

11281

24



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

"LA INMUNIZACIÓN CON *E. coli* QUE ACARREA EL PEPTIDO 323-339 DE OVA, INHIBE LA EOSINOFILIA PULMONAR, HIPERPLASIA DE CELULAS CALICIFORMES E INFLAMACIÓN EN UN MODELO MURINO DE ASMA ALERGICA"

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTORA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS "INMUNOLOGIA"

PRESENTA

SARA HUERTA YEPEZ

NOTA: APARECE UN PUNTO EN LA PARTE DE ABAJO EN TODA LA TESIS.

Tutor: Dr. César R. González Bonilla

MÉXICO, D.F.

2002

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 se realizó en la Unidad de Investigación Médica en Inmunología e Infectología. Hospital de Infectología "Dr. Daniel Méndez Hernández" Centro Médico Nacional "La Raza" IMSS, en el Departamento de Patología Experimental, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y de la Nutrición "Dr. Salvador Zubirán" y en el Departamento de Biomedicina Molecular, Centro de Investigación y Estudios Avanzados. IPN

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

①

Palabras clave: Balance Th1/Th2, asma, inflamación pulmonar, vectores bacterianos.

Abreviaturas utilizadas:

OVA	Ovalbumina
Alum	Hidróxido de aluminio en gel
LBA	Lavado bronquioalveolar
PBS	Buffer de fosfatos salino
SS	Solución salina
i.n.	Intranasal
i.t.	Intratraqueal
i.p.	Intraperitoneal
LPS	Lipopolisacárido
H/E	Hematoxilina y eosina
PAS	Acido periódico de Schiff
ACF	Adyuvante completo de Freud

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

INDICE

SUMMARY

1 RESUMEN	1
2 INTRODUCCION	2
3 OBJETIVOS E HIPÓTESIS	5
3.1 Objetivo general	
3.2 Objetivos particulares.	
3.3 Hipótesis	
4 MATERIAL Y METODOS	6
4.1 Ratones	
4.2 Anticuerpos	
4.3 Plásmidos	
4.4 Cepas bacterianas	
4.5 Cultivo de bacterias	
4.6 Construcción del plásmido pST13-OVA ₃₂₃₋₃₃₉	
4.7 Modelos experimentales para inducir asma	
4.8 Protocolo de sensibilización, vacunación y tratamiento	
4.9 Lavados bronquioalveolares (LBA)	
4.10 Análisis Histopatológico e inmunohistoquímico	
4.11 Análisis de transcripción de citocinas mediante RT-PCR	
4.12 Determinación de IgE e IgG2a específica para OVA mediante ELISA	
4.13 Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)	
4.14 Inmunoelectrotransferencia	
4.15 Citometría de flujo para identificación de proteínas en la superficie de bacterias	
4.15 Análisis estadístico	
5 RESULTADOS	13
5.1 Expresión de la proteína de fusión.	
5.2 Evaluación de los modelos experimentales para inducir inflamación pulmonar	
5.2.1 Determinación de la inflamación pulmonar	
5.2.2 Medición de la producción de moco por células caliciformes	
5.2.3 Análisis histológico e inmunohistoquímico	
5.2.4 Determinación de la eosinofilia en LBA	

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- 5.2.5 Análisis de los transcritos para IL-4 e IL-5 mediante RT-PCR
- 5.2.6 Determinación de los niveles de IgE específica para OVA
- 5.3 Tratamiento de ratones con *E.coli*-pST13-OVA₃₂₃₋₃₃₉ previamente sensibilizados con OVA
 - 5.3.1 Inhibición de la inflamación pulmonar
 - 5.3.1.1 Inhibición de la producción de moco por células caliciformes
 - 5.3.1.2 Análisis histológico
 - 5.3.2 Disminución de la eosinofilia en LBA
 - 5.3.3 inhibición de la expresión del RNAm para IL-5 e inducción de la expresión de IFN γ
 - 5.3.4 Niveles de IgE e IgG2a alergeno específica
- 5.4 Vacunación de ratones con *E.coli*-pST13-OVA₃₂₃₋₃₃₉ antes de ser sensibilizados con OVA
 - 5.4.1 Inflamación pulmonar
 - 5.4.1.1 Producción de moco por células caliciformes
 - 5.4.1.2. Análisis histológico
 - 5.4.2 Determinación de eosinofilia en LBA
 - 5.4.3 Evaluación de la expresión del RNAm para IL-5 e IFN γ .
 - 5.4.2 Niveles de IgE e IgG2a alergeno específica

5	DISCUSION DE RESULTADOS	23
7	SECCION DE FIGURAS	26
8	PERSPECTIVAS	51
9	REFERENCIAS	52

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

SUMMARY.

An *E. coli* strain expressing the ovalbumin (OVA) 323-329 allergenic peptide on the bacterial surface was evaluated for its ability to reduce the lung inflammatory response in mice allergic to OVA. BALB/c mice were rendered allergic by means of two intraperitoneal injections of OVA suspended in alum 5 days apart, and one intratracheal boost one week later. The mice were then treated with two intranasal, one week apart, doses of 4×10^9 *E. coli* UH302 transformed with plasmids pST13 or pST13-OVA₃₂₃₋₃₃₉, which bear the OmpC porin from *Salmonella enterica* serovar Typhi or the OmpC with the OVA allergenic 323-339 amino acid sequence inserted in the external loop 5. The allergic inflammatory reaction was evaluated on day 31, finding that mice treated with *E. coli* UH302-pST13-OVA reduced 4 to 7 times perivascular and peribronchial infiltrates, mucus production, goblet cell hyperplasia and eosinophils when compared with mice treated with *E. coli* UH302-pST13 or saline solution. These results were consistent with a significant decrease of IL-5 mRNA and induction of IFN- γ mRNA in cells from bronchio-alveolar lavages. Specific serum IgE anti-OVA was also reduced, although the decrease did not reach statistical significance. These results demonstrate that the bacterial live vector bearing an allergenic peptide successfully moderated two important components of allergy, pulmonary inflammation and mucus overproduction.

1. RESUMEN.

Con el propósito de conocer mejor el mecanismo de inducción del asma así como contar con mejores medidas terapéuticas contra esta enfermedad, se desarrolló un modelo murino experimental de este padecimiento utilizando ovalbúmina como alérgeno y se diseñó un tratamiento que disminuye la respuesta inflamatoria pulmonar, el cual consiste en la administración de *E. coli* que expresa el péptido alérgénico de OVA 323-339. El tratamiento es por vía intranasal (i.n.) con 1×10^5 bacterias que acarrean el péptido de OVA 323-339 en ratones previamente sensibilizados con OVA, inhibe de 4 a 5 veces el infiltrado inflamatorio en las áreas perivascular y peribronquial y reduce de manera muy importante la hiperplasia de células caliciformes. Los eosinófilos disminuyen de 4 a 7 veces si se compara con los ratones tratados con SS o con la bacteria que no expresa el antígeno de OVA. La inhibición de la inflamación pulmonar correlaciona con la inducción de la expresión del transcrito de $IFN\gamma$, disminución significativa del transcrito para IL-5 y con una pobre disminución en la producción de IgE específica para OVA. La inhibición de la respuesta Th2 en este modelo experimental, se debe a que el péptido alérgénico de OVA, expresado en el contexto de bacterias acarreadoras, conduce a una respuesta preferentemente Th1. Este es el primer reporte de tratamiento exitoso de asma inducido en un modelo experimental utilizando una vacuna bacteriana.

2 INTRODUCCION.

El asma constituye un problema de salud pública mundial. Es una enfermedad que en general no distingue grupos de raza ó condición socioeconómica. La información epidemiológica sobre el asma alérgica es variable de un país a otro; sin embargo; se indica que aproximadamente entre el 5 y 10 % de la población padece de esta enfermedad. En estados Unidos, 15 millones de personas sufren algún padecimiento relacionado a este desorden.¹ La Organización Mundial de la Salud (OMS) en 1995 situó al asma como la sexta enfermedad más prevalente en el mundo. En México no se dispone de cifras exactas; sin embargo; se calcula una población de entre 5 y 10 millones de asmáticos. En relación con la mortalidad por esta enfermedad, la tasa es baja contrastando con las altas cifras reportadas principalmente en países desarrollados.

Se han hecho avances muy importantes en la comprensión de la fisiopatología del asma y existen medicamentos cada vez más efectivos capaces de modificar el curso de la enfermedad. Sin embargo, el progreso en la identificación de los antígenos presentes en los alergenos ha sido una tarea muy compleja, por lo que el uso de vacunas específicas, cuyo objetivo es lograr que la producción de IgE alérgeno específica sea reemplazada por IgG, es muy limitada y continúa siendo una práctica empírica la utilización de extractos antigénicos crudos.

Por otro lado, se ha demostrado que la inmunoterapia con alergenos, mediante la administración de dosis crecientes de éstos, puede inhibir los síntomas clínicos y la producción de citocinas Th2 alérgeno específicas. Sin embargo, esta inmunoterapia clásica es útil para el tratamiento de rinitis y alergias a picaduras de insectos,²³ pero es poco efectiva para el asma alérgica, debido a que puede inducir reacciones sistémicas severas, exacerbar la enfermedad y puede producir shock anafiláctico ya que el alérgeno puede entrecruzar las IgE específicas unidas a las células cebadas.⁴

Los linfocitos T cooperadores CD4+ constituyen la pieza fundamental en la patogenia del asma, pues rigen del curso que ha de seguir la respuesta inmunológica adaptativa o antígeno específica, una vez que se establece la inducción de la respuesta inmune, que implica la captación, el procesamiento y la presentación de antígenos. Los linfocitos T CD4+ determinan, mediante las citocinas que producen, cuándo y cómo los otros elementos del sistema inmunológico siguen las trayectorias de la rama efectora humoral o celular.⁵

Dos subtipos principales de linfocitos T CD4+ se han descrito de acuerdo al perfil de citocinas que secretan.⁶ Los linfocitos Th1 producen principalmente IL-2 e IFN γ indispensables para el desarrollo de la inmunidad celular, en tanto que los linfocitos Th2 producen IL-4, IL-5 e IL-13, que tiene un papel fundamental en el progreso de la inmunidad humoral.⁷ Las citocinas tipo 2 participan en la patogenia de los fenómenos alérgicos, la IL-4 induce el cambio de isotipo de inmunoglobulinas hacia IgE, la IL-5 es el principal factor activador de eosinófilos y

la IL-13 induce hiperreactividad aérea y sobreproducción de moco por células caliciformes.^{8, 9, 10} Además, la producción de citocinas tipo 1 y tipo 2 se regula *in vivo* de manera recíproca y en ocasiones antagónica. El IFN γ , por ejemplo, inhibe el desarrollo de las células Th2.¹¹

La pérdida del balance Th1/Th2, en personas susceptibles con predisposición a desarrollar respuestas de tipo Th2, parece ser esencial en el desarrollo de los fenómenos alérgicos. En estudios clínicos se ha observado que los pacientes que cursan con infección por microorganismos que inducen respuestas Th1 como *Mycobacterium*¹² o *Listeria*¹³ se presenta una atenuación de la alergia y el asma. Por otro lado, se ha postulado sobre la base de los datos epidemiológicos del asma, que los individuos que crecen en ambientes más limpios y con menos infecciones bacterianas son más susceptibles a desarrollar asma y que esto se debe a una falta de estimulación de los linfocitos Th1.¹⁴

Consecuentemente, la estrategia más atractiva para la inmunoterapia de las alergias reside en la restitución del balance Th1/Th2, mediante la estimulación de respuestas Th1. Existen algunos modelos experimentales que han logrado modular Th1/Th2 mediante la administración de citocinas o sus antagonistas. El aumento de la respuesta Th1 y la disminución del asma, se ha confirmado administrando IL-12, IL-18 e IFN γ ^{15,16,17,18}, así como la reducción de eosinofilia pulmonar mediante anticuerpos contra IL-4 o IL-5.¹⁹ Ensayos clínicos se han realizado utilizando receptor soluble de IL-R administrado en aerosol con resultados prometedores. Sin embargo, los ensayos clínicos se han visto limitados por los efectos colaterales indeseables de las citocinas, labilidad y alto costo.

También regulación negativa de las células Th2 se ha demostrado mediante el empleo de vacunas de DNA que codifican para alérgenos; siempre y cuando contengan secuencias adyuvantes CpG bacterianas, que promueven respuestas Th1.²⁰ Por otro lado, una vacuna de DNA "mixta" que codifica para una proteína de fusión que contiene IL-18 (citocina Th1) y el alérgeno logró revertir la respuesta Th2 en un modelo de asma murino.²¹ Esta estrategia de inmunización génica resulta muy atractiva, ya que induce respuesta alérgeno específica. Sin embargo, el uso de vacunas de DNA en humanos todavía es muy limitado.

Otra alternativa para modular respuestas Th1/Th2 consiste en la utilización de bacterias atenuadas que funcionen como "vectores vivos" de antígenos.²² Teóricamente, estos vehículos transportan a los antígenos hasta las células presentadoras de antígeno (células dendríticas y macrófagos) induciendo el microambiente que lleva a la diferenciación de los linfocitos hacia el subtipo Th1. Por lo menos tres componentes bacterianos están implicados en la inducción de IL-12, fundamental en este proceso. El LPS induce estimulación señalizando a través de TLR-4, las secuencias CpG mediante TLR-9 y la péptido-glicana a través de TLR-2.²³ Así, la utilización de *S. typhi* como acarreador de la proteína CSP de *P. falciparum* logró inducir respuesta de linfocitos T CD8+ en humanos.²⁴ También *S. typhi* y *E. coli* se han utilizado como acarreadores de la proteína de fusión

OmpC y el epitopo NANP de *P. falciparum*, en donde la administración por vía oral de estas bacterias llevó a una respuesta de anticuerpos contra la proteína OmpC y contra los NANPs.²⁵

Por otro lado se sabe que la sensibilización con la proteína OVA o con el péptido inmunodominante 323-339 de OVA induce asma en modelos murinos.²⁶ Por ello, en este estudio la eficacia terapéutica de una bacteria que acarrea el péptido alergénico de OVA 323-339 se evaluó en un modelo experimental de asma en ratones. Mediante ingeniería genética se construyó una proteína de fusión que expresa el péptido alergénico de OVA 323 a 339 en una asa de la porina OmpC de *S. typhi*. Esta proteína se expresó en una cepa de *E. coli* carente de porina OmpC y, después de evaluar su expresión, se utilizó para tratar a ratones a los cuales previamente se les había sensibilizado mediante la administración de OVA.

Nuestros resultados muestran que la administración i.n. de una cepa de *E. coli* que acarrea el péptido de OVA en ratones previamente convertidos en asmáticos, promovió una disminución significativa del infiltrado inflamatorio pulmonar, de células caliciformes y de la expresión del transcrito de IL-5 por células de LBA, así como una modesta disminución de los niveles séricos de anticuerpos IgE alérgico específicos, comparado con los que recibieron solo con la bacteria acarreadora o con solución salina. Este estudio sugiere que las bacterias acarreadoras de péptidos alergénicos pueden disminuir la reactividad de células Th2 y consecuentemente el asma alérgica. Estos resultados sugieren que es posible la utilización de esta estrategia para desarrollar inmunoterapia contra la alergia en humanos.

3. OBJETIVOS E HIPOTESIS.

3.1 Objetivo general.

• Inhibir la respuesta de linfocitos T CD4+ Th2 mediante la inmunización bacteriana que acarrea la proteína de fusión OmpC-OVA₃₂₃₋₃₃₉ en un modelo murino de asma.

3.1.1 Objetivos particulares.

- Construir mediante métodos de Biología Molecular la bacteria que exprese la proteína de fusión OmpC de *Salmonella typhi* y el péptido 323-339 de OVA (OmpC- OVA₃₂₃₋₃₃₉).

- Evaluar si la vacunación con la bacteria acarreadora de la proteína de fusión OmpC-OVA₃₂₃₋₃₃₉ es capaz de inhibir la inflamación pulmonar, hiperplasia de células caliciformes, eosinofilia pulmonar y la producción de IgE específica para OVA en un modelo murino de asma.

- Evaluar si el tratamiento con la bacteria acarreadora de la proteína de fusión OmpC-OVA₃₂₃₋₃₃₉ es capaz de inhibir la inflamación pulmonar, hiperplasia de células caliciformes, eosinofilia pulmonar y la producción de IgE específica para OVA en un modelo murino de asma.

3.2 Hipótesis.

El tratamiento o la vacunación con una cepa de *E. coli* que acarrea la proteína de fusión OmpC de *Salmonella typhi* y el péptido 323-339 de OVA, a ratones previamente convertidos en asmáticos, es posible inhibir el fenómeno de hipersensibilidad a la OVA en un modelo murino. Esto debido a que la bacteria acarreadora contiene LPS y secuencias CpG de DNA, que induce la expresión de IL-12, IL-18 e IFN γ que promueven una respuesta de linfocitos T CD4+ Th1 alérgico específicos. Con lo que se logra la modulación de la respuesta Th2.

4. MATERIAL Y METODOS

4.1 Ratones

Ratones machos BALB/c de 6 a 8 semanas, libres de patógenos, se utilizaron en el bioterio del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y de la Nutrición "Dr. Salvador Zubirán", SSA.

4.2 Anticuerpos

Para los ensayos de ELISA se utilizaron anticuerpos monoclonales anti-IgE y anti-IgG2a de ratón conjugado a biotina (Zymed, San Francisco, CA. USA) y para revelar un conjugado estreptavidina-peroxidasa (Zymed).

Para la Inmunohistoquímica se utilizaron anticuerpos policlonales de cabra contra eotaxina 1 de ratón (R&D Systems Inc. Minneapolis, MN USA). Como segundo anticuerpo se utilizó un anticuerpo de conejo anti-IgG en cabra conjugado a biotina (DAKO corporation, Carpinteria, CA. USA), para aumentar la sensibilidad del método se empleó un complejo avidina fosfatasa alcalina y para revelar se utilizó el reactivo "New Fuchsin Subtrate" (DAKO).

4.3 Plásmidos

-pST13. Contiene el gene que codifica para la porina OmpC de *S. typhi*. (Amablemente donado por el Dr. Felipe Cabelllo New York Medical College Valhalla, NY. USA)

- pST13-OVA₃₂₃₋₃₃₉. Contiene una substitución en la región que codifica para el asa cinco de la porina OmpC por la secuencia que codifica para el péptido 323-339 de la OVA (La construcción se reporta en este trabajo)

4.4 Cepas bacterianas.

- *Escherichia coli* UH302. Cepa carente de porinas OmpA. OmpF y OmpC utilizada para expansión de los plásmidos.

- *Escherichia coli* UH302-pST13. Contiene el plásmido que codifica para la proteína OmpC de *Salmonella typhi*.

- *Escherichia coli* UH302-pST13-OVA₃₂₃₋₃₃₉. Expresa la proteína de fusión OmpC- péptido alérgico de OVA 323-339.

4.5 Cultivo de bacterias.

Las cepas bacterianas se crecieron en 5 ml de medio infusión cerebro corazón (BHI) (BIOXON) durante toda la noche a 37°C en agitación en un Enviro-Shaker (Lab-Line), al día siguiente 1 ml de este cultivo se adicionó a 100 ml de medio BHI

nuevo y se creció a 37°C con agitación hasta que se alcanzó la fase logarítmica (0.6 de D.O a 495 nm). Se agregaron 100 µg/ml de ampicilina cuando fue necesario. Después de alcanzar la fase logarítmica la bacteria fue lavada en dos ocasiones con solución salina (SS) estéril y cuantificada midiendo su densidad óptica a 540 nm. La cantidad de bacterias utilizada fue verificada mediante la realización de cuentas viables.

4.6 Construcción del plásmido pST13-OVA₃₂₃₋₃₃₉

El plásmido pST13 fue purificado a partir de *E. coli*-UH302-pST13 utilizando un sistema de purificación de ácidos nucleicos (CONCERT™ Rapid Plasmid Midiprep System, GIBCO BRL) y se procedió a amplificarlo completo, mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) (Vent_R DNA Polymerase; Biolabs, NEW ENGLAD) a partir de la secuencia que codifica para el asa 5 de la porina OmpC de *S. typhi*. Se utilizaron un par de oligonucleótidos híbridos los cuales contienen en su extremo 5' un sitio que reconoce una porción del asa 5 y además en la porción 3' se incluyó la secuencia que codifica para el péptido 323-339 de OVA y un sitio de corte SphI, diseñados como sigue

Sentido: 5'-ACATGCATGCAGCTCACGCTGAAATTAATGAAGC
TGGTAA AACGCTCGTCTGTACGGT-3'
antisentido: 5'-TCCCGATATCTGCATGCACAGCCTGGGAGATAGCGGTGT
TGTTCTGTC-3'

El producto de la PCR fue purificado utilizando columnas (GIBCO, BRL), posteriormente fue digerido con SphI y auto ligado (T₄ ligasa; Roche-Boheringer). El plásmido resultante pST13-OVA₃₂₃₋₃₃₉ (figura 1A) fue transformado en *E. coli*-UH302 mediante choque térmico. La verificación de la sustitución de la secuencia que codifica para asa cinco de la OmpC por la secuencia que codifica para el péptido OVA 323-339, se verificó mediante análisis de digestión del DNA plásmidico con diversas enzimas de restricción. La digestión con PvuI demostró que al realizar la sustitución se perdió un sitio de corte para esta enzima y la digestión con SphI demostró que se generó un nuevo sitio incluido en la secuencia del péptido de OVA 323-339. La expresión de la proteína de fusión OmpC-OVA₃₂₃₋₃₃₉ fue verificada mediante inmunoelectrotransferencia, utilizando un anticuerpo monoclonal anti-OmpC y un suero hiperinmune de conejo que previamente había sido inmunizado con un péptido sintético conteniendo la secuencia de OVA 323-339. (figura 1B).

4.7 Modelos experimentales para inducir asma.

Se desarrollaron cinco modelos para inducir inflamación alérgica pulmonar en ratones utilizando diferentes esquemas de sensibilización con OVA (grado V; Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA). Tres de estos esquemas han sido utilizados anteriormente como equivalentes de asma en el ratón.

Esquema 1 (E-1). Los ratones recibieron diariamente OVA al 1% en aerosol disuelto en SS, durante 20 minutos por 10 días consecutivos. Dos días después de la última exposición se determinó la respuesta inducida por el alérgeno (infiltrado inflamatorio a tejido pulmonar, niveles séricos de IgE específicas para OVA, expresión de IL-4, IL-5 y eotaxina).²⁷

Esquema 2 (E-2). Los ratones recibieron por vía i.p. 10 µg de OVA en un volumen de 200µl, a los 14 días se retaron con 100µl de una solución de OVA al 1.5% directamente en la tráquea. Diez días después recibieron OVA a la misma concentración de manera i.t. y después de cuatro días se determinó la respuesta inducida por el alérgeno.¹⁰

Esquema 3 (E-3). Los ratones recibieron 100µl de una suspensión que contenía 10µg de OVA en 1 mg de alum (SUPERFOS, Denmark), por vía i.p. los días 0 y 5, el día 12 fueron retados con OVA al 1% en aerosol por 1 hora en dos ocasiones, con un intervalo de 4 horas entre cada reto. Dos días después se determinó la respuesta inducida por el alérgeno.²⁸

Esquema 4. (E-4) Los ratones recibieron por vía i.p. 100µl de una suspensión de 10 µg de OVA en 1 mg de alum en los días 0 y 5. El día 12 fueron retados con 100µl de una solución de OVA al 0.75% de manera i.t. Cuatro días después del reto se determinó la respuesta de tipo Th2 inducida por el alérgeno.

Esquema 5 (E-5) Los ratones se inmunizaron por vía i.p con 100µl de una suspensión de 10µg de OVA en 1 mg de alum en los días 0 y 5. El día 12 y 22 fueron retados con 100µl de una solución de OVA al 0.75% de manera i.t. Cuatro días después se determinó la respuesta inducida por el alérgeno.

Grupos control. Cada grupo control recibió SS en lugar de OVA, de la misma manera que se describe en cada uno de los diferentes esquemas.

Colección de sueros. Se obtuvo sangre de los ratones de la vena axilar después de la sensibilización con los diferentes esquemas. La sangre se colectó a temperatura ambiente, centrifugada por 10 min a 3500 r.p.m. y el suero recolectado se almacena a -80°C.

4.8 Protocolo de sensibilización, vacunación y tratamiento.

Los ratones fueron sensibilizados de acuerdo al E-4. Cuatro días después del reto con OVA se determinó la respuesta de tipo Th2 inducida por el alérgeno.

Los grupos de ratones que fueron vacunados recibieron en los días 0 y 7 40µl de una suspensión de 1×10^{11} bacterias de SS por vía i.n. Posteriormente fueron sensibilizados de acuerdo al E-4 y el día 31 se sacrificaron. El protocolo de sensibilización y vacunación muestra en la figura 1C.

Los grupos de ratones que recibieron el tratamiento, después de ser sensibilizados recibieron en los días 20, 27 40µl de una suspensión de 1×10^{11} bacterias de SS

por vía i.n. y sacrificados en el día 31. El protocolo de sensibilización y tratamiento se muestra en la Figura 1C.

4.9 Lavados bronquioalveolares (LBA).

Los animales fueron sacrificados con CO₂. Por la traquea se introdujo una cánula, y los pulmones fueron lavados en seis ocasiones con 1 ml de SS. Las células obtenidas de los lavados fueron contadas usando un hematocitómetro, y la cuenta diferencial de las células fue determinada en frotis teñidos con Hematoxilina-Eosina (H/E). En cada preparación se analizaron 500 células utilizando microscopia de luz (X100 magnificaciones) basándose en los criterios morfológicos tradicionales.²⁹

4.10 Análisis Histopatológico e inmunohistoquímico.

Los animales utilizados para los análisis histológicos se sacrificaron por exanguinación, los pulmones se perfundieron desde la traquea con un 1 ml de etanol absoluto. Después de 24 hrs de fijación, los pulmones perfundidos fueron seccionados y embebidos en parafina. Secciones de 5 µm de grosor fueron teñidas con H/E o con ácido periódico de Schiff (PAS) para caracterizar la morfología del infiltrado y para la identificación de células productoras de moco (caliciformes). Para el análisis morfométrico se utilizó un analizador de imágenes Leica (Q5001W).³⁰

Para la localización Inmunohistoquímica de eotaxina, secciones seriadas de pulmón montadas en laminillas cubiertas con silano (Sigma) se desparafinaron. Después se trataron con recuperador antigénico (DAKO) durante 45 min y con suero de conejo libre de proteínas por 30 min. Las secciones se incubaron toda la noche a temperatura ambiente con anticuerpos policlonales de cabra contra eotaxina de ratón, diluidos 1:100 en TBS (Tris buffer salino pH 7.4). Las secciones se lavaron y se adicionó el segundo anticuerpo anti-IgG de cabra conjugado a biotina diluido 1:500 en TBS por 30 min. Después de otro lavado con TBS, se les adicionó el complejo avidina-fosfatasa alcalina por 10 min. Las secciones fueron contrateñidas con hematoxilina. Por último, las secciones se montaron utilizando resina y se examinarán por microscopia de luz.³¹

4.11 Análisis de transcripción de citocinas mediante RT-PCR.

A partir de tejido pulmonar o de células de LBA, el RNA total fue aislado usando TRIzol (GIBCO, BRL) de acuerdo a la técnica previamente descrita.³² Brevemente, se adicionó 1 ml de TRIzol a aproximadamente 100 mg de tejido pulmonar o al botón celular de los LBA, al homogeneizado se agregaron 200 µl de cloroformo y se mezcló (para el tejido pulmonar se utilizó un "poter" mecánico) después de 3 min, las muestras se centrifugaron a 12 000 xg, 20 min a 4°C. Posteriormente, la fase acuosa se recuperó en un tubo limpio al cual se le adicionó 500µl de isopropanol, se mezcló y se dejó a temperatura ambiente por 15 min. Después de

este tiempo las muestras se centrifugaron a 12 000 xg por 10 min a 4°C, se eliminó el sobrenadante y el botón fue lavado con 1 ml de etanol al 75%. El RNA fue resuspendido en 30 µl de agua tratada con DEPC y se incubó a 65°C durante 20 min. El RNA se cuantificó espectrofotométricamente a 260 nm.

La primera cadena de cDNA fue generada mediante transcripción reversa (RT) utilizando RT-AMV (Reverse Transcriptase, Avian Myeloblastosis Virus, Roche Molecular Biochemicals, La Jolla, CA. USA) y mezcla de hexanucleótidos (Roche) a partir de 1 µg de RNA total en 20µl de mezcla de reacción. El producto de la RT fue utilizado como molde para la amplificación por PCR usando oligonucleótidos específicos para IL-5, IFN γ y 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) por 40 ciclos utilizando el programa (94°C por 30 seg.; 57°C por 1 min; 72°C por 1.5 min.), de acuerdo a las secuencias de oligonucleótidos y el programa de amplificación previamente descritos^{33,34} en un termociclador (AMPLITOR II). Quince µl de los productos de PCR fueron visualizados en un gel de agarosa al 1.5%, teñido con bromuro de etidio. La amplificación del molde sin enzima RT-AMV en cada reacción se utilizó como control negativo de PCR. La expresión de la enzima GAPDH fue usada como control de la integridad y cantidad del RNA. El análisis densitométrico de las bandas se realizó utilizando el programa Sigma Gel.

4.12 Determinación de IgE e IgG2a específica para OVA mediante ELISA.

Los niveles séricos de IgE e IgG2a específica para OVA fueron determinados por ELISA, de acuerdo a la técnica previamente descrita²⁷ Brevemente, placas de microtitulación de 96 pozos (COSTAR) fueron sensibilizadas con OVA e incubados toda la noche a 4°C. Los pozos se bloquearon con PBS-leche al 5%, por 1 h a 37°C. 50 µl de los sueros diluidos 1:10 (para IgE) y 1:100 (para IgG2a en PBS-leche al 5% fueron adicionados a los pozos y se incubaron por 1 h a 37°C. Posteriormente, se adicionó el anticuerpo anti-IgE de ratón conjugado a biotina o el anticuerpo anti-IgG2a de ratón conjugados a peroxidasa y se incubó 1 hr a 37 C. Para la determinación de IgG2a además se adicionó el complejo streptavidina-peroxidasa (diluido 1:5000 y se incubó durante 1 h a 37°C. Entre cada periodo de incubación las placas fueron lavadas ocho veces con PBS-Tween 20 al 0.05%. Por último, se adicionó a la placa el sustrato OPD (Sanofi Diagnostic Paster) y se tomaron las lecturas a 495 nm.

4.13 Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE).

El análisis electroforético de las proteínas del extracto crudo de las diferentes cepas bacterianas se realizó en geles de poliacrilamida (LKB Instruments) en condiciones reductoras con un sistema de amortiguadores discontinuos, de acuerdo al método de Laemmli.³⁵ Como amortiguador de muestra se utilizó Tris 0.125 M pH 6.8, SDS al 2 %, β -mercaptoetanol al 5 %, glicerol al 10 % y azul de bromofenol al 0.005 %. Las bacterias fueron ajustadas a una concentración de 1×10^9 bacterias/ml, mezcladas con 30 µl de amortiguador de muestra y hervidas durante 10 min. El corrimiento electroforético se llevo a cabo durante 2 hrs

empleando 75 V. Posteriormente los geles fueron tenidos con una solución de azul de Coomasie R-250 al 0.25 % (Sigma), metanol-ácido acético-agua (45:10:45). Fueron desteñidos con una solución de metanol-ácido acético-agua (5:10:85).

4.14 Inmunoelctrotransferencia .

Las proteínas separadas mediante electroforesis fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa (Micron Hybon -C de Amersham), en una unidad de transferencia electrónica (LKB 2005 TRANSPHOR) durante 2 hrs. a 0.5 A de acuerdo al método de Towbin.³⁶ Posteriormente el papel de nitrocelulosa fue bloqueado con PBS-leche al 5% durante 1 hr. Posteriormente se le adicionó un anticuerpo anti-OmpC o un anticuerpo policlonal anti-péptido de OVA 323-339 diluidos 1:1000 durante 1 hr. a 37 C. Posteriormente se utilizó un anticuerpo anti-IgG de ratón o anti-IgG de conejo conjugado a peroxidasa (Zymed) diluido 1:100 durante 1 hr. a 37 C. La reacción fue revelada con 4-cloro naftol-H₂O₂; Entre cada incubación se realizaron 6 lavados con PBS-Tween al 0.05%.

4.15 Citometría de flujo para identificación de proteínas en la superficie de bacterias.

La identificación de proteínas en la superficie de bacterias se realizó de acuerdo a la metodología descrita previamente. Brevemente, las cepas bacterianas se crecieron en 5 ml de medio BHI a 37°C en agitación hasta que se alcanzó la fase logarítmica (0.6 de D.O a 495 nm) Se agregaron 100 µg/ml de ampicilina cuando fue necesario. Después de alcanzar la fase logarítmica las bacterias fueron lavadas en dos ocasiones con SS estéril y cuantificada midiendo su densidad óptica a 540 nm. La cantidad de bacterias utilizada fue verificada mediante la realización de cuentas viables, 1X10⁸ bacterias fueron lavadas en una ocasión con en 500 µl de PBS-BSA al 2%, después 100 µl de una dilución 1:1000 en PBS-BSA al 1% del suero hiperinmune de conejo anti-porinas o 100 µl de una dilución 1:100 del suero policlonal de conejo anti-péptido de OVA 323-339 fue adicionado al botón bacteriano, se mezcló gentilmente y se incubó a temperatura ambiente en agitación lenta durante 1 hr. Después se adicionó 100 µl de una dilución 1:100 en PBS-BSA al 1 % del anticuerpo anti-conejo conjugado a fluoresceína y se incubó a temperatura ambiente durante 1 hr. Entre cada incubación las bacterias fueron lavadas en 5 ocasiones con 500 µl de PBS-BSA al 1%, en cada lavada el botón bacteriano se resuspendió vigorosamente y se centrifugó a 12,000 g durante 10 min. Por último, se adicionó 500 µl PBS y 20 µl de yoduro de propidio (4 mg/L) a cada tubo y se determinó la expresión de las proteínas de superficie mediante citometría de flujo utilizando un equipo FACScan (Becton Dickinson, Mountain View, C.A.) 10³ bacterias fueron analizadas en cada muestra.

4.16 Análisis estadístico.

Todos los experimentos se realizaron de manera ciega y el código se rompió en presencia de un investigador no relacionado. Los resultados se expresaron como promedios \pm desviaciones estándar (DS). Para la comparación múltiple entre diferentes grupos se utilizó una prueba de ANOVA (Kruskal-Wallis); cuando esta prueba fue significativa, utilizamos la prueba de U Mann-Whitney para la comparación entre dos grupos individuales. Los datos fueron analizados mediante el software SPSS para Windows. Se estimó una p con valor \leq a 0.05 como significativa.

5 RESULTADOS.

5.1 Expresión de la proteína de fusión

La expresión de la proteína de fusión OmpC-OVA₃₂₃₋₃₃₉, se verificó transformando *E. coli*-UH302 con los plásmidos pST13 o pST13-OVA₃₂₃₋₃₃₉, las cepas transformadas se cultivaron en medio BHI con 100 µg de ampicilina, hasta la fase de crecimiento logarítmico (D.O de 0.6 a 540nm). 5X10⁸ bacterias fueron resuspendidas en 20 µl de amortiguador de muestra para proteína y llevadas a 100°C en baño de agua durante 8 min. Posteriormente, las proteínas fueron separadas mediante electroforesis y transferidas a una membrana de nitrocelulosa. Se utilizó un anticuerpo monoclonal anti-OmpC y un policlonal anti-OVA₃₂₃₋₃₃₉ para la verificación de la expresión de la proteína de fusión. La figura 1B muestra que existe expresión de la proteína OmpC en *E. coli*-pST13 y *E. coli*-pST13-OVA₃₂₃₋₃₃₉, pero no en *E. coli* sin plásmido. Cuando se verificó la expresión del péptido de OVA 323-339, solo se observó en *E. coli*-pST13-OVA₃₂₃₋₃₃₉, y no en *E. coli*-pST13 o *E. coli* sin plásmido. Lo que demuestra que la *E. coli*-pST13-OVA₃₂₃₋₃₃₉ esta expresando la proteína OmpC y el péptido de OVA 323-339. El tamaño de la proteína de fusión OmpC-OVA es semejante a la proteína nativa OmpC debido a que la secuencia OVA₃₂₃₋₃₃₉ no fue insertada, sino que substituyó a la secuencia que codifica para el asa cinco de la proteína OmpC nativa.

La proteína de fusión se encontraba en la superficie se verificó mediante análisis de citometría de flujo, en la tabla I se muestra que la expresión de la proteína OmpC se ve disminuida de manera significativa en la bacteria *E. coli*-pST13-OVA₃₂₃₋₃₃₉ comparada con la bacteria que expresa la OmpC nativa (*E. coli*-pST13), estos resultados son consistentes con otros trabajos que reportan que la expresión de esta proteína se ve afectada cuando se modifica su estructura en el asa cinco.²⁵ Sin embargo, esta modificación permite la expresión aun que disminuida de la proteína. Por otro lado la expresión del péptido 323-339 de OVA se observa que solo se pudo detectar una muy baja expresión en la superficie de la bacteria *E. coli*-pST13-OVA₃₂₃₋₃₃₉. Probablemente por que es un solo determinante antigenico el que se estaba buscando, además existe la posibilidad de que el péptido que substituyó al asa cinco de OmpC, cambie su estructura tridimensional y entonces el anticuerpo utilizado no la reconozca.

5.2 Evaluación de los modelos experimentales para inducir inflamación pulmonar.

Se evaluaron cinco modelos experimentales para inducir inflamación pulmonar en ratones utilizando OVA como alérgeno, tres de estos modelos (E-1, E-2 y E-3) descritos previamente, fueron comparados con dos variantes experimentales (E-4 y E-5) que se estandarizaron en nuestro laboratorio.

5.2.1 Determinación de la inflamación pulmonar.

La figura 2 muestra que la administración de SS en animales control indujo inflamación moderada de tipo mononuclear en el área peribronquial ($7000 \text{ m}\mu^2 \pm 628$) y perivascular ($3000 \text{ m}\mu^2 \pm 959$). La administración de OVA por medio de aerosol en animales no sensibilizados o la administración de OVA por inyección i.t. o aerosol en animales previamente sensibilizados con el mismo antígeno por vía i.p. con o sin aluminio, produjo un ligero incremento de la inflamación peribronquial y perivascular (figura 2A y 2B). En contraste, la sensibilización i.p. con OVA y aluminio acompañada de la inyección i.t. de una sola dosis de OVA indujo un incremento del 300% de la área de inflamación perivascular, y en animales con el mismo esquema de sensibilización pero con dos inyecciones i.t. de OVA produjo un incremento del área inflamatoria de 600% y 300% en el compartimiento perivascular y peribronquial respectivamente en comparación con los animales control (figura 2A y 2B).

5.2.2 Medición de la producción de moco por células caliciformes

En la figura 3 se muestra que la cuantificación automatizada de células caliciformes productoras de moco también correlacionó con la extensión del infiltrado inflamatorio producido por los diferentes esquemas para producir asma. En efecto, el porcentaje de células caliciformes producido por la administración de OVA en aerosol en ratones no sensibilizados produjo menos de 10% de células caliciformes. En contraste, animales sensibilizados con OVA y aluminio que recibieron dos inyecciones de OVA i.t. tuvieron más de 80% de células productoras de moco. Porcentajes menores pero de más del 50% de células moco productoras en el epitelio bronquial se observaron en los otros esquemas inductores de asma. Mientras que los grupos que recibieron solo SS el porcentaje de células productoras de moco fue del 0-4% en todos los esquemas.

5.2.3 Análisis histológico e inmunohistoquímico.

Las imágenes de las secciones de tejido pulmonar parafinado teñidas con H/E se muestra en la figura 4 de ratones sensibilizados con OVA con E-1, donde se observa una inflamación pulmonar leve (fig. 4A); en cambio, E-3 induce inflamación moderada (fig. 4D) y E-5 inflamación severa (fig. 4G). Por otro lado, las secciones teñidas con PAS para detectar mucina (producción de moco), muestran que escaso presenta material PAS-positivo en el lumen bronquial en los ratones sensibilizados con E-1 (fig. 4B), mientras que los sensibilizados con E-3 presenta mayor cantidad de este material (fig. 4E). Los ratones sensibilizados con E-5 muestran una abundante producción de moco que invade casi en su totalidad la luz del bronquio (fig. 4H). Es importante señalar que los ratones que recibieron solo SS con cualquiera de estos esquemas, no mostraron inflamación pulmonar y presentaron escaso material PAS-positivo (dato no presentado).

La expresión de eotaxina en las secciones pulmonares de los ratones sensibilizados con los diferentes esquemas se evaluó mediante inmunohistoquímica utilizando un

anticuerpo policlonal anti-eotaxina y revelando con un sistema basado en fosfatasa alcalina. No se observan células positivas para eotaxina en los ratones sensibilizados con E-1 (fig. 4C) y algunas células del endotelio bronquial positivas con E-3 (fig. 4F). En contraste, con E-5 se observan abundantes células del endotelio bronquial, además de macrófagos que están produciendo eotaxina (fig. 4I). Estos resultados muestran que la expresión de la eotaxina en tejido pulmonar es directamente proporcional al grado de inflamación pulmonar.

5.2.4 Determinación de la eosinofilia en LBA.

La cuantificación del infiltrado de eosinófilos en LBA de los ratones después de los diferentes esquemas de sensibilización con OVA comparados con los testigos que solo recibieron SS se muestra en la figura 5. El cálculo se realizó a partir de preparaciones de los LBA teñidos con H/E se identificaron morfológicamente 200 células. El porcentaje de eosinófilos en ratones sensibilizados con el E-1 se puede observar que no es significativamente diferente al control que solo recibió SS, 48 h después del último reto con el antígeno. En los animales sensibilizados con los E-2 y E-3, 96 h después del último reto, el porcentaje de eosinófilos aumenta significativamente con respecto a los controles ($p \leq 0.05$). Los valores obtenidos con estos dos esquemas de sensibilización son consistentes a los reportados anteriormente. Sin embargo, en los grupos de ratones inmunizados con E-4 y E-5 se induce una inflamación intensa no reportada con anterioridad, ya que el porcentaje de eosinófilos es mucho mayor con respecto a los controles, 5 veces más alto en el caso de E-4 y 8 veces para E-5 ($p \leq 0.05$).

5.2.5 Análisis de los transcritos para IL-4 e IL-5 mediante RT-PCR.

Los resultados de la RT-PCR para GAPDH, IL-5 e IL-4 de las células de tejido pulmonar de los ratones que fueron tratados con OVA o PBS con los diferentes esquemas utilizados para inducir asma se muestra en la figura 6. La presencia de bandas en el caso de GAPDH en todos los animales indica que la extracción de RNA y la síntesis de cDNA se realizó adecuadamente. La ausencia de banda en el control negativo indica que no existe contaminación de RNA al momento de realizar la síntesis de cDNA ya que en este control no se adicionó la enzima retrotranscriptasa, además, también muestra que no existe contaminación al momento de realizar la PCR. La presencia de bandas en IL-5 en el caso de los animales que recibieron el antígeno mediante E-2, E-3, E-4 y E-5 indica la presencia del transcrito, se observa que existe un aumento en su expresión cuando se sensibilizan los animales con E-4 y todavía más cuando se utiliza E-5. Estos resultados son consistentes con las cuentas diferenciales de LBA donde se muestra un aumento significativo en el porcentaje de eosinófilos en estos esquemas. Por otro lado la ausencia de la banda para IL-5 en los animales que fueron sensibilizados con E-1, indica la ausencia del transcrito para esta citocina, que es consistente con el hecho de que no se presentan infiltrado de eosinófilos en LBA en este esquema (figura 6).

5.2.6 Determinación de los niveles de IgE específica para OVA.

En la figura 7 se presentan los niveles séricos de IgE específica contra OVA medidos por ELISA. Los resultados muestran un aumento significativo en los niveles de IgE específica contra OVA en los grupos que fueron sensibilizados con OVA comparado con los controles ($p < 0.05$). Los grupos sensibilizados con E-1, E-2 y E-3 se observa que presentan una densidad óptica que va de 0.18 a 0.2, mientras que en E-4 y E-5 se puede observar una densidad óptica 5 veces mayor que en los otros esquemas ($p \leq 0.05$).

Estos datos demuestran que cuando los ratones son sensibilizados con E-1 y E-2, se induce inflamación pulmonar leve y un aumento discreto en los niveles de IgE alérgeno específica. Cuando E-3 se utiliza se induce inflamación pulmonar, infiltrado de eosinófilos, y un aumento discreto de IgE OVA. En contraste, cuando son sensibilizados con E-4 o E-5 la inducción de inflamación pulmonar severa, caracterizada por un infiltrado de eosinófilos abundante y un aumento muy importante en los niveles de IgE específica para OVA. Los resultados muestran claramente que hemos evaluado cinco modelos para inducir diferente grado de inflamación pulmonar, infiltrado de eosinófilos y niveles de IgE alérgeno específica, Tres de ellos descritos con anterioridad (E-1, E-2 y E-3) y dos reportados en este trabajo (E-4 y E-5), cuya patogenia es análoga al asma.

5.3 Tratamiento de ratones con *E.coli*-pST13-OVA₃₂₃₋₃₃₉ previamente sensibilizados con OVA.

Considerando el grado de severidad de la inflamación pulmonar que induce cada uno de los esquemas de sensibilización, se eligió el E-4 para evaluar la efectividad de la proteína de fusión OmpC-OVA₃₂₃₋₃₃₉ producida por *E. coli* UH302 para el tratamiento del asma.

5.3.1 Inhibición de la inflamación pulmonar.

Una vez que se comprobó que la bacteria *E.coli*-pST13-OVA₃₂₃₋₃₃₉ expresaba la proteína de fusión, se utilizó para tratar a ratones BALB/c sensibilizados con OVA de acuerdo al E-4. Las cepas *E.coli*-pST13 y *E.coli*-pST13-OVA₃₂₃₋₃₃₉ se administraron por vía i.n. en dos ocasiones de acuerdo al esquema de la figura 1C e incluyendo un grupo control con SS. La figura 8 muestra la evaluación del infiltrado inflamatorio celular, que se obtuvo mediante el análisis morfométrico de las secciones de tejido pulmonar teñidas con H/E. Para ello, de 5 a 8 secciones pulmonares fueron evaluadas en cada grupo, en cada sección se midió el infiltrado celular en 5 diferentes áreas perivasculares y 5

peribronquiales, los resultados representan el promedio del infiltrado de células por μm^2 en cada grupo. Los resultados muestran que el grupo de ratones sensibilizados con OVA y que fueron tratados con *E.coli*-pST13-OVA₃₂₃₋₃₃₉ una disminución significativa del infiltrado (5 veces menor) se observa comparada con los grupos que recibieron *E.coli*-pSt13 o SS ($p < 0.05$) y diferencia significativa cuando se compara con el grupo que no fue sensibilizado con OVA no se observa. Esta disminución se observa tanto en el área perivascular (fig. 7A), como en el área peribronquial (fig. 7B).

5.3.1.1 Inhibición de la producción de moco por células caliciformes.

La figura 9 muestra que se obtuvieron resultados similares cuando las secciones pulmonares fueron teñidas con PAS para la identificación de producción de mucina por células caliciformes en el epitelio pulmonar; para este experimento, el área que ocupa el material PAS-positivo fue medida utilizando un analizador de imágenes. De 5 a 8 secciones de tejido pulmonar fueron evaluadas en cada grupo incluyendo 5 campos por cada sección. Los resultados representan el promedio del área que ocupa el material PAS-positivo en $200 \mu\text{m}^2$ en cada grupo. Una disminución significativa (6 veces menor) en el grupo tratado con *E.coli*-pSt13-OVA₃₂₃₋₃₃₉ se observa que existe respecto a los grupos tratados con *E.coli*-pST13 o SS ($p < 0.05$) y no se observa diferencia cuando se compara con el grupo que no fue sensibilizado con OVA. Los resultados muestran que el tratamiento con *E.coli*-pST13-OVA₃₂₃₋₃₃₉, dan una marcada disminución en la inflamación pulmonar y producción de moco por células caliciformes inducida por OVA.

5.3.1.2 Análisis histológico

Las imágenes de las secciones pulmonares teñidas con PAS de los diferentes grupos de ratones se muestran en la figura 10. En los ratones sensibilizados con OVA y posteriormente tratados con *E.coli*-pST13 o SS se observa importante infiltrado inflamatorio que rodean los bronquios y arteriolas (fig. 8B y 8C), en comparación con las secciones pulmonares del grupo sensibilizado con OVA y tratado con *E.coli*-pST13-OVA₃₂₃₋₃₃₉ con escaso infiltrado inflamatorio (fig. 8D), muy parecido a la que se presenta en las secciones pulmonares del grupo de ratones control (fig. 8A). Así mismo, se muestra una marcada hiperplasia de células caliciformes, caracterizada por un aumento en el número, tamaño celular e intensidad en la tinción de PAS en el epitelio pulmonar de los ratones sensibilizados con OVA y tratados con SS o con *E.coli*-pSt13 (fig. 8B y 8C). En contraste, el grupo de ratones sensibilizados con OVA y tratados con *E.coli*-pST13-OVA₃₂₃₋₃₃₉ no se aprecia hiperplasia de células caliciformes (fig. 8D). Las observaciones histológicas demuestran que el tratamiento con *E.coli*-pST13-OVA₃₂₃₋₃₃₉ a ratones sensibilizados con OVA conduce a una disminución de la inflamación pulmonar y de la hiperplasia de células caliciformes en el epitelio pulmonar.

5.3.2 Disminución de la eosinofilia en LBA.

La valoración de la eosinofilia en LBA se presenta en la figura 11. Para este experimento, de 6 a 8 preparaciones de células de LBA por cada grupo fueron teñidas con H/E, identificando morfológicamente 500 células en cada preparación, mediante microscopía de luz (X100 magnificaciones). Los resultados representan el promedio de todas las preparaciones por grupo, expresados por mililitro de LBA. Los resultados en el número total de células y en número de macrófagos, linfocitos y neutrófilos no muestran diferencias significativas entre los diferentes grupos (dato no presentado). Sin embargo, en el grupo de ratones sensibilizados con OVA y posteriormente tratados con SS se observa un aumento dramático en el número de eosinófilos comparado con los ratones no sensibilizados. Por otro lado, en los ratones tratados con *E.coli*-pST13-OVA₃₂₃₋₃₃₉ se muestra una disminución significativa de la eosinofilia ($p < 0.05$). Este resultado muestra que el tratamiento con *E.coli*-pST13-OVA₃₂₃₋₃₃₉ es capaz de disminuir de manera sustancial la eosinofilia pulmonar en los ratones sensibilizados con OVA.

5.3.3 inhibición de la expresión del RNAm para IL-5 e inducción de la expresión de IFN γ .

Los resultados de la RT-PCR para analizar los transcritos de IL-5, IFN γ y GAPDH en células de LBA en los diferentes grupos de ratones se muestran en la figura 12. En el grupo de ratones no sensibilizados (controles negativos) no se observó la expresión IL-5 ni IFN γ , la integridad del RNAm fue verificada con la amplificación del gene constitutivo GAPDH. La sensibilización con OVA estimuló en los ratones un marcado aumento en la expresión del transcrito para IL-5, en ausencia de expresión de IFN γ , que es consistente con una respuesta de linfocitos Th2. Cuando los ratones sensibilizados con OVA fueron tratados con *E.coli*-pST13 o SS no se observaron cambios significativos en la expresión del transcrito para IL-5. Sin embargo, el tratamiento con *E.coli*-pST13-OVA₃₂₃₋₃₃₉ provocó una disminución significativa en la expresión del transcrito para IL-5, si se compara con los demás grupos. Por otro lado, también se observa que el tratamiento con *E.coli*-pST13 o con *E.coli*-pST13-OVA₃₂₃₋₃₃₉ induce la expresión del transcrito para IFN γ , este resultado puede ser explicado con el hecho de que ambas cepas de bacterias contienen LPS que se sabe es promotor de la respuesta Th1. No obstante, el tratamiento con *E.coli*-pST13-OVA₃₂₃₋₃₃₉ no solo induce la expresión de IFN γ , sino que produce una inhibición de la expresión de IL-5, dicha disminución es específica y puede atribuirse a que la bacteria acarrea al péptido alergénico de OVA, ya que es lo único que diferencia a las dos cepas bacterianas. Estos resultados fueron consistentes con el análisis densitométrico de las bandas comparando las bandas de las citocinas con la banda de amplificación de GAPDH (figura 13). Los resultados anteriores demuestran que el tratamiento con *E.coli*-pST13-OVA₃₂₃₋₃₃₉ induce una disminución importante en la expresión del transcrito para IL-5 y también induce un la expresión del transcrito de IFN γ .

5.3.4 Niveles de IgE e IgG2a alergeno especifica.

Grupos de 10 ratones BALB/c fueron sensibilizados con OVA y tratados con *E.coli*-pST13, SS o con *E.coli*-pST13-OVA₃₂₃₋₃₃₉ como se describe en la figura 1D. Noventa y seis horas después del último tratamiento se determinaron los niveles de IgE e IgG2a específicos contra OVA. En la figura 14A se observa que no existen diferencias significativas entre los grupos experimentales. A pesar de ello, existe una tendencia a la disminución en los niveles de IgE específica para OVA en los ratones tratados *E.coli*-pST13-OVA₃₂₃₋₃₃₉, resultado consistente dos experimentos independientes.

Los niveles en sueros de anticuerpos IgG2a específicos que no fue posible detectar para OVA en ninguno de los grupos experimentales (figura 14B). Por otro lado, niveles altos IgG2a en el suero de los ratones que recibieron OVA con ACF por vía i.p. fueron detectados .

Los resultados obtenidos en la determinación de IgE e IgG2a específica para OVA indican que el tratamiento con *E.coli*-pST13-OVA₃₂₃₋₃₃₉ no induce una respuesta Th1, pero sí una disminución en la respuesta Th2.

5.4 Vacunación de ratones con *E.coli*-pST13-OVA₃₂₃₋₃₃₉ antes de ser sensibilizados con OVA.

Considerando el grado de severidad de la inflamación pulmonar que induce cada uno de los esquemas de sensibilización, se eligió el E-4 para evaluar la efectividad de la proteína de fusión OmpC-OVA₃₂₃₋₃₃₉ producida por *E. coli* UH302 como vacuna para el asma, debido a que la inflamación pulmonar es muy clara y no están severo. Pues si se tiene una inflamación muy severa se corre el riesgo de ya no poder revertir el proceso.

5.4.1 Inflamación pulmonar.

Una vez que se comprobó que la bacteria *E.coli*-pST13-OVA₃₂₃₋₃₃₉ expresaba la proteína de fusión, se utilizó para vacunar a ratones BALB/c antes de que fueran sensibilizados con OVA de acuerdo al E-4. Las cepas *E.coli*-pST13 y *E.coli*-pST13-OVA₃₂₃₋₃₃₉ se administraron por vía i.n. en dos ocasiones de acuerdo al esquema de la figura 1C e incluyendo un grupo control con SS. La figura 15 muestra la evaluación del infiltrado inflamatorio celular, que se obtuvo mediante el análisis morfométrico de las secciones de tejido pulmonar teñidas con H/E. Para ésto, de 5 a 8 secciones pulmonares fueron evaluadas en cada grupo, en cada sección se midió el infiltrado celular en 5 diferentes áreas perivasculares y 5 peribronquiales, los resultados representan el promedio del infiltrado de células por μm^2 en cada grupo. Los resultados muestran que el grupo de ratones vacunados con *E.coli*-pST13-OVA₃₂₃₋₃₃₉ y posteriormente sensibilizados con OVA presentan una disminución no significativa del infiltrado si se compara con los grupos que recibieron *E.coli*-pSt13 o SS ($p > 0.05$). Estos resultados fueron consistentes tanto en el área perivascular (fig. 15A), como en el área peribronquial (fig. 15B).

5.4.2 Producción de moco por células caliciformes.

Resultados similares que se obtuvieron cuando las secciones pulmonares fueron teñidas con PAS para la identificación de producción de mucina por células caliciformes en el epitelio pulmonar; para este experimento, el área que ocupa el material PAS-positivo fue medida utilizando un analizador de imágenes como lo muestra la figura 16. De 5 a 8 secciones de tejido pulmonar fueron evaluadas en cada grupo incluyendo 5 campos por cada sección. Los resultados representan el promedio del área que ocupa el material PAS-positivo en $200 \mu\text{m}^2$ en cada grupo. No existe una disminución significativa en el grupo tratado con *E.coli*-pSt13-OVA₃₂₃₋₃₃₉ respecto a los grupos tratados con *E.coli*-pST13 o SS ($p > 0.05$), como se observa en la figura 15. Los resultados demuestran que la vacunación con *E.coli*-pST13-OVA₃₂₃₋₃₃₉, antes de la sensibilización con OVA no produce una disminución de la inflamación pulmonar y producción de moco por células caliciformes inducida por OVA. Sin embargo, si existe una tendencia muy clara a inducir disminución de dichos procesos (resultados consistentes en dos experimentos independientes).

5.4.1.1. Análisis histológico.

Las imágenes de las secciones pulmonares teñidas con PAS de los diferentes grupos de ratones se muestran en la figura 17. En los ratones vacunados con *E.coli*-pST13 o SS y posteriormente sensibilizados con OVA se observa importante infiltrado inflamatorio que rodea los bronquios y arteriolas (fig. 17B y 17C), en comparación con las secciones pulmonares del grupo vacunado tratado con *E.coli*-pST13-OVA₃₂₃ donde se observa una discreta disminución del infiltrado inflamatorio (fig. 17D) Sin embargo, esta disminución no es muy clara si se compara con las secciones pulmonares del grupo de ratones control (fig. 17A). Así mismo, se muestra una marcada hiperplasia de células caliciformes caracterizado por un aumento en el número, tamaño celular e intensidad en la tinción de PAS en el epitelio pulmonar de los ratones vacunados SS o con *E.coli*-pSt13 (fig. 17B y 17C) y posteriormente sensibilizados con OVA; en contraste, el grupo de ratones vacunados con *E.coli*-pST13-OVA₃₂₃₋₃₃₉ y sensibilizado posteriormente con OVA no se aprecia una hiperplasia de células caliciformes tan marcada (fig. 17D). Pero dicha disminución no es muy clara si se compara con los ratones no sensibilizados (fig 17A). Las observaciones histológicas demuestran que la vacunación con *E.coli*-pST13-OVA₃₂₃₋₃₃₉ a ratones antes de la sensibilización con OVA no induce una disminución significativa de la inflamación pulmonar y de la hiperplasia de células caliciformes en el epitelio pulmonar. Sin embargo, también se observa una tendencia muy clara a inducir disminución de dichos procesos (resultados consistentes en dos experimentos independientes).

5.4.2 Determinación de eosinofilia en LBA.

La valoración de la eosinofilia en LBA se presenta en la figura 18. Para este experimento, de 6 a 8 preparaciones de células de LBA por cada grupo fueron teñidas con H/E, identificando morfológicamente 500 células en cada preparación, utilizando microscopía de luz (X100 magnificaciones). Los resultados representan el promedio de todas las preparaciones por grupo, expresados por mililitro de LBA. Los resultados muestran que los ratones vacunados con SS y posteriormente sensibilizados con OVA presentan un aumento dramático en el número de eosinófilos comparado con los ratones no sensibilizados. Por otro lado, en grupo de ratones vacunados con *E.coli*-pST13 o con *E.coli*-pST13-OVA₃₂₃₋₃₃₉ se observa una disminución no significativa en la eosinofilia, ($p > 0.05$). Este resultado apoya que la vacunación con *E.coli*-pST13-OVA₃₂₃₋₃₃₉ antes de la sensibilización de los ratones, no induce la inhibición de la eosinofilia pulmonar en los ratones.

5.4.3 Evaluación de la expresión del RNAm para IL-5 e IFN γ .

Los resultados de la RT-PCR para analizar los transcritos de IL-5, IFN γ y GAPDH en células de LBA en los diferentes grupos de ratones la figura 19 muestra. En el grupo de ratones no sensibilizados (controles negativos) no se observó la expresión IL-5 ni IFN γ , pero la integridad del RNAm fue verificada con la amplificación del gene constitutivo GAPDH. La sensibilización con OVA estimuló en los ratones un marcado aumento en la expresión del transcrito para IL-5, en ausencia de expresión de IFN γ , que es consistente con una respuesta de linfocitos Th2. Cuando los ratones fueron vacunados con SS o *E.coli*-pST13 y posteriormente sensibilizados, no se observaron cambios significativos en la expresión del transcrito para IL-5. Los resultados fueron similares cuando se vacunó con *E.coli*-pST13-OVA₃₂₃₋₃₃₉ ya que se observó una disminución significativa en la expresión del transcrito para IL-5, si se compara con los demás grupos. Por otro lado, también se observa que el tratamiento con *E.coli*-pST13 o con *E.coli*-pST13-OVA₃₂₃₋₃₃₉ induce la expresión del transcrito para IFN γ , este resultado como ya se había comentado, puede ser explicado con el hecho de que ambas cepas de bacterias contienen LPS que se sabe es promotor de la respuesta Th1. Los resultados anteriores demuestran que la vacunación con *E.coli*-pST13-OVA₃₂₃₋₃₃₉ no induce una disminución importante en la expresión del transcrito para IL-5.

5.4.4 Niveles de IgE e IgG2a alergeno específica.

Grupos de 10 ratones BALB/c fueron vacunados con *E.coli*-pST13, SS o con *E.coli*-pST13-OVA₃₂₃₋₃₃₉ y posteriormente sensibilizados con OVA como se describe en la figura 1D. Noventa y seis horas después de que fueron sensibilizados se estimaron los niveles de IgE específicos contra OVA. En la figura 20A se observa que no existen

diferencias significativas entre los grupos experimentales. A pesar de ello, existe una tendencia a la disminución en los niveles de IgE específica para OVA en los ratones vacunados con *E.coli*-pST13-OVA₃₂₃₋₃₃₉, resultado consistente dos experimentos independientes. La figura 20B muestra que no pudimos detectar anticuerpos IgG2a específicos para OVA en el suero de ninguno de los grupos experimentales. Sin embargo, altos niveles de IgG2a en el suero de los ratones que recibieron OVA con ACF por vía i.p. fueron detectados.

Los resultados obtenidos indican que el tratamiento con *E.coli*-pST13-OVA₃₂₃₋₃₃₉ no induce una respuesta Th1, pero si una disminución en la respuesta Th2.

6 DISCUSION DE RESULTADOS.

Este estudio demuestra que el tratamiento por vía i.n. con bacterias que acarrean el péptido alergénico de OVA (323-339) originalmente descrito como un "epitopo" para linfocitos Th2, induce *in vivo* una disminución muy importante de la eosinofilia de LBA, de la hiperplasia de células caliciformes y de la inflamación pulmonar en un modelo murino de asma alérgica. Aunque no fue posible demostrar una clara respuesta de tipo Th1 ya que no se encontraron anticuepos IgG2a (figura 11B), si se observa una disminución de la respuesta Th2. Los resultados sugieren que un mismo antígeno presentado en un contexto diferente puede inducir respuestas distintas. El péptido alérgico de OVA en el contexto de una proteína de membrana externa, acarreado por una bacteria y administrado por vía i.n. indujo una inhibición de la respuesta Th2.

El efecto terapéutico de esta bacteria "candidato a vacuna" es muy posiblemente a una modulación del balance Th1/Th2 y puede ser explicado por diversos mecanismos. Es probable que los macrófagos estén involucrados, ya que se ha demostrado que promueven respuestas Th1 cuando producen IL-12, esta citocina inhibe la expresión de IL-4 e induce la síntesis de IFN γ . No obstante, se sabe también que tienen un efecto "inmunosupresor" de células T mediado por la producción de NO y PG2. Estas actividades paradójicas reflejan la heterogeneidad en estas células y que pueden diferenciarse de acuerdo a la influencia del IFN γ o de otra citocinas como M-CSF.^{37, 38}

Los macrófagos pulmonares son capaces de disminuir las reacciones alérgicas cuando inducen una respuesta Th1 en la mucosa bronquial que antagoniza a la respuesta Th2 alérgico específica. Las bacterias pueden activar al macrófago debido a que contienen patrones moleculares reconocidos de manera natural por el sistema inmune (PAMPS, pathogen associated molecular patterns), entre las que se incluyen al LPS, la peptidoglicana y los "motivos" CpG en su DNA, que inducen de manera muy eficiente la producción de IFN γ . Se ha demostrado que el IFN γ puede inhibir la inducción de eosinofilia pulmonar y el aumento de la resistencia aérea (ARA) cuando se aplica directamente en la mucosa pulmonar.³⁹ Además, Los "motivos" CpG en el DNA inducen la producción de IL-12, que induce la producción de IFN γ , y promueve la expresión de receptores para IL-18 en las células T, lo cual puede inhibir la eosinofilia pulmonar y HRA en modelos murinos de asma.⁴⁰ En diversos estudios se ha establecido que los CpG del DNA son capaces además de inducir activación de los macrófagos y producción de citocinas proinflamatorias, pueden promover la activación de las células dendríticas, incluyendo la sobrerregulación de proteínas clase II del MHC, actuar como moléculas coestimuladoras e inducir la proliferación de policlonal de linfocitos B.

El sistema inmune detecta de manera natural a los PAMPS mediante receptores específicos (PRR, pattern recognition receptors). Entre estos receptores, los que

pertenecen a la familia de los TLRs (Toll like receptors), recientemente han sido identificados como los sensores cruciales de infección capaces de reconocer el origen microbiano e inducir la activación de la respuesta inmune e inflamatoria.⁴¹ De los diez TLRs identificados en mamíferos, ha sido posible caracterizar funcionalmente a dos de ellos. El TLR4 es un receptor involucrado en el reconocimiento del LPS de bacterias Gram negativas (*Salmonella* y *E. coli*) ha sido demostrado, mientras que el TLR2 participa en el reconocimiento de los peptidoglicanos y lipoproteínas bacterianas.⁴² Aunque el TLR9 es absolutamente requerido para todas las respuestas celulares inducidas por CpGs del DNA se ha demostrado, que no ha sido posible establecer su localización celular.⁴³

Por todo lo anterior, es razonable pensar que un antígeno administrado en el contexto de una bacteria, inducirá preferentemente una respuesta de tipo Th1 y es consistente con nuestra observación de que el tratamiento con bacterias que acarrean el péptido de OVA 323-339 fue capaz de inhibir la eosinofilia en LBA, la hiperplasia de células caliciformes y la inflamación pulmonar en un modelo de asma.

En este estudio también se compararon cinco modelos para inducir inflamación pulmonar con diferentes grados de severidad. Estos modelos permitirán el estudio de la fisiopatología del asma y la disección del papel que tienen cada uno de los elementos de la respuesta inmune, como son los linfocitos, las citocinas, otras células y mediadores. En la variante experimental que describimos en este trabajo mostramos que existe un infiltrado celular perivascular y peribronquial muy abundante; además; de características morfológicas de bronco constricción, lo cual no se observa en los otros modelos de asma anteriormente descritos (figuras. 2, 3, 4, 5 y 6). Observación que es relevante cuando se trate de trasladar la fisiopatología al ser humano, pues se ha reportado que pacientes con diferentes grados de severidad de asma, presentan también diferente intensidad de inflamación pulmonar.⁴⁴

Las variantes experimentales para inducir inflamación pulmonar propuestas en este estudio tienen varias ventajas. Primero, son fáciles de realizar y son reproducibles; segundo, no requieren de inmunizaciones múltiples; y tercero, se inducen lesiones pulmonares similares al asma severa en humanos. Sin embargo, el presente estudio adolece también de limitaciones. No fue posible evaluar el desarrollo de resistencia aérea, desorden fundamental en el asma, por lo que es posible afirmar con seguridad que los modelos probados reflejen diferentes grados de severidad de asma donde puede haber bronco espasmo importante aún en ausencia de un proceso inflamatorio severo. Sin embargo, se sabe que una característica muy importante tanto clínica como inmunológica asociada con el asma es la inflamación pulmonar. Aunque el desarrollo de la reactividad aérea es independiente del desarrollo de la inflamación pulmonar, existen evidencias importantes de que la inflamación generalmente es requerida para que la reactividad aérea ocurra. La respuesta asmática temprana se caracteriza por la acumulación de linfocitos T CD4⁺ productores de citocinas que promueven la actividad de células B y eosinófilos, el edema rápido: en la mucosa, el

estrechamiento de las vías aéreas y la de granulación de células cebadas. En cambio, la respuesta asmática tardía es caracterizada por la migración de eosinófilos y linfocitos de la sangre hacia el parénquima pulmonar y el epitelio de las vías aéreas. En ambas respuestas, la producción de mediadores vasoactivos, factores quimiotácticos y citocinas que promueven la respuesta inmune de tipo Th2 (IL-4, IL-5 e IL-13) contribuyen al desarrollo de la reactividad aérea y la obstrucción aérea.

Por otro lado, el análisis estadístico de los resultados obtenidos cuando se vacunaron ratones con la bacteria acarreadora pre sensibilización con OVA, muestran que no se logró inhibir el proceso inflamatorio pulmonar, la hiperplasia de células caliciformes, ni la eosinofilia pulmonar de manera significativa (figuras 11, 12, 13 y 14). Nosotros consideramos que fue debido a que no se utilizó la dosis adecuada, ya que fue posible demostrar una tendencia clara a disminuir en todos estos procesos, lo que indica que muy probablemente el utilizar otras dosis podrían inhibir el fenómeno inflamatorio, como sucedió cuando tratamos con la bacteria acarreadora después de la sensibilización con OVA.

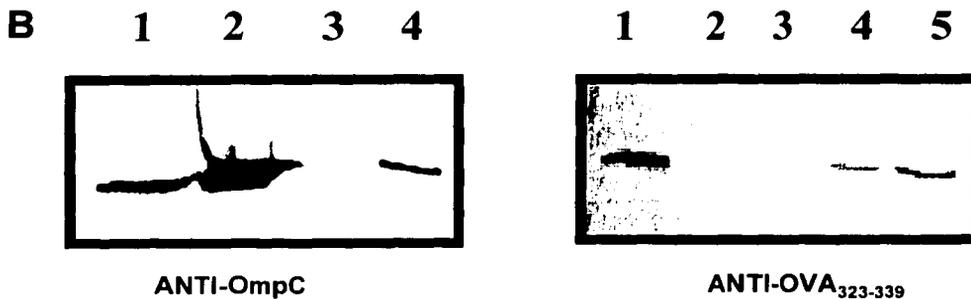
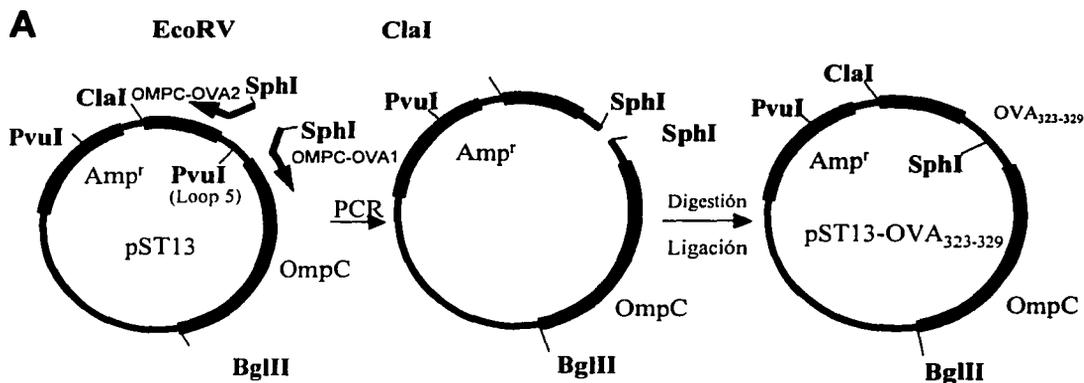
En resumen, nuestros resultados muestran, que la evaluación de varios modelos para inducir inflamación pulmonar abre la posibilidad de evaluar su fisiopatología posibles procedimientos para modularla y trasladar estas observaciones al diseño de mejores tratamientos en humanos. Pero más importantemente, se muestra por primera vez la capacidad de las bacterias acarreadoras de alergenos para atenuar la inflamación alérgica en un modelo murino, debido a que promueven la respuesta Th1 en el sitio de inflamación y antagonizan la respuesta Th2 inducida por el alergen. Estas bacterias acarreadoras de alergenos representan una terapia potencial de los desordenes alérgicos como el asma.

7 SECCION DE FIGURAS

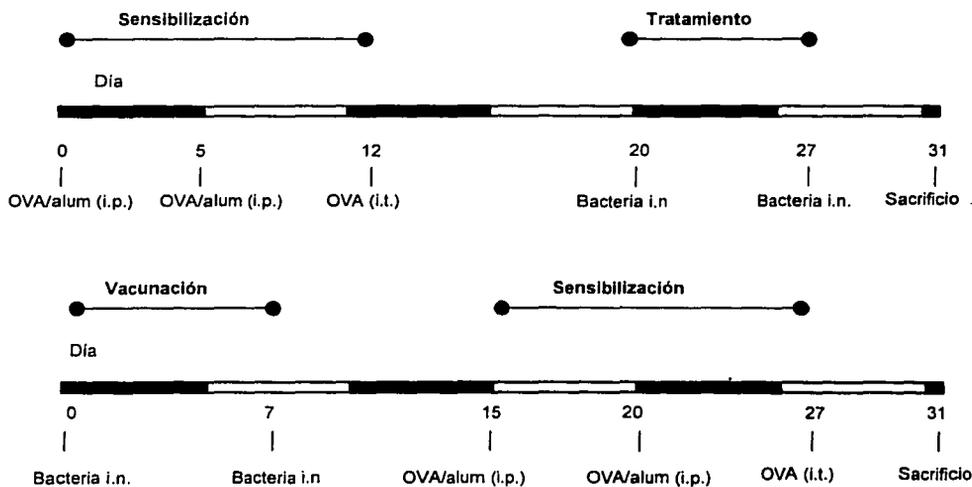
Figura 1.

A, construcción del vector de expresión de la proteína de fusión OmpC-OVA₃₂₃₋₃₃₉. Ver en materiales y métodos los detalles de la construcción. B. Expresión de la proteína de fusión. Panel superior. Western blot utilizando para revelar un anticuerpo monoclonal anti-OmpC; carril 1, proteína OmpC recombinante purificada, carril 2, *E. coli*-pST13, carril 3, *E. coli*, carril 4, *E. coli*-OVA₃₂₃₋₃₃₉. Panel inferior, Western blot revelando con un anticuerpo policlonal anti-péptido de OVA 323-339; carril 1 y 6 proteína OVA purificada, carril 2, *E. coli*, carril 3 *E. coli*-pST13, carril 4 y 5 *E. coli*-OVA₃₂₃₋₃₃₉. C, Esquema de sensibilización, tratamiento y vacunación para inhibir la inflamación pulmonar utilizando *E. coli*-OVA₃₂₃₋₃₃₉.

Figura 1

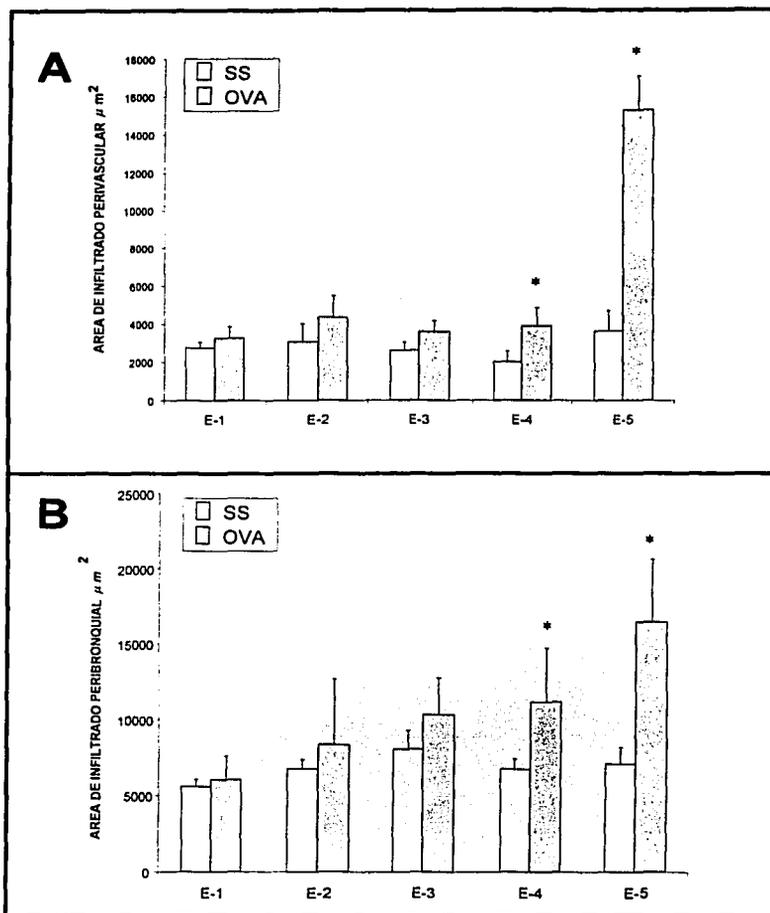


C Esquema de sensibilización, tratamiento y vacunación



TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

Figura 2.



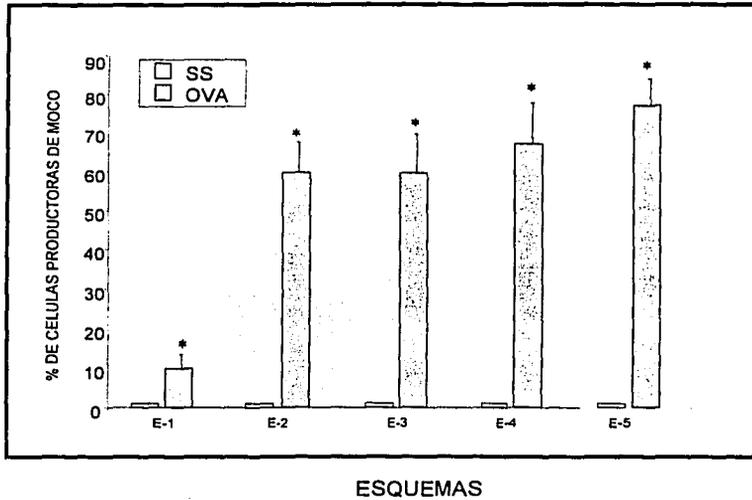
ESQUEMAS

Análisis morfométrico del infiltrado perivascular (A), peribronquial (B) en ratones que fueron tratados con SS o con OVA con los diferentes esquemas mencionados materiales y métodos. Cortes seriados de tejido pulmonar de 4 ratones por cada grupo fueron teñidos con PAS y observados utilizando microscopia de luz (40x de magnificación) en un analizador de imágenes como se describe en materiales y métodos. Los resultados representan el promedio de cada grupo \pm DS.

* $p < 0.05$ comparado con los grupos control.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 3.



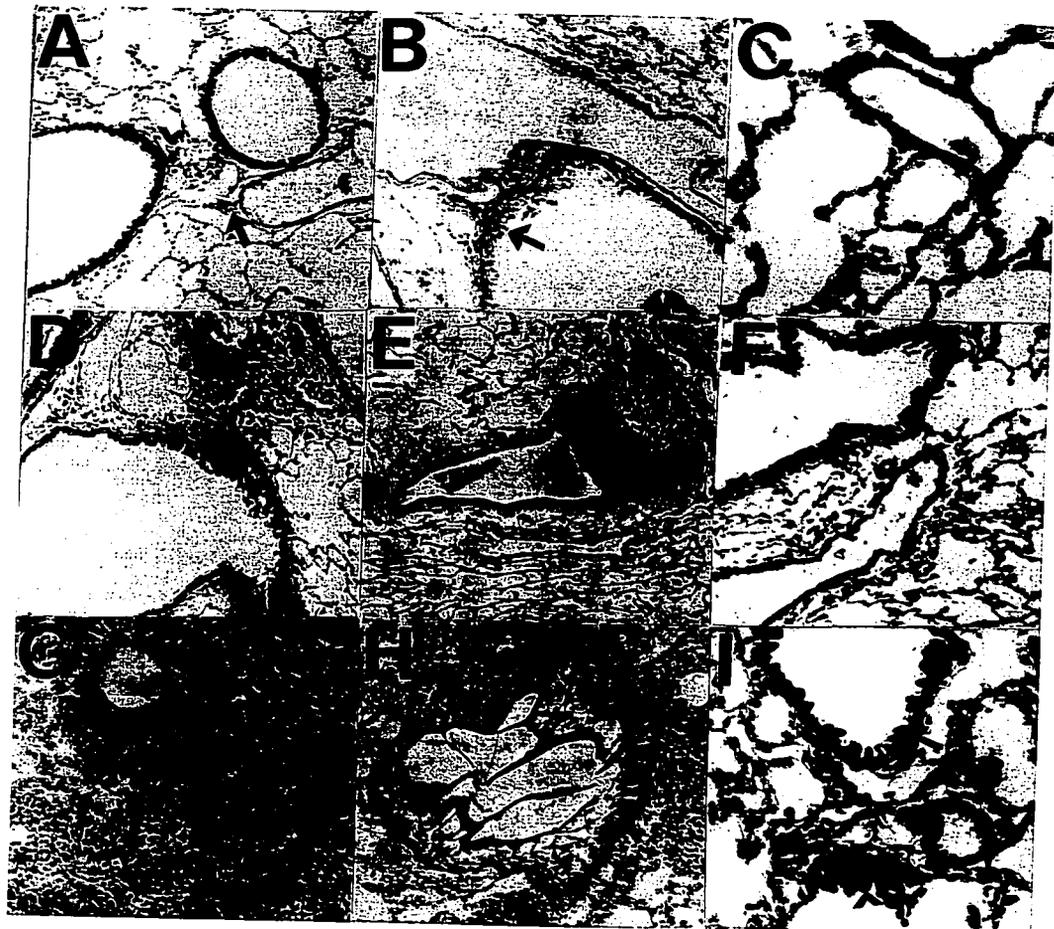
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Medición de la producción de moco por células caliciformes en ratones que fueron tratados con SS o con OVA con los diferentes esquemas mencionados materiales y métodos. Cortes seriados de tejido pulmonar de 4 ratones por cada grupo fueron teñidos con PAS y observados utilizando microscopia de luz (40x de magnificación) en un analizador de imágenes como se describe también en materiales y métodos. Los resultados representan el promedio de cada grupo \pm DS.

* $p < 0.05$ comparado con los grupos control.

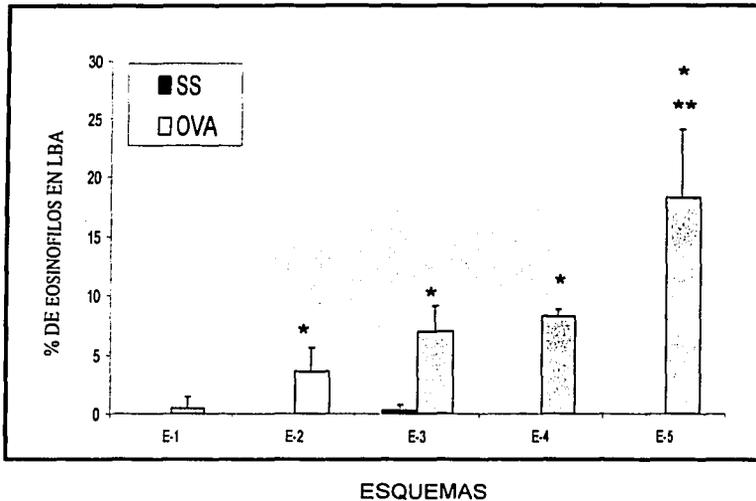
Figura 4.

Imágenes representativas de los hallazgos histológicos e inmunohistoquímicos de los pulmones de los ratones tratados con los diferentes esquemas de sensibilización para inducir inflamación pulmonar. Secciones de tejido pulmonar teñidas con H/E (A, E y H), con PAS para teñir mucina (B, E y H), y probada la expresión de eotaxina (C, F, I). (A) Ratones sensibilizados con una solución de OVA-SS en aerosol durante 10 días consecutivos (E-1), a microscopia de luz (X40 magnificaciones) se observa infiltrado inflamatorio mononuclear perivenular (flechas) y en áreas peribronquiales (cabeza de flecha). (B) en estos pulmones se observó escasa producción de moco (flecha), y las células no expresan eotaxina. (C) En comparación, los ratones sensibilizados por vía i.p con OVA en alumen con adyuvante y posteriormente expuestos a OVA en aerosol (E-3), exhibieron moderado infiltrado perivascular y peribronquial (D); con abundante producción de moco (G), así mismo se observaron abundantes células epiteliales productoras de eotaxina (H). En contraste los ratones sensibilizados con OVA en alum y posteriormente con OVA por inyección i.t. (E-5), muestra una excesiva inflamación perivascular y peribronquial (G), producción masiva de moco (H), y numerosas células epiteliales (flechas) y macrófagos (cabeza de flecha) que expresan eotaxina (I).



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 5.



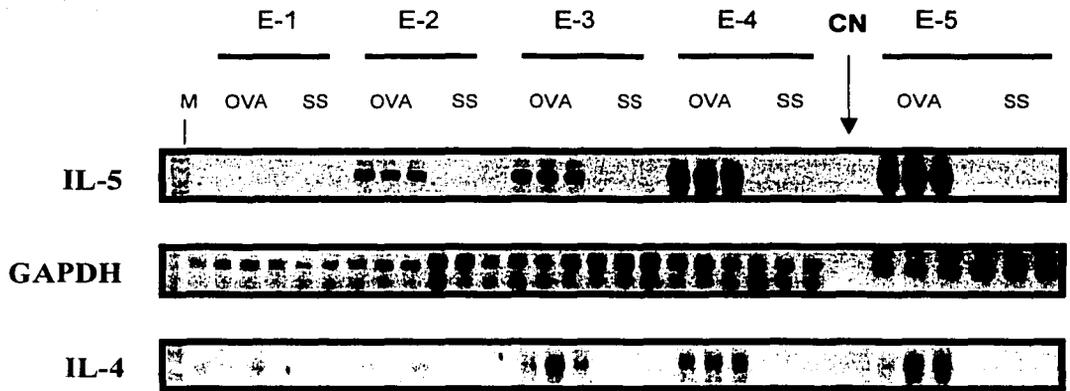
Infiltrado de eosinófilos en LBA de ratones, después del tratamiento con SS o con OVA utilizando los diferentes esquemas de sensibilización descritos en materiales y métodos. Las preparaciones de cada uno de los LBA fueron realizadas en un citospin, teñidas con H/E y contadas en un microscopio de luz (X100 magnificaciones). En total 200 células fueron identificadas en cada laminilla basandonos en los criterios de morfología tradicionales .

* $p < 0.05$ comparado con los grupos control (U de Mann-Whitney)

** $p < 0.05$ comparación entre grupos (ANOVA).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

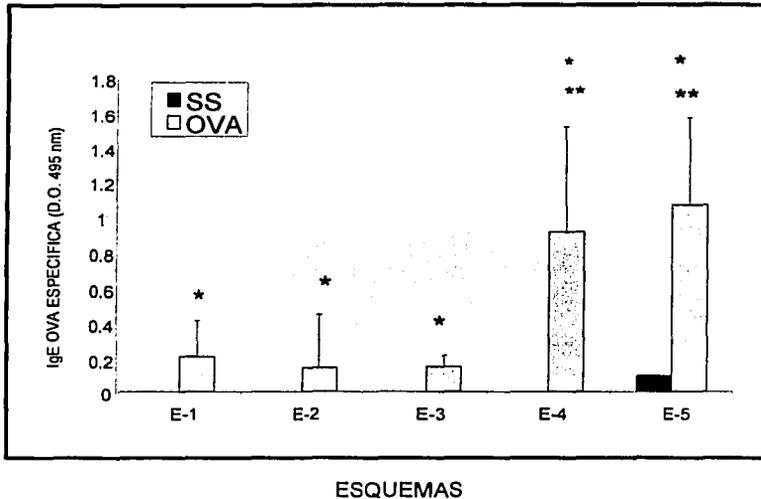
Figura 6.



Análisis de los transcritos para IL-4 e IL-5 de células de tejido pulmonar. Se realizó RT-PCR para los transcritos de IL-5, IL-4 y GAPDH de células de tejido pulmonar de los animales inmunizados con los diferentes esquemas para inducir asma que se describen en materiales y métodos. Las bandas obtenidas representan el resultado de tres animales por grupo de manera individual. CN = control negativo.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 7.



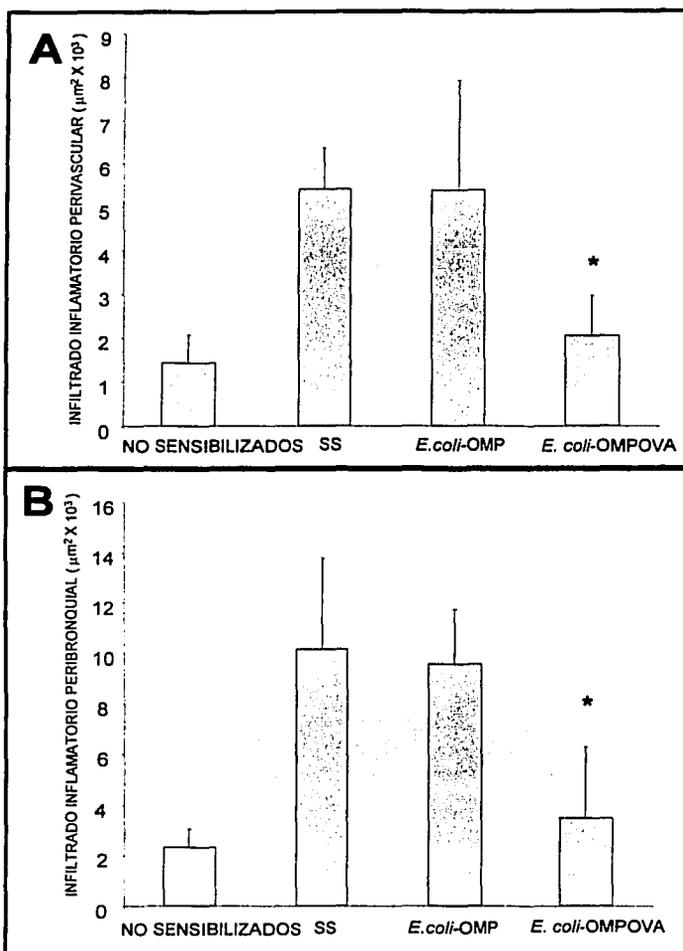
Niveles de IgE OVA específica determinados mediante ELISA en los ratones tratados con SS o con OVA utilizando los diferentes esquemas que se describen en materiales y métodos. Los datos se presentan en porcentaje y corresponden a la media \pm DS de grupos 5 ratones por esquema.

* $p < 0.05$ comparado con los grupos control (U de Mann-Whitney)

** $p < 0.05$ comparación entre grupos (ANOVA).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

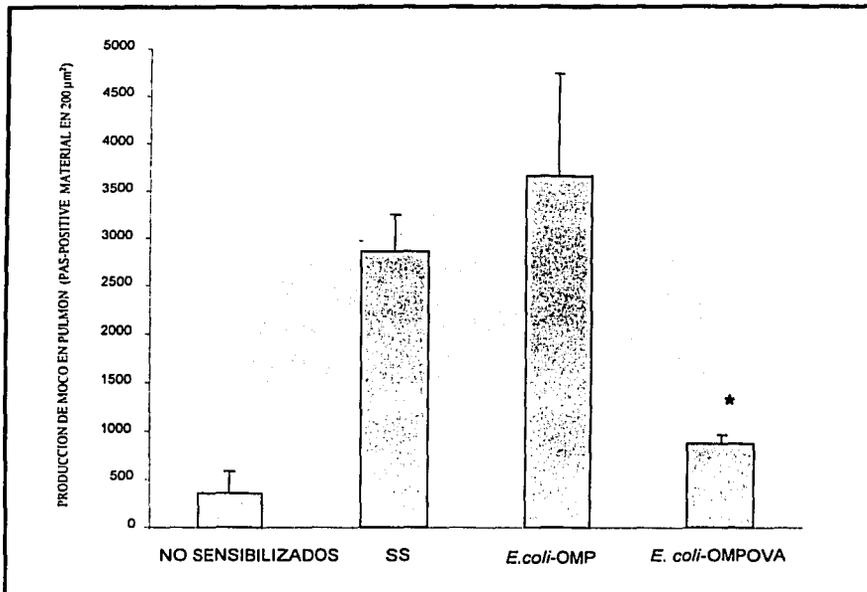
Figura 8.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

El tratamiento con *E. coli*-OVA₃₂₃₋₃₃₉ induce disminución del infiltrado inflamatorio pulmonar en los ratones sensibilizados con OVA. (A) Perivascular, (B) Peribronquial. Como se describe con detalle en materiales y métodos, secciones seriadas de pulmón teñidas con H/E para la evaluación del infiltrado inflamatorio celular en cada grupo, de 5 a 8 secciones pulmonares fueron medidas utilizando microscopia de luz (X40) en un analizador de imágenes, en cada sección se evaluó el infiltrado celular en diferentes áreas perivasculares y 5 peribronquiales, los resultados representan el promedio del infiltrado de células por µm² y la DS de cinco ratones por cada grupo. **p* < 0.05 comparación entre grupos (ANOVA).

Figura 9.



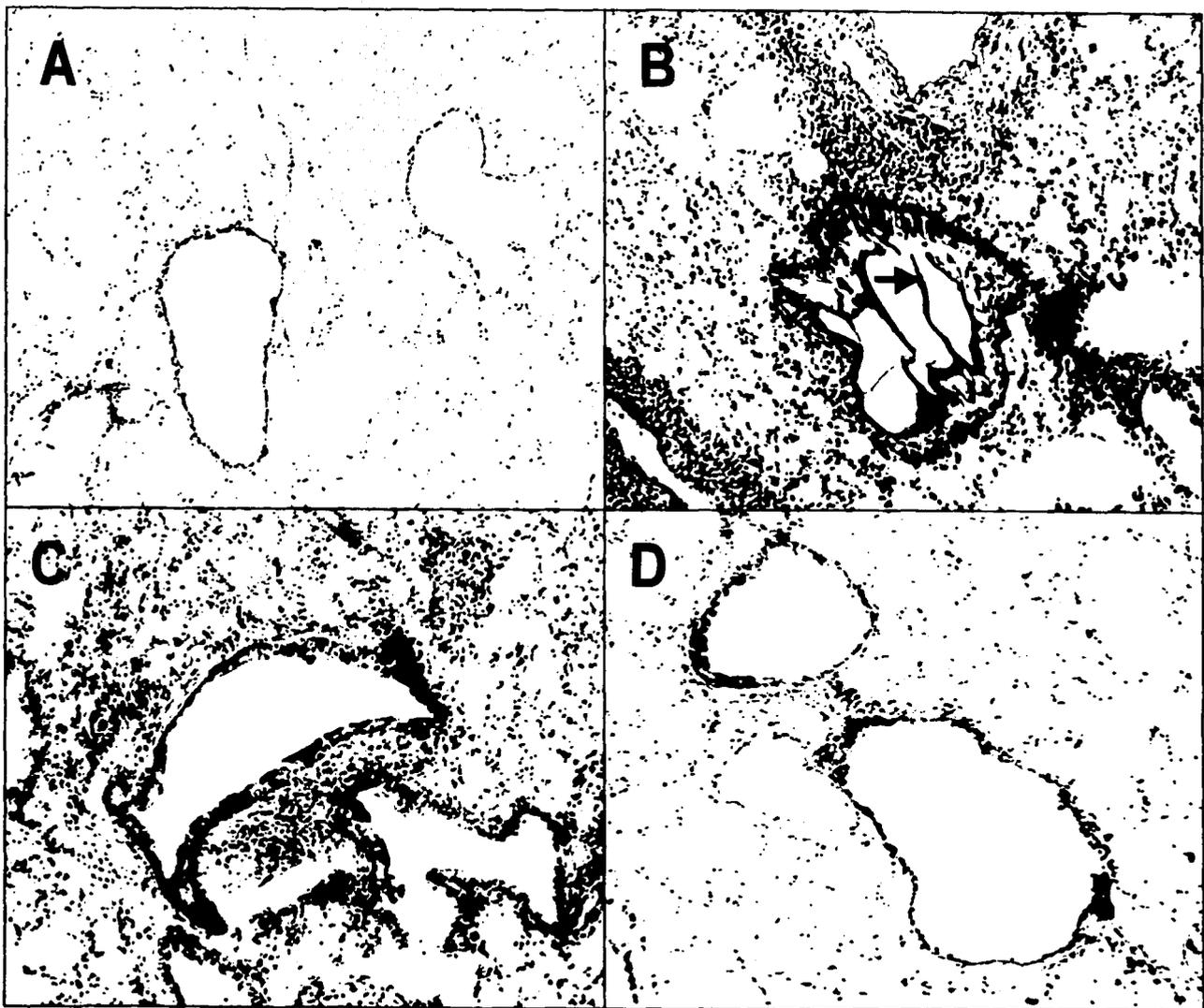
Producción de moco en pulmón. Como se describe con detalle en materiales y métodos, para identificación de producción de mucina por células calciformes en el epitelio pulmonar las secciones pulmonares fueron teñidas con PAS, en donde el área que ocupa el material PAS-positivo fue medida de 5 a 8 secciones de tejido pulmonar fueron evaluadas en cada grupo, 5 áreas por cada sección fueron medidas. Los resultados representan el promedio del área que ocupa el material PAS-positivo en 200 μm² en cada grupo y evaluadas mediante microscopia de luz (X40) usando un analizador de imágenes. Se presenta el promedio y la DS de cinco ratones por cada grupo.

* $p < 0.05$ comparación entre grupos (ANOVA).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

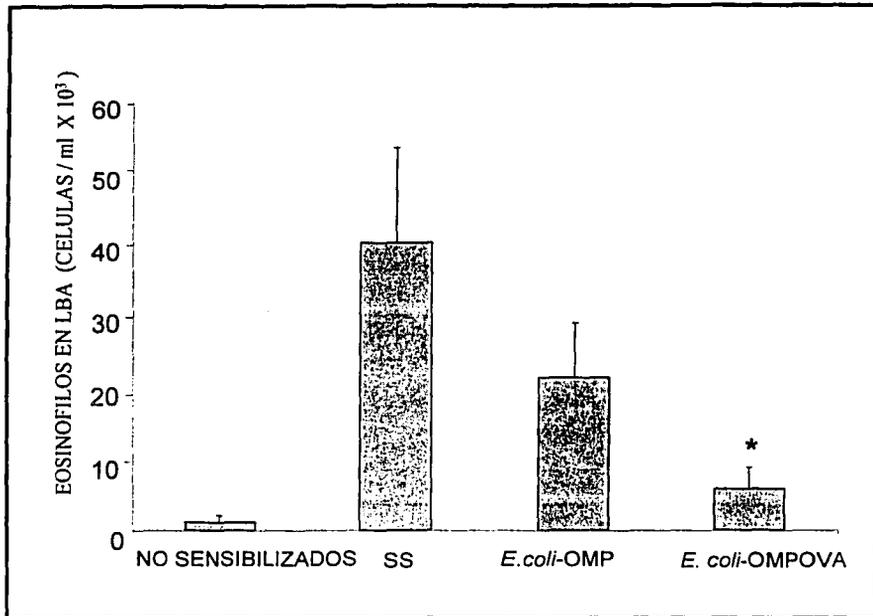
Figura 10.

Fotomicrografías de los hallazgos histológicos más representativos en las secciones de pulmón de ratones sensibilizados con OVA. El tejido pulmonar fue fijado con etanol y embebido en parafina. Secciones de 5 μm de longitud fueron teñidas con PAS (X400). A, Aspecto normal del tejido pulmonar de ratones no sensibilizados. B a D, ratones sensibilizados con OVA (E-4). B, control; ratones tratados con SS en dos ocasiones; se observa excesiva producción de material PAS-positivo (moco) en el lumen, e infiltrado celular importante en el área peribronquial. En C, se muestra que los cambios patológicos fueron ligeramente disminuidos en los ratones tratados con la bacteria acarreadora *E. coli*-pST13. D, el tratamiento con *E. coli*-OVA₃₂₃₋₃₃₉ inhibe de manera significativa la producción de moco y el infiltrado inflamatorio. Los datos son representativos de dos experimentos independientes donde se analizaron múltiples secciones de lobulillos pulmonares.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

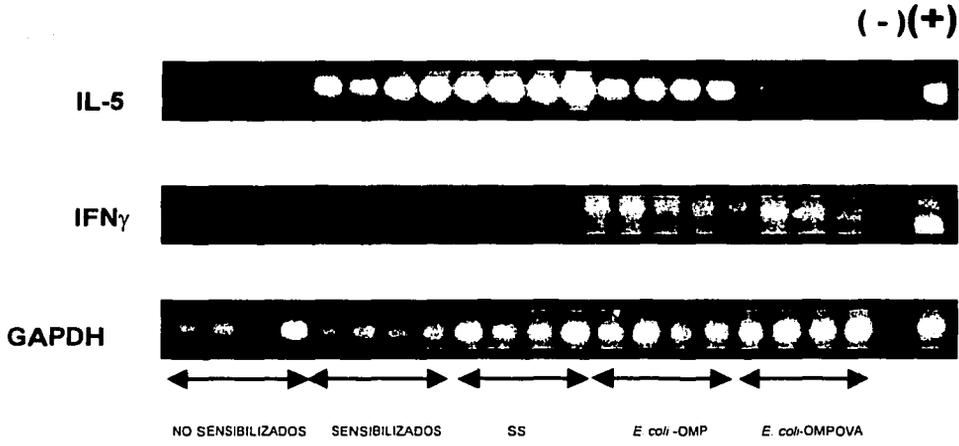
Figura 11.



El tratamiento *E. coli*-OMPOVA con inhibe la eosinofilia de LBA de ratones sensibilizados con OVA. Las células de LBA fueron obtenidas como se describe en materiales y métodos, las preparaciones de las células en el citoespin fueron teñidas con H/E, en cada preparación se identificaron 500 células utilizando microscopia de luz (X100 magnificaciones) basándose en los criterios morfológicos tradicionales. Se presenta la media y DS de los resultados utilizando 5 ratones por grupo.

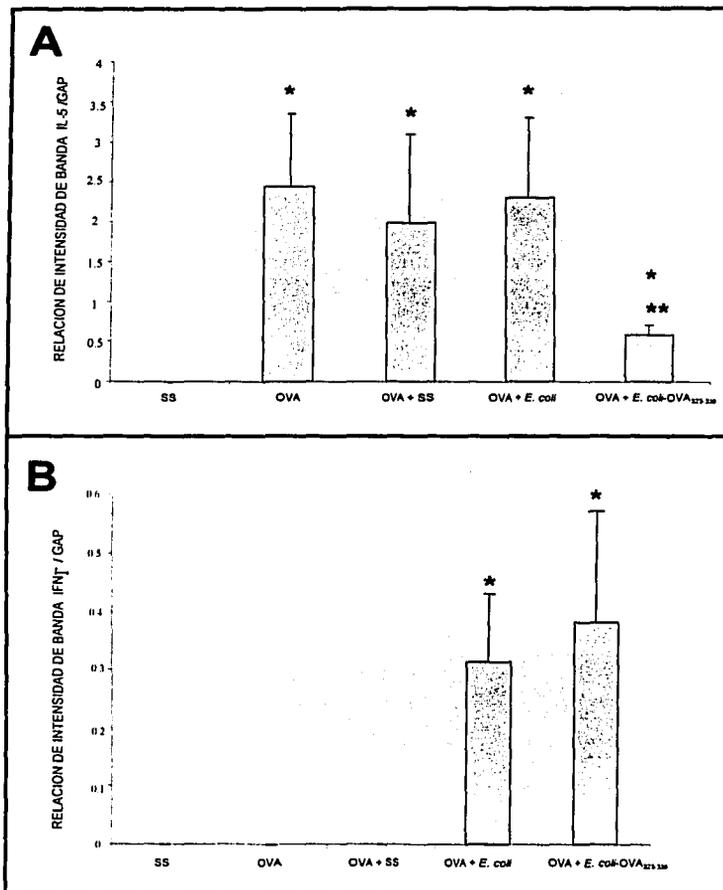
$p < 0.05$, prueba de ANOVA (Kruskal-Wallis).

Figura 12



El tratamiento con *E. coli*-OMPOVA induce una disminución de la expresión del transcrito para IL-5 y un aumento en la expresión del transcrito para IFN γ . El análisis de los transcritos se realizó mediante RT-PCR a partir de mRNA de células de LBA de los diferentes grupos. La amplificación del gene constitutivo de GAPDH fue utilizado como control de integridad del mRNA. Se presenta el resultado de 4 ratones por cada grupo de manera individual. El control negativo (-) y el control positivo (+) son mostrados para indicar que no existe contaminación con DNA y que la técnica se realizó adecuadamente.

Figura 13.

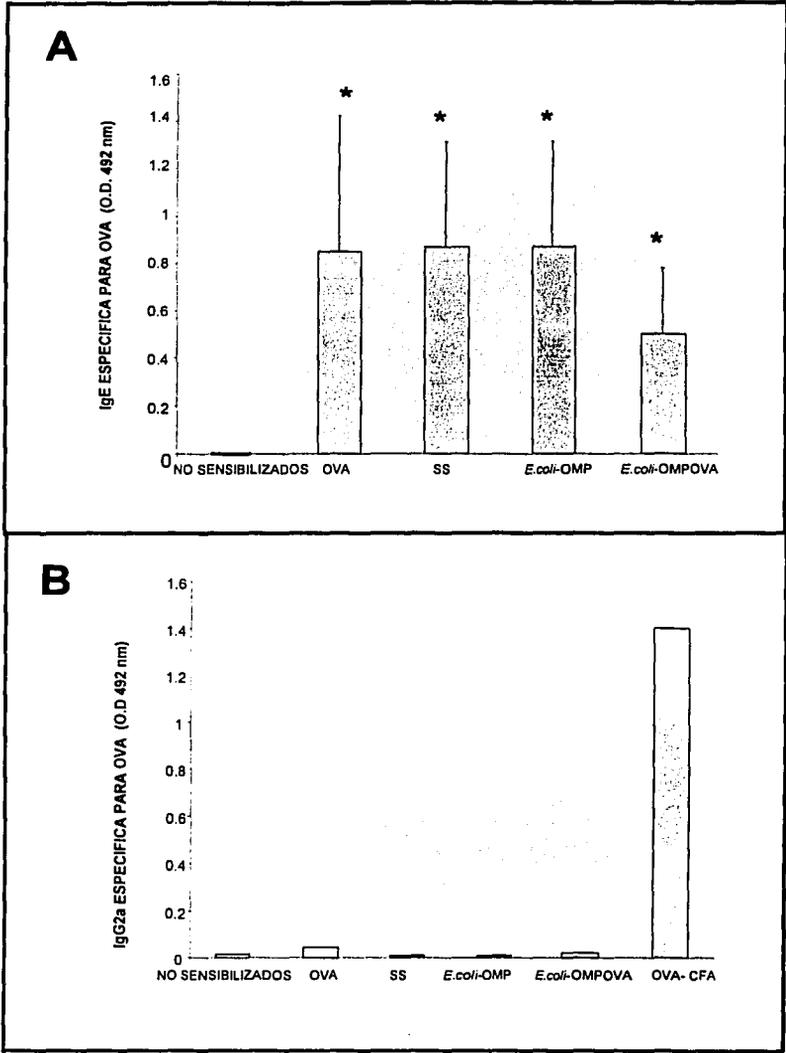


Intensidad de las bandas de PCR de las citocinas IL-5 e IFN γ . La intensidad de las bandas de PCR de las citocinas y GAPDH fueron cuantificadas utilizando el programa Sigma Gel, apartir de las fotografías originales de los geles de agarosa. Se muestra la relación entre la intensidad de la banda de la PCR para IFN γ (A) e IL-5 (B), y la intensidad de las bandas de PCR de GAPDH en los diferentes grupos de ratones.

* $p < 0.05$ comparado con los grupos control (U de Mann-Whitney)

** $p < 0.05$ comparación entre grupos (ANOVA).

Figura 14.

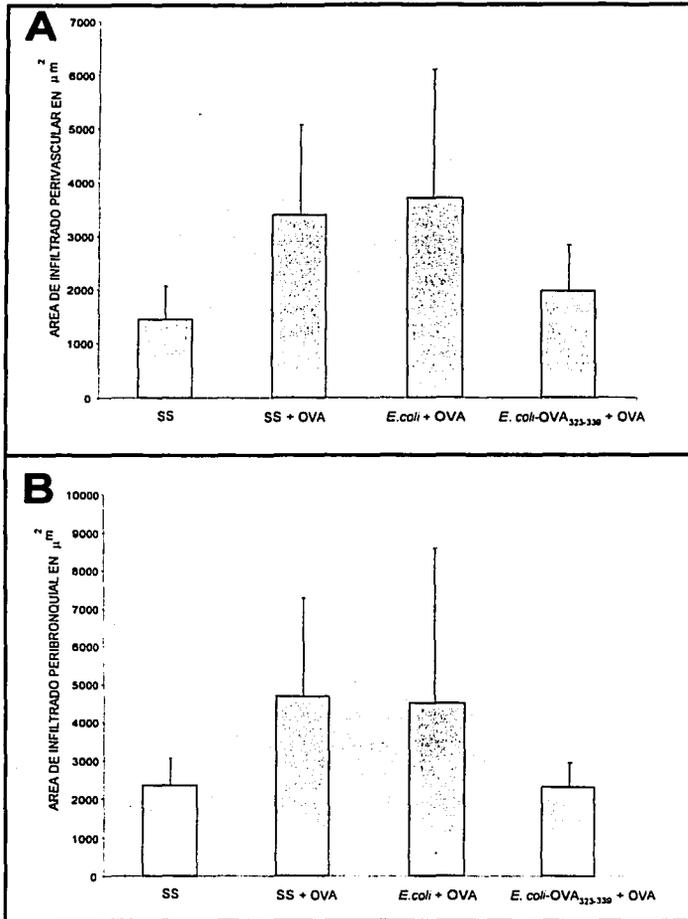


Determinación de IgE (panel A), e IgG2a (panel B) específica para OVA en suero, mediante ELISA en los diferentes grupos de ratones utilizados como se describe en materiales y métodos. Se presenta la media y DS de 10 ratones por grupo.

* $p < 0.05$ comparado con los grupos control (U de Mann-Whitney)

** $p < 0.05$ comparación entre grupos (ANOVA).

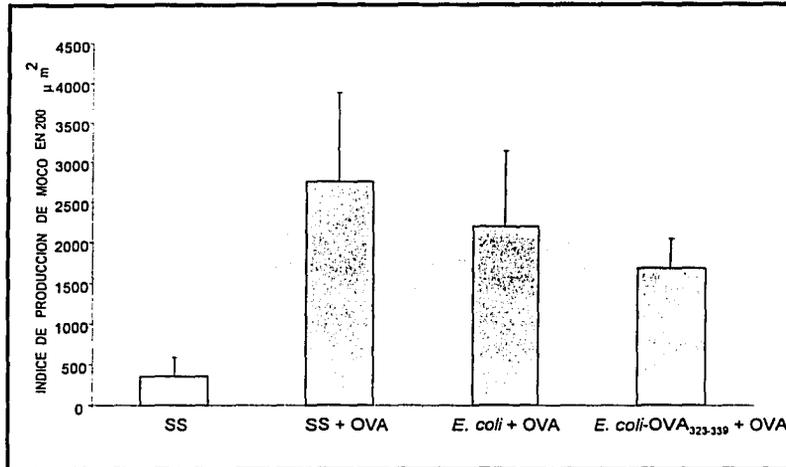
Figura 15.



La vacunación con *E. coli*-OVA₃₂₃₋₃₃₉ induce disminución no significativa del infiltrado inflamatorio pulmonar en los ratones sensibilizados con OVA. (A) Perivascular, (B) Peribronquial. Como se describe con detalle en materiales y métodos, secciones seriadas de pulmón teñidas con H/E para la evaluación del infiltrado inflamatorio celular (A y B), de 5 a 8 secciones pulmonares fueron evaluadas en cada grupo, en cada sección se midió el infiltrado celular en 5 diferentes áreas perivascular y 5 peribronquiales, los resultados representan el promedio del infiltrado de células por µm². Los resultados representan el promedio del área que ocupa el material PAS-positivo en 200 µm² en cada grupo y evaluadas mediante microscopia de luz (X40) usando un analizador de imágenes. Se presenta el promedio y la DS de cinco ratones por cada grupo.

**p* > 0.05 comparación entre grupos (ANOVA).

Figura 16.

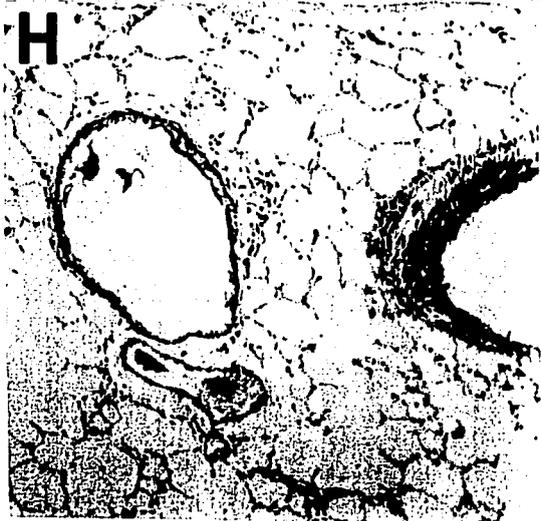


La vacunación con *E. coli*-OVA₃₂₃₋₃₃₉, induce disminución no significativa de la producción de moco en vías aéreas en los ratones sensibilizados con OVA. Como se describe con detalle en materiales y métodos, para la identificación de producción de mucina por células caliciformes en el epitelio pulmonar las secciones pulmonares fueron teñidas con PAS, en donde el área que ocupa el material PAS-positivo fue medida de 5 a 8 secciones de tejido pulmonar fueron evaluadas en cada grupo, 5 áreas por cada sección fueron medidas. Los resultados representan el promedio del área que ocupa el material PAS-positivo en 200 μm^2 en cada grupo y evaluadas mediante microscopia de luz (X40) usando un analizador de imágenes. Se presenta el promedio y la DS de cinco ratones por cada grupo.

* $p > 0.05$ comparación entre grupos (ANOVA).

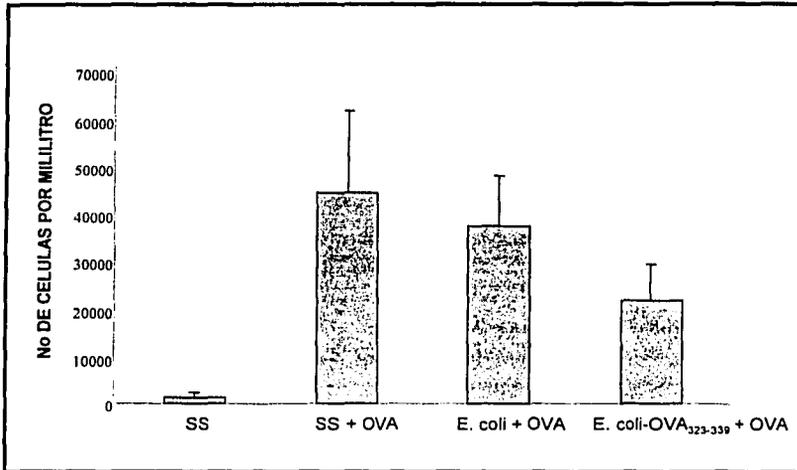
Figura 17.

Fotomicrografías de los hallazgos histológicos más representativos en las secciones de pulmón de ratones sensibilizados con OVA. El tejido pulmonar fue fijado con etanol y embebido en parafina. Secciones de 5 μm de longitud fueron teñidas con PAS (X400). A, Aspecto normal del tejido pulmonar de ratones no sensibilizados. F a H, ratones sensibilizados con OVA (E-4). F, control; ratones vacunados con SS dos ocasiones; se observa excesiva producción de material PAS-positivo (moco) en el lumen, e infiltrado celular importante en el área peribronquial. En G, se muestra que los cambios patológicos fueron ligeramente disminuidos en los ratones vacunados con la bacteria acarreadora *E. coli*-pST13. F, la vacunación con *E. coli*-OVA₃₂₃₋₃₃₉ inhibe de importante pero no significativa la producción de moco y el infiltrado inflamatorio. Los datos son representativos de dos experimentos independientes donde se analizaron múltiples secciones de lobulillos pulmonares.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 18.

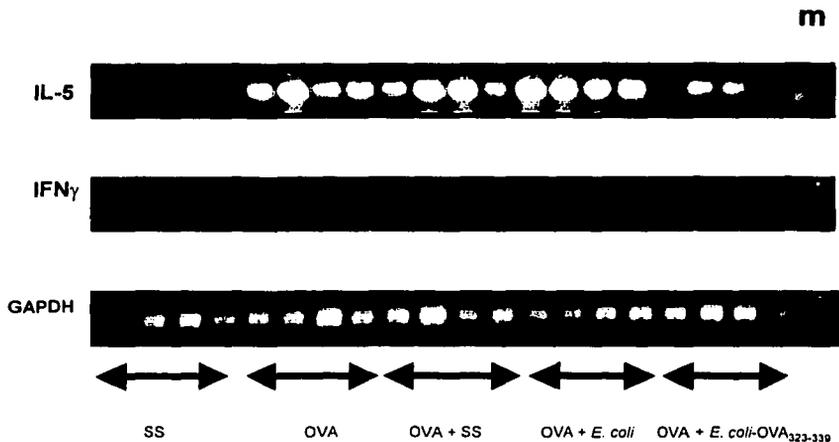


La vacunación con *E. coli-OVA*₃₂₃₋₃₃₉ induce una disminución no significativa de la eosinofilia de LBA de ratones sensibilizados con OVA. Las células de LBA fueron obtenidas como se describe en materiales y métodos, las preparaciones de las células en el citoespín fueron teñidas con H/E, en cada preparación se identificaron 500 células utilizando microscopia de luz (X100 magnificaciones) basándose en los criterios morfológicos tradicionales. Se presenta la media y DS de los resultados utilizando 5 ratones por grupo.

$p > 0.05$, prueba de ANOVA (Kruskal-Wallis).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 19.

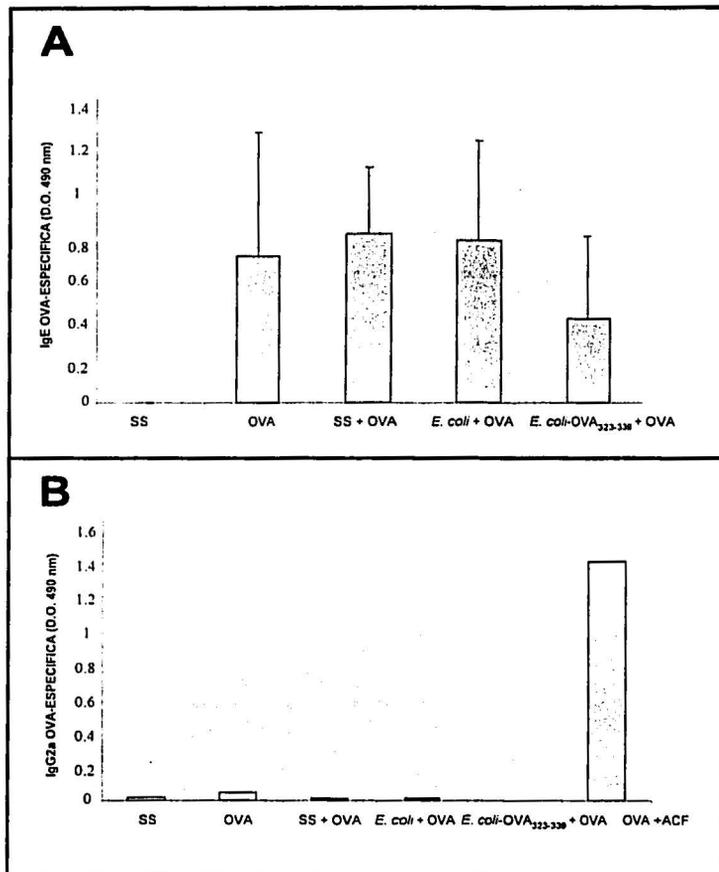


La vacunación con *E. coli*-OVA₃₂₃₋₃₃₉ induce una disminución de la expresión del transcrito para IL-5 y un aumento en la expresión del transcrito para IFN γ . El análisis de los transcritos se realizó mediante RT-PCR a partir de mRNA de células de LBA de los diferentes grupos. La amplificación del gene constitutivo de GAPDH fue utilizado como control de integridad del mRNA. Se presenta el resultado de 4 ratones por cada grupo de manera individual. m= marcadores de tamaño

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ESTA TESIS NO SALI
DE LA BIBLIOTECA

Figura 20.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Determinación de IgE (panel A), e IgG2a (panel B) específica para OVA en suero, mediante ELISA en los diferentes grupos de ratones vacunados y posteriormente sensibilizados con OVA como se describe en materiales y métodos. Se presenta la media y DS de 10 ratones por grupo.

* $p > 0.05$ comparado con los grupos control (U de Mann-Whitney)

8 PERSPECTIVAS.

1. Evaluación de la reactividad aérea. Como ya se mencionó la inflamación pulmonar generalmente es necesaria para el desarrollo de espasmo brónquial. Sin embargo, se requiere de la evaluación de este parámetro.

2. Estudios de dosis respuesta y vías de administración. En el presente trabajo solo se empleó una dosis de bacterias para el tratamiento por vía i.n a ratones sensibilizados con OVA. Con este esquema se logró una disminución muy importante de la inflamación pulmonar. Sin embargo, se sabe que la cantidad de antígeno y la vía de administración son de suma importancia para la modulación de la respuesta Th1/Th2.

Por otro lado, evaluamos si la administración preexposición con la bacteria acarreadora del alérgeno podía evitar el desarrollo de la enfermedad. Nuestros resultados revelaron que existe una disminución de la inflamación pulmonar, de la hiperplasia de células caliciformes, de la acumulación de eosinófilos y la producción de IgE específica para OVA; sin embargo, esta disminución no es estadísticamente significativa (consistente en dos experimentos independientes), por lo que es necesario evaluar si diferentes dosis de la bacteria acarreadora pueden evitar el desarrollo de la enfermedad.

3. Es necesario realizar estudios sobre la participación de otras células como células dendríticas, macrófagos y células cebadas en la patogenia del asma y su papel en el balance Th1/Th2.

9 REFERENCIAS

- ¹ **Sly R. M.** Decreases in asthma mortality in the United States. *Ann. Allergy Immunol.* 2000. **85**:121.
- ² **Graft, D. F.** Venom immunotherapy for stinging insect allergy. *Clin. Rev. Allergy.* 1987. **5**:149.
- ³ **Norman, P. S.** Immunotherapy for nasal allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1988. **81**:992.
- ⁴ **Greidener, D. K.** Risk management in allergen immunotherapy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1996. **98**:S330.
- ⁵ **Abbas, A., Murphy, K, and A, Sher.** Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature.* 1996. **383**:787.
- ⁶ **Mosman, T. R., Cherwinski, H., Bond, M. W., Gielden, M. A, and Coffman, R. L.** Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J. Immunol.* 1986. **136**:2348.
- ⁷ **Mosman, T. R, and Coffman, R. L.** Th1 and Th2 cells different patterns of lymphokine secretion leads to different functional properties. *Annu. Rev Immunol.* 1989. **7**:145.
- ⁸ **Lebman, D. A and Coffman, R. L.** Interleukin 4 causes isotype switching to IgE in T cell-stimulated clonal B cell cultures. *J Exp Med.* 1998. **168**:853.
- ⁹ **Lopez, A. F., Begley, C.G., Williamson, D. J., Warren, D.J., Vadas, M.A and Sonderson, C. J.** Murine eosinophil differentiation factor: an eosinophil-specific colony-stimulating factor with activity for human cells. *J Exp Med.* 1986. **163**:1085.
- ¹⁰ **Wills-Karp, M., Luyimbazi, J., Xu, X., Schofield, B., Neben, T. Y., Karp, C. L., and Donaldson D. D..** Interleukin-13: Central mediator of allergic asthma. *Science.* 1998. **282**. 2258.
- ¹¹ **Heinzel, F.P., M. D. Sadick, B. J. Holaday, R. L. Coffman, and R .M Locksley.** Reciprocal expression of interferon γ or IL-4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis evidence for expansion of distinct helper T cell subsets. *J. Exp. Med.* 1989. **169**:59.
- ¹² **Erb, K. J., Holloway, W. Sobeck, A. Moll, H, and LeGros, G.** Infection of mice with *Mycobacterium bovis*-bacillus Calmette-Guerin (BCG) suppresses allergen-induced airway eosinophilia. *J. Exp. Med.* 1998. **187**:561.
- ¹³ **Yeung, V. P., Gieni, R. S., Umetsu, D. T, and DeKruyff.R. H.** Heat-killed *Listeria monocytogenes* as an adjuvant converts established murine Th2-

dominated immune responses into Th1-dominated responses. *J. Immunol.* 1998. **161**:4146.

¹⁴ **Shirakawa, T., Enomoto, T., Shimazu, S., and Hopki, J. M.** The inverse association between tuberculin responses and atopic disorder. *Science.* 1997. **275**:77.

¹⁵ **Gavvett, S. H., O'Hearn, D. J., Li, X., Huang, S. K., Finkelman, F. D, and Wills-Karp, M.** IL-12 inhibits Ag-induced airway hyperresponsiveness, inflammation, and Th2 cytokine expression in mice. *J. Exp. Med.* 1995. **182**:1527.

¹⁶ **Kim, T. S., DeKruyff, R. H., Rupper, R., Maecker, H. T., Levy, S, and Umetsu, D. T.** An ovalbumin-IL-12 fusion protein is more affective than ovalbumin plus free recombinant IL-12 in inducing a T helper cell type 1-dominated immune response and inhibiting antigen-specific IgE production. *J. Immunol.* 1998. **158**:4137.

¹⁷ **Hofstra, C. L., Van Ark, I., Hofman, G., Kool, M., Nijkamp, F. P, and Van Oosterhout, A. J. .** Prevention of Th2-like cell responses by coadministration of IL-12 and IL-18 is associated with inhibition of antigen-induced airway hyperresponsiveness eosinophilia, and serum IgE leveles. *J. Immunol.* 1998. **161**:5054.

¹⁸ **Lack, G., Bradley. K. L., Hamelmann. E., Renz. H., Loader. J., Leung. D. Y, and Gelfand, E. W.** Nebulized IFN γ inhibits the development of secondary allergic responses in mice. *J. Immunol.* 1996. **157**:1432.

¹⁹ **Kung, T. T., Stelts, D. M., Zurcher, J. A., Jones, H., Umland, S.P., Egan, R. W., Kreutner, W, and Chapman, R. W.** IFN γ and Abs to interleukin-5 and interleukin-4 inhibit the pulmonary eosinophilia in allergic mices. *Inflamm. Res.* 1995. **44 (Suppl.2)**:S185.

²⁰ **Kline, J. N., Waldschmidt, T. J. Businga, T. R., Lemish, J. E., Weinstock, J.V., Thorne, P. S, and Krieg, A. M.** Modulation of airway inflamation by CpG oligodeoxynucleotides in a murine model of asthma. *J. Immunol.* 1998. **160**:2555.

²¹ **Maecker. H. T., Hansen, G., Walter, D. M. DeKruyff, R. H. Levy, S., and Umetsu, D. T.** Vaccination with allergen-IL-18 fusion DNA protects against, and reverses established, airway hyperreactivity in a murine asthma model. *J. Immunol.* 2001. **166**: 959.

²² **Bumann, D., Hueck, C., Aebischer, T and Meyer, T. F.** Recombinant live *Salmonella* spp. For human vaccination against heterologous pathogens. *FEMS Immunol Med Mcrobiol.* 2000. **27**:357.

-
- ²³ **Medzhitov, R.** CpG DNA: security code for host defense: The immunomodulatory character of bacterial CpG DNA is well known. A report in a recent issue of *Nature* pinpoints a Toll-like receptor as the cellular accomplice in this innate immune reaction. *Nature Immunol.* 2001. **2**:15.
- ²⁴ **González, C., Hone, D., Noriega, F., Taket, C., Davis, J., Losonsky, G., Nataro, J., Hoffman, S., Malik, A., Nardin, E., Sztejn, M., Isibasi and Levine, M.** *Salmonella typhi* vaccine strains CVD908 expressing the circumsporozoite protein of *Plasmodium falciparum*: Strain construction and safety and immunogenicity in human. *J Infect Dis.* 1994. **169**:927.
- ²⁵ **Huerta, Y. S., Ruiz, F., Carrera, M., Vega, M., Isibasi A., Noriega, F., Santos, P., Gonzalez, C.** Expression of the *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein major B cell epitope on the *Salmonella typhi* outer membrane protein C. Vaccine. 2001. Manuscrito en revisión.
- ²⁶ **Renz H., Bradley K., Larsen. G. L., McCall. C., and Gelfand. E. W.** Comparison of the allergenicity of Ovalbumin and Ovalbumin peptide 323-339. *J. Immunol.* 1993. **151**:7206.
- ²⁷ **Renz, H., Smith, H. R., Henson, J. E., Ray, B. S., Irvin, C. G., and Gelfand, E. W.** Aerosolized antigen exposure without adjuvant causes increased IgE production and increased airway responsiveness in the mouse. *J Allergy Clin Immunol.* 1992. **89**:1127.
- ²⁸ **Zhang, D. H., Yang, L., Cohn, L., Parkyn, L., Homer, R., Ray, P and Ray, A.** Inhibition of allergic inflammation in a murine model of asthma by expression of a dominant-negative mutant of GATA-3. *Immunity.* 1999, **11**:473.
- ²⁹ **Sur, S., Lam, J., Bouchard, P., Sigounas, A., Holbert, D, and Metzger, W. J.** Immunomodulatory effects of IL-12 on allergic lung inflammation depend on timing of doses. *J Immunol.* 1996. **157**: 4173.
- ³⁰ **Hernández, P. R and Rook, G. A.** The role of TNF α in T cell-mediated inflammation depends on the Th1/Th2 cytokine balance. *Immunol.* 1994. **82**:591.
- ³¹ **Hernández, P. R., Orozco, H., Arriaga, K., Sampieri, A., Larriva-Sahd, J and Madrid, M. V.** Analysis of the local kinetics and localization of interleukin-1 α , tumor necrosis factor- α and transforming growth factor- β , during the course of experimental pulmonary tuberculosis. *Immunol.* 1997. **90**:607.
- ³² **Chomczynski, P. A.** Reagent for the single step simultaneous isolation of RNA, DNA and protein from cells and tissue sample. *Biotechniques.* 1993. **15**:532.
- ³³ **Miralles, D.G., Stoeckle, M., McDermott, D., Finkelman, F. D and Murray, H. W.** Th1 and Th2 Cell-associated cytokines in experimental visceral leishmaniasis. *Infec Immun.* 1994. **62**:1058.

-
- ³⁴ **Sugaya, H., Aoki, M., Abe, T., Ishida, K and Yoshimura, K.** Cytokine responses in mice infected with *Angiostrongylus cantonensis* Parasitol Res. 1997. **83**:10.
- ³⁵ **Laemmli, U. K.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 1970. **227**:680.
- ³⁶ **Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J.** Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets; procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1979. **76**:4350.
- ³⁷ **Desmetd, M., Rottiers, P., Dooms, H., Fiers, W and Grooten, J.** Macrophages induce cellular immunity by activating Th1 cell responses and suppressing Th2 responses. J. Immunol. 1998. **160**:5300.
- ³⁸ **Bingisser, R. M., Tilbrook, P. A., Holt, P. G and Kees, U. R.** Macrophage derived nitric oxide regulates T cell activation via reversible disruption of the Jack 3/STAT5 signaling pathway. J Immunol. 1998. 160:5729.
- ³⁹ **Li, X. M., Chopra, T. Y. Chou, B. H. Schofield, M. Wills-Karp, and S. K. Huang.** Mucosal IFN γ gene transfer inhibits pulmonary allergic responses in mice. J. Immunol. 1996. **157**:3216.
- ⁴⁰ **Yoshimoto, T., k. Takeda, T. Tanaka, K. Ohkuso, S. Kashiwamura, H. Okamura, S. Akira, and K. Nakanishi.** IL-12 up-regulates IL-18 receptor expression on T Cells, Th1 cells, and B cells synergism with IL-18 for IFN γ production. 1998. **161**:3400.
- ⁴¹ **Adere, A and Ulevitch R. J..** Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. Nature. 2000. 406:782.
- ⁴² **Richard, I. T., Sachiko, A., Kensuke, M., Paul, J., Godowski, and Peter, S.,** Toll-Like Receptor 4, But Not Toll-Like Receptor 2, Is a Signaling Receptor for *Escherichia* and *Salmonella* Lipopolysaccharides. *J Immunol.* 2000. **165**: 5780.
- ⁴³ **Hemmi, H., Takeuchi, O., Kawai, T., Kaisho, T., Sato, S., Sanjo, H., Matsumoto, M., Hoshino, K., Wagner, H., Takeda, K and Akira, S. A** Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. Nature. 2000. 408:740.
- ⁴⁴ **Laitinen, L. A., Heino, M., Laitinen, A., Kava, T and Haahtela, T.** Damage of the airway epithelium and bronchial reactivity in patient with asthma. Am Rev Respir Dis. 1985. **131**:599.