 9. Anticuerpos anti-BSA en lavados vaginales	41
Figura 10. Anticuerpos anti-BSA en líquidos de intestino delgado	42
Figura 11. Anticuerpos anti-BSA en líquidos de intestino grueso	43
Figura 12. Electroforesis del conjugado CryI Ac-PSC6B	46
Figura 13. Cromatografía del conjugado CryI Ac-PSC6B	47
Figura 14. Anticuerpos anti-PSC6B en sueros y lavados traqueobronqueales	50
Figura 15. Anticuerpos anti-PSC6B en líquidos intestinales	51
Figura 16. Anticuerpos anti-Pulmovax en sueros y lavados traqueobronqueales	54
Figura 17. Anticuerpos anti-Pulmovax en líquidos intestinales	55
Figura 18. Compartimientos y componentes celulares del Tejido Linfoide Asociado a Nasofaringe (NALT)	63
Figura 19. Respuesta Inmune Nasal	64

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Grupos de ratones inmunizados con BSA sola, conjugada o coadministrada con CryIAc	27
Tabla 2. Grupos de ratones inmunizados con PSC6B solo, conjugado o coadministrado con CryIAc	28
Tabla 3. Grupos de ratones inmunizados con Pulmovax sola o coadministrada con CT o CryIAc	28
Tabla 4. Grupos de ratones inmunizados con BSA sola, conjugada o coadministrada con CryIAc que presentan diferencias significativas	44
Tabla 5. Grupos de ratones inmunizados con PSC6B solo, conjugado o coadministrado con CryIAc que presentan diferencias significativas	52
Tabla 6. Grupos de ratones inmunizados con Pulmovax sola o coadministrada con CT o CryIAc que presentan diferencias significativas	56

INDICE DE DIAGRAMAS

Diagrama 1. Obtención de CryIAc	17
Diagrama 2. Efecto Adyuvante y Acarreador de CryIAc Sobre la Respuesta de Anticuerpos anti-BSA	18
Diagrama 3. Efecto Adyuvante y Acarreador de CryIAc Sobre la Respuesta de Anticuerpos anti-PSC6B	19
Diagrama 4. Efecto Adyuvante de CryIAc Sobre la Respuesta de Anticuerpos anti-Pulmovax	20

ABREVIATURAS UTILIZADAS EN ESTE TRABAJO

Ag	Antígeno
APC	Célula Presentadora de Antígenos
ASC	Células Secretoras de Anticuerpos
BALT	Tejido Linfoide Asociado a Bronquios
BCR	Receptor de Células B
BSA	Albúmina Sérica Bovina
Células Th	Células T cooperadoras
Células Th1	Células T cooperadoras tipo 1
Células Th2	Células T cooperadoras tipo 2
CryIAc	Protoxina CryIAc de <i>Bacillus thuringiensis</i>
CryIAc-BSA	Conjugado de CryIAc con BSA
CryIAc-PSC6B	Conjugado de CryIAc con PSC6B
CT	Toxina del cólera
CTB	Subunidad B de la toxina del cólera
DC	Células Dendríticas
GALT	Tejido Linfoide Asociado al Intestino
IgA	Inmunoglobulina A
IgG	Inmunoglobulina G
IgM	Inmunoglobulina M
LP	Lamina Propia
LT	Enterotoxina Termolábil
MALT	Tejido Linfoide Asociado a Mucosas
MHC-II	Complejo Principal de Histocompatibilidad clase II
NALT	Tejido Linfoide Asociado a Nasofaringe
PMN	Neutrófilos
PP	Placas de Peyer

PSC

PSC6B

RALT

S-IgA

Tb

TCR

Polisacárido Capsular

Polisacárido Capsular serotipo 6B

Tejido Linfoide Asociado al Recto

IgA Secretora

Traqueobronqueal

Receptor de Células T

RESUMEN

Los neumococos y especialmente los serotipos menos inmunogénicos (6B, 14, 19F y 23F) son un importante problema de salud pública mundial en niños menores de dos años y pacientes inmunocomprometidos. Tan sólo en 1998 murieron 3.5 millones de personas en todo el mundo como resultado de la neumonía. Las vacunas antineumocócicas disponibles compuestas de polisacáridos capsulares (PSC) de *Streptococcus pneumoniae* no generan respuestas protectoras timo-dependientes. Esta limitación se ha resuelto parcialmente con vacunas conjugadas de PSC con proteínas acarreadoras para potenciar las respuestas de anticuerpos e inducir memoria inmunológica. La toxina del cólera (CT) de *Vibrio cholerae* y la enterotoxina termolábil (LT) de *Escherichia coli* tienen efectos adyuvantes cuando se administran o se conjugan con proteínas que no son inmunogénicas, sin embargo, estas sustancias no pueden aplicarse en humanos debido a que son tóxicas y sus costos de producción son elevados. La protoxina CryIAc recombinante de *Bacillus thuringiensis* es un buen candidato como adyuvante y acarreador ya que es altamente inmunogénica, inocua para vertebrados, resistente a proteólisis y a pH alcalino y de bajos costos de producción.

En este trabajo nos propusimos determinar (i) si la protoxina CryIAc funciona como acarreador vacunal para la inducción de respuestas de anticuerpos sistémicos y mucosos hacia BSA; (ii) el efecto de CryIAc sobre la respuesta inmune humoral contra el polisacárido capsular serotipo 6B (PSC6B) de *S. pneumoniae* conjugado (CryIAc-PSC6B) o coadministrado con CryIAc; y (iii) si la coadministración de CryIAc podría favorecer la respuesta de anticuerpos contra los 23 PSC de la vacuna comercial Pulmovax. Para ello administramos tres dosis de los antígenos por la ruta intranasal, y evaluamos la respuesta de anticuerpos de clase IgA, IgG e IgM antígeno-específico por ELISA en suero y secreciones vaginales, intestinales y de tracto respiratorio en ratones hembras Balb/c.

CryIAc es un buen acarreador de antígenos proteicos ya que la conjugación de CryIAc con BSA incrementó significativamente la respuesta de anticuerpos de clase IgA e IgG BSA-específicos a nivel sistémico y en mucosas locales (tracto respiratorio) y distantes (tracto genital femenino) cuando se administró por ruta intranasal.

La inmunización intranasal del conjugado CryIAc-PSC6B y la coadministración de CT y CryIAc con PSC6B indujo respuesta alta de IgM y moderada de IgA anti-PSC6B en suero, y en lavados traqueobronqueales (lavados tb) fue moderada para ambos isotipos. La coadministración de CryIAc con PSC6B estimuló una mayor respuesta de anticuerpos séricos de clase IgA que CT. Adicionalmente, analizamos la respuesta de anticuerpos en secreciones intestinales. La inmunización con el conjugado CryIAc-PSC6B y la coadministración de CT o CryIAc con PSC6B indujo una alta respuesta de anticuerpos anti-PSC6B de clase IgA en intestino delgado. La coadministración de Pulmovax con CryIAc incremento los niveles de anticuerpos séricos y en lavado tb anti-Pulmovax de clase IgA, IgG e IgM, mientras que CT solo los incremento para IgG en suero, y en lavado tb lo hizo para IgM e IgA. Sin embargo, estas respuestas fueron menores respecto a la coadministración con CryIAc. Adicionalmente, analizamos la respuesta de anticuerpos en secreciones intestinales. La coadministración de CryIAc con la vacuna indujo respuestas de anticuerpos anti-Pulmovax de clase IgA e IgM en intestino delgado y grueso, mientras que CT incremento los niveles de anticuerpos IgG en intestino delgado.

Nuestros resultados demuestran que (i) CryIAc es un buen acarreador de antígenos proteicos y de carbohidratos (polisacáridos), ya que la inmunización intranasal de CryIAc conjugada a BSA y PSC6B indujo respuestas de anticuerpos específicos a nivel sistémico y de mucosas; (ii) la coadministración de CryIAc con Pulmovax incrementa la inmunogenicidad de la vacuna; (iii) la superficie mucosa de la cavidad nasal es una ruta potencial para la vacunación, ya que la inmunización intranasal promueve el incremento de ambos tipos de inmunidad: sistémica y en mucosas, mientras que la inmunización oral es menos eficiente; y (iv) la variación de respuestas en los diferentes sitios mucosos analizados (tracto respiratorio, gastrointestinal y urogenital) aporta evidencias acerca de la regionalización de la respuesta inmune en mucosas. Esto sugiere que la inmunización de CryIAc conjugada o coadministrada con polisacáridos de neumococos podría generar protección en ratones contra el reto letal por neumococos; y la inmunización intranasal de Pulmovax con CryIAc puede sustituir en humanos el protocolo existente en el cual la vacuna es administrada por vía sistémica.

INTRODUCCIÓN

Inmunidad en Mucosas

Las enfermedades infecciosas (respiratorias, urogenitales y gastrointestinales) continúan siendo una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en humanos a nivel mundial a pesar de la disponibilidad de terapias antibióticas y de vacunas multiespecíficas.

Tan sólo en 1999 murieron más de 13 millones de personas en todo el mundo a raíz de dichas enfermedades, que representan el 25% de todas las causas de mortandad a nivel mundial; y en la próxima hora, 1 500 personas morirán de una enfermedad infecciosa, teniendo más de la mitad menos de 5 años de edad; aseguró la organización mundial de la salud (World Health Organization, WHO) en su informe sobre las enfermedades infecciosas 2000.

En los últimos años, el tratamiento de infecciones con antibióticos ha sido menos exitoso debido al dramático incremento de microorganismos resistentes a ellos por medio de uno o más mecanismos de resistencia intrínseca y/o adquirida y amplificadas por la presión selectiva a la exposición de los antibióticos (Ernst, 1999). Además existen enfermedades (por ejemplo, malaria, SIDA-HIV, herpes-HSV, entre otras) e infecciones importantes (por ejemplo, neumonía, cólera, hepatitis, y meningitis) para las cuáles no se cuenta con vacunas, y las disponibles son parcialmente efectivas por su grado y tiempo de protección, o presentan inconvenientes que limitan su aplicación (efectos colaterales, inestabilidad, altos costos de producción, reversión a un fenotipo virulento) (Heather, 1993; McCluskie and Davis, 1999).

La mayoría de los agentes infecciosos víales, bacterianos y/o protozoarios afectan directamente o son adquiridos a través de las superficies mucosas. La protección inmune específica de las superficies mucosas es mediada por el *Sistema Inmune Mucoso* y por pequeñas cantidades de inmunoglobulinas (Ig) séricas que establecen contacto con estos sitios. El sistema inmune mucoso comprende al tejido linfoide asociado con las superficies mucosas (mucosa-associated lymphoid tissue, MALT) y glándulas exocrinas (Staats *et al.*, 1994).

El MALT esta dividido en Sitios Inductores, donde el antígeno es endocitado, procesado y presentado a los linfocitos T y B, y en Sitios Efectores donde ocurre la secreción de anticuerpos (McGhee *et al.*, 1999a; Czerkinsky *et al.*, 1999).

Los principales sitios inductores son en el: (a) tracto gastrointestinal, el tejido linfoide asociado al intestino (gut-associated lymphoid tissue, GALT), por ejemplo, placas de Peyer, apéndice, nódulos linfáticos mesentéricos, nódulos linfoides aislados y linfocitos intraepiteliales; (b) tracto respiratorio, el tejido linfoide asociado a bronquios (bronchus-associated lymphoid tissue, BALT) y tejido linfoide asociado a nasofaringe (nasal-associated lymphoid tissue, NALT), por ejemplo, amígdala palatina, lingual y nasofaringe, y (c) tracto urogenital, el tejido linfoide asociado al recto (rectal-associated lymphoid tissue, RALT) del intestino grueso. Estos tejidos linfoides altamente especializados son colectivamente denominados tejido linfoide asociado con las superficies mucosas (MALT) (McGhee *et al.*, 1999a; Czerkinsky *et al.*, 1999). Además del tejido linfoide, las células presentadoras de antígeno (APC), tales como macrófagos y células dendríticas, en el GALT y en el tracto reproductor masculino y femenino pueden también actuar como sitios inductores.

El principal tejido linfoide mucoso estudiado son las placas de Peyer (PP) del intestino delgado. Las PP contienen una región en forma de domo altamente enriquecida por linfocitos, macrófagos, células dendríticas y células plasmáticas. Este tejido esta recubierto por un epitelio, que contiene epitelio asociado foliculo (FAE) o células M, y esta altamente especializado para la captación, absorción y transporte de antígenos intactos, tales como proteínas, bacterias, virus, y pequeños parásitos, hacia el tejido linfoide inferior. Bajo el domo de la PP los diferentes folículos contienen los centros germinales donde ocurre la división de las células B. Estos últimos son los principales sitios donde se lleva a cabo el "switch" o cambio de clase de células B IgM^+ de superficie ($sIgM^+$) a células B $sIgA^+$. La mayoría de las células B $sIgA^+$ se encuentran aquí. Las áreas de células T son adyacentes, y proporcionan funcionalidad a los linfocitos T citotóxicos (CTL) y células T cooperadoras (Th) que apoyan a las respuestas IgA. Después de la estimulación antigenica en los sitios inductores, las células T y B antígeno-específicas dejan la PP vía eferente linfático, alcanzan la circulación sistémica vía ducto torácico, y se diseminan en los sitios efectores. Estos son la lamina propia (LP) del tracto respiratorio, gastrointestinal y

urogenital, y las glándulas exocrinas (lagrimal, mamaria y salival). Bajo la influencia del antígeno, de células T y citocinas, las células B proliferan y maduran como células plasmáticas IgA.

La ruta de distribución de células desde sitios inductores IgA (BALT, GALT, NALT, RALT) hacia sitios efectores IgA (LP del tracto respiratorio, gastrointestinal y urogenital) se conoce como *Sistema Inmune Común de Mucosas* (McGhee *et al.*, 1999a).

La existencia de este sistema permite la inmunización en una superficie mucosa para inducir la secreción de anticuerpos de clase IgA-Secretora (S-IgA) antígeno-específico no sólo en el sitio de aplicación, sino también en sitios distantes (Corthesy and Spertini, 1999; Mestecky and Fultz, 1999).

Inmunización en Mucosas y el Uso de Adyuvantes

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

La inmunización de mucosas ofrece diversas ventajas en comparación con la inmunización parenteral; quizás la más importante es que puede lograr la inducción de ambos tipos de inmunidad: sistémica y en mucosas (McGhee *et al.*, 1999b; Baldrige *et al.*, 2000). Otras ventajas son la disminución del riesgo de probables efectos colaterales al evitar el ingreso directo de antígenos en la circulación sistémica, la facilidad de aplicación y la posibilidad de administrar vacunas múltiples (Kalambaheti *et al.*, 1998). A pesar de estas ventajas, la única vacuna que se aplica en alguna mucosa es la que protege contra la poliomielitis (Sabin) (Staats *et al.*, 1994), y esto se debe principalmente a la baja absorción de las vacunas comerciales disponibles, lo que obliga a que su aplicación se realice por alguna ruta sistémica. Otras limitantes de la inmunización en mucosas es que con frecuencia las respuestas son ineficientes o de corta duración, se

requiere de múltiples administraciones e incluso puede inducirse tolerancia inmunológica, por lo que debe hacerse uso de adyuvantes específicos. Por lo tanto, el desarrollo de vacunas que induzcan inmunidad protectora en las mucosas dependerá ampliamente del mejoramiento en la administración de los antígenos a los tejidos linfoides inductores y del descubrimiento de nuevos y efectivos adyuvantes (Chen, 2000).

Para facilitar la inmunización en las superficies mucosas la mayoría de los esfuerzos se han enfocado al desarrollo de estrategias de vacunación oral. Sin embargo, aunque podría esperarse que la administración oral de vacunas proteicas indujera respuestas inmunes en el tracto gastrointestinal y en otras mucosas distantes, en realidad esta forma de administración de antígeno generalmente resulta en respuestas pobres. Para solucionar este problema, se han desarrollado una serie de estrategias que incluyen el uso de bacterias atenuadas o virus recombinantes (Czerkinsky *et al.*, 1999) como acarreadores de antígenos heterólogos o que expresan genes que codifican para antígenos vacunales, la microencapsulación de antígenos en microesferas biodegradables (Gupta *et al.*, 1998), la incorporación de antígenos en liposomas (Wilschut *et al.*, 1994; White *et al.*, 1995), el uso de complejos inmunoestimuladores (ISCOMs) (Stewart-Tull, 1996), y el empleo de vacunas de DNA (McCluskie and Davis, 1999). El objetivo de utilizar todos estos vehículos es lograr una adecuada captación del antígeno por parte de los tejidos inductores, pero aún cuando esto suceda, queda pendiente lograr una respuesta eficiente y para ello es necesario el empleo de adyuvantes. Estas sustancias son capaces de mejorar la respuesta inmune en diferentes formas: (a) pueden incrementar la inmunogenicidad de antígenos débiles; (b) pueden ser usados para incrementar la velocidad y duración de la respuesta inmune; (c) modular la avidéz, especificidad, isotipo o distribución de las subclases de anticuerpos; (d) pueden estimular la inmunidad mediada por células; (e) promover la inducción de inmunidad en mucosas; (f) incrementar la respuesta inmune en individuos seniles o inmaduros inmunológicamente; (g) además pueden disminuir la dosis de antígeno y reducir los costos de las vacunas (Singh and O'Hagan, 1999).

Existen muchas sustancias que han mostrado su capacidad como adyuvantes vacunales pero la mayoría de ellos son útiles solamente para la inmunización parenteral. Entre los escasos adyuvantes de mucosas conocidos hasta ahora están la interleucina-12 (IL-12) (Elson and

Dertzbaugh, 1999), monofosforil lípido A (Baldrige *et al.*, 2000), muramyl dipéptido (MDP) (Singh and O'Hagan, 1999), las secuencias inmunoestimuladoras CpG (McCluskie and Davis, 1999), y algunas toxinas bacterianas (Elson and Dertzbaugh, 1999). De estas últimas, las más estudiadas son la toxina del cólera (CT) de *Vibrio cholerae* y la enterotoxina termolábil (LT) de *Escherichia coli* (Williams *et al.*, 1999). CT y LT tienen efectos adyuvantes en las respuestas sistémicas y mucosas cuando se coadministran o se conjugan con proteínas solubles que no son inmunogénicas en mucosas (Wilson *et al.*, 1989; Kalambaheti *et al.*, 1998; Tochikubo *et al.*, 1998; Johansson *et al.*, 1998); no obstante, su aplicación en humanos no es factible por su toxicidad (McGhee *et al.*, 1999b). Para resolver este problema se han diseñado mutantes no tóxicos que conserven su adyuvancia, como LT-G192, LT-K63 y LT-R72 (Douce *et al.*, 1999; Ryan *et al.*, 1999). Sin embargo, además de eliminar el problema de la toxicidad, deben obtenerse moléculas cuyos costos de producción permitan su uso masivo. Otra opción es la búsqueda de nuevas proteínas inmunogénicas no tóxicas para humanos capaces de inducir respuestas inmunes sistémicas y en mucosas que podrían ser buenos candidatos para utilizarse como adyuvantes y acarreadores para administrar epítopos vacunales por rutas mucosas.

ANTECEDENTES

La Protoxina CryIAc de *Bacillus thuringiensis* como Adyuvante de Mucosas

Bacillus thuringiensis es una especie bacteriana Gram positiva esporulada del suelo que produce cuerpos de inclusión paraesporales compuestos por una o más δ -endotoxinas conocidas como proteínas Cry (Cannon, 1996). Las propiedades bioquímicas de las proteínas Cry tales como alta resistencia a la proteólisis enzimática, así como su estabilidad a pH extremo, su inocuidad para los vertebrados y su alto peso molecular (Höfte and Whiteley, 1989) las hacen potencialmente útiles como acarreadores de epitopos en las vacunas conjugadas. Las proteínas Cry tienen actividad entomopatogénica de gran importancia económica, por lo cual se han estudiado diversos factores que influyen en su expresión. Los sistemas de producción efectivos para la expresión de los genes *cry* en *Escherichia coli* o en otros vectores son de gran ayuda para estudiar los productos del gen, su funcionalidad, rango de hospedero, su producción industrial, etc. *E. coli* JM103 es un buen sistema para la expresión del gen que codifica la proteína CryIAc de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD73, porque la cantidad producida es considerablemente mayor (284 $\mu\text{g/ml}$; el 48 % del total de proteínas) que la del hospedero natural (58 $\mu\text{g/ml}$; el 51% del total de proteínas) (Ge *et al.*, 1990). Las proteínas Cry se han estudiado ampliamente desde hace mucho tiempo para evaluar su actividad bioinsecticida pero las propiedades fisiológicas o inmunológicas en vertebrados han sido poco estudiadas a pesar de la homología de *B. thuringiensis* con la especie patógena *B. cereus* (Zahener *et al.*, 1989).

Prasad y Shethna (1975) reportaron que la inmunización con los cristales de *B. thuringiensis* subs. *thuringiensis* inducía un incremento en la respuesta humoral en ratas. En un trabajo posterior estos mismos autores (Prasad and Shethna, 1976) atribuyeron a una proteína extraída de los cristales una actividad antitumoral contra el sarcoma ascítico de Yoshida tanto *in vivo* como *in vitro*.

Recientemente en nuestro laboratorio se ha encontrado que la protoxina CryIAc recombinante clonada a partir de *Bacillus thuringiensis* subs. *kurstaki* es altamente inmunogénica y posee efectos adyuvantes tanto a nivel sistémico como de mucosas tan potentes como los de la toxina del cólera. Vázquez *et al.* (1996) observaron que la inmunización sistémica de ratones y conejos

con CryIAdm con el adyuvante completo de Freund inducía una alta respuesta de anticuerpos en suero. En un trabajo posterior, Vázquez *et al.* (1999a) administraron por vía intragástrica (IG) e intraperitoneal (IP) formas cristalinas y solubles de la protoxina, y encontraron que las dos formas indujeron altas respuestas de anticuerpos sistémicos por vía IP, sin embargo, solo CryIAdm soluble indujo respuestas de anticuerpos mucosos vía IG. Posteriormente probaron la adyuvancia (Vázquez *et al.*, 1999b) de CryIAdm soluble al coadministrarla con el antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg) y con albúmina sérica bovina (BSA) y compararon su eficiencia con la toxina del cólera (CT). De este trabajo se concluyó que CryIAdm es un adyuvante sistémico y de mucosas tan potente como CT. Moreno-Fierros *et al.* (2000) determinaron que la inmunización con CryIAdm por las vías intranasal, rectal e intraperitoneal induce respuestas de anticuerpos en mucosas del tracto gastrointestinal, urogenital y respiratorio.

Estos datos en conjunto sugieren que la protoxina CryIAdm podría ser útil como adyuvante y acarreador vacunal de epitopos para la inducción de respuestas sistémicas y en mucosas, debido a que además de su alta inmunogenicidad tanto a nivel mucoso como sistémico, tiene la ventaja de ser inocua para vertebrados y de producirse a gran escala y a bajos costos.

El descubrimiento de nuevos acarreadores y adyuvantes abre líneas de investigación en las cuales estos deben ser caracterizados y probada su potencialidad como vacunas para proteger contra enfermedades gastrointestinales, urogenitales y respiratorias. Para fines de este trabajo, la enfermedad de interés es la neumonía.

Infección por *Streptococcus pneumoniae* y Desarrollo de Vacunas

El neumococo, *Streptococcus pneumoniae*, es una bacteria Gram positiva que permanece como agente causal importante de morbilidad y mortalidad en todos los grupos de edad (Austrian, 1981). La mayor parte de la población ha presentado algún proceso infeccioso por neumococo: otitis media, neumonía (seguido de una bacteriemia), meningitis, y hasta cuadros graves como sepsis o neuroinfección.

La organización mundial de la salud (World Health Organization, WHO) estima que de una cuarta a una tercera parte de la mortandad en niños menores de 5 años es ocasionada por infecciones del tracto respiratorio, siendo la neumonía, más que cualquier otra enfermedad infecciosa, el homicida número uno en todo el mundo; que representa de 4-5 millones de muertes cada año, y aproximadamente el 40% de ellas son ocasionadas por *S. pneumoniae* (Lee *et al.*, 1997; Stack *et al.*, 1998).

En México, ocurren cada año 93 mil casos de neumonía y decenas de miles de gripe, lo que provoca ausentismo laboral y gastos en medicamentos. De acuerdo con la Secretaría de Salud (SS), el 31% de los casos de neumonía afecta a personas mayores de 60 años; y en 1999 murieron aproximadamente 14 000 personas por esta infección a pesar del tratamiento con antibióticos.

Diversos estudios han definido como grupos de alto riesgo de contraer y desarrollar alguna enfermedad por neumococos a los siguientes: pacientes con alguna malignidad (incluyendo leucemia, linfoma, mieloma múltiple y enfermedad de Hodgkins), asplenia anatómica o funcional, SIDA-HIV, insuficiencia renal crónica, alcoholismo, enfermedades cardio-pulmonares, diabetes mellitus, síndrome nefrótico y cualquier condición asociada con inmunosupresión (Poland, 1999).

Debido a la relevancia de este problema de salud, ha sido abordado por los científicos con estrategias que van desde la implementación de programas educativos, hasta el desarrollo de terapias antibióticas y de vacunas profilácticas.

La mayor parte de los neumococos son susceptibles a la penicilina, sin embargo, existen cepas resistentes. Además se tiene conocimiento de resistencia no sólo a la penicilina, sino también al cloranfenicol, trimetoprim-sulfametoxazol, ceftriaxona, eritromicina y tetraciclina (Alonso *et al.*, 1991; Bradley and Connor, 1991; Friedland and Klugman, 1991; Schwartz *et al.*, 1991; Shortridge *et al.*, 1999). Es por ello que se han probado vacunas antineumocócicas compuestas de diferentes polisacáridos capsulares para lograr la estimulación inmunológica (Robbins *et al.*, 1983; Bolan *et al.*, 1986; Lindberg, 1990).

Debido a que los neumococos invaden al organismo por vía hematógena o por extensión directa, a partir de las mucosas colonizadas (tracto respiratorio); se requieren desarrollar

estrategias de vacunación que induzcan tanto inmunidad en mucosas como a nivel sistémico (Miller *et al.*, 1992).

De los 84 serotipos de polisacáridos capsulares (PSC) expresados por *S. pneumoniae* (Van Dam *et al.*, 1990), sólo algunos son especialmente virulentos en humanos y otros no lo son.

La vacuna para uso humano ha sido formulada con una mezcla de 23 PSC seleccionados de los 84 serotipos expresados por este neumococo.

La inmunización con polisacáridos de neumococo estimula la producción de anticuerpos (Braconier *et al.*, 1984; Bardardottir *et al.*, 1990; Vidarsson *et al.*, 1994) y protege a los adultos sanos (Shapiro *et al.*, 1991). Sin embargo, su inmunogenicidad es baja en ciertos grupos de riesgo (ancianos, pacientes inmunodeficientes o inmunocomprometidos) (Landesman and Schiffman, 1981; Van Dam *et al.*, 1990; Seong *et al.*, 1999) y en niños menores de dos años (Douglas *et al.*, 1983; Giebink, 1985; Bruyn *et al.*, 1992; Lee and Wang, 1994); y además se ha reportado una disminución de los anticuerpos capsulares (Leinonen, 1982; Koskela *et al.*, 1986; Mufson *et al.*, 1987).

Los PSC se clasifican como antígenos timo-independientes tipo 2 (TI-2). Las características de estas respuestas son: ausencia de memoria, producción de anticuerpos de clase IgM con un limitado switch de clase y no existe una afinidad por madurez (Bruyn *et al.*, 1992; Mond *et al.*, 1995). Entre las estrategias para solucionar estos problemas se encuentra el desarrollo de vacunas de polisacáridos capsulares de neumococo conjugados o unidos a proteínas acarreadoras para generar respuestas timo-dependientes (Giebink, 1994; Eskola and Käyhty, 1995; Anderson *et al.*, 1996; Vidarsson *et al.*, 1998; Korkeila *et al.*, 2000).

Existen muchas técnicas de conjugación para proteínas y carbohidratos que consisten principalmente en reacciones de amidación, aminación reductiva, esterificación y en la formación de disulfuros entre otras. Los conjugados obtenidos por amidación, aminación, la formación de enlaces tioléter o combinaciones de estos son en general muy estables, aunque su estabilidad *in vivo* es incierta (Peeters *et al.*, 1996).

Se han analizado la seguridad, la memoria y la protección contra las infecciones neumocócicas conferidas por los conjugados vacunales formados por componentes proteicos de uso amplio

como los toxoides diftérico y tetánico, proteínas de membrana externa de neumococos y la toxina mutante diftérica CRM₁₉₇. Los resultados obtenidos con estas vacunas han sido positivos en general. No obstante, existen controversias sobre su eficacia, ya que mientras algunos autores reportan que estas vacunas conjugadas han demostrado ser inmunogénicas y capaces de inducir memoria inmunológica en humanos mejores que la vacuna comercial (Käyhty *et al.*, 1995; Ahman *et al.*, 1996; Giebink *et al.*, 1996; Rennels *et al.*, 1998; Rodriguez *et al.*, 1998; Vidarsson *et al.*, 1998; Korkeila *et al.*, 2000), otros reportan lo contrario (Powers *et al.*, 1996; Shelly *et al.*, 1997).

Por otra parte, diversas consideraciones prácticas hacen a estas alternativas poco apropiadas para su aplicación. Por ejemplo, el uso de estas sustancias está limitado a los posibles riesgos de toxicidad del vector. El proceso de destoxificación química produce grandes variaciones por lo que, las propiedades físicas y químicas de la toxina pueden ser sustancialmente modificadas y afectar la unión a los polisacáridos. La conjugación de estas proteínas con grandes cantidades de polisacáridos puede afectar las características conformacionales de la proteína e inactivar los epitopos de las células T y B. Aunado a estos inconvenientes, las proteínas derivadas de la toxina del cólera, toxoide diftérico y tetánico presentan problemas como hipersensibilidad o supresión de respuestas anti-carbohidrato ocasionados por la preexistencia de anticuerpos anti-acarreador. Estos efectos se observan cuando las proteínas acarreadoras se emplean en vacunas polivalentes o en formulas combinadas (Peeters *et al.*, 1991; Dintzis and Dintzis, 1992; Barington *et al.*, 1993; Barington *et al.*, 1994; Shelly *et al.*, 1997; Bergquist *et al.*, 1997).

Otra opción es la búsqueda de nuevas proteínas con propiedades acarreadoras para administrar epitopos vacunales por rutas mucosas.

JUSTIFICACIÓN

La vacuna antineumocócica para uso humano es un instrumento importante en la profilaxis de infecciones neumocócicas, ya que estimula la producción de anticuerpos y protege a los adultos sanos. Sin embargo, su inmunogenicidad es baja en ciertos grupos de riesgo (ancianos, pacientes inmunodeficientes o inmunocomprometidos) y en niños menores de dos años. Entre las estrategias para solucionar estos problemas se encuentra el desarrollo de vacunas de polisacáridos de neumococo conjugados o unidos a una proteína acarreadora. Los resultados obtenidos con estas vacunas han sido variables, aunque se ha demostrado que es posible obtener respuestas protectoras. No obstante, para obtener una vacuna lo suficientemente efectiva para iniciar las pruebas en humanos es necesario determinar la (s) ruta (s) óptima (s) de inmunización, los acarreadores y adyuvantes que sean los más apropiados.

Tomando como base la información precedente, podemos afirmar que la protoxina CryIAc es un buen candidato de adyuvante para mucosas que además cuenta con las ventajas de ser inocua para el ser humano y de producirse a gran escala y a un bajo costo. Es necesario explorar su potencialidad como adyuvante y acarreador de antígenos que induzcan protección contra enfermedades adquiribles a través de las mucosas y tal es el caso de la infección por *S. pneumoniae*. Nos interesa conocer si la coadministración de CryIAc podría favorecer la respuesta de anticuerpos contra los 23 polisacáridos capsulares de la vacuna comercial Pulmovax, adicionalmente usamos la toxina del cólera para comparar las respuestas de anticuerpos generadas con este inmunógeno conocido. Además se determino si un conjugado vacunal formado por la protoxina CryIAc recombinante y el polisacárido capsular 6B (PSC6B) de *S. pneumoniae* podría ser inmunogénico y potencialmente menos tóxico que los actuales e inducir protección eficaz y duradera en el modelo murino.

OBJETIVO GENERAL

Determinar si la protoxina CryIAc recombinante funciona como acarreador y adyuvante para la inducción de respuestas de anticuerpos sistémicos y mucosos hacia antígenos de naturaleza proteica y polisacárida (carbohidrato) en el modelo murino.

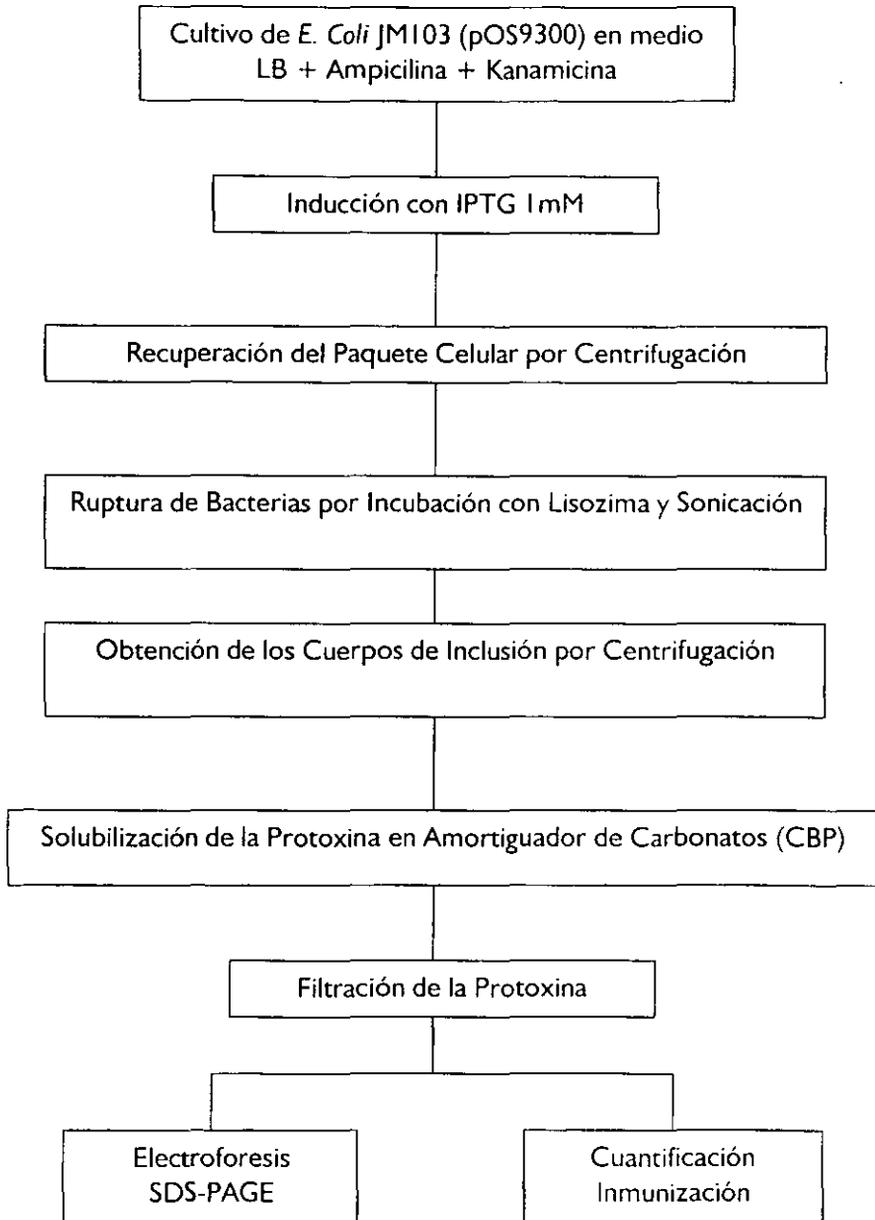
OBJETIVOS PARTICULARES

1. Evaluar el Efecto Acarreador y Adyuvante de CryIAc en la Respuesta de Anticuerpos anti-BSA
 - 1.1 Conjugar CryIAc con albúmina sérica bovina (BSA) para evaluar el potencial de CryIAc como acarreador de proteínas.
 - 1.2 Analizar la respuesta de anticuerpos anti-BSA en suero, lavados traqueobronqueales, intestinales y vaginales en ratones hembras Balb/c inmunizados por las rutas intranasal y oral con BSA, BSA coadministrada con CryIAc o toxina del cólera (CT), y con el conjugado CryIAc-BSA.
 - 1.3 Comparar la respuesta inmune anti-BSA inducida con el conjugado CryIAc-BSA con la inducida por la coadministración de BSA con CT.
 - 1.4 Comparar la respuesta inmune anti-BSA inducida por la ruta oral con la inducida por la ruta intranasal.

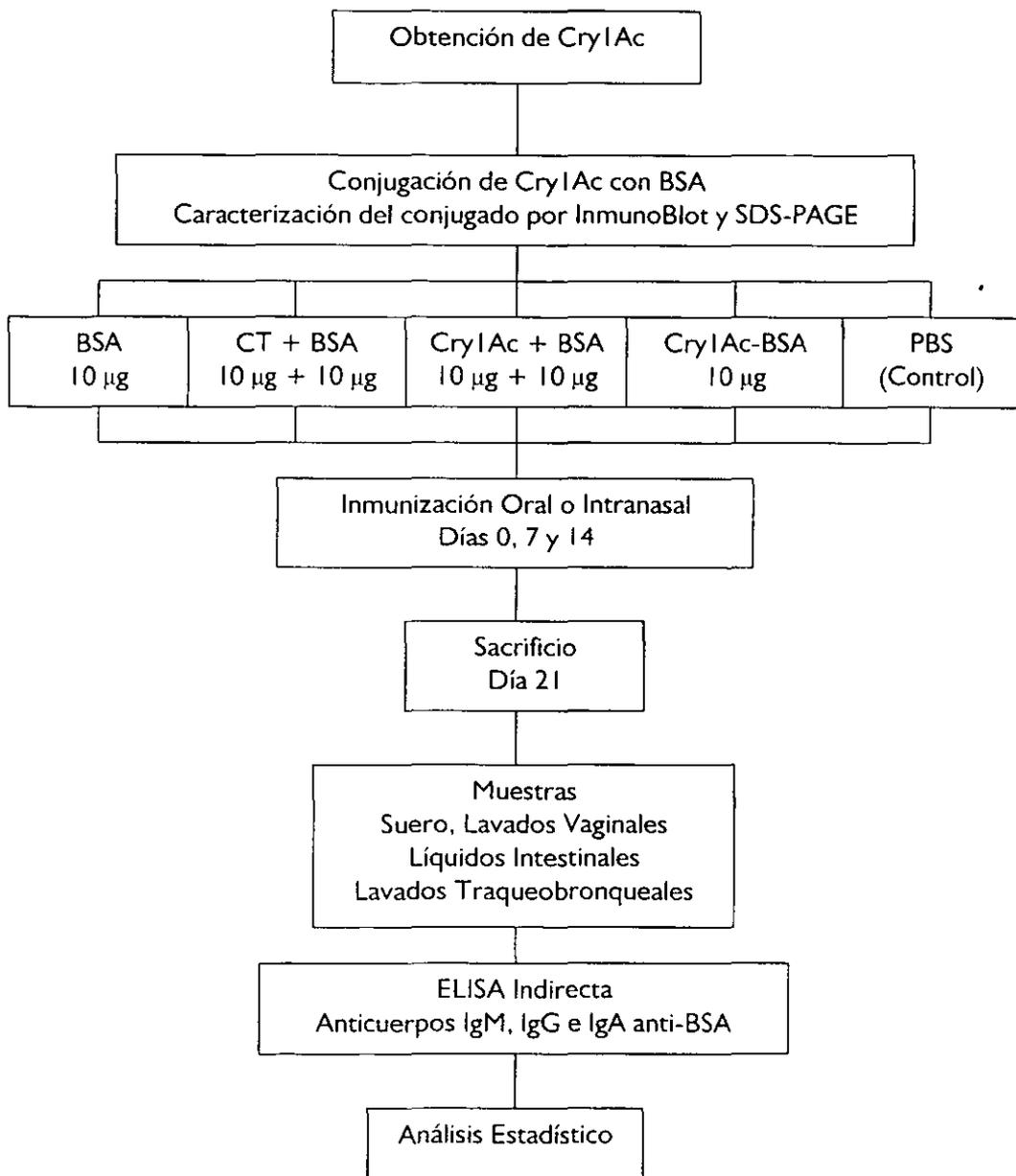
2. Evaluar el Efecto Acarreador y Adyuvante de CryIAc para la Inducción de Respuestas de Anticuerpos anti-PSC6B
 - 2.1 Conjugar CryIAc con el polisacárido capsular 6B de *Streptococcus pneumoniae* (PSC6B) a través de la formación de enlaces tioléter para evaluar el potencial de CryIAc como acarreador de polisacáridos.
 - 2.2 Analizar la respuesta de anticuerpos anti-PSC6B en suero, lavados traqueobronqueales e intestinales en ratones hembras Balb/c inmunizados por la ruta intranasal con PSC6B, PSC6B coadministrado con CryIAc o CT, y con el conjugado CryIAc-PSC6B.
 - 2.3 Comparar la respuesta inmune anti-PSC6B inducida con el conjugado CryIAc-PSC6B con la inducida por la coadministración de PSC6B con CT.

3. Determinar si CryI Ac tiene Efecto Adyuvante en la Respuesta de Anticuerpos anti-Pulmovax
 - 3.1 Establecer la adyuvancia de CryI Ac al coadministrarla con la vacuna comercial Pulmovax por ruta intranasal y evaluar la respuesta de anticuerpos sistémicos y mucosos anti-Pulmovax.
 - 3.2 Comparar la respuesta inmune anti-Pulmovax inducida por la coadministración de Pulmovax con CryI Ac con la inducida por la coadministración de Pulmovax con CT.

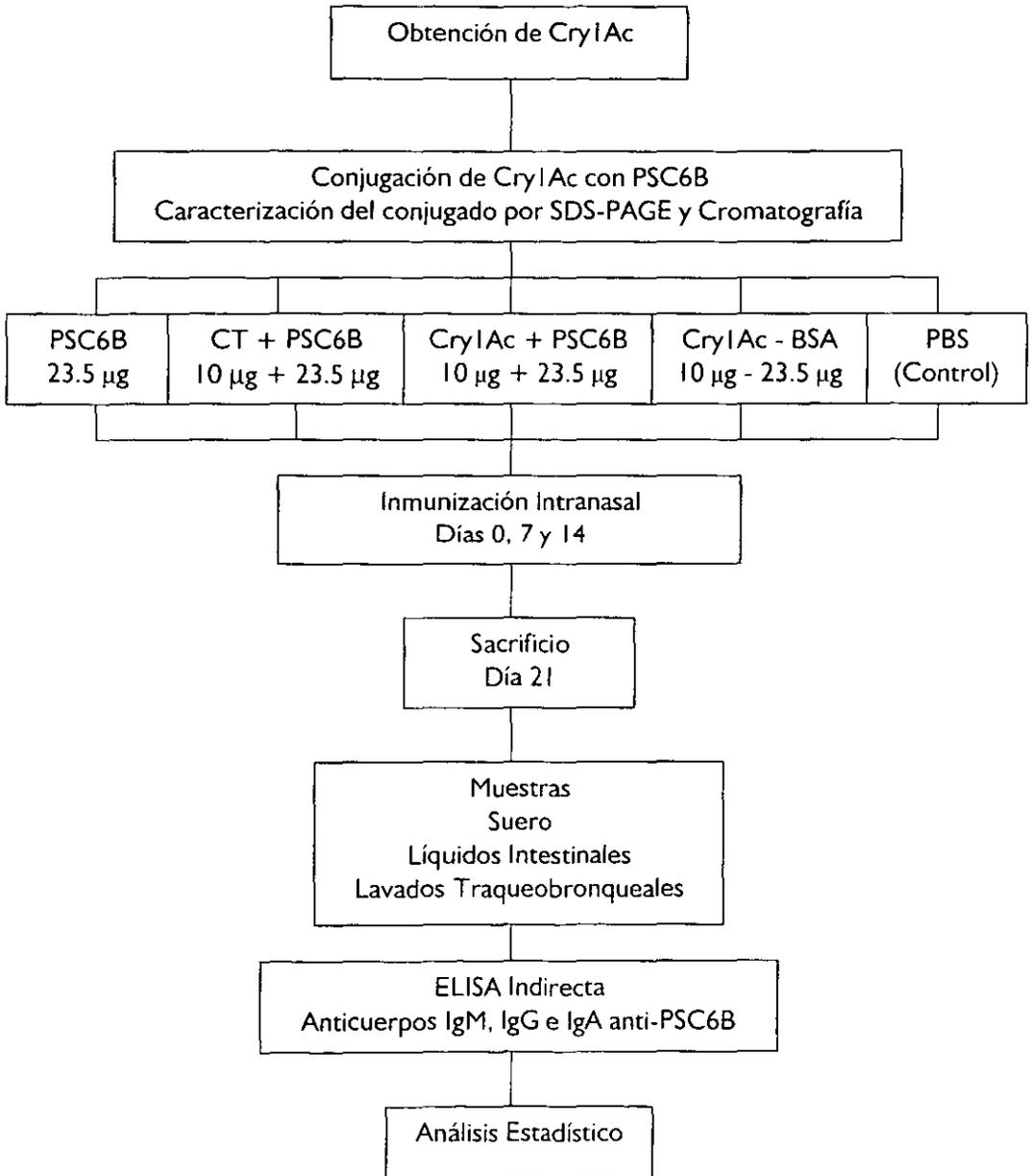
Obtención de CryI Ac



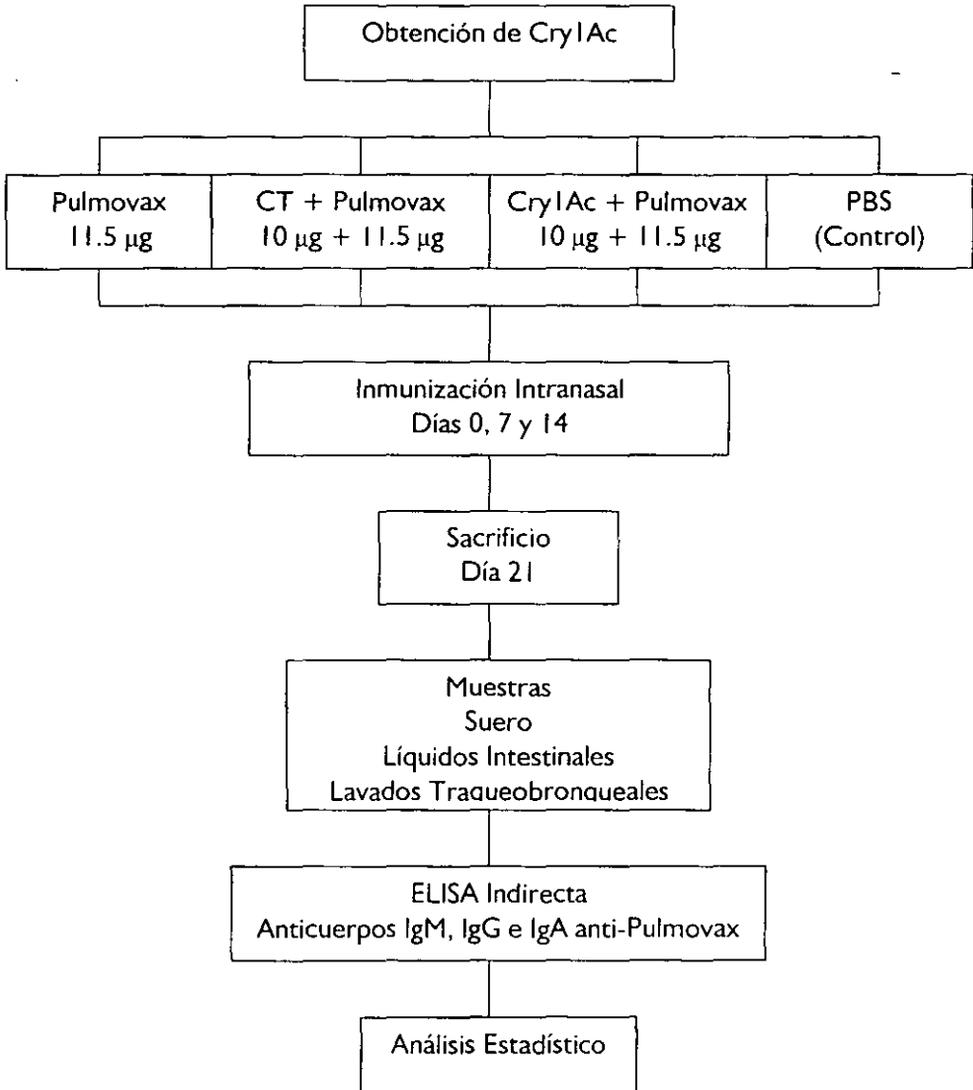
Efecto Adyuvante y Acarreador de CryIAc Sobre la Respuesta de Anticuerpos anti-BSA



Efecto Adyuvante y Acarreador de CryI Ac Sobre la Respuesta de Anticuerpos anti-PSC6B



Efecto Adyuvante de CryI Ac Sobre la Respuesta de Anticuerpos anti-Pulmovax



MATERIALES Y MÉTODOS

Inmunógenos

- Albúmina Sérica Bovina (BSA) y Toxina del Cólera (CT) fueron comprados a Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo)
- Polisacárido Capsular serotipo 6B (PSC6B) de *Streptococcus pneumoniae* obtenido de la American Type Culture Collection, Manassas, VA
- Pulmovax[®] Vacuna Antineumocócica Polisacárida, Polivalente, Acuosa de 23 polisacáridos capsulares (P23) comprada a Vida Inmunizada, Polanco. Distribuidor de Merck Sharp and Dohme en México
- Protoxina soluble recombinante CryIAc de *Bacillus thuringiensis* (CryIAc)
- Conjugado de CryIAc con BSA (CryIAc-BSA)
- Conjugado de CryIAc con PSC6B (CryIAc-PSC6B)

Obtención de CryIAc

Se inoculó una asada de *Escherichia coli* JM103 (pOS9300) (donada gentilmente por el Dr. Donald Dean, Ohio State University, Columbus) a un tubo con 5 ml de medio Luria-Bertani (LB) suplementado con kanamicina (30 µg/ml) y ampicilina (50 µg/ml), que luego se incubó toda la noche a 37°C en agitación constante. Un ml del tubo de toda la noche se inoculó en un matraz con 500 ml de medio LB con 0.5 ml de ampicilina y 0.5 ml de kanamicina, que se mantuvo en agitación por 5 h a 37°C; se adicionaron entonces 500 µl de isopropil β-D-tiogalactopiranosido (IPTG) 1 mM y se incubó por 24 h, al cabo de las cuales se adicionaron 250 µl de IPTG 1 mM, 0.5 ml de kanamicina y se continuó la incubación otras 24 h hasta que la absorbancia (A) A₅₄₀ llegó a 0.5-1.0. Las bacterias se cosecharon por centrifugación a 4°C y 12 000xg por 10 min, se resuspendió la pastilla con 50 ml de TE (Trizma 50 mM pH 8, EDTA 10 mM), se centrifugó nuevamente y se resuspendió con 50 ml de TE, se le añadió 0.5 ml de lisozima (2 mg/ml) y se incubó 1 h a 37°C mezclando suavemente de vez en cuando. El volumen se repartió en dos tubos Nalgene de 50 ml y cada uno se sonicó tres veces mientras estaba sumergido en hielo por 5 min (Ultrasonic Homogenizer 4710). Se reunieron los sonicados, y la mezcla resultante se centrifugó a 12 000xg durante 20 min a 4°C. A la pastilla

con los cuerpos de inclusión se añadieron 100 μ l de fluoruro de fenil-metil-sulfonilo (PMSF) 1 mM y 10 ml de agua; la mezcla se agitó y se centrifugó a 12 000xg por 10 min a 4°C. El sobrenadante se aspiró y la pastilla se resuspendió en 10 ml de Na₂CO₃ 0.1 M pH 9.6 con 100 μ l de PMSF 1 mM y 100 μ l de 2- β -mercaptoetanol 1% (2-ME); la mezcla se incubó 30 min a 37°C, se centrifugó a 4°C por 15 min a 12 000xg y el sobrenadante con la protoxina solubilizada se colocó en un tubo de 25 ml. Se esterilizó por filtración a través de una membrana de nitrocelulosa (poros de 0.25 μ m), se repartió en tubos Eppendorf en volúmenes de 1 ml y se almacenó a 4°C. La pureza de la proteína se analizó por electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970) y el contenido de proteínas se cuantificó con el método de Bradford (Bradford, 1976).

Conjugación de CryI Ac con BSA

Se usó el método descrito por Johnson and Dorling (1981). Un ml de la protoxina CryI Ac recién purificada (4 mg/ml) se dializó (bolsas de diálisis Spectra/Por[®], MWCO: 6-8 kDa) en contra de dos cambios de 500 ml de regulador de fosfatos salino 15 mM/NaCl 0.15 M pH 7.4 (PBS) a 4°C durante toda la noche. Se realizó un cambio a una solución de amortiguador de fosfatos (NaH₂PO₄ H₂O 2M, Na₂HPO₄ 0.2M) 0.1 M pH 6.8 mantenida en agitación suave por 2 h, posteriormente la protoxina se colocó en un tubo con rosca y se añadieron 12 mg de albúmina sérica bovina (BSA). Pasados 2 min, para acoplar ambas proteínas se adicionaron 50 μ l de glutaraldehído 1% y la mezcla se incubó en ausencia de luz a temperatura ambiente por 2 h en agitación suave. La mezcla fue dializada contra tres cambios de PBS a 4°C toda la noche. Se centrifugó en tubos Ultrafree[®]-15 (Biomax-100k NMWL, Millipore) a 2 800 rpm durante 8 min a 4°C. El sobrenadante fue colocado en tubos Eppendorf en volúmenes de 250 μ l y almacenados a 4°C. Se evaluó el contenido de proteínas totales (Bradford, 1976), y el conjugado se caracterizó por SDS-PAGE (Laemmli, 1970) e InmunoBlot (Towbin *et al.*, 1979). Para usar el conjugado como inmunógeno se esterilizó por filtración a través de una membrana de nitrocelulosa (poros de 0.22 μ m).

Conjugación de CryIAc con PSC6B

Concentración de CryIAc. Ochox3 ml de CryIAc recién purificada fueron colocados en bolsas de diálisis (Spectra/Por® 3787-D22, MWCO: 12-14 kDa) que se recubrieron completamente con polietilenglicol 800 (PEG) y se mantuvieron en frío por 1 h. Se realizaron dos cambios iguales del PEG hidratado. La solución final de cada bolsa tenía un volumen de 2 ml y 2.3 mg/ml de proteínas. Se mezclaron y a esta solución se le añadieron 70 μ l de 2-ME al 1%, la mezcla se incubó por 30 min a 37°C y se mantuvo 2 h en hielo.

Conjugación directa. Se usó el método descrito por Lees *et al.* (1996). Para activar el polisacárido del serotipo de *Streptococcus pneumoniae* 6B (PSC6B), a 1.3 ml de una solución acuosa de PSC6B (10 mg/ml) mantenida en agitación suave a 4°C, se añadieron lentamente 131 μ l de tetrafluoroborato de 1-ciano-4-dimetilaminopiridinio (CDAP, 100 mg/ml) y después de 30 seg se adicionaron 524 μ l de borato de sodio 0.1 M pH 8.8. Pasados 2 min, para acoplar la proteína al polisacárido activado se adicionaron rápidamente 1.8 ml de CryIAc (3.6 mg/ml) y la mezcla se mantuvo en agitación suave por 4 h. La reacción se detuvo con 100 μ l de etanolamina 0.5 M en Hepes 0.75 M, pH 7.5. La mezcla fue dializada contra cuatro cambios de 500 ml de PBS a 4°C. Volúmenes de 250 μ l del dializado fueron colocados en tubos Eppendorf y almacenados a 4°C. Se evaluó el contenido de proteínas (Bradford, 1976) y carbohidratos (Monsigny *et al.*, 1988) y se calculó la relación de proteínas/carbohidratos en el producto de conjugación.

El conjugado se caracterizó por filtración en una columna de Sephacryl S300HR y SDS-PAGE. Para usarlo como inmunógeno el conjugado se esterilizó por filtración a través de una membrana de nitrocelulosa (poros de 0.22 μ m).

Contenido de Proteínas

Se obtuvo la curva tipo de proteínas con el método de Bradford (1976) empleando albúmina sérica bovina como estándar. Las muestras problema fueron analizadas por duplicado en varias diluciones. Por regresión con mínimos cuadrados se obtuvo la ecuación de la curva tipo con la que se calculó la concentración de proteínas de las muestras diluidas apropiadamente ($0.05 < A_{620} < 0.5$).

Determinación de Carbohidratos

Las curvas tipo de los carbohidratos se obtuvieron a partir de soluciones de los polisacáridos auténticos. Para medir la cantidad de carbohidratos con el método de Monsigny *et al.* (1988), el contenido de un vial (10 mg) de PSC6B se disolvió con 5 ml de agua estéril y se almacenó a -70°C en volúmenes de 0.5 ml.

Un frasco ampula con 575 µg de la vacuna Pulmovax se mantuvo abierto en una incubadora a 37°C hasta sequedad (72 h), se disolvió con 0.5 ml de agua y se volvió a secar para eliminar la mayor cantidad posible de fenol. Se redisolvió en 0.1 ml de agua y se usó como solución de trabajo.

A los pozos de placas de ELISA (Costar 3590 High binding) se añadieron por duplicado muestras de 20 µl de la solución de polisacáridos, 20 µl de resorcinol 0.55 mM, 100 µl de H₂SO₄ 3.75 mM y 50 µl de la solución comercial de pristano (2.9 M). Las placas se taparon con cubiertas autoadherentes, se mezclaron por inversión y se calentaron en un baño de agua a 90°C por 30 min. Luego se mantuvieron a temperatura ambiente y en oscuridad por 30 min y se determinó su A₄₉₂ en el lector Multiskan MCC/340 (Labsystems).

Electroforesis en Geles de Dodecil Sulfato de Sodio-Poliacrilamida (SDS-PAGE)

Las muestras de CryIAc sin conjugar y conjugada se sometieron a SDS-PAGE (Laemmli, 1970) en condiciones no reductoras y reductoras (2-β-mercaptoetanol 10 mM). Las muestras se mezclaron con el regulador de muestras con o sin 2-β-mercaptoetanol y se aplicaron después de haber sido sumergidas en agua hirviendo por 3 min. Se usaron marcadores de peso molecular preteñidos (Sigma Chemical Co., SDS-7B). Se prepararon geles de 80×73×0.75 mm con poliacrilamida al 7.5% y 8% (para los conjugados CryIAc-BSA y CryIAc-PSC6B, respectivamente), se montaron en la cámara de electroforesis (Mini-Protean II, Bio-Rad) conectada a una fuente de poder (Bio-Rad, Modelo 1000/500). Se inició la electroforesis a 60 V y después de 30 min se aumentó a 100 V hasta que el colorante indicador llegó a 0.5 cm del extremo inferior del gel separador. El gel se colocó en un recipiente con colorante de Fairbanks (0.25 g de azul de Coomassie R-250, 125 ml de metanol, 50 ml de ácido acético glacial, 325 ml de agua) por toda la noche, se enjuagó con agua y luego se incubó en solución desteñidora rápida (45% de metanol, 45% de agua, 10% de ácido acético) por 25 min. Se hicieron luego

varios cambios de ácido acético al 7.5% y éste se eliminó con varios cambios de agua destilada por unas 12 h. Las imágenes de los geles teñidos se capturaron en un digitalizador de imágenes (Eagle Eye II, Stratagene) y luego se secaron al vacío sobre papel celofán en un secador de geles (Gel Slab Dryer, Bio-Rad 224).

Antisueros

Antisueros de ratón anti-BSA fueron obtenidos inmunizando 3 ratones Balb/c a intervalos de 7 días intraperitonealmente con 100 µg de BSA emulsificada en 100 µl de adyuvante completo de Freund (FCA), seguido de la inmunización con 100 µg de BSA y 100 µl de adyuvante incompleto de Freund (FIA) por dos semanas.

Antisueros de ratón anti-CryIAC fueron obtenidos inmunizando 3 ratones Balb/c a intervalos de 7 días intraperitonealmente con 50 µg de CryIAC en 100 µl de PBS. Los sueros fueron obtenidos una semana después de la última inmunización.

Inmunoblot (Inmunolectrotransferencia) de Proteínas de SDS-PAGE

El inmunoblot se realizó por el método de Towbin *et al.* (1979). Inmediatamente después de la electroforesis, las proteínas del gel se transfirieron a papel de nitrocelulosa (Bio-Rad, Trans Blot® 0.45µm) en presencia de amortiguador de transferencia (20 ml de metanol, 20 ml de Tris-Glicina 5X, 60 ml de agua, pH 8.3). La inmunolectrotransferencia se realizó en la cámara de transferencia (Labconco, Semi Dry Blotter) durante 30 min a 200 mA. El papel de nitrocelulosa se colocó en un recipiente con rojo Ponceau 0.5% en ácido acético 2% para observar las proteínas transferidas. El bloqueo de los sitios reactivos se realizó con leche Svelty al 6% en PBS-T pH 7.4 (PBS con Tween 20 al 0.05%) durante toda la noche a 4°C en agitación suave; posteriormente se lavo tres veces con PBS-T. El blot se incubo con 3 ml de antisuero de ratón anti-CryIAC o anti-BSA diluido 1:500 en PBS toda la noche a 4°C. El papel se lavo tres veces con PBS-T. Se adicionó el segundo anticuerpo anti-IgG diluido 1:2000 en PBS-T (inmunoglobulinas de cabra anti-cadenas pesadas y (Pierce) de ratón conjugadas a peroxidasa) y se incubo 2 h a temperatura ambiente. El blot se lavo tres veces con PBS-T y dos veces con PBS 1:3. Posteriormente se seco, y las bandas se visualizaron con solución de sustrato-cromógeno (20 mg de diaminobenzidina, 100 ml de PBS 1:3, 0.5 ml de H₂O₂ 1%).

Cromatografía en Sephacryl S300HR

A una columna (0.7x6.5 cm) de Sephacryl S300HR (Sigma Chemical Co.) equilibrada con PBS y conectada a una bomba peristáltica (flujo = 0.2 ml/min) se aplicaron 68 μ l de azul de dextrana (100 mg/ml) para determinar el volumen de exclusión (V_0). Se colectaron 60 fracciones de 200 μ l y se midió su A_{620} . La misma columna se lavó con cinco volúmenes del lecho con PBS y se le aplicaron en corridas independientes muestras de CryIAc, PSC6B y del conjugado CryIAc-PSC6B. El contenido de proteínas y carbohidratos se evaluó con los métodos ya descritos.

Inmunizaciones

Administración Oral e Intranasal de CryIAc Conjugada o Coadministrada con BSA

En todos los experimentos, se usaron ratones hembras Balb/c de 8-10 semanas de edad. Fueron mantenidos en jaulas con agua y alimento (Lab diet 5015, OMI Nutrition International) *ad libitum*. Los inmunógenos fueron administrados vía oral en 0.1 ml de NaHCO₃, o vía intranasal colocados directamente en las fosas nasales. Los grupos experimentales estuvieron formados por 5 ratones hembras, y cada uno recibió tres dosis de inmunógeno a los días 0, 7 y 14. Los ratones fueron sacrificados 7 días después de la última inmunización. Para cada ruta se usaron como inmunógenos albúmina sérica bovina (BSA) sola (10 μ g), CryIAc y toxina del cólera (CT) coadministrados con BSA (10 μ g de CT o CryIAc y 10 μ g de BSA), y CryIAc conjugada a BSA (10 μ g de conjugado). Para cada ruta se emplearon animales inmunizados solamente con PBS como controles negativos (Tabla 1).

Administración Intranasal de CryIAc Conjugada o Coadministrada con PSC6B

Grupos de 5 ratones Balb/c hembras fueron inmunizados a intervalos de 7 días por la ruta intranasal. Se usaron como inmunógenos polisacárido capsular 6B (PSC6B) solo (23.5 μ g), CryIAc y CT coadministrados con PSC6B (10 μ g de CryIAc o CT y 23.5 μ g de PSC6B), y CryIAc conjugada al PSC6B (10 μ g - 23.5 μ g). Se emplearon animales inmunizados solamente con PBS como controles negativos (Tabla 2).

Coadministración Intranasal de CryIAc o CT con Pulmovax

Grupos de 5 ratones Balb/c hembras fueron inmunizados a intervalos de 7 días por la ruta intranasal. Se usaron como inmunógenos la vacuna Pulmovax, la CT o CryIAc a las dosis indicadas en la tabla 3. Se emplearon animales inmunizados solamente con PBS como controles negativos.

Tabla 1. Grupos de ratones inmunizados con BSA sola, conjugada o coadministrada con CryIAc

<i>Dosis</i>	<i>Inmunógeno^a</i>	<i>Vía de administración^b</i>
100 µl	PBS	Oral
10 µg	BSA	Oral
10 µg + 10 µg	CT + BSA	Oral
10 µg + 10 µg	CryIAc + BSA	Oral
10 µg	CryIAc-BSA	Oral
10 µl	PBS	Intranasal
10 µg	BSA	Intranasal
10 µg + 10 µg	CT + BSA	Intranasal
10 µg + 10 µg	CryIAc + BSA	Intranasal
10 µg	CryIAc-BSA	Intranasal

^aCryIAc, Protoxina CryIAc; BSA, Albúmina Sérica Bovina; CT, Toxina del Cólera.

^bGrupos oral e intranasal; 5 ratones hembras Balb/c de 8-10 semanas de edad por grupo; se obtuvieron muestras de suero, líquidos intestinales, lavados vaginales y traqueobronqueales.

Tabla 2. Grupos de ratones inmunizados con PSC6B solo, conjugado o coadministrado con CryIAc

Dosis	Inmunógeno ^a	Vía de administración ^b
10 μ l	PBS	Intranasal
23.5 μ g	PSC6B	Intranasal
10 μ g + 23.5 μ g	CT + PSC6B	Intranasal
10 μ g + 23.5 μ g	CryIAc + PSC6B	Intranasal
10 μ g - 23.5 μ g	CryIAc - PSC6B	Intranasal

^aCryIAc, Protoxina CryIAc; PSC6B, Polisacárido Capsular serotipo 6B; CT, Toxina del Cólera.

^bGrupos intranasal; 5 ratones hembras Balb/c de 8-10 semanas de edad por grupo; se obtuvieron muestras de suero, líquidos intestinales y lavados traqueobronqueales.

Tabla 3. Grupos de ratones inmunizados con Pulmovax sola o coadministrada con CT o CryIAc

Dosis	Inmunógeno ^a	Vía de administración ^b
10 μ l	PBS	Intranasal
11.5 μ g	P23	Intranasal
10 μ g + 11.5 μ g	CT + P23	Intranasal
10 μ g + 11.5 μ g	CryIAc + P23	Intranasal

^aCryIAc, Protoxina CryIAc; P23, Vacuna Pulmovax; CT, Toxina del Cólera.

^bGrupos intranasal; 5 ratones hembras Balb/c de 8-10 semanas de edad por grupo; se obtuvieron muestras de suero, líquidos intestinales y lavados traqueobronqueales.

Obtención de Muestras

Se obtuvieron muestras de suero, de secreciones de intestino delgado, grueso, vagina y de tracto respiratorio como se describe a continuación.

Lavados Vaginales. Antes de sacrificar a los ratones se realizaron cinco lavados vaginales con 50 μ l de medio RPMI-1640 pH 7.4 (Sigma Chemical Co.) adicionado de garamicina (40 μ g/ml) (RPMI-G). El fluido se colectó en tubos Eppendorf; las muestras se centrifugaron a 8000xg durante 10 minutos a 4°C, y los sobrenadantes se almacenaron inmediatamente a -20°C.

Sueros. Los ratones se anestesiaron con éter y se obtuvieron muestras de sangre por punción cardíaca. Las muestras se incubaron a 37°C por 20 minutos y los sueros se separaron por centrifugación a 15 000xg por 5 minutos e inmediatamente después se almacenaron a -20°C.

Lavados Traqueobronqueales. En el cuarto frío se disectaron cuidadosamente los pulmones unidos a la tráquea, y se colocaron en una caja de Petri. El exterior se lavo exhaustivamente con Hank's Balanced Salt (HBSS) (Sigma Chemical Co.). Con una jeringa con cánula conectada a la tráquea se pasaron 2 ml de medio RPMI-G en dos ocasiones y el líquido se colectó en tubos Eppendorf. Las muestras se centrifugaron a 8000xg por 10 minutos a 4°C, y los sobrenadantes se almacenaron inmediatamente a -20°C.

Líquidos Intestinales. En el cuarto frío se disectaron los intestinos delgado y grueso, y se colocaron en cajas de Petri por separado. El exterior se lavo con HBSS. Se lavaron internamente mediante cánula con medio RPMI-G adicionado de ácido p-hidroximercuribenzoico (pHMB) (Sigma Chemical Co.) 100 mM en Trizma base 150 mM (RPMI-GP); para el intestino delgado se pasaron 5 ml y para el intestino grueso 3 ml de medio RPMI-GP. Las muestras se centrifugaron a 8000xg durante 10 min a 4°C y los sobrenadantes se almacenaron inmediatamente a -20°C.

Análisis de la Respuesta de Anticuerpos en Suero, Líquidos Intestinales, Lavados Vaginales y Traqueobronqueales

La evaluación de la respuesta de anticuerpos de clase IgM, IgG e IgA antígeno-específico se determinó mediante la técnica de ELISA indirecta.

Ensayo Inmunoenzimático anti-BSA

Se recubrieron placas de 96 pozos (Metrix) con 100 µl de BSA (10 µg/ml) en amortiguador de carbonatos-bicarbonatos pH 9.6. Las placas se incubaron 24 h a 4°C; se lavaron tres veces con 250 µl de PBS-T pH 7.4 (PBS con Tween 20 al 0.05%). El bloqueo de los sitios reactivos se realizó con 100 µl de caseína (Sigma Chemical Co.) al 1% en PBS-T durante 2 h a temperatura ambiente, posteriormente se lavaron tres veces con PBS-T. Se analizaron por duplicado las muestras de sueros diluidos 1:100 con caseína al 1% en PBS-T, los líquidos intestinales se diluyeron con caseína al 10% en PBS-T (concentración final 1%), los lavados vaginales y traqueobronqueales no diluidos se incubaron a 4°C por 24 h. Las placas se lavaron tres veces con PBS-T. Se adicionaron 100 µl de los segundos anticuerpos diluidos en caseína 1% PBS-T (1:500 para anti-IgA, 1:6400 para anti-IgG y 1:4800 para anti-IgM; inmunoglobulinas de cabra anti-cadenas pesadas µ, γ (Pierce) y α (Zymed) de ratón conjugadas a peroxidasa) y se incubaron 2 h a temperatura ambiente. Se lavaron tres veces con PBS-T y la reacción enzimática se realizó con solución de sustrato para ELISA (0.5 mg/ml de o-feniléndiamina, 0.01% H₂O₂ en amortiguador de citratos-fosfatos 0.05 M pH 5.2) durante 30 min en la oscuridad. La reacción se detuvo con H₂SO₄ 2.5 N y se midió la A₄₉₂ en el lector de ELISA Bio-Rad M-450.

Ensayo Inmunoenzimático anti-PSC6B

Las placas de ELISA (Costar 3590 High binding) se recubrieron con 100 µl de PSC6B (10 µg/ml) en amortiguador de carbonatos-bicarbonatos pH 9.6. Las placas se incubaron 24 h a 4°C; se lavaron tres veces con 250 µl de PBS-T. El bloqueo de los sitios reactivos se realizó con 100 µl de caseína al 1% en PBS-T durante 2 h a temperatura ambiente, posteriormente se lavaron tres veces con PBS-T. Se analizaron por duplicado las muestras de sueros diluidos 1:100 con caseína al 1% en PBS-T, los líquidos intestinales se diluyeron con caseína al 10% en PBS-T (concentración final 1%), y los lavados traqueobronqueales no diluidos se incubaron a 4°C por 24 h. Las placas se lavaron tres veces con PBS-T. Se adicionaron 100 µl de los segundos anticuerpos diluidos en caseína 1% PBS-T (1:1000 para anti-IgA, 1:2000 para anti-IgG y 1:4000 para anti-IgM; inmunoglobulinas de cabra anti-cadenas pesadas µ, γ (Pierce) y α (Zymed) de ratón conjugadas a peroxidasa) y se incubaron 2 h a temperatura ambiente. Se lavaron tres veces con PBS-T y la reacción enzimática se realizó con solución de sustrato para ELISA durante

30 min en la oscuridad. La reacción se detuvo con H_2SO_4 2.5 N y se midió la A_{492} en el lector de ELISA Multiskan MCC/340.

Ensayo Inmunoenzimático anti-Pulmovax

Las placas de ELISA (Costar 3590 High binding) se incubaron toda la noche a 4°C con 100 μl de la solución de polisacáridos (Pulmovax 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) en amortiguador de carbonatos-bicarbonatos pH 9.6. Se lavaron tres veces con 250 μl de PBS-T. Para asegurar la completa eliminación de uniones inespecíficas se bloqueo de la siguiente manera: para sueros y lavados traqueobronqueales se colocaron 100 μl de PBS con Tween 20 al 0.1% durante 1 h, y 100 μl de BSA al 1% en PBS-T 0.05% 1 h más a temperatura ambiente. Para líquidos intestinales el bloqueo de los sitios reactivos se realizó con 100 μl de BSA al 1% en PBS-T 0.05% durante 2 h a temperatura ambiente. Posteriormente se lavaron tres veces con PBS-T. Se analizaron por duplicado las muestras de sueros diluidos 1:1000 para IgA, 1:500 para IgG y 1:2000 para IgM en BSA al 1% en PBS-T. Los líquidos intestinales se diluyeron con leche Svelty al 10% en PBS-T (concentración final 1%), y los lavados traqueobronqueales no diluidos se incubaron a 4°C por 24 h. Las placas se lavaron tres veces con PBS-T. Se adicionaron 100 μl de los segundos anticuerpos diluidos en BSA 1% PBS-T (1:1000 para anti-IgA y anti-IgG, 1:12000 (sueros) y 1:3000 (líquidos intestinales y lavados traqueobronqueales) para anti-IgM; inmunoglobulinas de cabra anti-cadenas pesadas μ , γ (Pierce) y α (Zymed) de ratón conjugadas a peroxidasa) y se incubaron 2 h a temperatura ambiente. Se lavaron tres veces con PBS-T y la reacción enzimática se realizó con solución de sustrato para ELISA durante 30 min en la oscuridad. La reacción se detuvo con H_2SO_4 2.5 N y se midió la A_{492} en el lector Multiskan MCC/340.

Análisis Estadístico

El análisis de significancia estadística entre los niveles de anticuerpos en los grupos experimentales se determinó con un Análisis de Varianza (ANOVA) ($P < 0.05$), seguido de una comparación múltiple de medias (Prueba de Tukey) ($P < 0.05$).

RESULTADOS

Inducción con IPTG y Obtención de CryIAc

Para analizar la expresión y la formación de cuerpos de inclusión de la protoxina recombinante CryIAc, analizamos mediante microscopía electrónica de transmisión los cultivos de *E. coli* JM103 (pOS9300) inducidos con IPTG. La acumulación de la protoxina se apreció claramente por la formación de los cuerpos de inclusión de forma y tamaño variables que ocupaban gran parte del citoplasma; también se observó alargamiento de las células tratadas (Fig. 1 y 2).

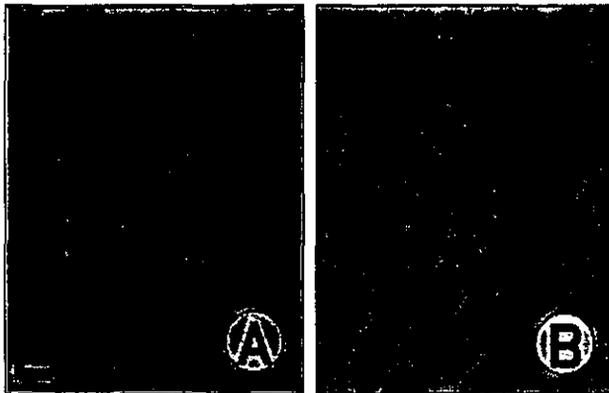


Fig. 1. Aspecto de los cultivos de *E. coli* JM103 (pOS9300) al microscopio electrónico de transmisión. **(A)** Sin inducir. **(B)** Inducidos 48 h con IPTG 1 mM (Barra = 500 nm).

De un litro de cultivo de *E. coli* JM103 obtuvimos un rendimiento de 50 mg de CryIAc, poco más de lo necesario para el proyecto. El peso molecular de CryIAc purificada (133 kDa) coincidió con el esperado (Adang *et al.*, 1985) (Fig. 3).

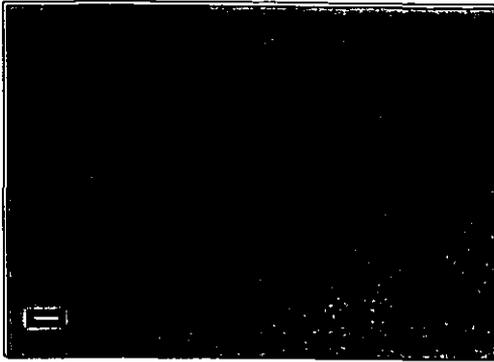


Fig. 2. Cuerpo de inclusión en una célula de *E. coli*. JM103 (pOS9300) inducida con IPTG (Barra = 100 nm).

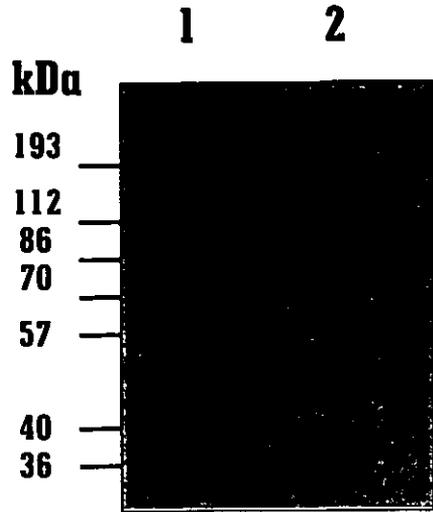


Fig. 3. Electroforesis de CryI Ac purificada. **Carril 1,** marcadores de peso molecular (en kDa): α_2 -macroglobulina 193, β -galactosamina 112, fructosa-6-fosfato-cinasa 86, piruvato cinasa 70, fumarasa 57, deshidrogenasa láctica 39.5 y triosa fosfoisomerasa 36. **Carril 2,** CryI Ac (4 μ g).

Conjugación de CryI Ac con BSA

Para la conjugación de CryI Ac con BSA se empleó el método de glutaraldehído de un paso (Johnson and Dorling, 1981), para unir de manera covalente los grupos amino disponibles de CryI Ac (la protoxina contiene 1178 residuos de aminoácidos; Choma and Kaplan, 1990) con los grupos amino de BSA (la proteína presenta 62 grupos amino disponibles para enlaces; Meyer *et al.*, 1991) mediante la formación de enlaces transversales vía grupos amino. La secuencia de reacciones para el entrecruzamiento de las proteínas se ilustra en la Fig. 4. La concentración de proteínas totales en el conjugado (16 mg/ml) indicó una relación CryI Ac/BSA = 1:4. Al realizar el entrecruzamiento, se observó un color amarillo en el producto de conjugación lo cual indicó un acoplamiento exitoso de ambas proteínas, similar al obtenido por otros autores (Borel *et al.*, 1984).

Para determinar si el peso molecular del complejo proteína/proteína aumentaba al conjugar BSA con CryIAc, el producto de la reacción de conjugación, BSA y CryIAc se sometieron a electroforesis en condiciones reductoras (2-ME). El conjugado tuvo un peso molecular mayor a 185 kDa (Fig. 5). En el carril 1 se presentan los marcadores de peso molecular; los carriles 2 y 3 contienen a BSA y CryIAc respectivamente. En el carril 4 se presentaron un número de bandas que corresponden a BSA libre (62 kDa), CryIAc libre (133 kDa), y una banda de alto peso molecular que corresponde al conjugado CryIAc-BSA. Este resultado indica que con la conjugación se generaron moléculas mayores que CryIAc monomérica.

El inmunoblot fue realizado para determinar cuáles bandas del gel (SDS-PAGE) contenían CryIAc, cuáles contenían BSA o cuáles contenían ambas proteínas (Fig. 6). En la inmunotransferencia de BSA revelada con el anticuerpo anti-BSA se reconoció la región de 62 kDa. En el inmunoblot de CryIAc revelado con el anticuerpo anti-CryIAc se reconoció la región de 133 kDa. En la inmunotransferencia del conjugado CryIAc-BSA revelado con el anticuerpo anti-BSA se reconocieron tres regiones con pesos moleculares de 62, 133 y mayor a 185 kDa. En el inmunoblot del conjugado CryIAc-BSA revelado con el anticuerpo anti-CryIAc se reconoció la región mayor a 185 kDa. Estos resultados sugieren que en la banda de mayor peso molecular presente en la preparación del conjugado, BSA y CryIAc están asociadas de manera covalente.

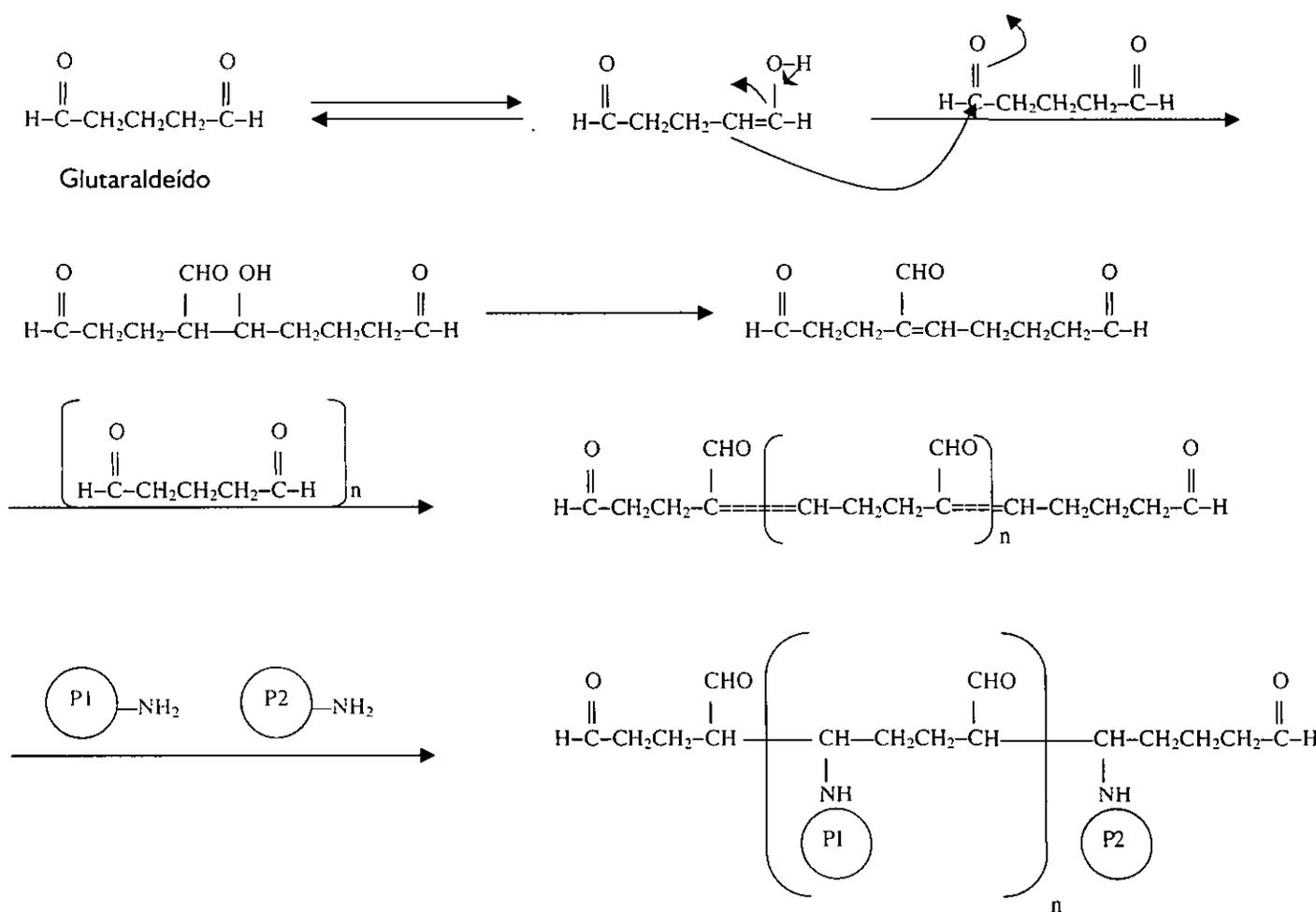


Fig. 4. Polimerización con glutaraldeído y entrecruzamiento de proteínas. Tomado de Wong, 1991.



Fig. 5. Electroforesis del conjugado CryIAc-BSA. **Carril 1**, marcadores de peso molecular (en kDa). **Carril 2**, BSA (2 μ g). **Carril 3**, CryIAc (4 μ g). **Carril 4**, conjugado CryIAc-BSA (2 μ g). La flecha indica la posición del conjugado, con un peso molecular mayor a 185 kDa.

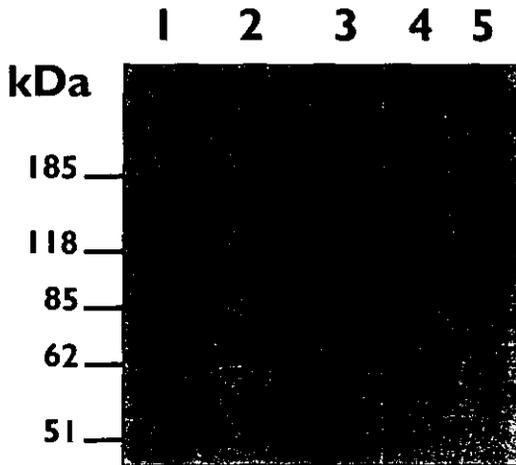


Fig. 6. Inmunoblot del conjugado CryIAc-BSA. **Carril 1**, marcadores de peso molecular (en kDa). **Carril 2**, BSA. **Carril 3**, CryIAc. **Carril 4**, conjugado CryIAc-BSA revelado con el anticuerpo anti-BSA. **Carril 5**, conjugado CryIAc-BSA revelado con el anticuerpo anti-CryIAc..

Efecto de la Administración Oral e Intranasal de CryIAc Conjugada o Coadministrada con BSA en la Respuesta de Anticuerpos anti-BSA

Respuesta de Anticuerpos anti-BSA en Suero

La administración oral de la albúmina sérica bovina (BSA) sola, coadministrada con CryIAc o CT, o conjugada (CryIAc-BSA) no indujo respuesta de anticuerpos anti-BSA IgA, IgG e IgM ($P>0.05$) (Fig. 7).

La inmunización intranasal con BSA indujo respuesta de anticuerpos anti-BSA IgA e IgG con respecto al grupo no inmunizado ($P<0.05$). La inmunización con el conjugado CryIAc-BSA incremento significativamente la respuesta de anticuerpos específicos IgG e IgA con respecto al grupo que recibió solamente BSA ($P<0.05$) (Fig. 7).

Respuesta de Anticuerpos anti-BSA en Lavados Traqueobronqueales (lavados tb)

La inmunización oral con BSA sola, coadministrada con CryIAc o CT, o conjugada no indujo respuestas de anticuerpos traqueobronqueales anti-BSA IgA, IgG e IgM ($P>0.05$) (Fig. 8).

La administración intranasal de BSA indujo respuestas significativas de anticuerpos anti-BSA de clase IgA e IgG pero no de IgM. BSA conjugada con CryIAc indujo niveles altos de anticuerpos específicos IgG e IgA mayores respecto al grupo de BSA, siendo significativa para este último isotipo ($P<0.05$) (Fig. 8).

Respuesta de Anticuerpos anti-BSA en Lavados Vaginales

Por vía oral BSA coadministrada o conjugada con CryIAc no indujo respuestas anti-BSA. CT indujo respuestas de anticuerpos anti-BSA de clase IgA no significativas ($P>0.05$) (Fig. 9).

Por vía intranasal el conjugado CryIAc-BSA incremento significativamente la respuesta de anticuerpos de clase IgA anti-BSA ($P<0.05$). Mientras que la inmunización de BSA sola, coadministrada con CryIAc o CT no indujo anticuerpos específicos ($P>0.05$) (Fig. 9).

Respuesta de Anticuerpos anti-BSA en Líquidos de Intestino Delgado

La inmunización oral e intranasal con BSA indujo niveles moderados de anticuerpos específicos IgA ($P<0.05$) pero no de IgG e IgM. La inmunización por ambas rutas con BSA conjugada,

coadministrada con CryI Ac o CT no modificaron significativamente los niveles de anticuerpos IgA, IgG e IgM ($P > 0.05$). La respuesta de IgA inducida por los diferentes tratamientos fue similar a la inducida por BSA (Fig. 10).

Respuesta de Anticuerpos anti-BSA en Líquidos de Intestino Grueso

La administración de BSA sola, coadministrada con CryI Ac o CT, o conjugada por ambas rutas (oral o intranasal) fue incapaz de inducir anticuerpos anti-BSA IgA, IgG e IgM en líquidos de intestino grueso ($P > 0.05$) (Fig. 11).

En la tabla 4 se resumen los resultados que fueron significativamente diferentes ($P < 0.05$).

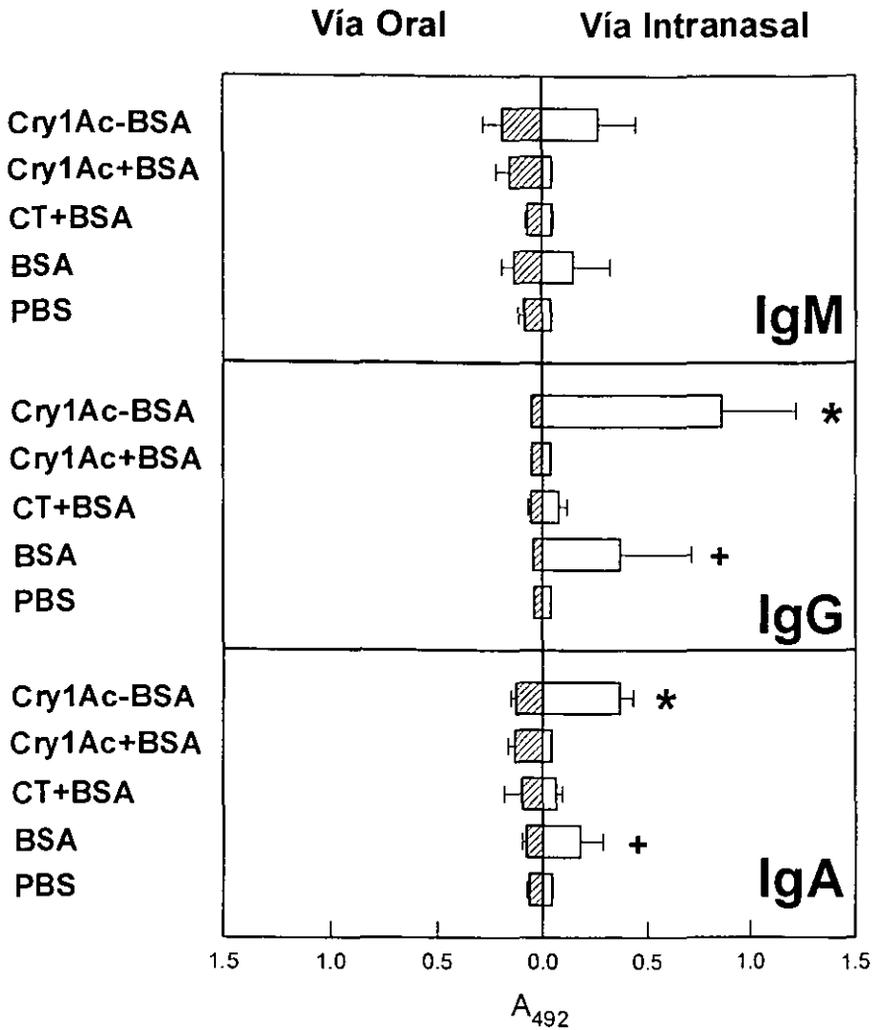


Fig. 7. Anticuerpos séricos anti-BSA de clases IgM, IgG e IgA. Grupos de cinco ratones hembras Balb/c fueron inmunizados con 10 μ g de BSA sola, coadministrada con 10 μ g de Cry1Ac o CT, o con el conjugado Cry1Ac-BSA (10 μ g) por las vías oral e intranasal. Los niveles de anticuerpos fueron determinados por ELISA y sus valores se expresan como lecturas de A_{492} . El signo + indica diferencias significativas ($P < 0.05$) respecto al grupo control (PBS), y los asteriscos * indican diferencias significativas ($P < 0.05$) respecto al grupo inmunizado con antígeno solo (BSA).

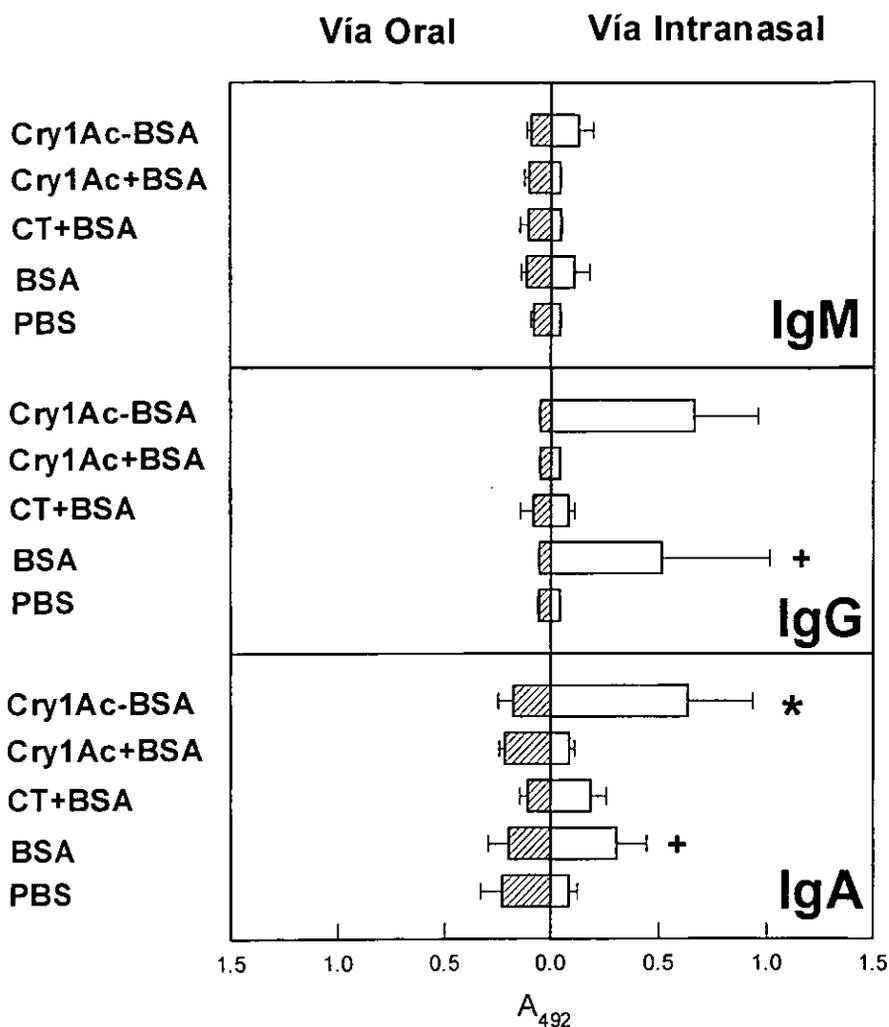


Fig. 8. Anticuerpos anti-BSA de clases IgM, IgG e IgA en lavados traqueobronqueales (lavados tb). Grupos de cinco ratones hembras Balb/c fueron inmunizados con 10 μ g de BSA sola, coadministrada con 10 μ g de Cry1Ac o CT, o con el conjugado Cry1Ac-BSA (10 μ g) por las vías oral e intranasal. Los niveles de anticuerpos fueron determinados por ELISA y sus valores se expresan como lecturas de A_{492} . El signo + indica diferencias significativas ($P < 0.05$) respecto al grupo control (PBS), y los asteriscos * indican diferencias significativas ($P < 0.05$) respecto al grupo inmunizado con antígeno solo (BSA).

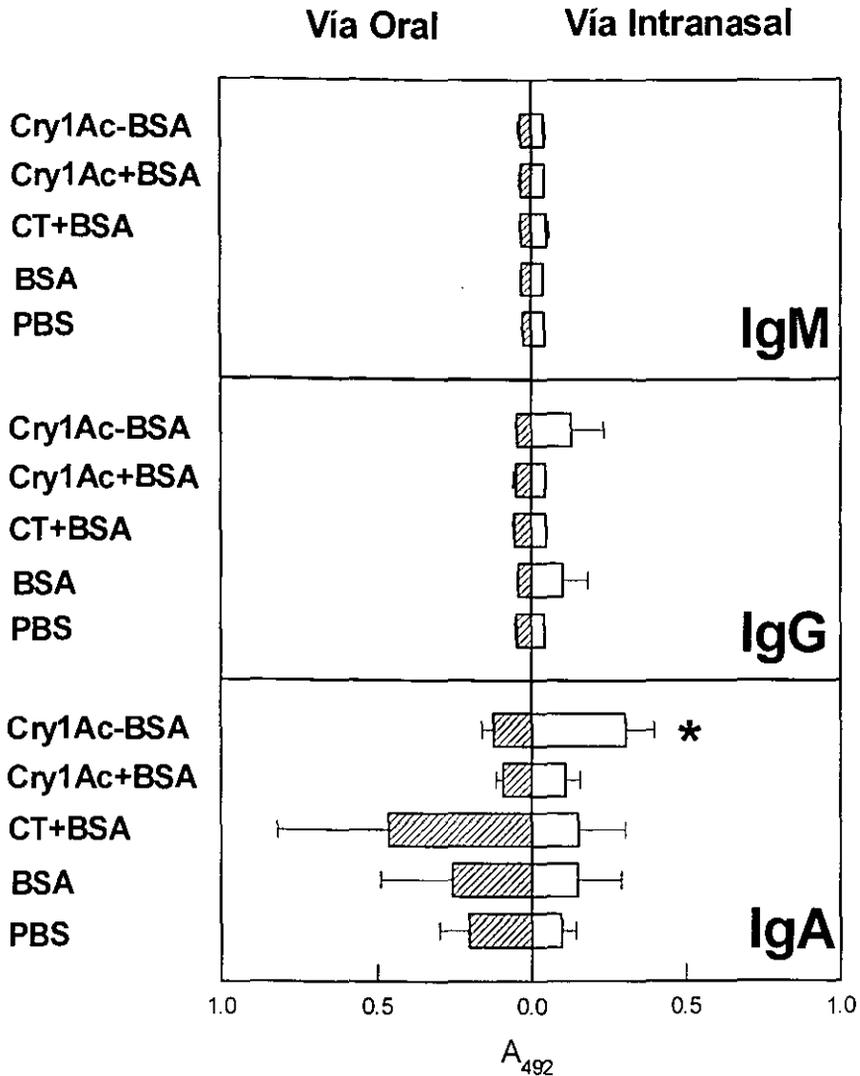


Fig. 9. Anticuerpos anti-BSA de clases IgM, IgG e IgA en lavados vaginales. Grupos de cinco ratones hembras Balb/c fueron inmunizados con 10 μ g de BSA sola, coadministrada con 10 μ g de Cry1Ac o CT, o con el conjugado Cry1Ac-BSA (10 μ g) por las vías oral e intranasal. Los niveles de anticuerpos fueron determinados por ELISA y sus valores se expresan como lecturas de A_{492} . El signo + indica diferencias significativas ($P < 0.05$) respecto al grupo control (PBS), y los asteriscos * indican diferencias significativas ($P < 0.05$) respecto al grupo inmunizado con antígeno solo (BSA).

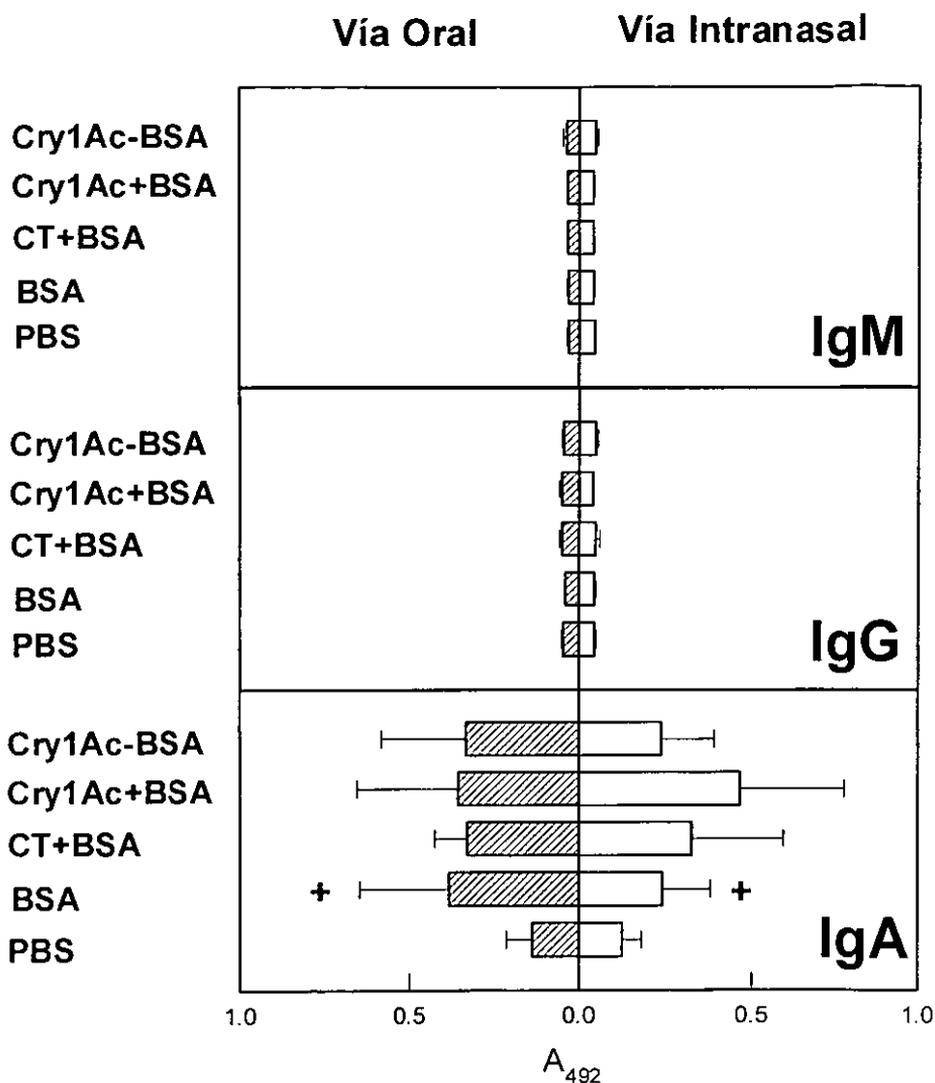


Fig. 10. Anticuerpos anti-BSA de clases IgM, IgG e IgA en líquidos de intestino delgado. Grupos de cinco ratones hembras Balb/c fueron inmunizados con 10 µg de BSA sola, coadministrada con 10 µg de Cry1Ac o CT, o con el conjugado Cry1Ac-BSA (10 µg) por las vías oral e intranasal. Los niveles de anticuerpos fueron determinados por ELISA y sus valores se expresan como lecturas de A_{492} . El signo + indica diferencias significativas ($P < 0.05$) respecto al grupo control (PBS), y los asteriscos * indican diferencias significativas ($P < 0.05$) respecto al grupo inmunizado con antígeno solo (BSA).

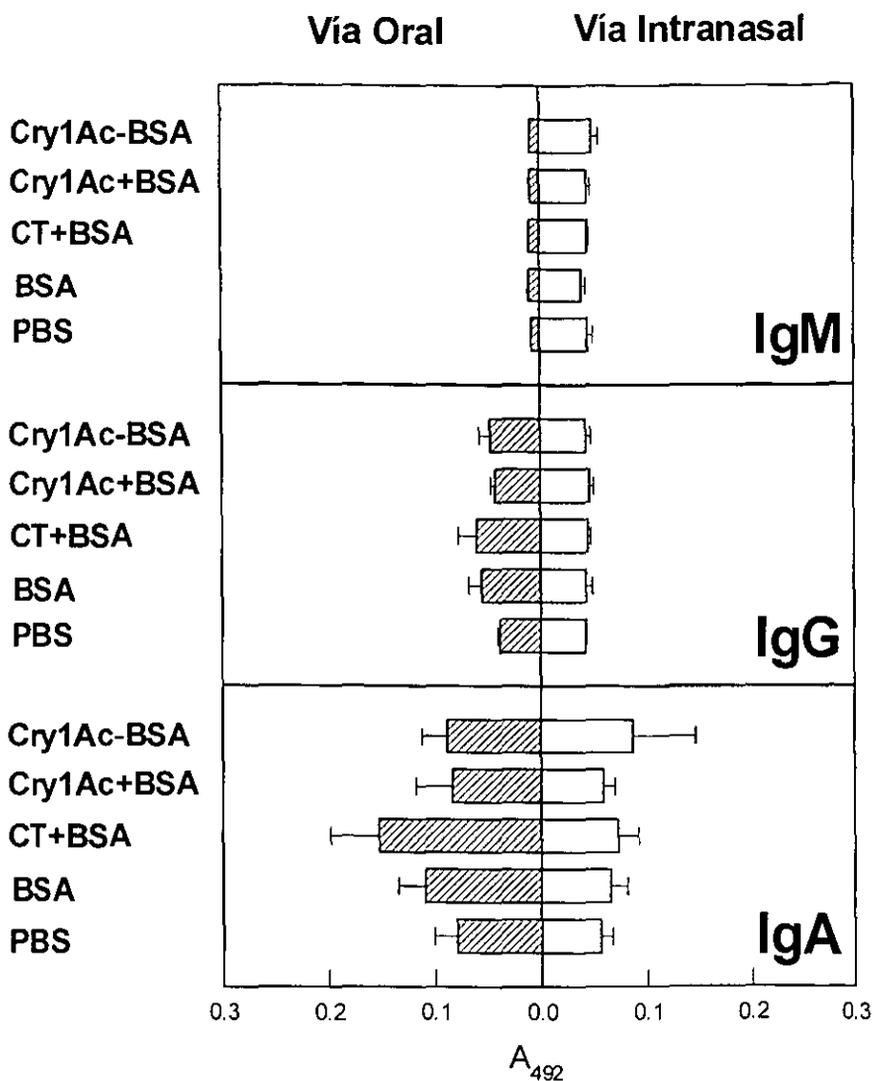


Fig. 11. Anticuerpos anti-BSA de clases IgM, IgG e IgA en líquidos de intestino grueso. Grupos de cinco ratones hembras Balb/c fueron inmunizados con 10 μ g de BSA sola, coadministrada con 10 μ g de Cry1Ac o CT, o con el conjugado Cry1Ac-BSA (10 μ g) por las vías oral e intranasal. Los niveles de anticuerpos fueron determinados por ELISA y sus valores se expresan como lecturas de A_{492} . El signo + indica diferencias significativas ($P < 0.05$) respecto al grupo control (PBS), y los asteriscos * indican diferencias significativas ($P < 0.05$) respecto al grupo inmunizado con antígeno solo (BSA).

Tabla 4. Grupos de ratones inmunizados con BSA sola, conjugada o coadministrada con CryIAc que presentan diferencias significativas

Muestra	Isotipo ^a	Vía de administración ^b	Resultados ^c
Suero	IgA	Intranasal	CryIAc-BSA>BSA> todos los demás grupos
	IgG	Intranasal	CryIAc-BSA>BSA> todos los demás grupos
Lavados tb	IgA	Intranasal	CryIAc-BSA> todos los demás grupos
	IgG	Intranasal	CryIAc-BSA y BSA> todos los demás grupos
Lavados vaginales	IgA	Intranasal	CryIAc-BSA>Control
Líquidos de intestino delgado	IgA	Oral	BSA>Control
	IgA	Intranasal	BSA>Control

^aLa evaluación de la respuesta de anticuerpos de clase IgA, IgG e IgM antígeno-específico se determinó mediante la técnica de ELISA indirecta.

^bGrupos oral e intranasal; 5 ratones hembras Balb/c de 8-10 semanas de edad por grupo; se obtuvieron muestras de suero, líquidos intestinales, lavados vaginales y traquéobronqueales.

^cSe indican los grupos que presentaron diferencias significativas; el análisis de significancia estadística entre los niveles de anticuerpos en los grupos experimentales se determinó con un análisis de varianza ($P < 0.05$), y con la prueba de Tukey ($P < 0.05$).

Conjugación de CryIAc con PSC6B

La conjugación de CryIAc con PSC6B se verificó en dos pasos: el PSC6B se activó primero con CDAP y luego se unió covalentemente a los grupos tiol disponibles de CryIAc (la protoxina contiene 1178 residuos de aminoácidos de los cuales 16 son cisteínas relacionadas con la formación de enlaces moleculares; Choma and Kaplan, 1990). La concentración de proteínas y carbohidratos en el conjugado dializado (192 y 452 $\mu\text{g}/\text{ml}$, respectivamente) indicaron una relación PSC6B/CryIAc = 2.4, similar a la obtenida por otros autores con el mismo método (Lees *et al.*, 1996; Peeters *et al.*, 1996).

La unidad de repetición del PSC6B consta de $\rightarrow 2) \alpha\text{-D-galactosa (1}\rightarrow 3) \alpha\text{-D-glucosa (1}\rightarrow 3) \alpha\text{-L-ramnosa (1}\rightarrow 4) \text{-D-ribitol-5 fosfato}$ con peso aproximado de 700 Da. El número de unidades por número en la preparación comercial es variable.

Para determinar si el peso molecular del complejo polisacárido/proteína aumentaba al conjugar el PSC6B con CryIAc, el producto de la reacción de conjugación y CryIAc se sometieron a electroforesis en condiciones no reductoras. El conjugado tuvo un peso molecular mayor a 193 kDa (Fig. 12). Este resultado indica que con la conjugación se generaron moléculas dos o más veces mayores que CryIAc monomérica.

CryIAc, el PSC6B y el conjugado se eluyeron en una columna de Sephacryl S300HR. El perfil de elución del PSC6B constó de varios picos con pesos moleculares menores que CryIAc como se esperaba del número variable de unidades de repetición que contiene el polisacárido. CryIAc dio un pico entre las fracciones 19 y 29 con un máximo en la 21 (Fig. 13) lo que indicó que era relativamente homogénea. En las fracciones del conjugado el pico de proteínas eluido coincidió con el único pico eluido (Fig. 13). Estos datos indican que mediante la reacción de conjugación el polisacárido se asoció covalentemente a la proteína.

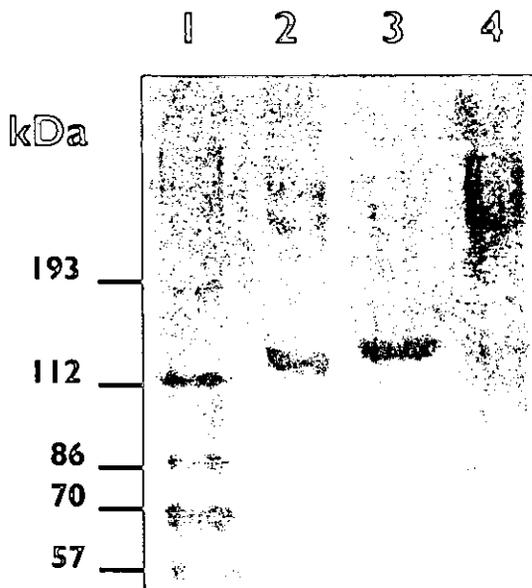


Fig. 12. Electroforesis del conjugado CryIAc-PSC6B en condiciones no reductoras. **Carril 1,** marcadores de peso molecular. **Carril 2,** CryIAc en condiciones no reductoras. **Carril 3,** CryIAc en condiciones reductoras (2-ME 71 mM). **Carril 4,** conjugado CryIAc-PSC6B en condiciones no reductoras.

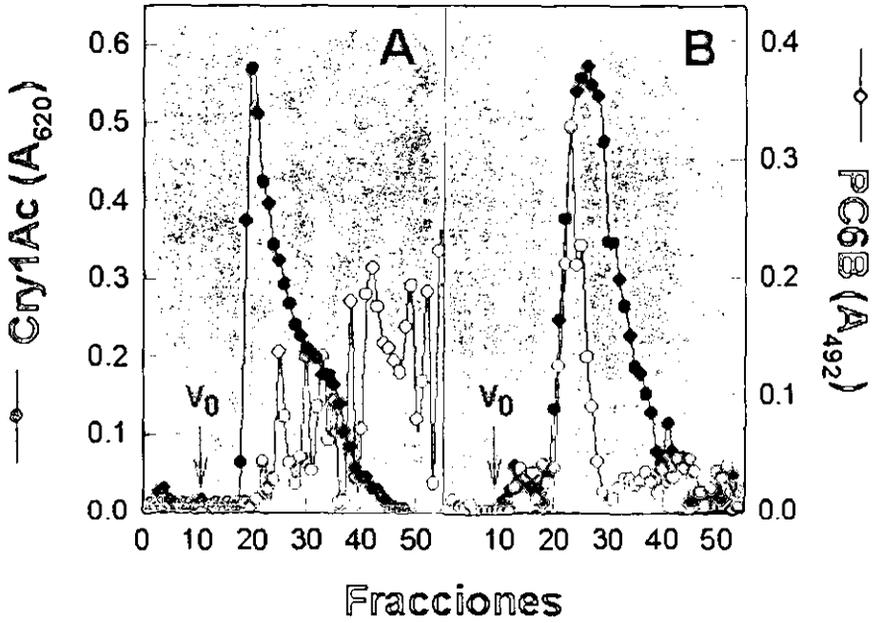


Fig. 13. Cromatografía de Cry1Ac, PSC6B y el conjugado Cry1Ac-PSC6B en Sephacryl S300HR. Muestras de 100 μ l de Cry1Ac (300 μ g), PSC6B (400 μ g) y del conjugado (192 μ g de Cry1Ac/452 μ g de PSC6B) aplicadas en corridas independientes a una columna de Sephacryl S300HR (0.7x6.5 cm) fueron eluidas a 200 μ l/min y colectadas en fracciones de 200 μ l. **(A)** Cry1Ac y PSC6B aplicados por separado. **(B)** Conjugado Cry1Ac-PSC6B.

Efecto de la Administración Intranasal de CryIAc Conjugada o Coadministrada con PSC6B en la Respuesta de Anticuerpos anti-PSC6B

Respuesta de Anticuerpos anti-PSC6B en Sueros

La administración del PSC6B no indujo respuesta de anticuerpos anti-PSC6B IgA, IgG e IgM ($P > 0.05$); mientras que con la administración del conjugado o con la coadministración con CT o CryIAc se incrementó significativamente la respuesta de anticuerpos anti-PSC6B IgA e IgM con respecto al grupo que recibió únicamente PSC6B ($P < 0.05$) (Fig. 14). La coadministración de PSC6B con CryIAc indujo una mayor respuesta de anticuerpos de clase IgA que la coadministración del PSC6B con CT ($P < 0.05$). La coadministración del PSC6B con CT o CryIAc, así como con la administración del conjugado no incrementó la respuesta anti-PSC6B IgG con respecto al grupo de PSC6B ($P > 0.05$).

Respuesta de Anticuerpos anti-PSC6B en Lavados Traqueobronqueales (lavados tb)

PSC6B sólo, coadministrado con CryIAc o CT no indujo respuestas de anticuerpos anti-PSC6B ($P > 0.05$). Después de la administración del conjugado CryIAc-PSC6B se incrementaron significativamente los niveles de anticuerpos de clase IgM e IgA con respecto al grupo que recibió solamente PSC6B ($P < 0.05$) (Fig. 14). Los niveles de anticuerpos IgG no fueron modificados por ninguna forma de administración.

Respuesta de Anticuerpos anti-PSC6B en Líquidos de Intestino Delgado

La administración del PSC6B indujo niveles moderados de anticuerpos anti-PSC6B IgA respecto al control ($P < 0.05$). Cuando se coadministró con CryIAc o CT, o se administró el conjugado CryIAc-PSC6B se indujeron altos niveles de anticuerpos específicos IgA significativamente mayores al grupo con PSC6B sólo ($P < 0.05$) (Fig. 15). La inmunización con el PSC6B sólo, coadministrado con CryIAc o CT o conjugado no fue capaz de inducir respuestas de anticuerpos anti-PSC6B IgG e IgM ($P > 0.05$).

Respuesta de Anticuerpos anti-PSC6B en Líquidos de Intestino Grueso

La inmunización con PSC6B sólo, coadministrado (con CT o Cry1Ac) o conjugado no indujo respuesta anti-PSC6B para los tres isotipos analizados ($P > 0.05$) (Fig. 15).

En la tabla 5 se resumen los resultados que fueron significativamente diferentes ($P < 0.05$).

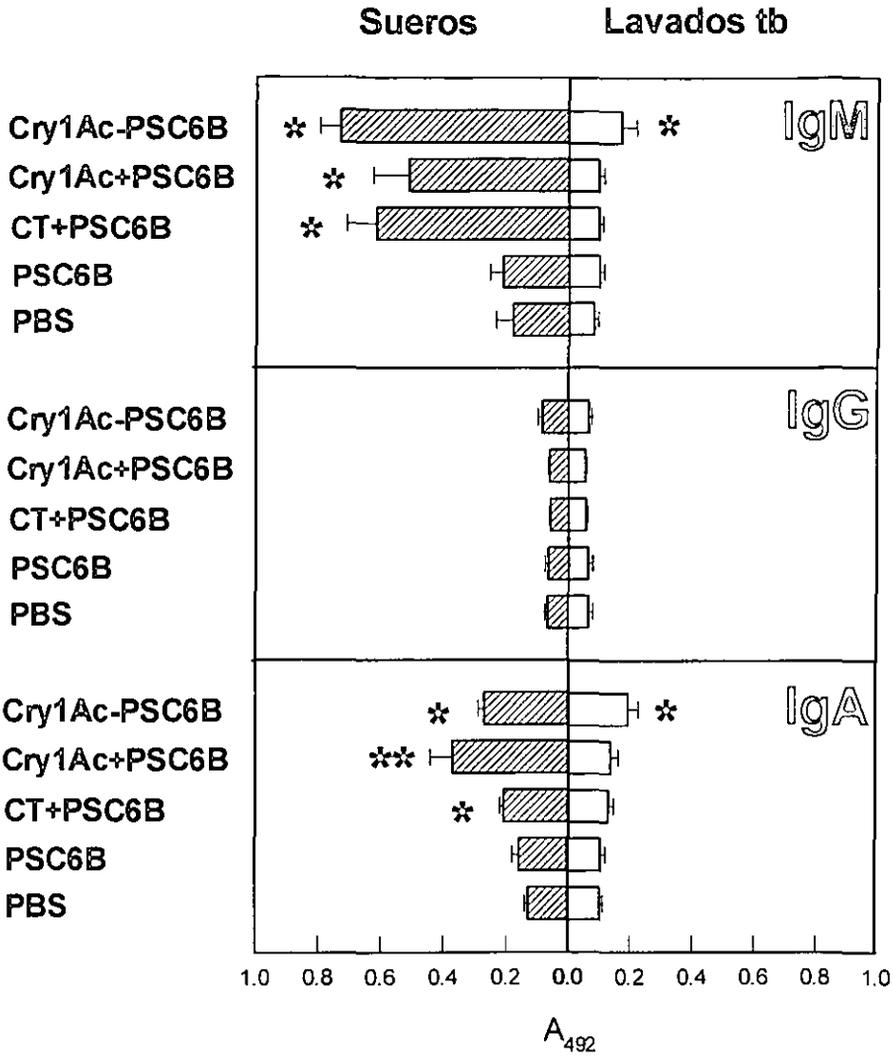


Fig. 14. Anticuerpos anti-PSC6B de clases IgM, IgG e IgA en sueros y lavados traqueobronqueales (lavados tb). Grupos de cinco ratones hembras Balb/c fueron inmunizados con 23.5 µg de PSC6B solo, coadministrado con 10 µg de Cry1Ac o CT, o con el conjugado Cry1Ac-PSC6B (las dosis de los componentes del conjugado fueron iguales a las coadministradas) por la ruta intranasal. Los niveles de anticuerpos fueron determinados por ELISA y sus valores se expresan como lecturas de A₄₉₂. El signo + indica diferencias significativas (P<0.05) respecto al grupo control (PBS), y los asteriscos * indican diferencias significativas (P<0.05) respecto al grupo inmunizado con antígeno solo (PSC6B).

Intestino Delgado Intestino Grueso

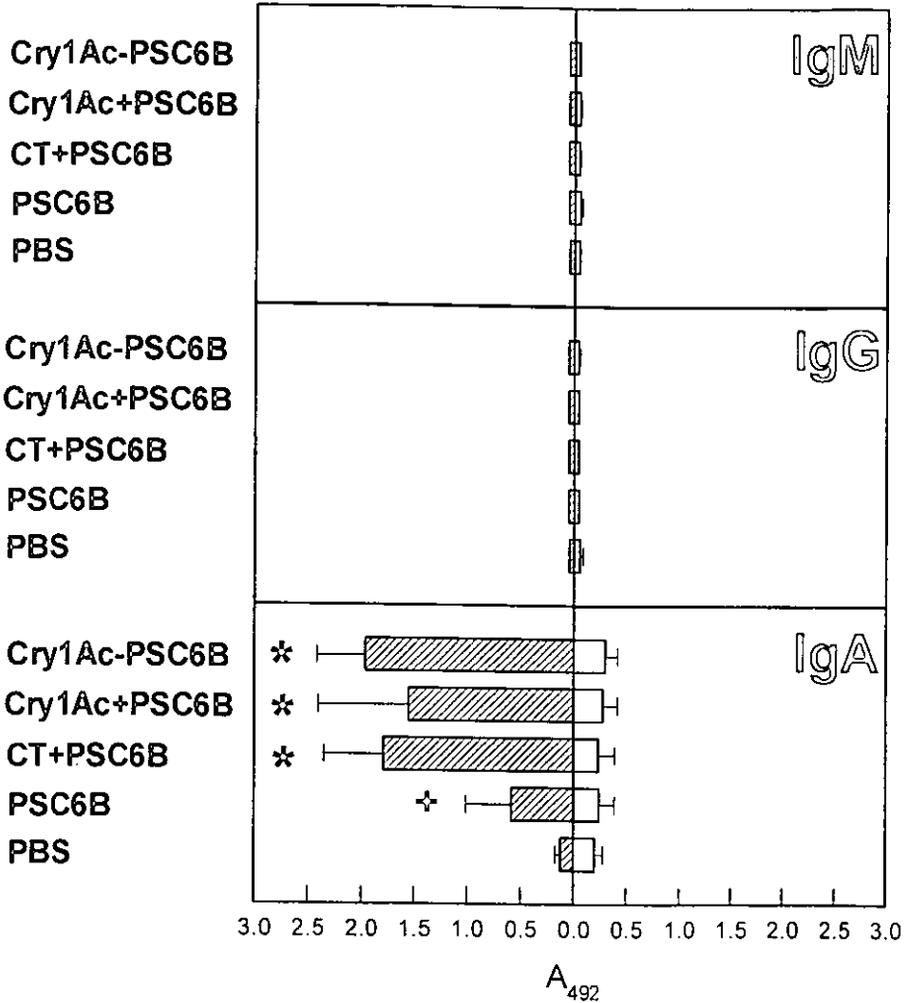


Fig. 15. Anticuerpos anti-PSC6B de clases IgM, IgG e IgA en líquidos intestinales (intestino delgado y grueso). Grupos de cinco ratones hembras Balb/c fueron inmunizados con 23.5 µg de PSC6B solo, coadministrado con 10 µg de Cry1Ac o CT, o con el conjugado Cry1Ac-PSC6B (las dosis de los componentes del conjugado fueron iguales a las coadministradas) por la ruta intranasal. Los niveles de anticuerpos fueron determinados por ELISA y sus valores se expresan como lecturas de A₄₉₂. El signo + indica diferencias significativas (P<0.05) respecto al grupo control (PBS), y los astenscos * indican diferencias significativas (P<0.05) respecto al grupo inmunizado con antígeno solo (PSC6B).

Tabla 5. Grupos de ratones inmunizados con PSC6B solo, conjugado o coadministrado con CryIAc que presentan diferencias significativas

Muestra	Isotipo ^a	Vía de administración ^b	Resultados ^c
Suero	IgA	Intranasal	CryIAc+PSC6B>CT+PSC6B>PSC6B y Control
	IgM	Intranasal	CryIAc-PSC6B, CT+PSC6B y CryIAc+PSC6B>PSC6B y Control
Lavados tb	IgA	Intranasal	CryIAc-PSC6B>todos los demás grupos
	IgM	Intranasal	CryIAc-PSC6B>todos los demás grupos
Líquidos de intestino delgado	IgA	Intranasal	CryIAc-PSC6B, CT+PSC6B y CryIAc+PSC6B>PSC6B>Control

^aLa evaluación de la respuesta de anticuerpos de clase IgA, IgG e IgM antígeno-específico se determinó mediante la técnica de ELISA indirecta.

^bGrupos intranasal; 5 ratones hembras Balb/c de 8-10 semanas de edad por grupo; se obtuvieron muestras de suero, líquidos intestinales, lavados traqueobronqueales.

^cSe indican los grupos que presentaron diferencias significativas; el análisis de significancia estadística entre los niveles de anticuerpos en los grupos experimentales se determinó con un análisis de varianza ($P < 0.05$), y con la prueba de Tukey ($P < 0.05$).

Efecto de la Coadministración Intranasal de CryIAc o CT con Pulmovax en la Respuesta de Anticuerpos anti-Pulmovax

Respuesta de Anticuerpos anti-Pulmovax en Suero

La vacuna Pulmovax (P23) no indujo respuesta de anticuerpos anti-Pulmovax IgA, IgG e IgM ($P > 0.05$); la coadministración con CryIAc incremento significativamente los niveles de anticuerpos anti-Pulmovax de los tres isotipos, mientras que CT solo los incremento para IgG ($P < 0.05$) (Fig. 16). La coadministración de CryIAc con Pulmovax indujo una mayor respuesta de anticuerpos de clase IgG que CT ($P < 0.05$).

Respuesta de Anticuerpos anti-Pulmovax en Lavados Traqueobronqueales (lavados tb)

La administración de la vacuna indujo respuesta anti-Pulmovax alta de IgM y baja de IgG pero significativa con respecto al grupo control ($P < 0.05$). CT o CryIAc coadministrada con Pulmovax indujo altas respuestas de IgM y bajas de IgA con respecto al grupo que recibió la vacuna ($P < 0.05$). Sólo la coadministración de CryIAc con Pulmovax incremento los niveles de anticuerpos de clase IgG significativamente ($P < 0.05$) (Fig. 16).

Respuesta de Anticuerpos anti-Pulmovax en Líquidos de Intestino Delgado

La vacuna no indujo respuesta de anticuerpos anti-Pulmovax. CT coadministrada con la vacuna incremento los niveles de anticuerpos IgG ($P < 0.05$). Tanto CryIAc como CT incrementaron significativamente la respuesta anti-Pulmovax de clase IgA ($P < 0.05$). La coadministración con CryIAc indujo respuestas significativamente mayores que la coadministración con CT para IgA ($P < 0.05$) (Fig. 17).

Respuesta de Anticuerpos anti-Pulmovax en Líquidos de Intestino Grueso

Pulmovax sola o coadministrada con CT no indujo respuestas significativas de anticuerpos IgA, IgG e IgM ($P > 0.05$). Mientras que la coadministración de CryIAc con Pulmovax incrementó significativamente los niveles de anticuerpos de clase IgM e IgA ($P < 0.05$) (Fig. 17).

En la tabla 6 se resumen los resultados que fueron significativamente diferentes ($P < 0.05$).

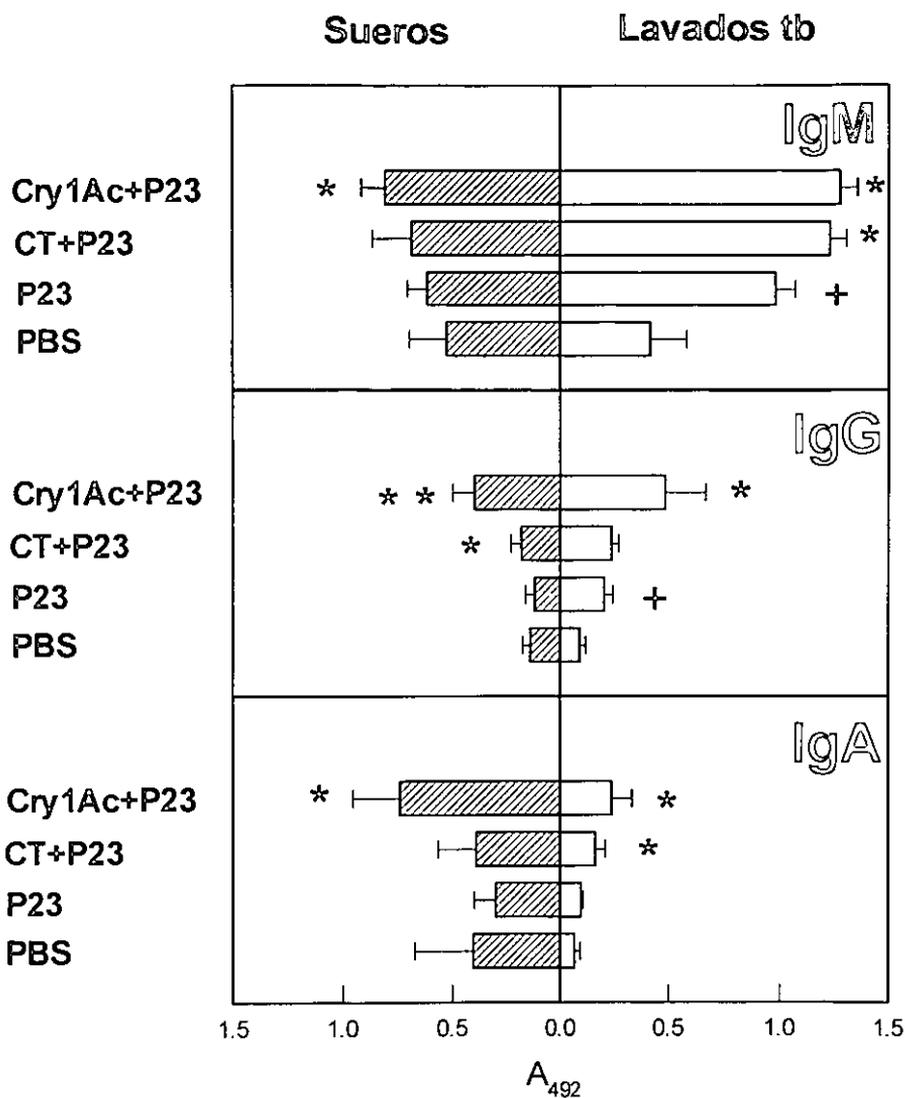


Fig. 16. Anticuerpos anti-Pulmovax de clases IgM, IgG e IgA en sueros y lavados traqueobronqueales (lavados tb). Grupos de cinco ratones hembras Balb/c fueron inmunizados con 11.5 μ g de la vacuna Pulmovax sola, coadministrada con 10 μ g de Cry1Ac o CT, por la ruta intranasal. Los niveles de anticuerpos fueron determinados por ELISA y sus valores se expresan como lecturas de A_{492} . El signo + indica diferencias significativas ($P < 0.05$) respecto al grupo control (PBS), y los asteriscos * indican diferencias significativas ($P < 0.05$) respecto al grupo inmunizado con antígeno solo (Pulmovax).

Intestino Delgado Intestino Grueso

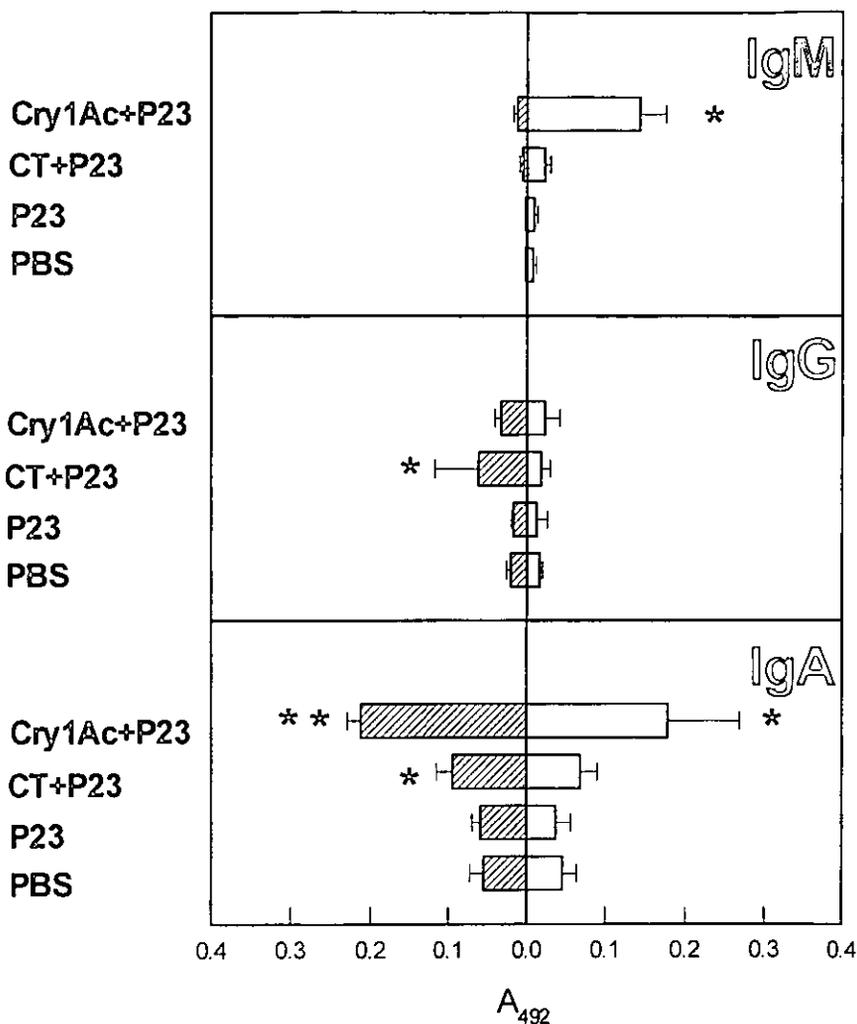


Fig. 17. Anticuerpos anti-Pulmovax de clases IgM, IgG e IgA en líquidos intestinales (intestino delgado y grueso). Grupos de cinco ratones hembras Balb/c fueron inmunizados con 11.5 μg de la vacuna Pulmovax sola, coadministrada con 10 μg de Cry1Ac o CT, por la ruta intranasal. Los niveles de anticuerpos fueron determinados por ELISA y sus valores se expresan como lecturas de A_{492} . El signo + indica diferencias significativas ($P < 0.05$) respecto al grupo control (PBS), y los asteriscos * indican diferencias significativas ($P < 0.05$) respecto al grupo inmunizado con antígeno solo (Pulmovax).

Tabla 6. Grupos de ratones inmunizados con Pulmovax sola o coadministrada con CT o CryIAc que presentan diferencias significativas

Muestra	Isotipo ^a	Vía de administración ^b	Resultados ^c
Suero	IgA	Intranasal	CryIAc+P23>P23
	IgG	Intranasal	CryIAc+P23>CT+P23>P23 y Control
	IgM	Intranasal	CryIAc+P23>P23
Lavados tb	IgA	Intranasal	CryIAc+P23 y CT+P23>P23 y Control
	IgG	Intranasal	CryIAc+P23>P23>Control
	IgM	Intranasal	CryIAc+P23 y CT+P23>P23>Control
Líquidos de intestino delgado	IgA	Intranasal	CryIAc+P23>CT+P23>P23
	IgG	Intranasal	CT+P23>P23
Líquidos de intestino grueso	IgA	Intranasal	CryIAc+P23>P23
	IgM	Intranasal	CryIAc+P23> todos los demás grupos

^aLa evaluación de la respuesta de anticuerpos de clase IgA, IgG e IgM antígeno-específico se determinó mediante la técnica de ELISA indirecta.

^bGrupos intranasal; 5 ratones hembras Balb/c de 8-10 semanas de edad por grupo; se obtuvieron muestras de suero, líquidos intestinales, lavados traqueobronqueales.

^cSe indican los grupos que presentaron diferencias significativas; el análisis de significancia estadística entre los niveles de anticuerpos en los grupos experimentales se determinó con un análisis de varianza ($P < 0.05$), y con la prueba de Tukey ($P < 0.05$).

DISCUSIÓN

Inducción con IPTG y Obtención de CryI Ac

E. coli JM103 (pOS9300) inducida con IPTG formó cuerpos de inclusión de forma y tamaño variables, similares a los encontrados por otros autores (Oeda *et al.*, 1989, Ge *et al.*, 1990). Para nuestro trabajo eran necesarios aproximadamente 40 mg de CryI Ac pura. La recuperación y solubilización de los cuerpos de inclusión generaron 50 mg de CryI Ac por litro de medio de cultivo con un alto grado de pureza por lo que el método de obtención fue eficiente y el rendimiento suficiente para nuestro proyecto. El peso molecular de CryI Ac determinado por SDS-PAGE fue de 133 kDa que concuerda con el reportado por Adang *et al.* (1985).

Conjugación de CryI Ac con BSA

Los resultados del Inmunoblot revelan que las moléculas de CryI Ac y BSA presentes en el conjugado están acopladas unas a otras. En la inmunotransferencia del conjugado CryI Ac-BSA revelado con el anticuerpo anti-BSA se reconocieron tres regiones que corresponden a pesos moleculares de 62, 133 y mayor a 185 kDa, que contienen BSA. En el inmunoblot del conjugado CryI Ac-BSA revelado con el anticuerpo anti-CryI Ac se reconoció la región mayor a 185 kDa. Esto indica que la región de mayor peso molecular contiene a CryI Ac y BSA acopladas de manera covalente.

En SDS-PAGE el conjugado CryI Ac-BSA tuvo una distribución más difusa que BSA y CryI Ac, y peso molecular mayor a 185 kDa lo que pareció confirmar la eficacia del método de conjugación.

En este estudio empleamos glutaraldehído como agente acoplante para unir de manera covalente BSA con CryI Ac. Muchos procedimientos han sido descritos para conjugar antígenos de interés vacunal con proteínas acarreadoras. Los principales grupos funcionales empleados para los conjugados son los grupos amino, carboxilo y tiol. EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodimida) es un agente heterobifuncional que acopla un grupo amino con un grupo carboxilo para formar un enlace peptídico. MBS (succinimidyl *m*-maleimidobenzoato),

MHS (succinimidyl-6-(N-maleimido)-n-hexanoato) y SMCC (succinimidyl-4-(N-maleimido-metil)-ciclo-hexano-1-carboxilato) son usados cuando un grupo amino y un grupo tiol están disponibles (Zegers *et al.*, 1990).

El glutaraldehído es un agente homobifuncional que acopla dos proteínas o péptidos vía grupos amino. Para acoplar BSA con CryI Ac empleamos el método de glutaraldehído de un paso. Algunos autores reportan que este método falla para evocar respuestas de anticuerpos antígeno-específico debido a la conjugación ineficiente (por ejemplo, polimerización no deseada o precipitación durante el acople), y recomiendan emplear el método de dos pasos (Zegers *et al.*, 1990; Meyer *et al.*, 1991). Sin embargo, este método también presenta desventajas (por ejemplo, puede alterar la estructura física de los epitopos) (Meyer *et al.*, 1991).

La conjugación estable de proteínas puede ser lograda por medio de aldehídos α , β -insaturados. El glutaraldehído forma polímeros de aldehídos α , β -insaturados antes o durante la condensación con un grupo amino primario. Por medio de esta vía, más de tres moléculas del hapteno pueden unirse a un grupo amino de la proteína acarreadora (Meyer *et al.*, 1991), y esta relación es considerada alta y aceptable para conjugados vacunales (Peeters *et al.*, 1996).

Efecto de la Administración Oral e Intranasal de CryI Ac Conjugada o Coadministrada con BSA en la Respuesta de Anticuerpos anti-BSA

Un componente importante en la investigación para el desarrollo de vacunas en contra de enfermedades virales o bacteriales adquiridas por las superficies mucosas es la definición de la (s) ruta (s) y otras condiciones de inmunización que estimulen respuestas inmunes mucosas en el tracto respiratorio, gastrointestinal y urogenital, y también respuestas sistémicas. En años recientes la inmunización intranasal se ha vuelto una interesante ruta de administración para vacunas, y se ha demostrado su eficiencia en la inducción de respuestas inmunes en animales (Bergquist *et al.*, 1995; Hopkins *et al.*, 1995; Russell *et al.*, 1996; Johansson *et al.*, 1998). Nuestros resultados después de la inmunización con CryI Ac demuestran que (i) la inmunización intranasal promueve el incremento de ambos tipos de inmunidad: sistémica y en mucosas, mientras que la inmunización oral es menos eficiente; (ii) la conjugación de CryI Ac con BSA incrementa significativamente la respuesta de anticuerpos IgA e IgG antígeno-específico a nivel sistémico y en mucosas locales (tracto respiratorio) y distantes (tracto genital femenino) cuando

se administra por ruta intranasal; y (iii) la variación de respuestas en los diferentes sitios mucosos analizados (tracto respiratorio, urogenital y gastrointestinal) aporta evidencias acerca de la regionalización de la respuesta inmune en mucosas.

Este estudio fue diseñado para evaluar la habilidad de CryIAc como acarreador de epitopos después de la inmunización intranasal, y compararla con la ruta oral, la cual es la ruta de vacunación que se usa generalmente hoy en día para estimular respuestas inmunes en mucosas. Las observaciones indican claras diferencias entre ambas rutas. Generalmente se infiere del concepto del sistema inmune común de mucosas que la inmunización oral resulta en la migración de células productoras de anticuerpos no solo en el intestino sino también en el tracto respiratorio, genital y glándulas mamarias (Corthesy and Spertini, 1999; Mestecky and Fultz, 1999). Nuestros resultados demuestran que ningún grupo que recibió BSA coadministrada con CT o CryIAc, o conjugada por ruta oral indujo niveles detectables de anticuerpos BSA-específicos en suero y secreciones. Esta discrepancia entre nuestros resultados y otros estudios puede deberse al hecho de que otros autores emplean dosis más altas de antígeno y adyuvante (Tochikubo *et al.*, 1998) a las empleadas por nosotros, o utilizan virus vivos como inmunógenos (Ogra *et al.*, 1968; Moldoveanu *et al.*, 1995), mientras que nosotros inmunizamos con un antígeno no replicativo. Otra posibilidad es que la respuesta de anticuerpos en el intestino es y necesita ser, regulada más fuertemente que en el tracto respiratorio, con el propósito de reducir al mínimo el riesgo de reacción en contra de bacterias comensales y de antígenos alimenticios o ambientales y mantener la integridad del tejido. Además, se ha demostrado que en individuos inmunizados por ruta oral, existe un pico de células secretoras de anticuerpos (ASC) después de la primera semana de inmunización, sin embargo, estos niveles desaparecen dos semanas después de la vacunación (Rudin *et al.*, 1998). Finalmente, otra razón puede ser, y esto es más probable, que se haya inducido tolerancia oral, por medio de enterocitos. Estas células presentan tres características que pueden contribuir con este mecanismo inmunológico: (i) carecen de moléculas co-estimuladoras (CD80, CD86, CD40 y HSA) requeridas para estimular células T naïve; (ii) expresan una conformación anormal de moléculas del complejo principal de histocompatibilidad clase II (MHC-II) por lo que son ineficientes en procesar y presentar antígenos a células T de memoria antígeno-específico; y (iii) pueden inhibir las respuestas

inmunes mediadas por células T por medio de la secreción de citocinas inmunosupresivas, como interleucina (IL)-10 y factor de crecimiento transformante β (TGF- β) (ambas citocinas producidas por células epiteliales intestinales) (Kaiserlian, 1999). Además, se ha reportado que en este estado inmunológico existe una tendencia hacia una respuesta de células T donde el TGF- β predomina, mientras que las concentraciones de interferón gamma (IFN- γ) están disminuidas (MacDonald, 1999). Esta evidencia sugiere que la tolerancia es un mecanismo mediado por citocinas. Por otro lado, es probable que los enterocitos jueguen un papel directo en la inhibición sistémica de respuestas antígeno-específicas, ya que no migran y sus efectos inhibidores mediados por citocinas son antígeno-no-específico. Otros mecanismos, incluyendo antígenos que interactúan en las placas de Peyer y su transporte hacia tejidos periféricos, pueden ser responsables de la tolerancia periférica inducida por la administración oral de BSA. Respecto a esto, se ha reportado que células T restringidas a MHC-II están involucradas en la tolerancia oral, ya que en un estudio utilizando ratones knockout (se les ha suprimido un gen específico) del MHC-II y ratones normales tratados con un anticuerpo monoclonal anti-CD4⁺, no desarrollaron tolerancia oral hapteno-específico (Kaiserlian, 1999). Esto sugiere que la sub-regulación de células T CD4⁺ puede ser la clave en el mecanismo de tolerancia sistémica inducida por un tolerógeno oral.

Por otra parte, en este trabajo la respuesta de anticuerpos anti-BSA IgG e IgA séricos y mucosos (lavado traqueobronqueal y vaginal) después de la inmunización intranasal con el conjugado CryIAc-BSA fueron mayores a los inducidos por la administración de BSA sola, coadministrada con CT o CryIAc (Fig. 7, 8 y 9). Esto sugiere que la inmunización intranasal de BSA con CryIAc como acarreador puede inducir respuestas sistémicas y en mucosas locales y distantes, y que la superficie mucosa de la cavidad nasal es una ruta potencial para la vacunación.

Una posible explicación, pero no exclusiva, del porque la coadministración intranasal de BSA con CT o CryIAc no fue capaz de inducir respuestas de anticuerpos sistémicos y en mucosas es que se haya inducido tolerancia nasal. Este mecanismo presenta características similares a la tolerancia oral (MacDonald, 1999). Otra posibilidad es que los antígenos no hayan sido debidamente administrados ya que los animales fueron inmunizados sin estar anestesiados. Se ha demostrado que manipulando la liberación de las vacunas, siendo el blanco el tracto

respiratorio, se influye en el resultado de la respuesta inmune (Ryan *et al.*, 1999). El empleo de anestesia y un volumen relativamente grande de antígeno, que permite la entrada en los pulmones (Pizov *et al.*, 1992; Thompson *et al.*, 1999), resulta con altas respuestas de IgA y Th2 locales en el nódulo linfóide cervical y torácico. En contraste, volúmenes pequeños y sin el empleo de anestesia, puede confinarse la vacuna en la cavidad nasal, resulta con altas respuestas Th1, especialmente en el nódulo linfóide cervical superior, pero con respuestas de anticuerpos débiles.

Las razones por las cuales la inmunización intranasal del conjugado CryIAc-BSA dio una mayor respuesta de anticuerpos sistémicos y mucosos en contraste con la inmunización oral probablemente incluyen: una baja exposición del inmunógeno a condiciones adversas tales como pH ácido y la abundancia de enzimas proteolíticas que prevalecen en el estomago e intestino. Además, ya que el tracto respiratorio contiene ambos compartimentos, sistémico (espacio alveolar) y mucoso (vías aéreas superiores y bronquios), la coexpresión de un fenotipo periférico (adhesina de nódulo periférico, PNAd) con la adhesina mucosa (molécula-1 de adhesión celular a mucosas, MadCAM-1) puede permitir el tráfico de linfocitos y facilitar la respuesta inmune sistémica y en mucosas (Csencsits *et al.*, 1999). Además, con la inmunización intranasal se libera el inmunógeno directamente en el sitio de captación y de inducción inmune, el NALT (Kuper *et al.*, 1992; Wu *et al.*, 1997a), mientras que al llegar al GALT, tales como placas de Peyer que están distribuidas a lo largo del intestino delgado, el inmunógeno se difunde a través del intestino y por lo tanto queda muy distribuido. Consecuentemente, es probable que una alta proporción del inmunógeno administrado establezca contacto con células inmunocompetentes del NALT comparado con el GALT. Análisis de las propiedades de las células del NALT demuestran que ellas se asemejan a las del GALT, excepto que ellas presentan un fenotipo naive (Wu *et al.*, 1996), y existen más células T CD4⁺ que células T CD8⁺ (Hiroi *et al.*, 1998) (Fig. 18). Los antígenos liberados en el tracto nasal pueden penetrar fácilmente el epitelio o, ser capturados y transportados por células M hacia el tejido linfóide inferior (NALT) y ser capturados por células presentadoras de antígeno (APC) residentes, principalmente células dendríticas (Porgador *et al.*, 1998); estas migran hacia el nódulo linfóide cervical superior que a su vez drena al nódulo linfóide cervical posterior (Kuper *et al.*, 1992), iniciándose una respuesta

inmune. Si el antígeno penetra en el pulmón (BALT), entonces el nódulo torácico se activa también, resultando con altas respuestas de IgA y Th2 locales (Fig. 19). La IgA es el anticuerpo predominante en el compartimento mucoso y se sabe que depende de células Th. Las células Th2 son las células T predominantes en los sitios productores de IgA del sistema mucoso (Hiroi *et al.*, 1998) y diferentes estudios han indicado la importancia de citocinas Th2 para el desarrollo e incremento en la producción de IgA (McGhee *et al.*, 1989; Husband *et al.*, 1996; Yamamoto *et al.*, 1996; Cortesy and Spertini, 1999). Se ha demostrado que IL-6 e IL-10 juegan un papel esencial en la diferenciación de células B productoras de IgA (Husband *et al.*, 1996; Yamamoto *et al.*, 1996). Además basándose en estudios donde se inmunizo con *Salmonella typhimurium* recombinante, Yamamoto *et al.* (1996) sugieren que la combinación de IL-6, IL-10 y células Th1 antígeno-específico pueden estimular la producción de IgA en ausencia de citocinas tradicionales Th2.

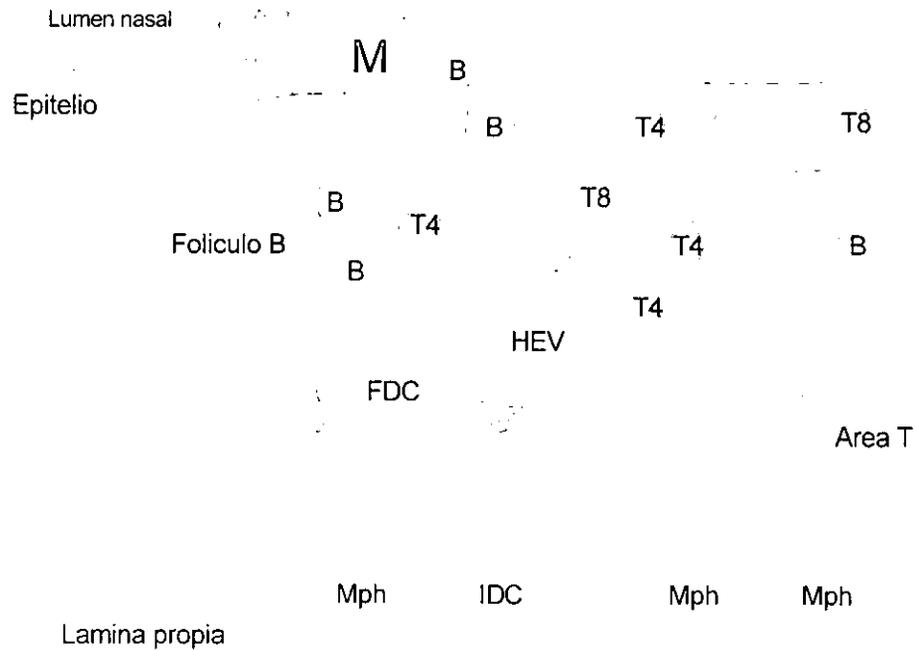


Fig. 18. Representación esquemática de los compartimentos y componentes celulares del NALT (Tejido Linfoides Asociado a Nasofaringe). B: Células B; T4: Células T CD4⁺; T8: Células T CD8⁺; M_φ: Macrófagos; IDC: Célula Dendrítica Interdigitante; FDC: Célula Dendrítica Folicular; HEV: Venuas de Endotelio Alto; M: Células M. (Modificado de Kuper *et al.*, 1992).

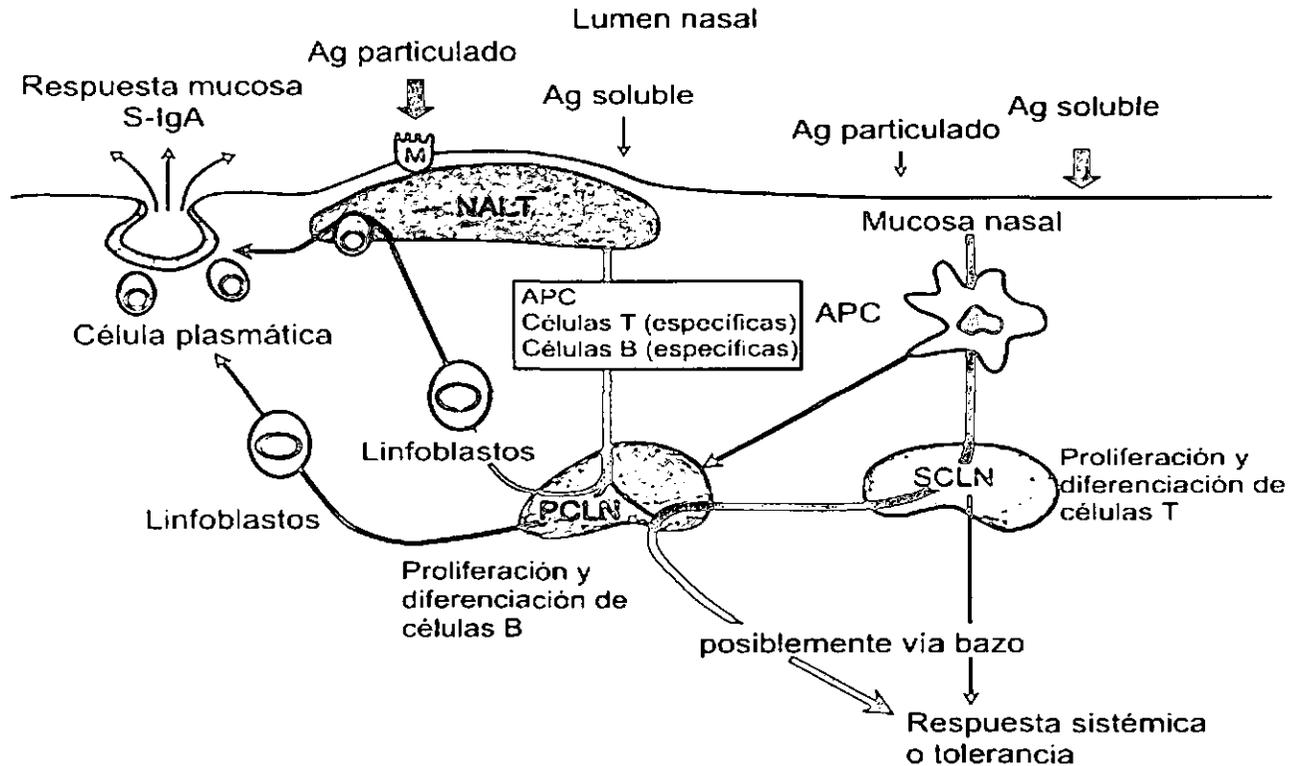


Fig. 19. Esquema hipotético de las rutas que evocan respuestas inmunes en mucosas (locales y distantes) y sistémicas o tolerancia, vía NALT y Mucosa Nasal (para explicación ver texto). APC: Células Presentadoras de Antígeno (Macrófagos, Células Dendríticas); M: Células M; NALT: Tejido Linfoide Asociado a Nasofaringe; PCLN: Nódulo Linfoide Cervical Posterior (o Central); SCLN: Nódulo Linfoide Cervical Superior; S-IgA: IgA Secretora (Modificado de Kuper *et al.*, 1992).

En este trabajo encontramos altos niveles de anticuerpos IgG BSA-específicos en el lavado traqueobronqueal después de la inmunización intranasal con el conjugado CryI Ac-BSA. Se ha propuesto que estos anticuerpos atraviesan la barrera epitelial por transudación, es decir, que son de origen sérico. Sin embargo, creemos que la mayor parte de la IgG nasal es producida localmente por la estimulación directa de CryI Ac en el NALT. Esto se ve apoyado por estudios previos, donde CryI Ac indujo altos títulos de anticuerpos IgG antígeno-específico en mucosas (Vázquez *et al.*, 1999a; Vázquez *et al.*, 1999b).

Después de la inmunización intranasal con alguno de los tratamientos, no se indujeron respuestas de anticuerpos BSA-específicos en lavados intestinales. Una posible explicación viene dada por evidencia que sugiere la existencia de una regionalización o compartimentalización del sistema inmune mucoso. Recientes estudios han demostrado que después de la inmunización intranasal, células secretoras de anticuerpos IgA aparecen en el NALT, así como en sitios efectoros (lámina propia y glándulas salivales), pero ninguna o muy pocas en otros sitios inductores, como placas de Peyer del intestino delgado (Wu *et al.*, 1997a). Los argumentos para una compartimentalización entre las respuestas de anticuerpos mucosos en el tracto respiratorio y el intestino son reforzados por el hecho de que la inmunización nasal no induce respuestas de anticuerpos de clase IgA CTB-específicas en extractos fecales, mientras que muchos sujetos responden con anticuerpos IgA específicos en extractos fecales después de la inmunización oral con la subunidad B de la toxina del cólera (CTB) (Jertborn *et al.*, 1996; Rudin *et al.*, 1998).

En años recientes muchos grupos han comparado la relativa eficiencia de diferentes rutas de inmunización para inducir anticuerpos en el tracto genital de animales y humanos. La mayoría de estos estudios han demostrado que la inmunización intranasal o vaginal es la ruta más eficiente para la inducción de anticuerpos específicos y células productoras de anticuerpos en el tracto genital, aunque la inmunización oral con organismos vivos también es efectiva (Cui *et al.*, 1991; Di Tommaso *et al.*, 1996; Russell *et al.*, 1996; Johansson *et al.*, 1998; Rudin *et al.*, 1998). Sin embargo, existen diferencias entre roedores y humanos en la organización del sistema inmune genital. En humanos, el cervix es el órgano efector inmune predominante, mientras que en

roedores el útero es el albergue de la mayoría de las células productoras de anticuerpos genitales (Kutteh and Mestecky, 1994; Brandtzaeg, 1997; Kutteh, 1999). Además, a diferencia de la IgA sérica humana, la mayor parte de la IgA sérica de roedores es dimérica y puede ser transportada en la mucosa genital vía componente secretor (SC) (Kutteh, 1999). En el desarrollo de vacunas en contra de infecciones del tracto genital (por ejemplo, las ocasionadas por el virus herpes simplex, papilomavirus humano, HIV, *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* y *Haemophilus ducreyi*) es necesario explorar como estimular una respuesta inmune óptima (inmunidad humoral y mediada por células) en el tracto urogenital femenino humano.

Estudios previos han demostrado que la vacunación nasal evoca respuestas de anticuerpos en secreciones vaginales (Rudin *et al.*, 1998; Johansson *et al.*, 1998). En nuestro estudio comparamos las rutas oral e intranasal respecto a la respuesta de anticuerpos genitales en ratones. Demostramos que solo con el conjugado CryIAC-BSA, administrado por ruta intranasal, se indujo una respuesta significativa de IgA BSA-específica en lavados vaginales (Fig. 9). Este resultado demuestra que la ruta intranasal puede inducir anticuerpos antígeno-específico en mucosas distantes. Por ruta oral, solo cuando se coadministro BSA con CT, se indujeron respuestas anti-BSA de IgA no significativas. Es posible que la desviación estándar, que fue grande para este grupo (CT+BSA), se deba a la influencia del ciclo estral y/o a las hormonas sexuales. Se sabe que estas últimas influyen sobre la respuesta inmune del tracto genital. En ratas, el estadio del ciclo estral influye en la acumulación de IgA e IgG en secreciones uterinas (Lü *et al.*, 1999). Cuando los animales se encuentran en el estro, el epitelio puede actuar como una barrera para el movimiento de las proteínas y puede interferir con la captación del antígeno (Johansson *et al.*, 1998). Además, se ha demostrado que la habilidad de las APC para presentar antígenos en el útero y vagina varía con el estado del ciclo estral. También la expresión del receptor de la IgA polimérica por células epiteliales cervicales y uterinas varía con el estado del ciclo menstrual en mujeres (Lü *et al.*, 1999). Estos cambios cíclicos en la respuesta inmune pueden ser el origen de la falta de respuesta en nuestro trabajo, ya que no se llevó un control del ciclo estral, y por lo tanto trabajamos con una población heterogénea. Como alternativa para evitar estas variaciones, podemos monitorear el ciclo estral de los animales o bien

homogeneizarlo con hormonas, particularmente con progesterona. Esta hormona mantiene a los animales en el estadio diestro del ciclo, donde la influencia de estrógenos es baja.

Por otro lado, no está claro porque la ruta intranasal induce fuertes respuestas de anticuerpos en el tracto genital, mucho mejor que la inmunización oral y parenteral. Una posibilidad es la expresión diferencial de receptores del "homing" sobre inmunocitos activados por antígenos de diferentes sitios inductores mucosos. Tal diferencia fue recientemente encontrada en humanos después de la inmunización con CTB por las rutas intranasal, oral y rectal, donde células secretoras de anticuerpos después de la inmunización oral o rectal expresaron la integrina $\alpha 4\beta 7$, y solo una pequeña fracción de estas células expresaron L-selectina, mientras que las células secretoras de anticuerpos co-expresaron, después de la inmunización intranasal, L-selectina y $\alpha 4\beta 7$ (Corthesy and Kraehenbuhl, 1999). Además, recientes estudios en ratón han demostrado que la interacción $\alpha 4\beta 7$ -MadCAM-1 puede jugar algún rol en el reclutamiento de linfocitos del tejido nasal y por lo tanto pueda proporcionar un método de diseminación de células productoras de anticuerpos en sitios efectores mucosos distantes, incluyendo el tracto genital y gastrointestinal (Csencsits *et al.*, 1999). Sin embargo, no se sabe cuales ligando-receptor específicos están involucrados en el "homing" de linfocitos del tracto genital. Nuestros resultados confirman observaciones previas, donde la inmunización intranasal evoca respuestas de anticuerpos en tracto genital (Rudin *et al.*, 1998; Johansson *et al.*, 1998). Por lo tanto, parece que las rutas intranasal y vaginal son rutas de administración eficientes para futuras vacunas STD (enfermedades transmitidas sexualmente) en mujeres, y es necesario determinar si la inmunización intranasal puede servir para la vacunación de hombres.

Conjugación de CryIAc con PSC6B

El contenido de proteínas y carbohidratos en las fracciones de la cromatografía de filtración en S300HR reveló el conjugado (CryIAc-PSC6B) formado por moléculas de PSC6B y CryIAc (en promedio 250 unidades de repetición de PSC6B por molécula de CryIAc) unidas covalentemente. La muestra de PSC6B eluyó en varios picos de menor peso molecular que CryIAc, en cambio las fracciones de mayor peso molecular que contenían el polisacárido y proteína conjugados eluyeron en el mismo pico, poco después de V_0 . La relación

polisacárido/proteína de 2.4 obtenida es considerada alta y aceptable para conjugados vacunales (Peeters *et al.*, 1996; Lees *et al.*, 1996).

En SDS-PAGE el conjugado tuvo una distribución más difusa que CryI Ac y peso molecular mayor a 193 kDa lo que pareció confirmar la eficacia del método de conjugación.

Algunos polisacáridos contienen grupos químicos convenientes para su conjugación como aminas, carboxilos o aldehídos, mientras que otros requieren activación y derivación con moléculas espaciadoras antes de acoplarlo a las proteínas. El tetrafluoroborato de 1-ciano-4-dimetilaminopiridinio (CDAP) tiene ventajas respecto al CNBr (bromuro de cianógeno), que es el agente activador de polisacáridos más empleado, como agente acoplante ya que las condiciones de cianilación son relativamente más suaves (útil para polisacáridos ácidos o neutros sensibles al pH como los que contienen ésteres de fosfato), no reduce los O -acetiles, la activación es rápida y puede realizarse (sin emplear espaciador) en menos pasos. Estas condiciones mantienen la mejor inmunogenicidad de los antígenos (Lees *et al.*, 1996; Shafer *et al.*, 2000) y evocan altos niveles de anticuerpos antígeno-específico (Konadu *et al.*, 1996; Konadu *et al.*, 2000; Kossaczka *et al.*, 2000).

Efecto de la Administración Intranasal de CryI Ac Conjugada o Coadministrada con PSC6B en la Respuesta de Anticuerpos anti-PSC6B

El serotipo 6 de *S. pneumoniae* es uno de los más frecuentes causantes de infecciones neumocócicas en todo el mundo y en individuos de todas las edades, aunque estas son más comunes en pacientes pediátricos. Las respuestas inmunológicas contra los neumococos del grupo 6 son tardías en niños de hasta 4-6 años o más. En adultos enfermos, alrededor del 80% de los aislados son del tipo 6A y 20% del tipo 6B, mientras que en niños los aislados comúnmente son del serotipo 6B (Van Dam *et al.*, 1990). De los 84 serotipos de neumococos sólo unos pocos son responsables de la mayoría de las enfermedades pediátricas. Los serotipos 6B, 14, 19F y 23F son los más comunes y comprenden aproximadamente el 50% de las enfermedades invasivas por neumococos en niños (Vella *et al.*, 1992).

De los anticuerpos contra los polisacáridos de la vacuna actual, los dirigidos contra el serotipo 6B (PSC6B) llaman la atención porque (i) hay una baja correlación entre la concentración de

anticuerpos anti-PSC6B y su capacidad de opsonización; (ii) su variabilidad funcional puede tener un significado clínico a pesar de que el PSC6B es inmunogenicamente pobre y en niños, los anticuerpos anti-PSC6B podrían estar en bajas concentraciones; y (iii) el grado de reactividad cruzada del serotipo 6B con el 6A varía individualmente aunque todavía no hay evidencias de protección cruzada en humanos (Park *et al.*, 1996).

La unión covalente de polisacáridos capsulares de neumococos con proteínas acarreadoras puede inducir aumentos importantes en la respuesta de anticuerpos específicos que de otra forma son poco inmunogénicos al inicio de la vida (Lee *et al.*, 1997).

Este antecedente y los datos obtenidos de la inmunización intranasal con el conjugado CryIAc-BSA, nos llevaron a probar el conjugado constituido por CryIAc y el polisacárido capsular serotipo 6B (PSC6B) en ratones Balb/c. Nuestros resultados demuestran que (i) la conjugación y coadministración de CryIAc con PSC6B incrementan significativamente la respuesta de anticuerpos IgA e IgM antígeno-específico a nivel sistémico y en mucosas locales (tracto respiratorio) y distantes (tracto gastrointestinal) por ruta intranasal; (ii) la inducción de respuestas sistémicas y mucosas anti-PSC6B es relevante, ya que demuestra que CryIAc no solo es adyuvante y acarreador de antígenos proteicos sino también de antígenos de naturaleza polisacárida (carbohidratos); y (iii) la superficie mucosa de la cavidad nasal es una ruta potencial para la vacunación.

Este estudio se diseñó para evaluar la habilidad de CryIAc como acarreador y adyuvante de polisacáridos de *S. pneumoniae* de interés vacunal después de la inmunización intranasal, y compararla con la inducida por toxina del cólera (CT), que es el principal adyuvante de mucosas descrito hoy en día. La inmunización intranasal del conjugado CryIAc-PSC6B y la coadministración de CT o CryIAc con PSC6B indujo respuesta alta de IgM y moderada de IgA anti-PSC6B en suero ($P < 0.05$), y en lavados traqueobronqueales (lavados tb) la respuesta fue moderada para ambos isotipos ($P < 0.05$). La coadministración de CryIAc con PSC6B estimuló una mayor respuesta de anticuerpos séricos de clase IgA que CT ($P < 0.05$). En un estudio previo de nuestro grupo (datos no publicados) se indujeron respuestas de anticuerpos IgM e IgA anti-PSC6B en suero y lavados tb, sin embargo, estas respuestas fueron menores a las encontradas en este trabajo. Esta discrepancia entre nuestro trabajo y el estudio previo puede

deberse al hecho de que en ese estudio se emplearon dosis más bajas de antígeno y adyuvante, o se administraron por una vía parenteral (subcutánea e intraperitoneal), mientras que nosotros inmunizamos por una vía mucosa, la nasal, y con dosis más altas. Se sabe que la inmunización por mucosas puede lograr ambos tipos de inmunidad: sistémica y en mucosas, mientras que la parenteral solo induce respuestas a nivel sistémico (McGhee *et al.*, 1999b; Baldrige *et al.*, 2000). En la sección donde se evaluó CryIAc como acarreador de BSA, se discuten otras razones por las cuales la inmunización intranasal da una mayor respuesta de anticuerpos. Por otra parte, varios mecanismos pueden contribuir con la actividad adyuvante y acarreadora de CryIAc por la ruta intranasal. De acuerdo con un estudio reciente (Guttormsen *et al.*, 1999), el incremento en la inmunogenicidad de las vacunas conjugadas es el resultado de interacciones de células B PSC-específicas y células T. Los eventos involucrados son: (i) los polisacáridos capsulares (PSC) se unen a inmunoglobulinas de superficie de células B (BCR) PSC-específicas, resultando con la internalización del conjugado por endocitosis mediada por receptores. La porción proteica del conjugado es procesada en péptidos, y los epitopos son presentados -en el contexto de moléculas del MHC clase II- al TCR (receptor de células T) de células Th acarreador-específico (señal 1); (ii) la coestimulación de células T se realiza a través de la interacción B7-CD28 (señal 2), y es crítica para la inducción de memoria inmunológica y switch de isotipo; y (iii) la coestimulación de células B a través de la interacción CD40-CD40L es esencial para el switch de isotipo timo-dependiente. Por lo que las interacciones MHC clase II-Ag-TCR, B7-CD28, y CD40-CD40L son críticas en las respuestas inmunes para vacunas conjugadas *in vivo* (Garg *et al.*, 1996; Guttormsen *et al.*, 1999). Además, se ha observado que la protoxina CryIAc se une al epitelio del yeyuno y más intensamente a enterocitos. La protoxina se une principalmente a la superficie apical incluyendo el "brush-border" (Vázquez *et al.*, 2000). Nuestros resultados en conjunto, aunque obviamente se necesitan más estudios, sugieren que un receptor para CryIAc puede estar presente en el epitelio nasal, donde CryIAc puede inducir cambios temporales *in situ* en las propiedades electrofisiológicas similares a las ocasionadas en el epitelio intestinal (yeyuno), resultando con un incremento en la permeabilidad de la barrera mucosa nasal. Por lo tanto, la adyuvancia de CryIAc puede ser el resultado de un incremento en la liberación de antígeno en el tejido linfocitario nasal (NALT). En relación a esto se ha demostrado que el incremento en la permeabilidad observada en la mucosa intestinal

y nasal expuesta a CT contribuye con su actividad adyuvante (Lycke *et al.*, 1991; Gizurarson *et al.*, 1992). Sin embargo, es posible que CryIAC también ejerza algún efecto inmunomodulador sobre las células inmunitarias, como se ha reportado para CT y LT (Takahashi *et al.*, 1996; Cong *et al.*, 1997; Lycke *et al.*, 1997; Marinaro *et al.*, 1997; Li and Fox, 1998). En un trabajo reciente, Rodríguez *et al.* (datos no publicados) demostraron que CryIAC incrementa la actividad fagocítica de APC (monocitos/macrófagos), y tiene efectos mitogénicos tanto *in vivo* como *in vitro* sobre monocitos y órganos linfoides del compartimiento mucoso (GALT) y sistémico (bazo).

Es interesante que la mayoría de los adyuvantes mucosos son toxinas producidas principalmente por enterobacterias u otras bacterias que infectan las superficies mucosas. Estas incluyen LT, CT, y la toxina pertussis (Roberts *et al.*, 1995), y algunos toxoides como el diftérico y tetánico (Isaka *et al.*, 1998; Isaka *et al.*, 2000). Interesantemente, para muchas de estas toxinas la actividad enzimática es responsable de su toxicidad mientras que el efecto adyuvante, al menos para alguna de ellas, es independiente de la actividad enzimática (Douce *et al.*, 1995; Douce *et al.*, 1997; Ryan *et al.*, 1999; Douce *et al.*, 1999) y depende de la unión de la toxina a las células (Nashar *et al.*, 1996; Ryan *et al.*, 1998; Williams *et al.*, 1999). Por lo tanto es tentador especular, desde el punto de vista evolutivo, que estas toxinas se desarrollaron para llevar a cabo una función principal (que es dependiente de la actividad enzimática) y que adquirieron su actividad adyuvante como un "efecto secundario", probablemente dependiente de su unión a membranas celulares. Las proteínas Cry son activadas previamente por enzimas proteolíticas, y una vez activadas se unen a la membrana apical de las células columnares presentes en el intestino medio de insectos ocasionando desbalance osmótico y provocando lisis celular (Cannon, 1996). De esto se puede deducir que la actividad enzimática es responsable de la toxicidad en insectos, mientras que su adyuvancia en mamíferos al parecer, es dependiente de su unión con receptores de membrana (Vázquez *et al.*, 2000).

Se sabe que los anticuerpos sistémicos IgG PSC-específico protegen en contra de las infecciones invasivas (Jakobsen *et al.*, 1999). Nuestros resultados demuestran que ningún grupo que recibió PSC6B coadministrado con CT o CryIAC, o conjugado por ruta intranasal indujo niveles

detectables de anticuerpos IgG PSC6B-específico en suero y secreciones. Esta discrepancia entre nuestros resultados y otros estudios puede deberse a diversos factores que influyen en la inmunogenicidad de los antígenos. Estos incluyen (i) la naturaleza física del antígeno ya sea como un oligosacárido o polisacárido; (ii) el serotipo empleado; (iii) la vía de administración; (iv) la relación proteína/carbohidrato presente en el conjugado; (v) la presencia de polisacárido libre; (vi) el uso de adyuvantes; y (vii) la proteína acarreadora usada (Shelly *et al.*, 1997). Otra posibilidad, es que se hayan estimulado células dendríticas (DC) de la mucosa nasal y del NALT. Existe evidencia que indica que las DC tienen un papel en el switch de isotipo. La activación de células T por DC de la mucosa inducen un patrón de citocinas Th2, mientras que las DC del bazo inducen citocinas Th1 (MacPherson and Liu, 1999). Las citocinas Th1 inducen anticuerpos de clase IgG mientras que las citocinas Th2 de clase IgA. Nosotros inmunizamos por una vía mucosa, la nasal, mientras que la mayoría de los trabajos lo hace por una vía sistémica, y esto pudiera tener repercusiones importantes en el patrón de clases de anticuerpos. Se sabe que las citocinas Th2 son de gran importancia para el desarrollo e incremento en la producción de IgA (McGhee *et al.*, 1989; Husband *et al.*, 1996; Yamamoto *et al.*, 1996; Corthesy and Spertini, 1999). Esto explicaría en parte porque no se indujeron anticuerpos de clase IgG, pero si de IgA e IgM en nuestro estudio.

La presencia de anticuerpos séricos IgG e IgM son esenciales para la opsonización de neumococos, pero no se sabe si los anticuerpos IgA jueguen algún papel en la prevención de infecciones. Pacientes con hipogammaglobulinemia son generalmente predispuestos a infecciones por *S. pneumoniae* o *H. influenzae*, mientras que pacientes con deficiencias en IgA no lo son (Bruyn *et al.*, 1992). En un trabajo reciente, Jakobsen *et al.* (1999) encontraron una correlación negativa entre los niveles de anticuerpos séricos IgA y la densidad de neumococos en pulmones y suero, indicando que la IgA puede ser de gran importancia en la eliminación de neumococos. Esto último se ve apoyado por estudios en humanos, donde se ha demostrado que la habilidad de la IgA sérica para regular la eliminación de *S. pneumoniae* por fagocitos (neutrófilos, PMN) esta asociada principalmente con la forma polimérica del anticuerpo y con la participación de la vía alterna del complemento. Además, la IgA puede regular la captación y eliminación del organismo mediante PMN en ausencia de complemento (Janoff *et al.*, 1999).

Por lo tanto, la IgA sérica puede servir en el control de las infecciones neumocócicas y bloquear la entrada del patógeno a la circulación (Johnson *et al.*, 1996; Janoff *et al.*, 1999).

Por otra parte, los anticuerpos mucosos IgA e IgM antígeno-específico funcionan para prevenir las infecciones en las superficies mucosas. En este estudio se indujeron anticuerpos de clase IgA e IgM PSC6B-específico en lavados traqueobronqueales solo después de la inmunización intranasal con el conjugado CryIAc-PSC6B (Fig. 14). Las superficies mucosas están caracterizadas principalmente por la presencia de anticuerpos de clase IgA-secretora (S-IgA). Estos anticuerpos protegen a las superficies mucosas en contra de patógenos por medio de un fenómeno denominado Exclusión Inmune. Este mecanismo previene la adhesión de microorganismos a la membrana plasmática de células epiteliales bloqueando la invasión e infección (Corthesy and Kraehenbuhl, 1999; Corthesy and Spertini, 1999). Aunque existen muy pocos trabajos donde se haya estudiado la respuesta mucosa IgA con vacunas de neumococo, se ha observado que la inmunidad en estas superficies puede jugar un papel importante en la protección en contra de la colonización y enfermedades por neumococos (Bruyn *et al.*, 1992; Wu *et al.*, 1997b; Jakobsen *et al.*, 1999; Korkeila *et al.*, 2000).

La magnitud de las respuestas de anticuerpos de clase IgM vario dependiendo del sitio analizado. En suero las respuestas fueron mayores que en lavados tb. Una posible explicación de esta variación viene dada por evidencia que sugiere que las células T reclutadas por vacunas conjugadas juegan un papel central en la magnitud de las respuestas IgM anti-PSC. Además, las interacciones MHC clase II-Ag-TCR, B7-CD28 , y CD40-CD40L son críticas en los incrementos de IgM PSC-específico (Guttormsen *et al.*, 1999). Esto indica que las células T juegan un papel importante en la regulación de las respuestas de anticuerpos IgM para PSC. La inducción de anticuerpos de clase IgM son importantes, ya que la IgM es el mejor activador de la vía clásica del complemento en modelos animales de bacteremia neumocócica (Bruyn *et al.*, 1992).

Adicionalmente, analizamos la respuesta de anticuerpos en secreciones intestinales. La inmunización intranasal con el conjugado CryIAc-PSC6B y la coadministración de CT o CryIAc

con PSC6B indujo una alta respuesta de anticuerpos anti-PSC6B de clase IgA en intestino delgado. Esta respuesta no es relevante para inducir protección en contra de las infecciones por *S. pneumoniae*, sin embargo, debido a la amplia reactividad cruzada de los polisacárido capsulares (PSC) de neumococo y de otros géneros bacterianos como *E. coli*, *Klebsiella* K2, *H. influenzae* b, estreptococos del grupo B, y de algunas plantas (Lee *et al.*, 1991; Bruyn *et al.*, 1992), la inducción de una respuesta de anticuerpos funcionales contra los PSC podría extenderse a la búsqueda de protección en contra de otros patógenos que ocasionan infecciones del tracto gastrointestinal, como *E. coli*. Por otra parte, una posible explicación del porque la ruta intranasal indujo una fuerte respuesta de anticuerpos a nivel intestinal viene dada por estudios recientes donde se demostró que la interacción $\alpha 4\beta 7$ -MadCAM-1 puede jugar algún papel en el reclutamiento de linfocitos del tejido nasal y por lo tanto pueda proporcionar un método de diseminación de células productoras de anticuerpos en sitios efectores mucosos distantes, incluyendo el tracto gastrointestinal (Csencsits *et al.*, 1999).

Efecto de la Coadministración Intranasal de Cry I Ac o CT con Pulmovax en la Respuesta de Anticuerpos anti-Pulmovax

Si bien es cierto que las infecciones bacterianas pueden ser mortales, el tratamiento de las enfermedades virales con antibióticos no sólo es ineficaz sino que contribuye a la aparición de cepas resistentes (WHO, 2000). Además de prevenir la aparición de enfermedades, las vacunas también ofrecen la mejor esperanza de combatir la resistencia porque reducen el número de personas infectadas y de ese modo reducen al mínimo la transmisión, las infecciones y la necesidad de tratamiento. Se han desarrollado vacunas para prevenir algunas neumonías virales y bacterianas. La versión más reciente de una vacuna antineumocócica para uso humano a base de polisacáridos capsulares (PSC), licenciada en 1983 en USA y denominada Pneumovax (Pulmovax en México), ha sido formulada con una mezcla de los PSC determinantes de 23 serotipos de *S. pneumoniae* responsables del ~90% de las infecciones. Incluye los serotipos 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19F, 20, 22F, 23F y 33F, de acuerdo a la nomenclatura danesa; y es un instrumento importante en la profilaxis de infecciones neumocócicas (Lee *et al.*, 1997), aunque hay controversias sobre su eficacia (Butler *et al.*, 1993; Koivula *et al.*, 1997). La principal desventaja de la vacuna Pulmovax es la pobre respuesta de

anticuerpos en niños e infantes hacia los serotipos que ocasionan infecciones invasivas y otitis media. En el presente estudio, demostramos que (i) la baja inmunogenicidad de la vacuna puede ser incrementada mediante su coadministración con CryIAc o CT; y (ii) una vez más la inmunización intranasal promueve la inmunidad sistémica y en mucosas.

Este estudio fue diseñado para evaluar la adyuvanticidad de CryIAc y compararla con la inducida por CT. Los resultados demuestran que solo la coadministración de Pulmovax con CryIAc incremento los niveles de anticuerpos séricos y en lavados traqueobronqueales (lavados tb) anti-Pulmovax de clase IgA, IgG e IgM ($P < 0.05$), mientras que CT solo los incremento para IgG en suero, y en lavados tb lo hizo para IgM e IgA. Sin embargo, estas respuestas fueron menores respecto a la coadministración con CryIAc. En un trabajo previo de nuestro grupo (datos no publicados) se demostró que solo con dosis altas de Pulmovax (115 μ g) y adyuvante (100 μ g) (10 veces más elevadas que las nuestras) se obtenían respuestas significativas de anticuerpos séricos y mucosos anti-Pulmovax, sin embargo, estas respuestas fueron menores a las nuestras. Esta discrepancia entre nuestros resultados y los del estudio previo pueden deberse al hecho de que en ese estudio los antígenos se administraron por vía intrapentoneal y subcutánea, que son vías sistémicas, mientras que nosotros inmunizamos por una vía mucosa, la nasal.

Casi no hay datos publicados sobre el efecto de proteínas coadministradas con la vacuna completa antineumocócica actual. La mayoría de los estudios se enfoca en medir los niveles de anticuerpos séricos. En general los individuos inmunizados con la vacuna presentan incrementos en los niveles de anticuerpos de clase IgG hacia los 23 serotipos de la vacuna. Sin embargo, no responden a la mayoría de los serotipos que ocasionan enfermedades invasivas (Rubins *et al.*, 1999). En este estudio demostramos que la coadministración de CryIAc con Pulmovax no sólo incrementa los niveles de anticuerpos séricos de clase IgG sino también de clase IgA e IgM y en sitios mucosos (tracto respiratorio y gastrointestinal).

Esto sugiere que la inmunización intranasal de Pulmovax con CryIAc como adyuvante puede sustituir en humanos el protocolo existente en el cual la vacuna es administrada por vía sistémica (subcutánea o intramuscular), ya que con esta forma de administración se necesitan grandes cantidades de antígeno o inducen reacciones alérgicas. Además el anillo de Waldeyer que

consiste de amígdalas y adenoides en humanos es equivalente en funcionalidad al NALT de ratones (Kuper *et al.*, 1992). La efectividad de la inmunización intranasal en humanos ha sido investigada con el virus influenza de la hemaglutinina y vacunas combinadas de tétanos-difteria mezcladas con polisorbato y glicéridos caprílico/caprico (Isaka *et al.*, 1998).

Los adyuvantes de aluminio (hidróxido y fosfato de aluminio, genéricamente denominados "alum") y el fosfato de calcio son aceptados para vacunas en humanos por la US FDA (Rockville, MD) cuando se inoculan subcutánea o intramuscularmente con un antígeno. A pesar de que incrementan la respuesta inmune humoral Th2 para toxoides bacteriales y otros antígenos, presentan limitaciones. Los compuestos de aluminio no han presentado efectos adyuvantes cuando se coadministran con algunos antígenos, tales como el virus influenza de la hemaglutinina, vacunas conjugadas de polisacáridos capsulares de *Haemophilus influenzae* b-toxoide tetánico, y para la vacuna de la tifoidea. Por otro lado, se han reportado efectos colaterales de estos adyuvantes, tales como formación de nódulos subcutáneos, granulomas y abscesos (Isaka *et al.*, 1998). Además, los antígenos adsorbidos con sales de aluminio evocan frecuentemente respuestas de anticuerpos de clase IgE que en ausencia de éstas sales no ocurre; estos anticuerpos pueden provocar hipersensibilidad para antígenos de vacunas (Allison, 1999; Singh and O'Hagan, 1999). Por otro lado, existen muy pocas sustancias con propiedades adyuvantes capaces de incrementar las respuestas inmunes en mucosas. CT y LT tienen efectos adyuvantes en las respuestas cuando se coadministran o se conjugan con proteínas solubles que no son inmunogénicas en mucosas (Wilson *et al.*, 1989; Kalambaheti *et al.*, 1998; Tochikubo *et al.*, 1998; Johansson *et al.*, 1998). Sin embargo, su aplicación en humanos no es factible por su toxicidad y altos costos de producción (McGhee *et al.*, 1999b). Las formas mutantes no tóxicas de CT y LT que mantienen parcialmente su adyuvancia son también excesivamente costosas de producirse (Douce *et al.*, 1999; Ryan *et al.*, 1999). Debido a estos inconvenientes, proponemos que la coadministración intranasal de Pulmovax con CryIAc parece ser un buen medio de vacunación en contra de las neumonías estreptococcales con respecto a facilidad, inocuidad, seguridad y bajos costos de producción.

La habilidad de CryI Ac para incrementar los niveles de anticuerpos de clase IgM e IgG séricos y mucosos es de gran importancia, ya que estos anticuerpos opsonizan y activan la vía clásica del complemento. Los polisacáridos inducen anticuerpos IgG que son predominantemente de subclase IgG2 en humanos, IgG2c en ratas e IgG3 en ratones (Lottenbach *et al.*, 1999). Las subclases de IgG difieren en sus funciones efectoras. Los anticuerpos IgG1 e IgG3 son más eficientes activadores del complemento que IgG2 e IgG4. Además, la interacción con receptores Fc es mayor con IgG1 que con IgG2. Se ha demostrado que la conjugación de polisacáridos con proteínas acarreadoras cambia la distribución de subclases de anticuerpos IgG anti-polisacárido hacia IgG1 en ratones (Soininen *et al.*, 1999). Aunque nosotros no analizamos las subclases de IgG, es tentador especular que la protoxina CryI Ac puede ejercer algún efecto sobre la distribución de subclases de anticuerpos, y esto pudiera tener repercusiones importantes en la protección contra infecciones respiratorias, principalmente las ocasionadas por *S. pneumoniae* y *H. influenzae* b, ya que la porción Fc del anticuerpo se une a receptores FcγR de APC (macrófagos y células dendríticas).

Adicionalmente, analizamos la respuesta de anticuerpos en secreciones intestinales. La coadministración de CryI Ac con la vacuna indujo respuestas de anticuerpos anti-Pulmovax de clase IgA e IgM en intestino delgado y grueso, mientras que CT incremento los niveles de anticuerpos IgG en intestino delgado. Esta respuesta no es relevante para inducir protección en contra de las infecciones por *S. pneumoniae*, sin embargo, como ya se menciono la inducción de una respuesta de anticuerpos funcionales contra los PSC podría extenderse a la búsqueda de protección en contra de otros patógenos que ocasionan infecciones del tracto gastrointestinal.

En el proceso de búsqueda de vacunas en contra de enfermedades infecciosas (respiratorias, urogenitales y gastrointestinales) se ha hecho patente la necesidad de encontrar nuevos adyuvantes y acarreadores para mucosas y dentro de éstos, la protoxina CryI Ac es un buen candidato ya que es altamente inmunogénica y posee efectos adyuvantes y acarreadores tanto a nivel sistémico como de mucosas tan potentes como los de la toxina del cólera pero con la ventaja de ser inocua para mamíferos. Las respuestas inducidas por la inmunización intranasal de CryI Ac cumple con varias de las características deseables para vacunas en contra de

diferentes enfermedades infecciosas, como son (i) incremento de ambos tipos de inmunidad: sistémica y en mucosas (tracto respiratorio, gastrointestinal y urogenital); (ii) eficiencia en prevenir la transmisión por mucosas y sistémicas; (iii) estimular inmunidad humoral y mediada por células; (iv) adyuvante y acarreador de antígenos de naturaleza proteica y polisacárida (carbohidratos); (v) un excelente perfil de seguridad, con un mínimo riesgo de reacciones adversas; (vi) bajos costos de producción, lo que permitiría una amplia cobertura en países en desarrollo; (vii) estabilidad y facilidad de administración para optimizar campañas de vacunación masivas en países subdesarrollados; y (viii) la coadministración de antígenos con CryI_{Ac} como adyuvante es importante ya que pueden administrarse vacunas múltiples, no requiere de personal entrenado y disminuyen los riesgos de contaminación, mientras que la preparación de conjugados antígeno-acarreador es más laboriosa, eleva los costos de producción y el método de conjugación puede afectar las características conformacionales de la proteína e inactivar los epitopos de las células T y B.

CONCLUSIONES

1. CryIAc funciona como acarreador de antígenos, ya que la conjugación de CryIAc con BSA incrementa significativamente la respuesta de anticuerpos de clase IgA e IgG BSA-específicos a nivel sistémico y en mucosas locales (tracto respiratorio) y distantes (tracto urogenital femenino) cuando se administra por ruta intranasal.
2. La conjugación de CryIAc con PSC6B incrementa significativamente la respuesta de anticuerpos IgA e IgM antígeno-específico a nivel sistémico y en mucosas locales (tracto respiratorio) y distantes (tracto gastrointestinal) por ruta intranasal.
3. La coadministración de CryIAc con Pulmovax incrementa la inmunogenicidad de la vacuna.
4. La superficie mucosa de la cavidad nasal es una ruta potencial para la vacunación, ya que la inmunización intranasal promueve el incremento de ambos tipos de inmunidad: sistémica y en mucosas, mientras que la inmunización oral es menos eficiente.
5. La variación de respuestas en los diferentes sitios mucosos analizados (tracto respiratorio, gastrointestinal y urogenital) aporta evidencias acerca de la regionalización de la respuesta inmune en mucosas.
6. CryIAc no solo es adyuvante y acarreador de antígenos proteicos sino también de antígenos de naturaleza polisacárida (carbohidratos).
7. La capacidad adyuvante de CryIAc es importante ya que pueden administrarse vacunas múltiples, es inocua para vertebrados, no requiere de personal entrenado y disminuyen los riesgos de contaminación, mientras que la preparación de conjugados antígeno-acarreador es más laboriosa, eleva los costos de producción y el método de conjugación puede afectar las características conformacionales de la proteína e inactivar los epitopos de las células T y B.

BIBLIOGRAFÍA

1. Adang, M.J., M.J. Staver, T.A. Rocheleau, J. Leighton, R.F. Barker and D.V. Thompson (1985). "Characterized full-length truncated plasmid clones of the crystal proteins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-73 and their toxicity in *Manduca sexta*." Gene 36: 289-300.
2. Ahman, H., H. Käythy, P. Tamminen, A. Vuorela, F. Malinoski and J. Eskola (1996). "Pentavalent pneumococcal oligosaccharide conjugate vaccine PncCRM is well-tolerated and able to induce an antibody response in infants." Pediatr Infect Dis J 15 (2): 134-139.
3. Allison, A.C. (1999). "Squalene and squalane emulsions as adjuvants." Methods 19: 87-93.
4. Alonso, J., V. Madrigal and M. García (1991). "Recurrent meningitis from a multiply resistant *Streptococcus pneumoniae* strain treated with Erythromycin." Pediatr Infect Dis J 10: 256.
5. Anderson, E.L., D.J. Kennedy, K.M. Geldmacher, J. Donnelly and P.M. Mendelman (1996). "Immunogenicity of heptavalent pneumococcal conjugate vaccine in infants." J Pediatr 128: 649-653.
6. Austrian, R. (1981). "Some observations on the pneumococcus and on the current status of pneumococcal disease and its prevention." Rev Infect Dis 3: S1-17.
7. Baldridge, J.R., Y. Yorgensen, J.R. Ward and T. Ulrich (2000). "Monophosphoryl lipid A enhances mucosal and systemic to vaccine antigens following intranasal administration." Vaccine 18: 2416-2425.
8. Bardardottir, E., S. Jonsson, I. Jonsdottir, A. Sigfusson and H. Valdimarsson (1990). "IgG subclass response and opsonization of *Streptococcus pneumoniae* after vaccination of healthy adults." J Infect Dis 162: 482-488.
9. Barington, T., M. Skettrup, L. Juul and C. Heilmann (1993). "Non-epitope-specific suppression of the antibody response to *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccines by preimmunization with vaccine components." Infect Immun 61: 432-438.
10. Barington, T., A. Gyhrs, K. Kristensen and C. Heilmann (1994). "Opposite effects of actively and passively acquired immunity to the carrier on responses of human infants to a *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccine." Infect Immun 62: 9-14.

11. Bergquist, C., T. Lagergard, M. Lindblad and J. Holmgren (1995). "Local and systemic antibody responses to dextran-cholera toxin B subunit conjugates." Infect Immun 63: 2021-2025.
12. Bergquist, C., T. Lagergard and J. Holmgren (1997). "Anticarrier immunity suppresses the antibody response to polysaccharide antigens after intranasal immunization with the polysaccharide-protein conjugate." Infect Immun 66(5): 1579-1583.
13. Bolan, G., C.V. Broome, R.R. Facklam, B.D. Plikaytis, D.W. Fraser and W.F. Schlech (1986). "Pneumococcal vaccine efficacy in selected populations in the United States." Ann Intern Med 104(1): 1-6.
14. Borel, H., T. Sasaki, D.B. Stollar and Y. Borel (1984). "Conjugation of DNA fragments to protein carriers by glutaraldehyde: immunogenicity of oligonucleotide-hemocyanin conjugates." J Immunol Methods 67(2): 289-302.
15. Braconier, J.H., F.K. Pedersen, H. Odeberg and C. Rosen (1984). "Opsonic and antibody responses to pneumococcal polysaccharide types 6A, 19F and 23F after vaccination of immunocompromised patients." Scand J Infect Dis 16: 161-167.
16. Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem 72: 248-254.
17. Bradley, J.S. and J.D. Connor (1991). "Ceftriaxine failure in meningitis caused by *Streptococcus pneumoniae* with reduced susceptibility to beta-lactam antibiotics." Pediatr Infect Dis J 11: 871-873.
18. Brandtzaeg, P. (1997). "Mucosal immunity in the female genital tract." J Reprod Immunol 36 (1-2): 23-50.
19. Bruyn, G.A.W., B.J.M. Zegers and R. Van Furth (1992). "Mechanisms of host defense against infection with *Streptococcus pneumoniae*." Clin Infect Dis 14: 251-262.
20. Butler, J.C., R.F. Breiman, J.F. Campbell, H.B. Lipman, C.V. Broome and R.R. Facklam (1993). "Pneumococcal polysaccharide vaccine efficacy. An evaluation of current recommendations." JAMA 270:1826-1831.
21. Cannon, R.J.C. (1996). "*Bacillus thuringiensis* use in agriculture: a molecular perspective." Biol Rev 71: 561-636.

22. Chen, H. (2000). "Recent advances in mucosal vaccine development." J Controlled Release 67: 117-128.
23. Choma, C.T. and H. Kaplan (1990). "Folding and unfolding of the protoxin from *Bacillus thuringiensis*: evidence that the toxic moiety is present in an active conformation." Biochem 29: 10971-10977.
24. Cong, Y., C.T. Weaver and C.O. Elson (1997). "The mucosal adjuvanticity of cholera toxin involves enhancement of costimulatory activity by selective up-regulation of B7.2 expression." J Immunol 159: 5301-5308.
25. Corthesy, B. and F. Spertini (1999). "Secretory immunoglobulin A: from mucosal protection to vaccine development." Biol Chem 380(11): 1251-1262.
26. Corthesy, B. and J.-P. Kraehenbuhl (1999). "Antibody-mediated protection of mucosal surfaces." Current Topics in Microbiology and Immunology 236: 93-109.
27. Csencsits, K.L., M.A. Jutila and D.W. Pascual (1999). "Nasal-associated lymphoid tissue: phenotypic and functional evidence for the primary role of peripheral node addressin in naive lymphocyte adhesion to high endothelial venules in a mucosal site." J Immunol 163 (3): 1382-1389.
28. Cui, Z.-D., T.D. Tristram, L.J. LaScolea, T. Kwiatkowski, Jr., S. Kopti and P. Ogra (1991). "Induction of antibody response to *Chlamydia trachomatis* in the genital tract by oral immunization." Infect Immun 59: 1465-1469.
29. Czerkinsky, C., F. Anjuere, J.R. McGhee, A. George-Chandy, J. Holmgren, M.P. Kieny, K. Fujiyashi, J.F. Mestecky, V. Pierrefite-Carle, C. Rask and J.B. Sun (1999). "Mucosal immunity and tolerance: relevance to vaccine development." Immunol Rev 170: 197-222.
30. Di Tommaso, A., G. Saletti, M. Pizza, R. Rappuoli, G. Dougan, S. Abrignani, G. Douce and M.T. De Magistris (1996). "Induction of antigen-specific antibodies in vaginal secretions by using a nontoxic mutant of heat-labile enterotoxin as a mucosal adjuvant." Infect Immun 64: 974-979.
31. Dintzis, H.M. and R.Z. Dintzis (1992). "Profound specific suppression by antigen of persistent IgM, IgG and IgE antibody production." Proc Natl Acad Sci USA 89: 1113-1117.
32. Douce, G., C. Turcotte, I. Cropley, M. Robets, M. Pizza, M. Domenighini, R. Rappuoli and G. Dougan (1995). "Mutants of *Escherichia coli* heat-labile toxin lacking ADP-

- ribosyltransferase activity acts as nontoxic, mucosal adjuvants." Proc Natl Acad Sci USA 92: 1644-1648.
33. Douce, G., M. Fontana, M. Pizza, R. Rappuoli and G. Dougan (1997). "Intranasal immunogenicity and adjuvanticity of site-directed mutant derivatives of cholera toxin." Infect Immun 65: 2821-2828.
 34. Douce, G., V. Giannelly, M. Pizza, D. Lewis, P. Everest, R. Rappuoli and G. Dougan (1999). "Genetically detoxified mutants of heat-labile toxin from *Escherichia coli* are able to act as oral adjuvants." Infect Immun 67(9): 4400-4406.
 35. Douglas, R.M., J.C. Paton, S.J. Duncan and D.J. Hansman (1983). "Antibody response to pneumococcal vaccination in children younger than five years of age." J Infect Dis 148: 131-137.
 36. Elson, C.O. and M.T. Dertzbaugh (1999). "Mucosal adjuvants." In: Ogra, P.L., J. Mestecky, M.E. Lamm, W. Strober, J. Bienenstock and J.R. McGhee (eds). Handbook Mucosal Immunology. Second edition. Academic Press. San Diego, CA. 817-838.
 37. Ernst, J. D. (1999). "Toward the development of antibacterial vaccines: report of a symposium and workshop. Organizing Committee." Clin Infect Dis 29(5): 1295-302.
 38. Eskola, J. and H. Käyhty (1995). "New vaccine for prevention of pneumococcal infections." Ann Med 27: 53-56.
 39. Friedland, I. and K.P. Klugman (1991). "Recurrent penicillin-resistant pneumococcal meningitis after chloramphenicol therapy." Pediatr Infect Dis J 10: 705-708.
 40. Garg, M., W. Luo, A.M. Kaplan and S. Bondada (1996). "Cellular basis of decreased immune responses to pneumococcal vaccines in aged mice." Infect Immun 64 (11):4456-4462.
 41. Ge, A.Z., R.M. Pfister and D.H. Dean. (1990). "Hyperexpression of a *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin-encoding gene in *Escherichia coli*: properties of the product." Gene 93: 49-54.
 42. Giebink, G.S. (1985). "Preventing pneumococcal disease in children: recommendations for using pneumococcal vaccine." Pediatr Infect Dis J 4: 343-348.
 43. Giebink, G.S. (1994). "Immunology: promise of new vaccines." Pediatr Infect Dis J 13: 1064-1068.

44. Giebink, G.S., J.D. Meier, M.K. Quartey, C.L. Liebler and C.T. Lee (1996). "Immunogenicity and efficacy of *Streptococcus pneumoniae* polysaccharide-protein conjugate vaccine against homologous and heterologous serotypes in the chinchilla otitis media model." Infect Dis 173(1): 119-127.
45. Gizurason, S., S. Tamura, C. Aizawa and T. Kurata (1992). "Stimulation of the transepithelial flux of influenza HA vaccine by cholera toxin B subunit." Vaccine 10: 101-106.
46. Gupta, R.K., A.C. Chang and G.R. Siber (1998). "Biodegradable polymer microspheres as vaccine adjuvants and delivery systems." Dev Biol Stand 92: 63-78.
47. Guttormsen, H.-K., A.H. Sharpe, A.K. Chandraker, A.K. Brngtsen, M.H. Sayegh and D.L. Kasper (1999). "Cognate stimulatory B-cell-T-cell interactions are critical for T-cell help recruited by glycoconjugate vaccines." Infect Immun 67(12): 6375-6384.
48. Heather, L.M. (1993). "DNA-based immunization induces continuous secretion of hepatitis B surface antigen and high levels of circulating antibody." Human Molecular Genetics 2(11): 1847-1851.
49. Hiroi, T., K. Iwatani, H. Iijima, S. Kodama, M. Yanagita and H. Kiyono (1998). "Nasal immune system: distinctive Th0 and Th1/Th2 type environments in murine nasal-associated lymphoid tissues and nasal passage, respectively." Eur J Immunol 28: 3346-3353.
50. Höfte, H. and H. Whiteley (1989). "Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*." Microbiol Rev 53: 242-255.
51. Hopkins, S., J.-P. Kraehenbuhl, F. Schödel, A. Potts, D. Peterson, P. De Grandi and D. Nardelli-Haeffliger (1995). "A recombinant *Salmonella typhimurium* vaccine induces local immunity by four different routes of immunization." Infect Immun 63: 3279-3286.
52. Husband, A.J., D.R. Kramer, S. Bao, R.M. Sutherland and K.W. Beagley (1996). "Regulation of mucosal IgA responses in vivo: cytokines and adjuvants." Vet Immun Immunopath 54 (14): 179-186.
53. Isaka, M., Y. Yasuda, S. Kozuka, Y. Miura, T. Taniguchi, K. Matano, N. Goto and K. Tochikubo (1998). "Systemic and mucosal immune responses of mice to aluminium-adsorbed or aluminium-non-adsorbed tetanus toxoid administered intranasally with recombinant cholera toxin B subunit." Vaccine 18: 743-751.

54. Isaka, M., Y. Yasuda, S. Kozuka, T. Taniguchi, K. Matano, J-I Maeyama, T. Komiya, K. Ohkuma, N. Goto and K. Tochikubo (2000). "Induction of systemic and mucosal antibody responses in mice immunized intranasally with aluminium-non-adsorbed diphtheria toxoid together with recombinant cholera toxin B subunit as an adjuvant." Vaccine 18: 743-751.
55. Jakobsen, H., D. Schulz, M. Pizza, R. Rappuoli and I. Jónsdóttir (1999). "Intranasal immunization with pneumococcal polysaccharide conjugate vaccines with nontoxic mutants of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxins as adjuvants protects mice against invasive pneumococcal infections." Infect Immun 67(11): 5892-5897.
56. Janoff, E.N., C. Fasching, J.M. Orenstein, J.B. Rubins, N.L. Opstad and A.P. Dalmasso (1999). "Killing of *Streptococcus pneumoniae* by capsular polysaccharide-specific polymeric IgA, complement, and phagocytes." J Clin Invest 104(8): 1139-1147.
57. Jertborn, M., A.-M. Svennerholm and J. Holmgren (1996). "Intestinal and systemic immune responses in humans after oral immunizations with a bivalent B subunit-O1/O139 whole cell cholera vaccine." Vaccine 14: 1459-1465.
58. Johansson, E.-L., C. Rask, M. Fredriksson, K. Eriksson, C. Czerkinsky and J. Holmgren (1998). "Antibodies and antibody-secreting cells in the female genital tract after vaginal or intranasal immunization with cholera toxin B subunit or conjugates." Infect Immun 66 (2): 514-520.
59. Johnson, G.D. and J. Dorling (1981). "Immunofluorescence and immuno-peroxidase techniques." In: Thompson, R.A., editor. Techniques in Clinical Immunology. Second Edition. 106-137.
60. Johnson, S., N.L. Opstad, J.M. Douglas, Jr., and E.N. Janoff (1996). "Prolonged and preferential production of polymeric immunoglobulin A in response to *Streptococcus pneumoniae* capsular polysaccharide." Infect Immun 64(10): 4339-4344.
61. Kaiserlian, D. (1999). "Epithelial cells in antigen. Sampling and presentation in mucosal tissues." Current Topics in Microbiology and Immunology 236: 55-78.
62. Kalambaheti, T., U. Chaisri, P. Srیمانote, E. Pongponratn and W. Chaicumpa (1998). "Immunogenicity and protective role of three formulations of oral cholera vaccine." Vaccine 16 (2/3): 201-207.

63. Käyhty, H., H. Ahman, P.-R. Rönnerberg, R. Tillikainen and J. Eskola (1995). "Pneumococcal polysaccharide-meningococcal outer membrane protein complex conjugate vaccine is immunogenic in infants and children." J Infect Dis 172: 1273-1278.
64. Koivula, I., M. Stén, M. Leinonen and P.H. Mäkelä (1997). "Clinical efficacy of pneumococcal vaccine in the elderly: a randomized, single-blind population-based trial." Am J Med 103: 281-290.
65. Konadu, E.Y., J. Shiloach, D.A. Bryla, J.B. Robbins and S.C. Szu (1996). "Synthesis, characterization, and immunological properties in mice of conjugates composed of detoxified lipopolysaccharide of *Salmonella paratyphi* A bound to tetanus toxoid, with emphasis on the role of O-acetyls." Infect Immun 64 (7): 2709-2715.
66. Konadu, E.Y., F.-Y. C. Lin, V.A. Hó, N.T.T. Thuy, P.V. Bay, T.C. Thanh, H.B. Khiem, D.D. Trach, A.B. Karpas, J. Li, D.A. Bryla, J.B. Robbins and S.C. Szu (2000). "Phase I and phase 2 studies of *Salmonella enterica* serovar paratyphi A O-specific polysaccharide-tetanus toxoid conjugates in adults, teenagers, and 2- to 4-year-old children in Vietnam." Infect Immun 68 (3): 1529-1534.
67. Korkeila, M., H. Lehtonen, H. Ahman, O. Leroy, J. Eskola and H. Käyhty (2000). "Salivary anti-capsular antibodies in infants and children immunised with *Streptococcus pneumoniae* capsular polysaccharides conjugated to diphtheria or tetanus toxoid." Vaccine 18: 1218-1226.
68. Koskela, M., M. Leinonen, V.-M. Häivä, M. Timonen and P.H. Mäkelä (1986). "First and second dose antibody responses to pneumococcal polysaccharide vaccine in infants." Pediatr Infect Dis 5(1): 45-50.
69. Kossaczka, Z., J. Shiloach, V. Johnson, D.N. Taylor, R.A. Finkelstein, J.B. Robbins and S.C. Szu (2000). "*Vibrio cholerae* O139 conjugate vaccines: synthesis and immunogenicity of *V. cholerae* O139 capsular polysaccharide conjugates with recombinant diphtheria toxin mutant in mice." Infect Immun 68 (9): 5037-5043.
70. Kuper, C.F., P.J. Koornstra, D.M.H. Hameleers, J. Brewenga, B.J. Spit, A.M. Duijvestijn, P.J.C. van Breda Vriesman and T. Sminia (1992). "The role of nasopharyngeal lymphoid tissue." Immunol Today 13 (6): 219-224.

71. Kutteh, W.H. and J. Mestecky (1994). "Secretory immunity in the female reproductive tract." Am J Reprod Immunol 31: 40-46.
72. Kutteh, W.H. (1999). "Mucosal immunity in the human female reproductive tract." In: Ogra, P.L., J. Mestecky, M.E. Lamm, W. Strober, J. Bienenstock and J.R. McGhee (eds). Handbook Mucosal Immunology. Second edition. Academic Press. San Diego, CA.1423-1434.
73. Laemmli, U.K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature 227: 680-685.
74. Landesman, S.H. and G. Schiffman (1981). "Assessment of the antibody response to pneumococcal vaccine in high-risk populations." Rev Infect Dis 3 (Suppl): S184-197.
75. Lee, C.-J., S.D. Banks and J.P. Li (1991). "Virulence, immunity and vaccine resulted to *Streptococcus pneumoniae*." Crit Rev Microbiol 18: 89-114.
76. Lee, C.-J. and T.R. Wang (1994). "Pneumococcal infection and immunization in children." Crit Rev Microbiol 20(1): 1-12.
77. Lee, C.-J., T.R. Wang and S.S. Tai (1997). "Immunologic epitope, gene, and immunity involved in pneumococcal glycoconjugate." Crit Rev Microbiol 23(2): 121-142.
78. Lees, A., B.L. Nelson and J.J. Mond (1996). "Activation of soluble polysaccharides with 1-cyano-4-dimethylaminopyridinium tetrafluoroborate for use in protein-polysaccharide conjugate vaccines and immunological reagents." Vaccine 14(3): 190-198.
79. Leinonen, M. (1982). "Antibody responses against pneumococcal polysaccharide antigens in vaccinated persons." Ann Clin Res 14: 267-271.
80. Li, T.-K. and B.S. Fox (1998). "Cholera toxin B subunit binding to an antigen-presenting cell directly co-stimulates cytokines production from a T cell clone." Int Immunol 8: 1849-1856.
81. Lindberg, A.A. (1990). "Polysaccharide vaccines: Vaccines needed for the 1990s. New antibacterial strategies." HC New Churchill Livingstone. First edition. 69-85.
82. Lottenbach, K.R., C.M. Mink, S.J. Barenkamp, E.L. Anderson, S.M. Homan and D.C. Powers (1999). "Age-associated differences in immunoglobulin G1 (IgG1) and IgG2 subclass antibodies to pneumococcal polysaccharides following vaccination." Infect Immun 67 (9): 4935-4938.

83. Lü, F.X., Z. Ma, T. Rourke, S. Srinivasan, M. McChesney and C.J. Miller (1999). "Immunoglobulin concentrations and antigen-specific antibody levels in cervicovaginal lavages of rhesus macaques are influenced by the stage of the menstrual cycle." Infect Immun 67 (12): 6321-6328.
84. Lycke, N., U. Karlsson, A. Sjolander and K.E. Magnusson (1991). "The adjuvant action of cholera toxin is associated with an increased intestinal permeability for luminal antigens." Scand J Immunol 33: 691-698.
85. Lycke, N. (1997). "The mechanism of cholera toxin adjuvanticity." Res Immunol 148: 504-520.
86. MacDonald, T.T. (1999). "Effector and regulatory lymphoid cells and cytokines in mucosal sites." Current Topics in Microbiology and Immunology 236: 113-135.
87. MacPherson, G.G. and L.M. Liu (1999). "Dendritic cells and Langerhans cells in the uptake of mucosal antigens." Current Topics in Microbiology and Immunology 236: 33-53.
88. Marinaro, M., P.N. Boyaka, F.D. Finkelman, H. Kiyono, R.J. Jackson, E. Jirillo and J.R. McGhee (1997). "Oral but not parenteral interleukin (IL)-12 redirects T helper 2 (Th2)-type responses to an oral vaccine without altering mucosal IgA responses." J Exp Med 185: 415-427.
89. McCluskie, M.J. and H.L. Davis (1999). "Mucosal immunization with DNA vaccines." Microbes and Infection 1: 685-698.
90. McGhee, J.R., J. Mestecky, C.O. Elson and H. Kiyono (1989). "Regulation of IgA synthesis and immune response by T cells and interleukins." J Clin Immun 9 (3): 175-199.
91. McGhee, J.R., M.E. Lamm and W. Strober (1999a). "Mucosal immune responses: an overview." In: Ogra, P.L., J. Mestecky, M.E. Lamm, W. Strober, J. Bienenstock and J.R. McGhee (eds). Handbook Mucosal Immunology. Second edition. Academic Press. San Diego, CA. 485-506.
92. McGhee, J.R., C. Czerkinsky and J. Mestecky (1999b). "Mucosal vaccines: an overview." In: Ogra, P.L., J. Mestecky, M.E. Lamm, W. Strober, J. Bienenstock and J.R. McGhee (eds). Handbook Mucosal Immunology. Second edition. Academic Press. San Diego, CA. 741-757.

93. Mestecky, J. and P.N. Fultz (1999). "Mucosal immune system of the human genital tract." J Infect Dis 179(Suppl 3): S470-474.
94. Meyer, K. H., D. M. Behringer and R.W. Veh (1991). "Antibodies against neuroactive amino acids and neuropeptides. I. A new two-step procedure for their conjugation to carrier proteins and the production of an anti-Met-enkephalin antibody reactive with glutaraldehyde-fixed tissues." J Histochem Cytochem 39(6): 749-60.
95. Miller, C.J., J.R. McGhee and M.B. Gardner (1992). "Biology of disease. Mucosal immunity, HIV transmission, and AIDS." Lab Invest 68: 129-145.
96. Moldoveanu, Z., M.L. Clements, S.J. Prince, B.R. Murphy and J. Mestecky (1995). "Human immune responses to influenza virus vaccines administered by systemic or mucosal routes." Vaccine 13: 1006-1012.
97. Mond, J.J., A. Lees and C.M. Snapper (1995). "T cell-independent antigens type 2." Annu Rev Immunol 13: 655-92.
98. Monsigny, M., C. Petit and A.C. Roche (1988). "Colorimetric determination of neutral sugar by a resorcinol sulfuric acid micromethod." Anal Biochem 175:525-530.
99. Moreno-Fierros, L., N. García, R. Gutiérrez, L. Neri-Bazán, R. López-Revilla and R.I. Vázquez-Padrón (2000). "Intranasal, rectal and intraperitoneal immunization with protoxin CryIAc from *Bacillus thuringiensis* induces serum, intestinal, vaginal and pulmonary responses in Balb/c mice". Microbes and Infection 2: 1-6.
100. Mufson, M.A., H.E. Krause, G. Schiffman, D.F. Hughey (1987). "Pneumococcal antibody levels one decade after immunization of healthy adults." Am J Med Sci 293(5): 279-84.
101. Nashar, T.O., H.M. Webb, S. Eaglestone, N.A. Williams and T.R. Hirts (1996). "Potent immunogenicity of the B subunit of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin: receptor binding is essential and induces differential modulation of lymphocyte subsets." Proc Natl Acad Sci USA 93: 226-230.
102. Oeda, K., K. Inouye, Y. Ibuchi, K. Oshie, M. Shimizu, K. Nakamura, R. Nishioka, Y. Takada and H. Ohkawa (1989). "Formation of crystals of the insecticidal proteins of *Bacillus thuringiensis* subs. aizawai IPL7 in *Escherichia coli*." J Bacteriol 171: 3568-3571.

103. Ogra, P.L., D.T. Karzon, F. Righthand and M. MacGillivray (1968). "Immunoglobulin response in serum and secretions after immunization with live and inactivated poliovaccine and natural infection." N Engl J Med 279: 893-900.
104. Park, M.K., S. Yan, J.V. Olander, J.W. Hoffman and M. Nahm (1996). "The repertoire of human antibodies to the carbohydrate capsule of *Streptococcus pneumoniae* 6B." J Infect Dis 174: 75-82.
105. Peeters, C.C.A.M., A.-M. Tenbergen-Meekes, J.T. Poolman, M. Beurret, B.J.M. Zegers and G.T. Rijkers (1991). Effect of carrier priming on immunogenicity of saccharide-protein conjugate vaccine." Infect Immun 59: 3504-3510.
106. Peeters, C.C.A.M., P.R. Lagerman, O. Weers, L.A. Oomen, P. Hoogerhout, M. Beurret and J.T. Poolman (1996). "Polysaccharide-conjugate vaccines." In: Robinson, A., G.H. Farrar and C.M. Wiblin (eds). Methods in Molecular Medicine: Vaccine protocols. Humana press. Totowa, NJ. 111-133.
107. Pizov, R., M. Takahashi, C.A. Hirshman and T. Croxton (1992). "Halothane inhibition of ion transport of the tracheal epithelium. A possible mechanism for the anesthetic-induced impairment of mucociliary clearance." Anesthesiology 76: 985-989.
108. Poland, G.A. (1999). "The burden of pneumococcal disease: the role of conjugate vaccines." Vaccine 17: 1674-1679.
109. Porgador, A., H.F. Staats, Y. Itoh and B.L. Kelsall (1998). "Intranasal immunization with cytotoxic T-lymphocyte epitope peptide and mucosal adjuvant cholera toxin: selective augmentation of peptide-presenting dendritic cells in nasal mucosa-associated lymphoid tissue." Infect Immun 66 (12): 5876-5881.
110. Powers, D.C., E.L. Anderson, K. Lottenbach and C.M. Mink (1996). "Reactogenicity and immunogenicity of a protein-conjugated pneumococcal oligosaccharide vaccine in older adults." J Infect Dis 173(4): 1014-1018.
111. Prasad, S. and Y. Shethna (1975). "Enhancement of immune response by the proteinaceous crystal of *Bacillus thuringiensis* var *thuringiensis*." Biochim Biophys Res Commun 62: 517-523.
112. Prasad, S. and Y. Shethna (1976). "Mode of action of a purified antitumor protein from the proteinaceous crystal of *Bacillus thuringiensis* subsp. *thuringiensis* on Yoshida ascites sarcoma cells." Antimicrobial Agents and Chemotherapy 10: 293-298.

113. Rennels, M.B., K.M. Edwards, H.L. Keyserling, K.S. Reisinger, D.A. Hogerman, D.V. Madore, I. Chang, P.R. Paradiso, F.J. Malinoski and A. Kimura (1998). "Safety and immunogenicity of heptavalent pneumococcal vaccine conjugated to CRM197 in United States infants." Pediatrics 101(4 Pt 1): 604-611.
114. Robbins, J.B., R. Austrian, C.J. Lee, S.C. Rastogi, G. Schiffman, J. Henrichsen, P.H. Makela, C.V. Broome, R.R. Facklam, R.H. Tiesjema, *et al.* (1983). "Considerations for formulating the second-generation pneumococcal polysaccharide vaccine with emphasis on the cross-relative types within groups." J Infect Dis 148: 1136-1159.
115. Roberts, M., A. Bacon, R. Rappuoli, M. Pizza, I. Cropley, G. Douce, G. Dougan, M. Marinaro, J.R. McGhee and S. Chaffield (1995). "A mutant pertussis toxin molecule that lacks ADP-ribosyltransferase activity, PT9K/129G, is an effective mucosal adjuvant for intranasally delivered proteins." Infect Immun 63: 2100-2108.
116. Rodríguez, M.E., G.P. van den Dobbelen, L.A. Oomen, O. de Weers, L. van Buren, M. Beurret, J.T. Poolman and P. Hoogerhout (1998). "Immunogenicity of *Streptococcus pneumoniae* type 6B and 14 polysaccharide-tetanus toxoid conjugates and the effect of uncoupled polysaccharide on the antigen-specific immune response." Vaccine 16(20): 1941-1949.
117. Rodríguez-Orozco, A.R., R. López-Revilla, G. Rico-Rosillo and D. Carrasco-Daza (2000). "The adjuvant *Bacillus thuringiensis* CryIAC protoxin is a potent monocyte activator and mitogen." Manuscrito en preparación.
118. Rubins, J.B., M. Alter, J. Loch and E.N. Janoff (1999). "Determination of antibody responses of elderly adults to all 23 capsular polysaccharides after pneumococcal vaccination." Infect Immun 67 (11): 5979-5984.
119. Rudin, A., E.-L. Johansson, C. Bergquist and J. Holmgren (1998). "Differential kinetics and distribution of antibodies in serum and nasal and vaginal secretions after nasal and oral vaccination of humans." Infect Immun 66 (7): 3390-3396.
120. Russell, M.W., Z. Moldoveanu, P.L. White, G.J. Sibert, J. Mestecky and S.M. Michalek (1996). "Salivary, nasal, genital, and systemic antibody responses in monkeys immunized intranasally with a bacterial protein antigen and the cholera toxin B subunit." Infect Immun 64: 1272-1283.

121. Ryan, M., L. McCarthy, R. Rappuoli, B.P. Mahon and K.H.G. Mills (1998). "Pertussin toxin potentiates Th1 and Th2 responses to co-injected antigen: adjuvant action is associated with enhanced regulatory cytokine production and expression of the co-stimulatory molecules B7-1, B7-2, and CD28." Int Immunol 10: 651-662.
122. Ryan, E.J., E. McNeela, G.A. Murphy, H. Stewart, D. O'Hagan, M. Pizza, R. Rappuoli and K.H.G. Mills (1999). "Mutants of *Escherichia coli* heat-labile toxin act as effective mucosal adjuvants for nasal delivery of an acellular pertussis vaccine: differential effects of the nontoxic AB complex and enzyme activity on Th1 and Th2 cells." Infect Immun 67 (12): 6270-6280.
123. Schwartz, R.H., W.N. Khan and S. Akram (1991). "Penicillin and trimethoprim-sulfamethoxazole resistant pneumococci isolated from blood evalues of three infants in metropolitan Washington, D.C. A harbinger of terious future problems." Pediatr Infect Dis J 10: 782-783.
124. Secretaría de Salud, Ssa, Mex. <http://www.ssa.gob.mx/epide/>
125. Secretaría de Salud, Ssa, Mex. <http://www.ssa.gob.mx/unidades/dgied/sns/vitales/>
126. Seong, S.-Y., N.-H. Cho, I.C. Kwon and S.Y. Jeong (1999). "Protective immunity of microsphere-based mucosal vaccine a against lethal intranasal challenge with *Streptococcus pneumoniae*." Infect Immun 67(7): 3587-3592.
127. Shafer, D.E., B. Toll, R.F. Schuman, B.L. Nelson, J.J. Mond and A. Lees (2000). "Activation of soluble polysaccharides with 1-cyano-4-dimethylaminopyridinium tetrafluoroborate (CDAP) for use in protein-polysaccharide conjugate vaccines and immunological regents. II. Selective crosslinking of proteins to CDAP-activated polysaccharides." Vaccine 18: 1273-1281.
128. Shapiro, E.D., A.T. Berg, R. Austrian, D. Schroeder, V. Parcells, A. Margolis, R.K. Adair and J.D. Clemens (1991). "The protective efficacy of polyvalent pneumococcal polysaccharide vaccine." N Engl J Med 325: 1453-1460.
129. Shelly, M.A., H. Jacoby, G.J. Riley, B.T. Graves, M. Pichichero and J.J. Treanor (1997). "Companson of pneumococcal polysaccharide and CRM197-conjugated pneumococcal oligosaccharide vaccines in young and elderly adults." Infect Immun 65 (1): 242-247.
130. Shortndge, V.D., G.V. Doern, A.B. Brueggemann, J.M. Beyer and R.K. Flamm (1999). "Prevalence of macrolide resistance mechanisms in *Streptococcus pneumoniae* isolates from

- a multicenter antibiotic resistance surveillance study conducted in the United States in 1994-1995." Clin Infect Dis 29: 1186-1188.
131. Singh, M. and D. O'Hagan (1999). "Advances in vaccine adjuvants." Nat Biotechnol 17(11): 1075-1081.
132. Soininen, A., I. Seppälä, T. Nieminen, J. Eskola and H. Käyhty (1999). "IgG subclass distribution of antibodies after vaccination of adults with pneumococcal conjugate vaccines." Vaccine 17: 1889-1897.
133. Staats, H.F., R.J. Jackson, M. Marinaro, I. Takahashi, H. Kiyono and J.R. McGhee (1994). "Mucosal immunity to infection with implications for vaccine development." Curr Opin Immunol 6(4): 572-583.
134. Stack, A.M., R. Malley, C.M. Thompson, L. Kobzik, G.R. Siber and R.A. Saladino (1998). "Minimum protective serum concentrations of pneumococcal anti-capsular antibodies in infant rats." J Infect Dis 177: 986-990.
135. Stewart-Tull, D.E.S. (1996). "The use of adjuvants in experimental vaccine: IV ISCOMS." In: Robinson, A., G. Farr and C. Wiblin (eds). Methods in Molecular Medicine: Vaccine Protocols. Humana Press. Totowa, NJ. 153-155.
136. Takahashi, I., M. Marinaro, H. Kiyono, R.J. Jackson, I. Nakagawa, K. Fujihashi, S. Hamada, J.D. Clements, K.L. Bost and J.R. McGhee (1996). "Mechanisms for mucosal immunogenicity and adjuvancy of *Escherichia coli* labile enterotoxin." J Infect Dis 173: 627-635.
137. Thompson, A.H., J.G. McRoberts, S.R. Crowe, L. London, and S.D. London (1999). "Optional induction of upper respiratory tract immunity to reovirus I/L by combined upper and lower respiratory tract inoculation." Vaccine 17: 1404-1415.
138. Tochikubo, K., M. Isaka, Y. Yasuda, S. Kozuka, K. Matano, Y. Miura and T. Tuniguchi (1998). "Recombinant cholera toxin B subunit acts as an adjuvant for the mucosal and systemic responses of mice to mucosally co-administered bovine serum albumin." Vaccine 16 (2/3): 150-155.
139. Towbin, H., T. Stachelin and T. Gordo (1979). "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications." Proc Natl Acad Sci 76:4350-4354.

140. Van Dam, J.E.G., A. Flier and H. Snippe (1990). "Immunogenicity and immunochemistry of *Streptococcus pneumoniae* capsular polysaccharides." Antonie Van Leeuwenhoek 58: 1-47.
141. Vázquez-Padrón, R.I., D. Prieto, G.A. de la Riva and S. Housein (1996). "Development of an immunoradiometric assay for quantitative determination of CryIAb protein in transgenic sugarcane plants." J Immunol Meth 196: 33-39.
142. Vázquez-Padrón, R.I., L. Moreno-Fierros, L. Neri-Bazán, G.A. de la Riva and R. López-Revilla (1999a). "Intragastric and intraperitoneal administration of CryIAc protoxin from *Bacillus thuringiensis* induce systemic and mucosal antibody responses in mice." Life Sciences 64(21): 1897-1912.
143. Vázquez-Padrón, R.I., L. Moreno-Fierros, L. Neri-Bazán, G.A. de la Riva and R. López-Revilla (1999b). "*Bacillus thuringiensis* CryIAc protoxin is a potent systemic and mucosal adjuvant." Scand J Immunol 49: 578-584.
144. Vázquez-Padrón, R.I., J. González-Cabrera, C. García-Tovar, L. Neri-Bazán, R. López-Revilla, M. Hernández, L. Moreno-Fierros and G.A. de la Riva (2000). "CryIAc protoxin from *Bacillus thuringiensis* sp. *kurstaki* HD73 binds to surface proteins in the mouse small intestine." Biochemical and Biophysical Research Communications 271: 54-58.
145. Vella, P.P., S. Marburg, J.M. Staub, P.J. Kniskern, W. Miller, A. Hagopian, R.L. Tolman, C.M. Rusk, L.S. Chupak and R.W. Ellis (1992). "Immunogenicity of conjugate vaccine consisting of pneumococcal capsular polysaccharide types 6B, 14, 19F and 23F and a meningococcal outer membrane protein complex." Infect Immun 60: 4977-4983.
146. Vidarsson, G., I. Jonsdottir, S. Jonsson and H. Valdimarsson (1994). "Opsonization and antibodies to capsular and cell wall polysaccharides of *Streptococcus pneumoniae*." J Infect Dis 170: 592-599.
147. Vidarsson, G., S.T. Sigurdardottir, T. Gudnason, S. Kjartansson, K.G. Kristinsson, G. Ingolfssdottir, S. Jonsson, H. Valdimarsson, G. Schiffman, R. Schneerson and I. Jonsdottir (1998). "Isotypes and opsonophagocytosis of pneumococcus type 6B antibodies elicited in infants and adults by an experimental pneumococcus type 6B-tetanus toxoid vaccine." Infect Immun 66(6): 2866-70.

148. White, W.I., D.R. Cassatt, J. Madsen, S.J. Burke, R.M. Woods, N.M. Wassef, C.R. Alving and S. Koenig (1995). "Antibody and cytotoxic T-lymphocyte responses to a single liposome-associated peptide antigen." Vaccine 13(12): 1111-1122.
149. Williams, N.A., T.R. Hirst and T.O. Nashar (1999). "Immune modulation by the cholera-like enterotoxins: from adjuvant to therapeutic." Immunology Today 20(2): 95-101.
150. Wilschut, J., A. de Haan, H.J. Geerligs, J.P. Huchshorn, G.J.M. van Scharrenburg, A.M. Palache, K.B. Renegar and P.A. Small (1994). "Liposomes as a mucosal adjuvant system: an intranasal liposomal influenza subunit vaccine and the role of IgA in nasal anti-influenza immunity." J Liposome Res 4(1): 301-314.
151. Wilson, A.D., C.R. Stokes and F.J. Bourne (1989). "Adjuvant effect of cholera toxin on the mucosal immune response to soluble proteins." Scand J Immunol 29: 739-745.
152. Wong, S.S. (1991). "Homobifunctional cross-linking reagents." In: Chemistry of protein conjugation and cross-linking. CRC press. USA. 75-145.
153. World Health Organization, WHO. <http://www.WHO.int/infectious-disease-report/2000/>
154. Wu, H.-Y., E.B. Nikolova, K.W. Beagley and M.W. Russell (1996). "Induction of antibody-secreting cells and T-helper and memory cells in murine nasal lymphoid tissue." Immunology 88: 493-500.
155. Wu, H.-Y., H.H. Nguyen and M.W. Russell (1997a). "Nasal lymphoid tissue (NALT) as a mucosal immune inductive site." Scand J Immunol 46 (5): 506-513.
156. Wu, H.-Y., M.H. Nahm, Y. Guo, M.W. Russell and D.E. Briles (1997b). "Intranasal immunization of mice with PspA (pneumococcal surface protein A) can prevent intranasal carriage, pulmonary infection, and sepsis with *Streptococcus pneumoniae*." J Infect Dis 175: 839-846.
157. Yamamoto, M., J.L. Vancott, N. Okahashi, M. Marinaro, H. Kiyono, K. Fujihashi, R.J. Jackson, S.N. Chatfield, H. Bluethmann and J.R. McGhee (1996). "The role of Th1 and Th2 cells for mucosal IgA responses." Ann NY Acad Sci 778: 64-71.
158. Zahener, V., H. Momen, C.A. Salles and L. Rabinovitch (1989). "A comparative study of enzyme variation in *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*." J Appl Bact 67: 275-282.

159. Zegers, N., K. Gerritse, C. Deen, W. Boersma and E. Claassen (1990). "An improved conjugation method for controlled covalent coupling of syntetic peptides to proteins using glutaraldehyde in a dialysis method." J Immunol Methods 130 (2): 195-200.