

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE
CELULAR EN EL MODELO MURINO UTILIZANDO
MICROVESÍCULAS DE *Brucella ovis* EN UN
SISTEMA NANOPARTICULADO.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO
P R E S E N T A N:

ROGELIO TRINIDAD GODÍNEZ RESÉNDIZ
PEDRO MARTÍNEZ BAUTISTA

ASESORES:

Dr. ENRIQUE SALAS TÉLLEZ
Dra. ALMA LUCILA NÚÑEZ DEL ARCO
Dr. ROBERTO DÍAZ TORRES
Dra. PATRICIA MIRANDA CASTRO



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS



DEPARTAMENTO DE
EXAMENES PROFESIONALES

DRA. SUEMI RODRIGUEZ ROMO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
PRESENTE

ATN: L. A. ARACELI HERRERA HERNANDEZ
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la Tesis :

"Evaluación de la respuesta inmune celular en el modelo murino
utilizando microvesículas de Brucella ovis en un sistema nano-
particulado"

que presenta el pasante: Rogelio Trinidad Godínez Reséndiz
con número de cuenta: 40301508-5 para obtener el título de :
Químico Farmacéutico Biólogo

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 30 de abril de 2008

PRESIDENTE MVZ. Gerardo Cruz Jiménez

VOCAL Dra. Susana Elisa Mendoza Elvira

SECRETARIO Dr. Enrique Salas Téllez

PRIMER SUPLENTE Dr. Andrés Romero Rojas

SEGUNDO SUPLENTE Dr. Rafael Villalobos García



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN



DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

DRA. SUEMI RODRIGUEZ ROMO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
PRESENTE

ATN: L. A. ARACELI HERRERA HERNANDEZ
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la Tesis:

"Evaluación de la respuesta inmune celular en el modelo murino
utilizando microvesículas de Brucella ovis en un sistema nano-particulado"

que presenta el pasante: Pedro Martínez Bautista
con número de cuenta: 09919023-1 para obtener el título de :
Químico Farmacéutico Biólogo

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 30 de abril de 2008

PRESIDENTE	MVZ. Gerardo Cruz Jiménez	
VOCAL	Dra. Susana Elisa Mendoza Elvira	
SECRETARIO	Dr. Enrique Salas Téllez	
PRIMER SUPLENTE	Dr. Andrés Romero Rojas	
SEGUNDO SUPLENTE	Dr. Rafael Villalobos García	

AGRADECIMIENTOS.

- A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la FES-Cuautitlán campo 1, nuestras casas de estudio, porque gracias a su gran labor de formar e instruir profesionales en todas las áreas de la sociedad, es la única manera como México puede avanzar y así conseguir que los mexicanos puedan tener un mejor estilo de vida y una existencia más plena y feliz.
- A nuestros asesores de tesis: Dr. Enrique Salas y Dra. Alma Nuñez, gracias por su tiempo y dedicación y porque siempre nos demostraron su apoyo en la elaboración de este trabajo.
- A la Dra. Susana Mendoza, Dra. Paty Ramírez, Dra. Raquel López, Dra. Elizabeth García, Profesor. Gerardo Cruz, porque sin sus consejos y la colaboración que prestaron a este proyecto, este jamás se hubiera finalizado.
- Al Técnico Rodolfo Robles, por la colaboración prestada en el uso del microscopio electrónico y por el tiempo en la elaboración de esta tesis.
- A nuestros coasesores: Dr. Roberto Díaz Torres y Dra. Paty Miranda, por sus consejos, tiempo, dedicación, material y equipo proporcionado.
- A demás al jurado calificador de esta tesis, Dr. Andrés Romero, Dr. Rafael Villalobos, ya que han contribuido de manera importantísima a mejorar la calidad y presentación de este documento.
- A los profesores de la carrera de QFB que nos influenciaron en nuestro paso en la facultad como: Prof. Juan José Lara, Prof. Sampere, Profra. Elia Enríquez, Profra. Miriam Castillo, Profra. Guadalupe Koizumi, Profra. Lidia Rangel, Prof. René Miranda, Prof. Enrique Ramos, Prof. José Juan Escobar.
- A la Dra. Sara Valdés, la M. en C. Caro Moreno, la IA. Ángeles, al Laboratorista Sergio, Sr. Gabino, Dr. David Quintanar, por el espacio y material proporcionado para la elaboración de la tesis.

“Por mi raza hablará el espíritu”



DEDICATORIAS ROGELIO

Este trabajo de tesis lo dedico a:

A DIOS, porque me diste la oportunidad de venir a este mundo, y aunque a través de la vida nos podemos encontrar con dificultades, siempre debemos tener el valor de enfrentarlas y superarlas, y aunque parezca que no existe solución posible, debemos buscar el coraje en aquellas personas que han pasado por los mismos problemas y no fueron derrotadas; porque al ser la vida tan fugaz hay que vivirla justamente, ya que siempre hay una razón para levantar la cabeza y seguir luchando, porque eso significa *vivir*.

A mi familia:

A mi madre Reyna Reséndiz Benítez, porque sin ti y tus consejos hace tiempo que hubiera perdido en esta batalla de la vida y gracias por todo ese amor que me has dado incluso antes de que naciera, porque es verdad que una madre ama a su hijo aún antes de conocerlo. A ti te dedico este trabajo y te dedicaré muchos más porque esto es solo una pequeña etapa en la larga carrera de la vida.

A mi padre Rogelio Godínez Carbajal, porque en todos momentos has creído en mí y me has apoyado en todo lo que emprendo, porque como me has dicho “todo lo que hace una persona debe hacerlo bien” y porque sé que siempre contaré contigo y que juntos y apoyándonos mutuamente superaremos todas las adversidades que la vida nos presente. También te dedico este trabajo y te dedicaré muchos más.

A mi hermano Aarón, porque soy feliz de ser tu hermano y quiero decirte que siempre contarás conmigo en todo lo que hagas.

A mi tía María de Jesús y mi tía Lidia, porque son mis segundas madres y porque siempre encuentro en ellas amor, cariño y un inmenso apoyo.

A mi tío Macrino, mi tía Gaby y a mi primo Jesús, gracias por estar conmigo y que son muy importantes para mí.

A mi abuelitos Trinidad y Hermelinda, y a mi Abuelita María de la Luz, porque a pesar de que no están presentes en estos momentos, sé que siempre me están cuidando como a todos sus nietos y que algún día nos volveremos a ver.

A mis tíos Nacho y Víctor, porque ya no están presentes pero siempre están en mis recuerdos.

A todos mis primos y tíos que han faltado y que quisiera mencionar pero son muchos, doy gracias a Dios por haberlos conocido.

A mis amigos Qufos: Bety Hernández, Marisol, Jonathan (Bolillo), César, Juan Carlos, Carlos, Aída, María Nava, Guadalupe (Dorita), Javier, Noemí, Hugo Axel, Hugo (Hooligan), Héctor Marduck, Dalila, Angélica, Itzmel, Lety, Felipe (Pitufo), Priscila, Gustavo, Juan, Jesús, Christian, Bety (QFB 31), Néstor, Guadalupe Herrera, me alegro de haberlos conocido y quiero que sepan que todos son excelentes personas y que pueden lograr todo lo que se propongan, siempre los recordaré y espero que sigamos en contacto y continuemos siguiendo amigos toda la vida.

A mi amigo Pedro Martínez Bautista, con quien realicé este trabajo, quiero decirte que eres una excelente persona y un excelente amigo, espero que cumplas todas tus metas y sé que así será.

Antes de cerrar este capítulo quiero decirles que conocerlos ha influido significativamente en mi vida y que se cierra una etapa pero se abre otra con retos mucho mayores, pero contando con ustedes y ustedes conmigo, haremos de este viaje algo único porque la vida en si es una “experiencia única”.



Rogelio Trinidad Godínez Reséndiz

“No consideres el estudio como un deber, sino como la oportunidad de entrar en el maravilloso mundo del saber”
(Albert Einstein)

“A las plantas las endereza el cultivo; a los hombres, la educación.”
(Rosseau)

“La felicidad es algo que cada uno lleva en sí mismo, sin darse cuenta de ello.”
(Hugo Betti)

“El alma tiene sus ilusiones, como el pajarillo sus alas: Son ellas quienes las sostienen.”
(Víctor Hugo)

“Aquel que no está orgulloso de su origen no valdrá nada, por que empieza a despreciarse a sí mismo.”
(Pedro Albizu Campos)

DEDICATORIAS PEDRO

Este trabajo de tesis lo dedico a:

A MI FAMILIA:

A Mi Padre Pedro Martínez Ramón, A Mi Madre Rosa María Bautista Ruíz, A Mis Hermanos: Raymundo, Irene, Eduardo, Carina y en especial a mi Hermano José Armando, A Mi Prima Consuelo Monroy Ramón, A Mis Cuñados: Ángel y Liliana. Por último a mis seres queridos que formaron parte de mi vida, que son: Mis Abuelitos Pedro Martínez Ramírez y Marcelina Ramón López. Les dedico estas palabras.

A mi Familia

Como un testimonio de mi infinito aprecio y agradecimiento, por toda una vida de esfuerzos y sacrificios, brindándome siempre cariño y apoyo cuando más lo necesite. Deseo de todo corazón que mi triunfo como hombre y profesionista, lo sientan como el suyo propio.

Con Amor, Admiración y todo mi Cariño.

PEDRO

A MIS AMIGOS:

ENP No. 4 = Bernardo, Charlie, Víctor, Carlos, Edgar, Horacio, Betty, Mariana, Verónica, José Guadalupe, Adriana, Brenda, Julieta, Miguel y por ultimo con los que tengo una Amistad en donde el tiempo ha dejado de existir: Alejandra y Juan Manuel.

FESC No. 1 = Rogelio Trinidad, Hugo Axel (chambitas), Jacobo, Aida Janet, Guadalupe (dorita), María de Jesús (chucha), Betty, Marisol (qufita), Javier, Eyerai, Jonathan (bolillo), Felipe (pitufo), Priscila, Agustín (ladilla), Hugo (Hooligan) y Sandra, Cesar, Carlos (mal amigo) y Fabiola, Pilar, Chiquilinas (Angélica, Itzmel y Leticia), Pamela, Yeni , María Vázquez, Dalila, Carmen, Juanes (Gustavo, Juan, Jesús y Christian), Pablo, ΨRodrigo, Melisa (la china), ΨGie-bele, Claudia, Néstor, Alejandra, Berenice, Tania, Zaida, Alejandro (gutierrez) y Daniela, ΨGuadalupe Herrera, Raquel, Paty, Sandra Mata, Héctor Marduck y Juan Carlos (juancho cachondo). Son Amigos en quien deposite mi amistad.

COSTCO = A mis amigos de Cajas: Alberto (barnie) Alejandro Urbina, Gerardo, Roberto, Sergio (checo). A mis amigos Supervisores: Rodrigo (rod), Carlos (sugy), Ivan (copki), Ramón y Susana. A mis amigos de Farmacia: Jessica, Fernanda, Claudia, Luis Alberto, Oscar y por último a mi brother Miguel Ángel. A mis amigos con lo que compartí risas y diversión.

CINVESTAV = Alicia, Edgar, Farid Andrés, Francisco Miguel, Mario, Marco, Raúl Salvador y por último a Iris, Chin Chan, Sócrates. A mis amigos que compartimos el mismo sueño.

CUBIL FELINO = Paco, María Inés, Isabel, Laura, María (la güera), Janet. A mis amigos del laboratorio.

O T R O S = Miguel Gerardo, Iván, Diego Francisco y Álvaro Giussepe. Gracias por enseñarme a vivir.

SER UN TRIUNFADOR

El verdadero reto de nuestra vida está en aceptar nuestros errores y no perder la calma para lograr ser dueños de nosotros mismos.

Cuando el egoísmo no limite tu capacidad de amar.

Cuando confíes en ti mismo aunque todos duden de ti y dejes de preocuparte por el que dirán.

Cuando tus acciones sean tan concisas en duración como largas en resultados.

Cuando puedas renunciar a la rutina sin que aquello altere el metabolismo de tu vida.

Cuando sepas distinguir una sonrisa de una burla, y prefieras la eterna lucha que la compra de la falsa victoria.

Cuando actúes por convicción y no por adulación.

Cuando puedas ser pobre sin perder tu riqueza y rico sin perder tu humildad.

Cuando sepas perdonar tan fácilmente como ahora te disculpas.

Cuando en la vida te tropieces y te puedas levantar.

Cuando puedas caminar junto al pobre sin olvidar que es un hombre, y junto al rico sin pensar que es un dios.

Cuando sepas enfrentar tus errores tan fácil y positivamente como tus aciertos.

Cuando halles satisfacción compartiendo tu riqueza.

Cuando sepas obsequiar tu silencio a quien no te pide palabras, y tu ausencia a quien no te aprecia.

Cuando ya no debas sufrir por conocer la felicidad y no seas capaz de cambiar tus sentimientos y tus metas por el placer.

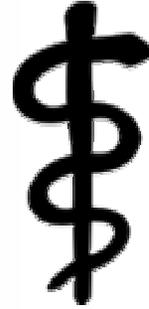
Cuando no trates de hallar las respuestas en las cosas que te rodean, sino en dios y en tu propia persona.

Cuando aceptes los errores, cuando no pierdas la calma, entonces y solo entonces, Serás...

¡¡UN TRIUNFADOR!!



Pedro M.B.



**PEDRO MARTINEZ BAUTISTA
(PITER PUNK)**

ÍNDICE

TEMA	PÁGINA
RESUMEN	1
1.0 INTRODUCCIÓN	2
1.1.1 Generalidades	5
1.1.2 Antecedentes Históricos	6
1.1.3 Aspectos Generales	7
1.1.4 Composición Antigénica	9
1.1.4.1 Antígenos de la Membrana Externa	9
1.4.4.1.1 Lipopolisacárido	9
1.4.4.1.2 Proteínas de Membrana Externa	10
1.4.4.1.2.1 OMP Mayores	10
1.4.4.1.2.2 OMP Menores	10
1.1.4.2 Antígenos del Espacio Periplásmico Intermedio	11
1.1.4.2.1 Proteínas Periplásmicas	11
1.1.4.3 Antígenos del Citoplasma	11
1.1.4.3.1 Proteínas Citoplasmáticas	11
1.1.4.4 Otros Antígenos	12
1.1.4.4.1 Vesículas de Membrana Externa	12
1.1.4.4.2 Actividad Bactericida de las MVs	12
1.1.4.4.3 Actividad Proteolítica de las MVs	13
1.1.4.4.4 Actividad Inmunogénica de las MVs	13
1.1.5 Respuesta Inmune	14
1.1.5.1 Inmunidad innata	14
1.1.5.1.1 Células Efectoras de la Inmunidad Innata	14
1.1.5.1.2 El Sistema del Complemento	15
1.1.5.2 Inmunidad adaptativa	15
1.1.5.2.1 Inmunidad Humoral	15
1.1.5.2.2 Inmunidad Mediada por Células	16
1.1.6 Vacunas	19

1.1.6.1 Vacunas Celulares	19
1.1.6.1.1 Vacunas de Microorganismos Vivos Atenuados	19
1.1.6.1.1.1 Vacunas Aglutinógenas	19
1.1.6.1.1.2 Vacunas no Aglutinógenas	20
1.1.6.1.2 Vacunas de Microorganismos Enteros Inactivados	21
1.1.6.2 Identificación de Antígenos Protectores contra <i>Brucella ssp</i>	22
1.1.6.3 Vacunas Subcelulares	23
1.1.6.3.1 Vacunas No Recombinantes	23
1.1.6.3.2 Vacunas Recombinantes	25
1.1.6.4 Vacunas de Nueva Generación	26
1.1.6.4.1 Vacunas de Microorganismos Vivos Atenuados Genéticamente	26
1.1.6.4.2 Vacunas de ADN	27
1.1.7 Adyuvantes	28
1.2 JUSTIFICACIÓN	31
1.3 HIPÓTESIS	31
2.0 OBJETIVOS	32
2.1 Objetivos Generales	32
2.2 Objetivos Particulares	32
3.0 MATERIAL Y MÉTODOS	33
3.1 Obtención de Vesículas de Membrana Externa de <i>Brucella ovis</i>	33
3.2 Determinación de proteínas de Vesículas de Membrana Externa por el Método de Bradford	33
3.3 Electroforesis en Gel Poliacrilamida de las proteínas de Vesícula de Membrana Externa	34
3.4 Formación de un Sistema Nanoparticulado con Inmunógeno de <i>Brucella ovis</i> mediante la técnica de Ión–Gelación utilizando el Polímero Quitosán	36
3.5 Formación de un Sistema Nanoparticulado con Inmunógeno de <i>Brucella ovis</i> mediante la técnica de Polimerización–Continua utilizando el Polímero Etil-2-Cianoacrilato	37
3.6 Evaluación de la eficacia del proceso de encapsulación y morfología de los sistemas nanoparticulados preparados con los polímeros	38

3.7 Inmunización y preparación del cultivo celular de células de bazo utilizando ratones Balb-c	38
3.8 Cuantificación de IL-2, IL-4 e INF- γ por el Sistema Elisa Dúo Set®	39
4.0 RESULTADOS	41
4.1 Determinación de la Concentración de la Curva Estándar de Interleucinas (IL-2, IL4, INF- γ) de los Adyuvantes (Quitósán y Etil-2-Cianoacrilato)	41
4.2 Evaluación de las Vesículas de Membrana Externa (MVs) de <i>Brucella ovis</i>	45
4.3 Determinación del Tamaño Partícula y Morfología del Antígeno, Adyuvantes, Inmunógeno	47
4.4 Perfil de Citocinas producidas por las Partículas (Antígeno, Adyuvantes, Inmunógeno)	49
4.4.1 Empleo de Quitósán como Adyuvante	51
4.4.1.1 Vesículas de Membrana Externa	51
4.4.1.2 Nanopartículas de Quitósán	51
4.4.1.3 Nanopartículas de Quitósán con MVs Exteriores	51
4.4.2 Empleo de Etil-2-Cianoacrilato como Adyuvante	53
4.4.2.1 Vesículas de Membrana Externa	53
4.4.2.2 Nanopartículas de Etil-2-Cianoacrilato	53
4.4.2.3 Nanopartículas de Etil-2-Cianoacrilato con MVs Interiores	53
4.4.2.4 Nanopartículas de Etil-2-Cianoacrilato con MVs Exteriores	53
5.0 DISCUSIÓN	55
6.0 CONCLUSIONES	61
7.0 BIBLIOGRAFÍA	62

LISTA DE FIGURAS

FIGURA. 1 Crecimiento a las 72hrs/37°C de <i>Brucella ovis</i> en Agar Sangre	8
FIGURA. 2 Representación esquemática estructural de la envoltura celular de <i>Brucella ssp</i>	13
FIGURA. 3 Respuesta Inmune Celular y Humoral en <i>Brucella ovis</i>	18
FIGURA. 4 Electroforesis SDS-PAGE al 12% de MVs de <i>Brucella ovis</i>	46
FIGURA. 5 Microscopía Electrónica de Barrido de las partículas (Antígeno, Adyuvante, Inmunógeno)	48

LISTA DE CUADROS

CUADRO. 1 Antecedentes Históricos de <i>Brucella ovis</i>	6
CUADRO. 2 Pruebas Bioquímicas de los principales microorganismos asociados con Epididimitis Ovina	7
CUADRO. 3 Principales Vacunas Celulares de microorganismos vivos atenuados aglutinógenas	20
CUADRO. 4 Principales Vacunas Celulares de microorganismos vivos atenuados no aglutinógenas	21
CUADRO. 5 Principales Vacunas Celulares de microorganismos enteros inactivados	22
CUADRO. 6 Principales Vacunas Subcelulares no recombinantes	24
CUADRO. 7 Principales Vacunas Subcelulares recombinantes	25
CUADRO. 8 Principales Vacunas de Nueva Generación de microorganismos vivos atenuados genéticamente	27
CUADRO. 9 Métodos de preparación de diversas partículas usando polímeros diferentes	30
CUADRO. 10 Características de una Vacuna Ideal	30

LISTA DE GRÁFICAS

GRÁFICA. 1 Curva Estándar de Interleucinas (IL-2, IL-4, INF- γ) del Quitosán	43
GRÁFICA. 2 Curva Estándar de Interleucinas (IL-2, IL-4, INF- γ) del Etil-2-Cianoacrilato	44
GRÁFICA. 3 Cuantificación de Proteínas por el Método de Bradford	45
GRÁFICA. 4 Inducción de INF- γ , IL-2 e IL-4 en células de bazo de ratón Balb-c estimuladas con Mvs, nanopartículas de Quitosán y Quitosán-MVs interiores	52
GRÁFICA. 5 Inducción de INF- γ , IL-2 e IL-4 en células de bazo de ratón Balb-c estimuladas con Mvs, nanopartículas de Etil-2-Cianoacrilato y Etil-2-Cianoacrilato-MVs (interiores y exteriores)	54

LISTA DE TABLAS

TABLA. 1 Concentración de la Curva Estándar de Interlucinas (IL-2, IL-4, INF- γ) de los Adyuvantes	42
TABLA. 2 Concentración de proteína contenida en las diferentes nanopartículas	46
TABLA. 3 Propiedades Físico-Químicas de las partículas determinadas	47
TABLA. 4 Concentración de Interlucinas obtenidas del sobrenadante de células de bazo de ratón Balb-c estimuladas con Mvs, nanopartículas de Quitosán y Quitosán-MVs interiores	49
TABLA. 5 Concentración de Interlucinas obtenidas del sobrenadante de células de bazo de ratón Balb-c estimuladas con Mvs, nanopartículas de Etil-2-Cianoacrilato y Etil-2-Cianoacrilato-MVs (interiores y exteriores)	50

LISTA DE ABREVIATURAS

APCs	Células Presentadoras de Antígeno
CP	Proteínas del Citosol
DCs	Células Dendríticas
DL ₅₀	Dosis Letal 50
DTH	Hipersensibilidad Retardada
HS	Hot Saline
IFA	Adyuvante Incompleto de Freud
IL	Interlucina
IMAC	Inmunidad Mediada por Anticuerpos
IMC	Inmunidad Mediada por Células
IMP	Proteínas de Membrana Interna
INF	Interferon
LPS	Lipopolisacárido
LT	Linfocito T
MVs	Vesículas de Membrana Externa
OM	Membrana Externa
OMP	Proteínas de Membrana Externa
PBS	Solución Buffer de Fosfatos
PEC	poli-ε-caprolactona
PG	Peptidoglicano
PLA	ácido poli-láctico
PLG	poli (láctico-co-glicólico)
PLGA	poli (láctico-co- ácido glicólico)
PM	Marcador de Peso Molecular
PNM	Polimorfonucleares
PSO	Polisacárido O
SIP	Espacio Periplasmático Intermedio
TH1	Linfocitos T Cooperadores tipo 1
TH2	Linfocitos T Cooperadores tipo 2
TNF	Factor de Necrosis Tumoral
UFC	Unidades Formadoras de Colonia

RESUMEN.

El objetivo del presente estudio es determinar la mejor formulación de nanopartículas de quitosán y etil-2-cianoacrilato para encapsular y presentar adecuadamente a las MVs de *B. ovis* para inducir la respuesta TH1 ó TH2, para el desarrollo de Inmunidad Protectora contra *B. ovis*. La determinación de este estudio se realizó por Microscopia Electrónica de Barrido, las nanopartículas resultaron ser de morfología esférica y con tamaños similares (≈ 500 nm). Se evaluó la concentración de producción de interleucinas por Linfocitos T en cultivo celular, que previamente fueron sensibilizados (Quitosan-MVs exteriores, Etil-2-Cianoacrilato-MVs interiores y Etil-2-Cianoacrilato-MVs exteriores). En general, tanto el antígeno (MVs) en combinación de los adyuvantes (Quitosan y Etil-2-Cianoacrilato) mostraron excelentes niveles de producción de citocinas. En donde se demuestra que las nanopartículas de Etil-2-Cianoacrilato-MVs exteriores inducen una excelente respuesta de INF- γ iniciando a las 48hrs. Por otro lado, las nanopartículas de Etil-2-Cianoacrilato-MVs interiores inducen una excelente respuesta de IL-2 iniciando a las 24hrs. Además, las nanopartículas de Quitosán-MVs exteriores inducen una buena respuesta de IL-4 iniciando a las 24hrs. Respectivamente en cada una de las nanopartículas mencionadas la duración de su respuesta fue de 144hrs. En la brucelosis, una inmunidad protectora está dada por una respuesta celular (TH1) y humoral (TH2). Considerándose que la combinación de las tres formulaciones de nanopartículas resultan como un excelente inmunógeno, como posible “Vacuna Subcelular” al modular la respuesta TH1 y TH2, su eficacia deberá ser evaluada a campo en el hospedero susceptible (ganado ovino) en contra de la infección por *Brucella ovis*.

1.0 INTRODUCCIÓN.

La brucelosis es una enfermedad originada, tanto en el hombre como en los animales, por microorganismos del genero *Brucella*. Son cocobacilos Gram negativos, pequeños, aerobios. Aunque se reconocen seis especies, los estudios de hibridación de ADN demuestran que solo se trata de una especie, *Brucella melitensis*, con seis biovariedades. De estas seis especies, solo cuatro producen enfermedad en el humano: *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. canis*; las especies *B. ovis* y *B. neotomae* no son patógenas en el hombre (Timoney, et al., 1992).

Brucella ovis produce una enfermedad clínica o subclínica en ovinos llamada epididimitis contagiosa del carnero, que esta caracterizada por lesiones genitales en carneros y placentitis en ovejas. Las principales consecuencias de la enfermedad son infertilidad en carneros, abortos infrecuentes en ovejas y una mortalidad perinatal incrementada (Bulguin and Anderson. 1983). No existen reportes de infección de *B. ovis* en humanos (Hausler, et. al., 1991).

Se han evaluado las proteínas de membrana externa (outer membrane proteins) de *Brucella* como posibles antígenos para pruebas de diagnóstico y elaboración de inmunógenos biosintéticos (Santos, et.al., 1984). El papel de los grupos principales de OMP, en la inmunidad protectora contra las infecciones de *Brucella*, está actualmente bajo investigación por varios grupos de investigadores (Azftal and Scott, 1987).

La protección conferida por vacunas contra la epididimitis ovina no ha resultado exitosa (Blasco, 1997; Jiménez de Bagües, et.al., 1995), de allí que exista gran preocupación por los investigadores en obtener un inmunógeno que funcione en campañas de control y erradicación. El desarrollo de nuevas vacunas que no posean los inconvenientes del empleo de las vacunas vivas ha llevado a diversas investigaciones. Los nuevos inmunógenos se han basado en la utilización de distintos componentes de fracciones subcelulares, además de la utilización de diversos adyuvantes (Murillo, et.al., 2002). Un adyuvante es cualquier sustancia que incrementa la capacidad del antígeno de presentar una respuesta inmune. Un adyuvante “ideal” es aquel que provoca una respuesta inmune prolongada y de calidad, no tóxico, biodegradable, no inmunogénico y que cuyo método de fabricación pueda ser reproducible (Zaharoff et. al. 2006). Diversos estudios han establecido que el efecto inmunopotenciador de la respuesta inmune es dependiente del tipo de adyuvante utilizado, y en algunos casos, su presencia incrementa la magnitud de la respuesta en comparación de cuando no se usan (Salas et. al., 2005).

La utilización de sistemas de nanopartículas formados por polímeros naturales y sintéticos como adyuvantes para facilitar la presentación de antígenos es un campo que ha sido muy estudiado desde hace ya varios años. Un gran número de polímeros como componentes de sistemas de nanopartículas han sido probados, para demostrar sus efectividades como adyuvantes, mientras minimizan los efectos adversos. Las nanopartículas incrementan la estabilidad, proveen biodisponibilidad y disminuyen efectos colaterales, además de otros importantes beneficios. Esto ha llevado a emplearlas para distribuir fármacos, en sistemas de liberación controlada, en vacunas, terapia génica y un gran número de aplicaciones.

Polímeros como los cianoacrilatos, fueron sintetizados por primera vez en 1949 y su uso clínico fue reportado hasta finales de los 50's. Estos polímeros están lejos de ser tóxicos, debido a que permanecen químicamente intactos. Aunque es conocido que pueden degradarse a cianoacetato y formaldehído. Sin embargo, el grado de degradación está relacionado a la longitud de la cadena. Debido a su gran estabilidad, se está estudiando la posibilidad de utilizarlos como acarreadores de fármacos en el organismo (Díaz Torres et. al., 2005).

Existen otros polímeros naturales como el quitosán, un polisacárido catiónico derivado de la deacetilación de la quitina, un material natural encontrado en los exoesqueletos de varios crustáceos. Los derivados del quitosán han demostrado poseer muchos efectos benéficos incluyendo propiedades curativas en heridas (Biagini, et.al., 1991), fungicida (Susuki, et.al., 1987) y actividades antivirales. También puede conferir protección contra el virus *Sendai* e infecciones por *E. coli*. El quitosán no es tóxico en humanos y estudios han demostrado que cuando se administra en vías como la nasal, no presenta daño permanente en el sistema inmune (Aspden et. al. 1997). Además presenta la capacidad de liberar fármacos a través de la cavidad nasal y tiene un gran potencial adyuvante, haciéndolo un buen candidato para el desarrollo de vacunas (Jabbal, et. al., 1998).

Estudios previos han demostrado la protección conferida por el antígeno HS (Hot Saline) de *Brucella ovis* en el modelo murino, ante el desafío de *B. ovis*. (Riezu-Boj, et.al., 1986; Gamazo, et.al., 1989; Murillo, et. al., 2001) reportaron que el antígeno HS encapsulado en micropartículas del polímero poli-ε-caprolactona, activa una respuesta de citocinas responsables de la inmunidad celular, además señalan la importancia del adyuvante en el desarrollo de una respuesta celular y humoral. Estudios realizados (Salas et. al. 2005), demostraron que empleando diferentes fracciones subcelulares de *B. ovis*: proteínas de membrana externa (Omp), proteínas de membrana interna (Imp) y proteínas de citosol (Cit), las que mejor respuesta inmune celular produjeron *in vitro* fueron las Omp, comportamiento que también encontraron en microvesículas (MVs).

B. ovis es una bacteria intracelular facultativa que puede sobrevivir dentro de los fagocitos mononucleares utilizando diversos mecanismos de evasión como: 1) la resistencia a enzimas lisosomales y a los productos de oxígeno reactivo, 2) el impedimento de la unión fagosoma – lisosoma y por ultimo, 3) el escape del fagosoma dentro del citoplasma, debido a la formación de microvesículas. Las vesículas (MVs) de *B. ovis*, micrométricas, cuyo contenido no está bien establecido, han sido utilizadas como inmunógenos contra el microorganismo demostrando que pueden provocar una respuesta de tipo celular en el organismo confiriendo inmunidad protectora (Salas et. al., 2005).

Los linfocitos T se diferencian en dos subclases, Th1 y Th2. Los Th1 principalmente secretan IL-2, IFN- γ y TNF- β , los cuales participan en la inmunidad celular, mientras que los Th2 secretan IL-4, IL-5 e IL-10, los que promueven una respuesta inmune humoral. Se ha reportado que células vivas de *Brucella abortus* inducen la producción de IFN- γ , sin embargo, células muertas o fracciones subcelulares inducen la IL-4 (Zhan and Cheers, 1995). La respuesta inmune celular es crucial para la defensa del huésped contra bacterias intracelulares. Ha significado un paradigma el explicar como la bacteria induce la respuesta inmune celular en el huésped (Cheers, 1997). Existen pocos estudios relacionados con la respuesta inmune celular en ovinos y ratones inducida por *Brucella ovis* (Murillo, et.al., 2001).

Debido a que *B. ovis* es la bacteria causante de la epididimitis contagiosa del carnero, una enfermedad que produce un decremento de la fertilidad y posible esterilidad del carnero provocando grandes pérdidas económicas a los ganaderos, esta tesis tiene como objetivo estudiar la respuesta inmune celular empleando el modelo murino, de las microvesículas (MVs) de *B. ovis* en polímeros como el quitosán y el etil-2-cianoacrilato como adyuvantes en sistemas nanoparticulados para una mejor presentación del antígeno y como potenciadores de la respuesta inmune.

1.1.1 GENERALIDADES

La brucelosis es una enfermedad infecto-contagiosa de distribución mundial que afecta a especies animales domesticas, de vida silvestre y al hombre; cuyos agentes etiológicos son las bacterias del género *Brucella*.

En el género se reconocen seis especies clásicas, cada una de las cuales tiene un hospedador principal:

B. abortus (bovinos), *B. canis* (caninos), *B. melitensis* (caprinos), *B. neotomae* (rata del desierto), *B. ovis* (ovinos) y *B. suis* (porcinos). Recientemente se han identificado nuevas variantes de *Brucella* aisladas de mamíferos marinos que se ha sugerido sean incorporadas como dos nuevas especies: *B. cetaceae* y *B. pinnipediae* (Moreno, et. al., 2002).

El hombre contrae la enfermedad por contagio directo, durante el manejo de los animales infectados o por ingestión de productos lácteos frescos contaminados, pero no es fuente de contagio.

En el Manual de Bergey de Bacteriología Sistemática 1984, se reconoce la existencia de seis especies del género *Brucella*, de las que cuatro son de interés económico: *B. abortus*, que afecta al ganado bovino; *B. melitensis*, que afecta al ganado caprino y ovino; *B. suis*, que afecta al ganado porcino; y *B. ovis*, que afecta al ganado ovino (Salas et. al., 2005).

La brucelosis de los ovinos es una enfermedad infecciosa de curso crónico producido por *Brucella ovis* ya que impacta de manera negativa en los establecimientos de cría ovina ya que infecta principalmente a los machos ovinos y es el agente etiológico de la epididimitis contagiosa del carnero.

La epididimitis contagiosa del carnero es una enfermedad que se caracteriza por una inflamación del epidídimo en los carneros, con la consiguiente disminución de la fertilidad, baja calidad del semen, presencia de granulomas espermáticos y fibrosis progresiva del epidídimo, además puede producir abortos tardíos en las hembras y un aumento de la mortalidad perinatal (Robles, 1998).

1.1.2 ANTECEDENTES HISTÓRICOS

En el Cuadro. 1 resume los diversos eventos relevantes en la historia de la *Brucella ovis*.

Año	Evento	Bibliografía
1952	Se aísla un Bacilo Gram (-) a partir de carneros afectados de epididimitis.	Mc Farland et. al., 1952
1953	Se describe un microorganismo semejante en Australia y Nueva Zelanda.	Simmons and Hall. 1953 Buddle and Boyes. 1953
1953	El microorganismo se considera una mutante de <i>Brucella melitensis</i> .	Buddle and Boyes. 1953
1955	Se denomina <i>Brucella ovis</i> porque contiene antígenos comunes con cepas rugosas de <i>Brucella abortus</i> y <i>Brucella melitensis</i> , sin poseer antígenos A y M. Este mismo autor propone la denominación alternativa de “ <i>Brucella brucei</i> variedad <i>ovis australasiae</i> ”.	Buddle, 1955
1956	Se incluye dentro del género <i>Neisseria</i> o dentro del género <i>Haemophilus</i> , debido a la existencia de ciertas propiedades comunes.	Meyer and Cameron. 1956 Kennedy et. al., 1956
1962 y 1966	El subcomité de Taxonomía del género <i>Brucella</i> de la ASM, rehusó admitir este microorganismo como <i>Brucella</i> .	Jones, 1967
1967	Con base en las relaciones antigénicas de <i>Brucella ovis</i> con <i>Brucella melitensis</i> , se recomienda su inclusión en el género <i>Brucella</i> .	Díaz et. al., 1967
1968	Debido al análisis de los ácidos nucleicos propone que <i>Brucella ovis</i> pertenece al genero <i>Brucella</i> .	Hoyer and Mc Cullough, 1968
1974	Se describe por primera vez en México la presencia de anticuerpos contra <i>Brucella ovis</i> .	Suárez et. al., 1974
1976	Es aceptada la inclusión de <i>Brucella ovis</i> dentro del genero <i>Brucella</i> por el Subcomité de Taxonomia.	Alton et. al., 1976
1979	Se realiza el primer aislamiento de <i>Brucella ovis</i> en México a partir de sementales Suffolk importados de USA.	Pérez et. al., 1979
1983	La epididimitis se describe en numerosos países.	Blasco, 1983
1997	Se considera importante la presencia de la enfermedad en México, al reportarse el 2.4% de reactores positivos en sementales jóvenes.	Núñez et. al., 1997

Cuadro. 1 Antecedentes Históricos de *Brucella ovis* (Salas et. al., 2004).

1.1.3 ASPECTOS GENERALES

En el Cuadro.2 resume las propiedades bioquímicas entre los principales microorganismos asociados con la epididimitis ovina.

Pruebas Bioquímicas	<i>Brucella ovis</i>	<i>Actinobacillus seminis</i>	<i>Histophilus ovis</i>
Gram	-	-	-
Catalasa	+	-/+	-
Oxidasa	-	-	+
Motilidad	-	-	-
Hemólisis	-	-/+	-
Nitratos	-	-	+
Indol	-	-	-/+
Urea	-	-	-
Rojo de Metilo	-	-	-
Voges-Prokauer	-	-	-
Arabinosa	-	-	-
Ramnosa	-	-	-
Xilosa	-	-	+
Glucosa	-	-	+
Fructuosa	-	-	+
Galactosa	-	-	-
Sucrosa	-	-	-
Lactosa	-	-	-
Trealosa	-	-	-
Glicerol	-	-	-
Dulcitol	-	-	-
Manitol	-	-	-/+
Sorbitol	-	-	-/+
Maltosa	-	-	-
Gelatina	-	-	-
Ziehl-Neelsen	-	-	-
Ziehl-Neelsen modificado Stamp	Cocobacilos de color Azul	Cocobacilos color Rojo	-

Cuadro. 2 Pruebas Bioquímicas de los principales microorganismos asociados con Epididimitis Ovina (Bergey, 1984).

Brucella ovis crece adecuadamente en el medio Thayer-Martín modificado mediante la adición de diversos antimicrobianos: Nitrofurantoina, Vancomicina, Colistina y Nitastina agregados a la base de Agar Sangre o Agar Soya Trypticaseina enriquecida con un 5 % al 10% de Suero animal (Thayer and Martín, 1964).

El primo aislamiento debe hacerse a 37°C en una estufa con 10% al 20% de CO₂ o bien carecer de éste si se trata de cepas previamente acondicionadas (cepa REO 198 de *Brucella ovis*). En el primo aislamiento las colonias pueden aparecer aproximadamente entre los 4-7 días. Estas son grisáceas y circulares, con bordes enteros y regulares, convexas y de superficie brillante; el centro es opaco y la periferia translúcida y morfológicamente es prácticamente imposible distinguir las colonias de otras especies lisas del género *Brucella*.

Además *Brucella ovis* no produce H₂S, su crecimiento es inhibido por el violeta de metilo, pero se multiplica en presencia de fucsina y tionina. Oxida a los aminoácidos L y D-alanina, L-asparagina, L-ácido glutámico, L y D-serina. No oxida a los aminoácidos L-arginina, L y D-citrulina, L y D-ornitina y L-lisina. Los cultivos no son lisados por los fagos Tb, WB, M-51-5708, Fz, Bk, MC-75, D y R. Sin embargo, los fagos R/O – R/C son líticos para *Brucella ovis*. Es sensible “*in vitro*” a la penicilina, estreptomycinina y tetraciclina (Corbel and Brinley, 1975).

En la Figura. 1 se observa el crecimiento característico de *Brucella ovis* cepa Reo 198 independiente de CO₂.



FIGURA. 1 Crecimiento en Agar Sangre de *Brucella ovis* a las 72hrs a 37°C.

1.1.4 COMPOSICIÓN ANTIGÉNICA

Los microorganismos del género *Brucella* son cocobacilos Gram negativos, no esporulados, acapsulados, carentes de pilis o flagelos. Poseen una envoltura celular característica: la membrana externa (OM), la membrana interna (IMP) y un espacio periplásmico intermedio (SIP). En el periplasma hay proteínas y un gel glucopeptídico denominado peptidoglicano (PG) responsable de la forma e integridad osmótica de la bacteria. El citoplasma es rico en ADN, ARN y proteínas citosólicas, algunas de ellas importantes desde el punto de vista del diagnóstico.

1.1.4.1 Antígenos de la membrana externa (OM)

Los antígenos de la membrana externa de *Brucella* han sido objeto de investigación desde el punto de vista del diagnóstico y de la inmunoprolifaxis, considerando que representan el punto de contacto inicial entre el patógeno y el hospedador. Las moléculas mejor caracterizadas corresponden a dos grupos: el lipopolisacárido (LPS) y las proteínas de la membrana externa (outer membrane proteins “OMP”) (Robinson and Melling, 1993).

1.1.4.1.1 Lipopolisacárido (LPS)

Las especies de *Brucella* pueden ser clasificadas como “lisas y rugosas” de acuerdo al aspecto de las colonias en medio sólido. El aspecto diferente de estas colonias reside en el tipo de LPS expresando en mayor proporción en la superficie: LPS-S (Lisas) y LPS-R (rugosas).

El LPS-S consta de una parte glicolípídica (lípidos A) inserta en la membrana externa y otra polisacáridica expuesta hacia el interior, esta se divide en dos secciones: el núcleo más interno o core y la cadena-O (polisacárido O: PSO). Esta cadena es un homopolímero lineal de perosamina que se encuentra ausente en el LPS-R de la especie rugosas (*B. ovis* y *B. canis*) (Moreno, et. al., 1984).

El PSO es el antígeno inmunodominante de superficie, capaz de inducir una respuesta inmunológica en la mayoría de los animales en contacto con especies lisas de *Brucella* (*B. abortus*, *B. melitensis* y *B. suis*); además es la estructura antigénica más expuesta (Díaz and Lévioux, 1972) y blanco de anticuerpos protectores (Plommet, 1987).

Por otro lado, el PSO posee epitopes compartidos con otras especies bacterianas como: *Yersinia enterocolitica* O: 9, *Vibrio cholerae*, *Salmonella landau*, *Escherichia coli* O: 157 H7 responsables de reactividad cruzada en las pruebas serológicas que se basan en la detección de Anticuerpos hacia este Antígeno.

1.1.4.1.2 Proteínas de la membrana externa (OMP)

Las OMP de *Brucella* se clasifican en mayores y menores de acuerdo con su abundancia relativa, hallándose ambas intercaladas en la membrana y estrechamente unidas al LPS por fuerzas hidrofóbicas. Muchas de estas OMPs han sido caracterizadas desde el punto de vista genético, inmunológico, estructural y funcional (Cloekaert, et al., 2002).

1.1.4.1.2.1 OMP mayores

Las OMP mayores son insolubles en disolventes acuosos y para su estudio ha sido necesario el empleo de detergentes u otros agentes surfactantes.

En la década de los 80's estas proteínas fueron identificadas por primera vez en *Brucella abortus* en una fracción insoluble en Dodesilsulfato de Sodio extraída a partir de la envoltura celular (SDS-I) (Dubray and Bezard, 1980) (Dubray and Charriaut, 1983).

Dicha fracción contiene 2 de las OMP mayores: una de 25-27 KDa y otra de 36-38 KDa y mostró tener actividad protectora parcial en el ratón (Dubray, et.al, 1987). Ambas OMP también fueron identificadas mediante extracción con otros detergentes y designadas como grupo 3 y grupo 2. Cuando la fracción SDS-I se obtuvo a partir de *Brucella melitensis* se identificó adicionalmente una proteína de 31-34 KDa, (Cloekaert, et.al., 2002) hoy denominada Omp31 y ausente en *Brucella abortus* (Vizcaíno, et. al, 1997).

1.1.4.1.2.2 OMP menores

Los OMP menores son Omp1 y las Lipoproteínas Omp10, Omp16, Omp19 que a diferencia de las OMP mayores, no se encuentran asociadas al Peptidoglicano. (Cloekaert, et. al., 1996) Entre otras proteínas minoritarias, se han descrito una Lipoproteína de 8KDa unida en forma covalente al Peptidoglicano que posee epitopes comunes con la Lipoproteína Braun de *E.-coli* (Gómez, et. al., 1987) (Gómez and Moriyón, 1986).

1.1.4.2 Antígenos del espacio periplásmico intermedio (SIP)

1.1.4.2.1 Proteínas periplásmicas

En *Brucella* han sido identificados varias proteínas periplásmicas inmunogénicas cuyos genes han sido clonados, tales como la Superóxido Dismutasa (SOD) dependiente de Cu^{+2} y Zn^{+2} y BP26 o Omp28 (Bricker, et. al., 1990).

En particular, parece ser que BP26 u Omp28 posee propiedades diagnósticas ya que se han encontrado que son inmunodominantes en animales infectados: vacas, borregos, cabras, incluyendo al ser humano. De estas proteínas no se ha llegado a evaluar su actividad protectora.

La inmunización con SOD dependiente $\text{Cu}^{+2}/\text{Zn}^{+2}$ no produce protección contra *Brucella abortus*, sin embargo, la inmunización con un péptido sintético derivado de SOD dependiente $\text{Cu}^{+2}/\text{Zn}^{+2}$ confiere protección en el modelo murino (Cloekaert, 1997).

1.1.4.3 Antígenos del citoplasma (CP)

1.1.4.3.1 Proteínas citoplasmáticas

Entre las proteínas Citosólicas se han caracterizado las proteínas del estrés térmico: GroEL, GroES, DnaK, HtrA; las proteínas Ribosomales: L7/L12; las proteínas YajC, UvrA; la Bacterioferritina (BFR), la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH); proteínas con funciones denominadas p15, p17, p39 y cp24.

También se han identificado y purificado proteínas de actividad desconocida con pesos moleculares de 14kDa, 22.9kDa y 32.2kDa. La actividad inmunogénica y protectora de estas proteínas recombinantes en el Modelo Murino en el ratón Balb-c (Cloekaert, 1997).

1.1.4.4 Otros Antígenos

1.1.4.4.1 Vesículas de Membrana Externa (MVs)

Son estructuras presentes en diferentes géneros de Bacterias Gram (-), el fenómeno por el cual estas Vesículas se forman en la Membrana Externa de las bacterias aun se desconoce, algunas características importantes que se consideran:

Es una fuente de caracterización y aislamiento de componentes celulares ya que pueden estar formadas por: Lipopolisacáridos, Proteínas Periplasmáticas, Proteínas de la Membrana Externa, Fosfolípidos, Enzimas, ADN e incluso Toxinas. Lo cual ha sido demostrado en algunos géneros de Bacterias Gram (-). Las Vesículas de Membrana Externa pueden presentar diferentes actividades biológicas: bactericidas, proteolíticas e inmunogénicas.

Las Vesículas son pequeñas esferas cerradas que derivan de la membrana externa por fragmentación seguida por cierre hermético, probablemente son el resultado de la expulsión de la membrana celular. Estas estructuras tienen un tamaño aproximado de 200-500nm, se han encontrado en diferentes géneros: *Bacteroides*, *Pseudomonas*, *Actinobacillus*, *Escherichia*, *Haemophilus*, *Neisseria* y recientemente *Brucella*.

Estas Vesículas pueden actuar como Factores de Virulencia, su pequeño tamaño puede permitirles fácilmente cruzar barreras del epitelio que son impermeables a bacterias enteras, también puede servir como un vehículo para toxinas y enzimas proteolíticas, además puede producir una respuesta inmunológica semejante o igual a la bacteria completa.

1.1.4.4.2 Actividad bactericida de MVs

Las Vesículas de Membrana Externa de Bacterias Gram (-) (*Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Morganella*, *Proteus*, *Salmonella* y *Shigella*) poseen varios tipos de hidrolasas de mureína (Autolisinas) que se unen covalentemente al Peptidoglicano de la Pared Celular de Bacterias Gram (+), hidrolizándolo y causando la inestabilidad de la integridad celular.

1.1.4.4.3 Actividad proteolítica de MVs

Es posible que otras enzimas proteolíticas se encuentren en las MVs localizadas en la superficie. Por ejemplo: Proteasas, Lipasas, Fosfolipasa C pueden facilitar la digestión por hidrólisis de moléculas complejas originando fragmentos pequeños empleados en la nutrición de la bacteria.

1.1.4.4.4 Actividad inmunogénica de MVs

Las MVs de *Brucella ovis* muestra una protección eficiente ya que contienen Omp31 y LPS-R que potencializa la respuesta inmune celular, induciendo citocinas Th1 (Reyes, 2002).

Cabe mencionar, que la protección adquirida en el modelo murino por las MVs de *Brucella ovis* son dependiente del tipo de Adyuvante, Ruta de administración y la Cepa de desafío (Salas et. al., 2005).

En la Figura. 2 se observa la composición antigénica de *Brucella ssp* implicados en la patogénesis y de la inducción de la respuesta inmune en el hospedero.

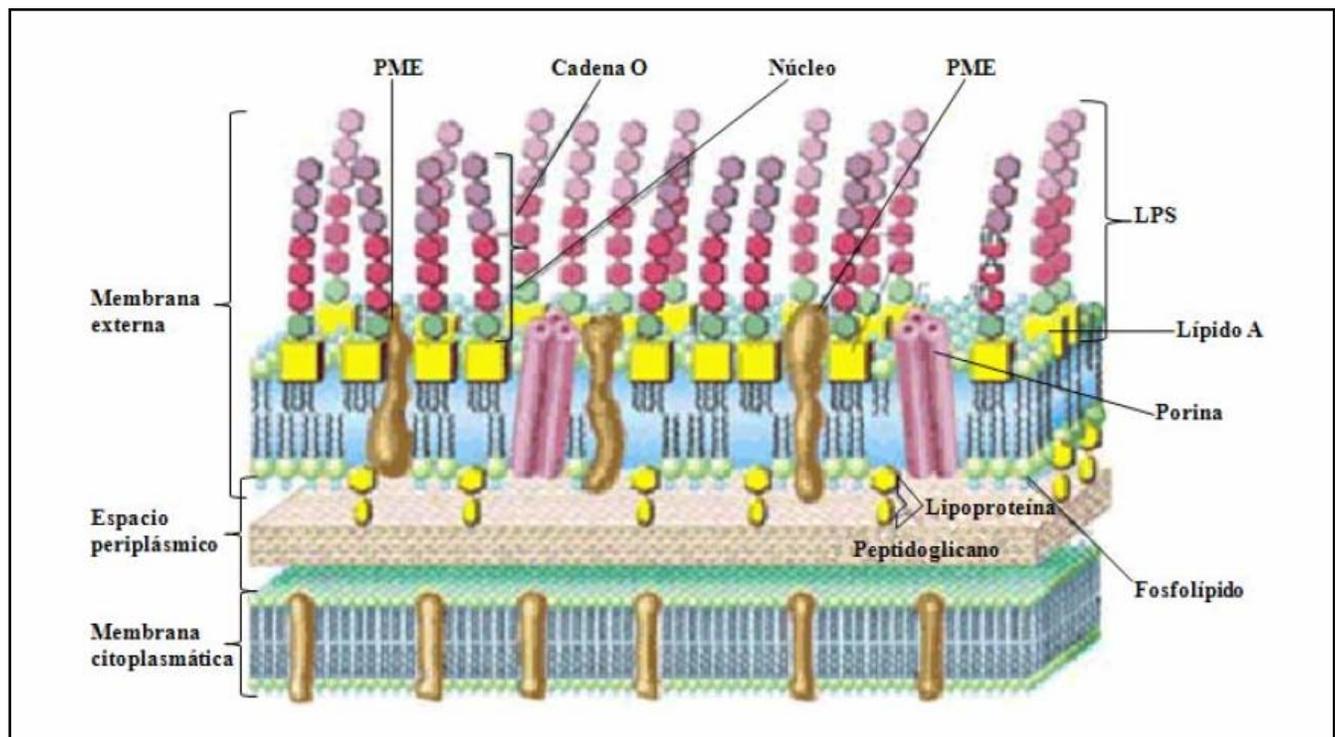


FIGURA. 2 Representación esquemática estructural de la envoltura celular de *Brucella ssp* (Venegas, 2007).

1.1.5 RESPUESTA INMUNE

Brucella es un microorganismo intracelular facultativo capaz de sobrevivir y multiplicarse dentro de las Células del Sistema Retículo-Endotelial y desencadenando en el huésped susceptible una Respuesta Inmune Innata y Respuesta Inmune Adaptativa.

1.1.5.1 Inmunidad Innata.

Son los primeros mecanismos en activarse ante la entrada de los agentes infecciosos, reduce el número inicial de bacterias y prepara para la activación de los mecanismos de la Inmunidad Adaptativa. (Ko and Splitter, 2003).

1.1.5.1.1 Células Efectoras de la Inmunidad Innata

Las bacterias del genero *Brucella* ingresan al Hospedador susceptible por las Vías Oral, Vía Nasal, Vía Conjuntival y Vía Genital. La vía genital es la principal para el contagio con *Brucella ovis*, luego de la infección, la bacteria es rápidamente fagocitada por los Leucocitos Polimorfonucleares Neutrófilos (PMNN) en los que sobrevive y se multiplica (Enright, 1990).

Los PMNN facilitan la diseminación de las bacterias por 2 mecanismos:

1. Sirviendo de protección frente a las actividades bactericidas de Anticuerpos y Complemento.
2. Transportándolas hacia los Tejidos Linfoides y los Órganos del Sistema Retículo-Endotelial donde la bacteria infecta a los Macrófagos y se multiplica en su interior.

Se ha demostrado que los macrófagos y los neutrófilos poseen la capacidad de destruir, aunque no completamente a las *Brucellas* fagocitadas. Los mecanismos activados son para inhibir la multiplicación de la *Brucella* o destruirla, incluyen la estimulación del estallido respiratorio y la producción de radicales libres de oxígeno en los PMNN (Canning et.al., 1988). Se ha demostrado que la ingestión y el estallido respiratorio dependen de la opsonización específica con anticuerpos y/o inespecífica con C3b, además de citocinas como Interferón- γ (INF- γ) y Factor de Necrosis Tumoral- α (TNF- α) que influyen el proceso de Fagocitosis (Canning, 1988 y Eze et. al., 2000).

Los Linfocitos NK no cumplen una función importante en el control de la infección aguda con *Brucella*, al menos en el modelo murino. Otras células de la inmunidad innata involucradas en la protección son los Linfocitos T γ/δ , sin embargo el rol de estas células in vivo aun no ha sido caracterizado (Wyckoff, 2002).

1.1.5.1.2 El Sistema del Complemento

Entre los mecanismos de la respuesta humoral Innata, el Complemento tiene un papel importante en la defensa contra *Brucella* cuando esta se encuentra en el compartimiento extracelular y en bajo número. Estudios realizados en Bovinos indican que *Brucella abortus* puede ser destruida por el Complemento, está involucrada en la lisis de la bacteria, que fueron por la Vía Clásica y Vía de las Lectinas (mediada por la Proteína Fijadora de Manosa “MBP”) (Fernández and Nikolich, 2001).

1.1.5.2 Mecanismos de la Inmunidad Adaptativa.

Contra *Brucella* se conocen 3 mecanismos que actúan en diferentes etapas de la infección:

1. La generación de una respuesta humoral con producción de anticuerpos
2. La activación de la función bactericida de los macrófagos por acción de INF- γ producido por Linfocitos T CD4⁺ y Linfocitos T CD8⁺
3. La lisis de células infectadas por Linfocitos CD8⁺

1.1.5.2.1 Inmunidad Humoral

Quizás *Brucella ssp*, en mayor grado que otros microorganismos intracelulares facultativos, inducen la producción de anticuerpos. Estos pueden otorgar alguna protección en las etapas iniciales de la infección pero la fase bactericida coincide con el inicio de la Inmunidad Mediada por Células (IMC).

La participación de los anticuerpos en la inmunidad innata contra *Brucella* se ha estudiado en animales de laboratorio, principalmente en el ratón. En esta especie, el suero es capaz de limitar la infección por 2 mecanismos:

1. Transferencia de las bacterias al hígado y fagocitosis por células Kuppfer
2. Bloqueo de la diseminación

En rumiantes, la participación de los Anticuerpos en la protección es difícil de evaluar. Los animales en contacto con *Brucella* Lisa responden con la producción de anticuerpos dirigidos contra los diferentes componentes del microorganismo., pero especialmente contra los antígenos de superficie, en particular contra Lipopolisacárido-S (LPS-S).

Estos Anticuerpos aparecen en los estadios tempranos de la infección y suelen permanecer detectables en el suero durante años. Los anticuerpos producidos colaboran en la lucha del hospedero contra el patógeno pero no son suficientes para evitar la enfermedad. Sin embargo, la detección de anticuerpos dirigidos contra el LPS es útil para el diagnóstico, pronóstico y curso de la infección.

Así mismo, se ha comprobado que la respuesta humoral a diferentes OMP (Proteínas de Membrana Externa) en bovinos y ovinos infectados naturalmente con *B. abortus* y *B. melitensis*, respectivamente es muy pobre y heterogénea. (Zygmunt et. al, 1994). En ovinos, aunque no se ha evaluado el rol de los anticuerpos en la protección, se ha demostrado que las proteínas del grupo 3: Omp25, Omp31, Omp16 y LPS-R son antígenos inmunodominantes en el curso de la infección por *Brucella ovis* (Kittelberger et. al., 1998).

1.1.5.2.2 Inmunidad Mediada por Células (IMC)

La participación de los Linfocitos T en la respuesta inmune en *Brucella* ha sido principalmente en el modelo murino en ratón Balb-c y la transferencia de suero y Linfocitos T han demostrado que la protección es debida en parte a los anticuerpos y en parte a los Linfocitos T con efectos no aditivos (Araya and Winter, 1990).

En infecciones con *Brucella* Lisas, los Linfocitos T parecen pesar más que los anticuerpos, esto indica que ambas poblaciones de Linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ actúan en la protección, señalando que ambas subpoblaciones tienen una participación comparable en la protección contra *Brucella abortus*.

La resistencia a los patógenos intracelulares como *Brucella abortus* depende de la activación de la inmunidad mediada por células. El principal activador de los macrófagos es el IFN- γ secretado por Linfocitos CD4⁺ y CD8⁺. En efecto, *in vitro*, el tratamiento de Macrófagos murinos con IFN- γ controla la multiplicación de *Brucella abortus* y favorece su muerte activando la producción de intermediarios oxidativos y otras moléculas microbicidas.

Además la inyección de INF- γ recombinante en ratones, se observa resistencia a *Brucella* en macrófagos esplénicos y peritoneales, mientras que la inyección de anticuerpos-M anti IFN- γ exacerbaba la infección por *Brucella abortus* y favorece la esplenomegalia, el principal signo patológico de la Brucelosis en ratones y en el hombre. Así mismo, se ha demostrado la activación específica *in vitro* de Linfocitos de bovinos infectados o inmunizados con bacterias atenuadas o fracciones de *Brucella* y la producción de Interleucina-2 e INF- γ (Wyckoff et. al., 1993).

Los estudios realizados con *Brucella abortus* señalan que solo estas bacterias vivas son capaces de inducir inmunidad mediada por células (IMC), activando a las células Th1 a producir INF γ e IL-2 favoreciendo de este modo la síntesis de IgG2a y el fenómeno de hipersensibilidad retardada (DTH) en ratón (Jiang et. al., 1993).

En contraposición demostraron que la inyección de extractos de *Brucella* ricos en proteínas o bacteria muerta, estimulan la población Th2 con la producción de IL-4 e IgG1 (Zhan and Cheers, 1995).

Sin embargo recientemente indican que *Brucella abortus* inactivada estimula la activación de células dendríticas, la secreción de IL-2 se ha dilucidado la respuesta hacia un perfil Th1 y que además activa la población de Linfocitos citotóxicos (Golding et. al., 2001; Inoue et. al., 2005).

Varias citocinas y en especial TNF e IL-12 juegan un rol principal *in vivo* e *in vitro* en la secreción de IFN- γ por Linfocitos CD4⁺. Estas citocinas secretadas por el macrófago, también participan en la activación de Linfocitos NK, aunque tienen actividad inespecífica, estos contribuyen con los Linfocitos T al control de la infección por microorganismos intracelulares.

Recientemente se ha estudiado el rol de las Oponinas en la interacción *Brucella melitensis* y macrófago, cuando *Brucella* es opsonizada por anticuerpos o por el Complemento, la activación del macrófago por el INF- γ inhibe la multiplicación de *Brucella* pero no la destruye, sugieren la necesidad de otros mecanismos celulares como acción citotóxica de Linfocitos CD8⁺ que destruirán el macrófago infectado liberando a las bacterias al medio extracelular donde serán blanco de los anticuerpos o del Complemento (Eze et. al., 2000).

A diferencia de lo que ocurre con las especies *Brucella* Lisas (*B. ovis* y *B. canis*), la respuesta inmune humoral tendrá un rol más importante que la respuesta inmune celular en la protección de *Brucella ovis*:

- La transferencia de suero de ratón convaleciente confirió una protección mayor a aquella obtenida por la transferencia de Linfocitos T sensibilizados, extraídos a partir de bazo o ganglio linfático (Jiménez et. al., 1994)
- La infección por *Brucella ovis* indujo principalmente los isótopos de IgG2a e IgG3 sobre IgG1 se ha inferido que esta bacteria estimularía principalmente la población de Linfocitos T (Th1) productores de INF- γ (Jiménez et. al., 1994).

En la Figura 3 se resume el destino de los linfocitos tras su encuentro con los antígenos. En una respuesta inmune normal, un antígeno inmunógeno estimula la proliferación y diferenciación de linfocitos específicos para ese antígeno desencadenando una inmunidad celular y humoral. Los antígenos tolerógenos pueden inducir una respuesta no funcional o la muerte de linfocitos específicos, lo que los hace incapaces de responder al antígeno desencadenando una regulación inmune.

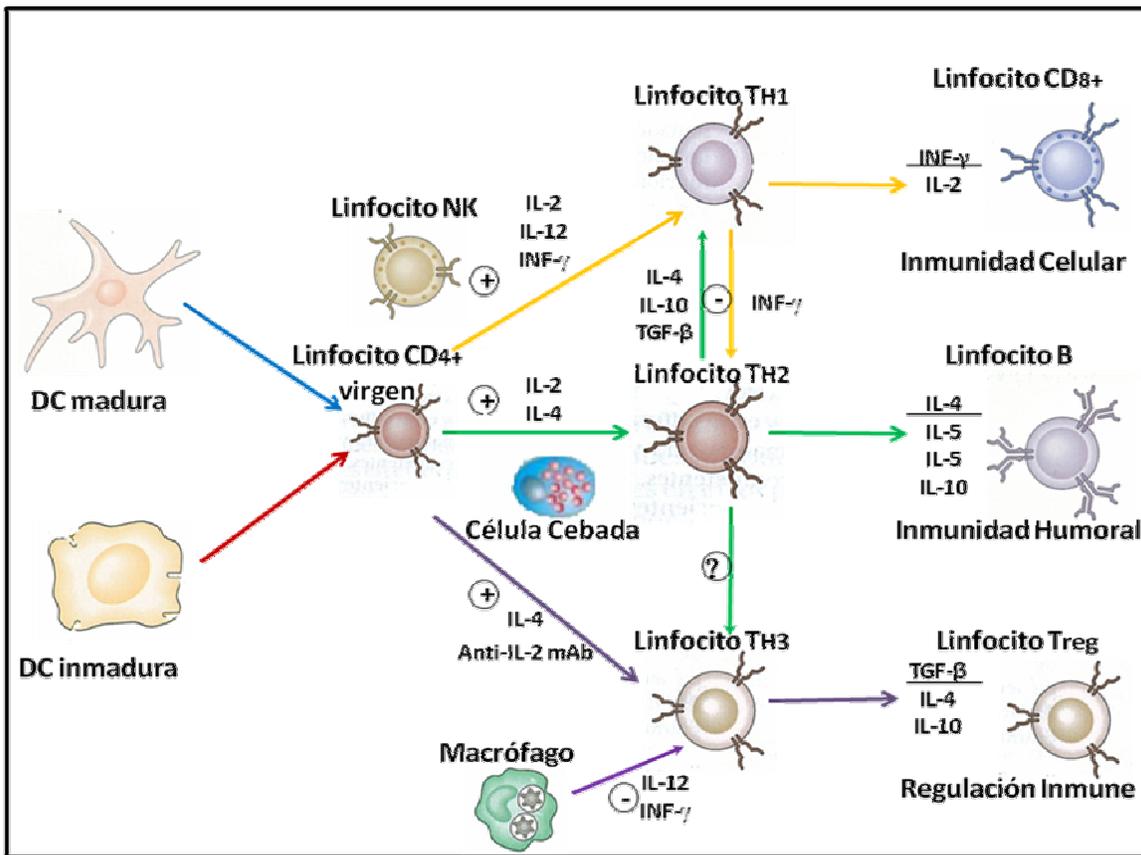


FIGURA. 3 Respuesta Inmune Celular y Humoral en *Brucella ovis* (Martínez, 2008).

1.1.6 VACUNAS

Suspensión de microorganismos vivos o fracciones del mismo, generalmente atenuadas o inactivas, cuya administración induce respuesta inmunológica frente a alguna enfermedad.

1.1.6.1 Vacunas Celulares:

Estas cepas son capaces de establecer una infección limitada imitando el proceso de infección natural por cepas silvestres y confiriendo de esta manera protección contra el aborto y la infección. Sin embargo, el empleo de estas vacunas puede ocasionar abortos en las hembras gestantes e infertilidad por infección genital.

1.1.6.1.1 Vacunas de microorganismos vivos atenuados.

Asegura la inducción de una respuesta inmune completa contra un gran número de componentes y una re-estimulación del sistema inmune gracias a la replicación de la bacteria.

Las vacunas vivas atenuadas son patógenas para el hombre, debe haber precauciones particulares durante la manipulación de la vacuna, lo cual introduce un importante problema de salud pública (Blasco and Díaz, 1993).

1.1.6.1.1.1 Vacunas Aglutinógenas.

Inducen anticuerpos que interfieren contra las pruebas serológicas de rutina, impidiendo la diferenciación entre animales infectados y vacunados.

Se han implementado modificaciones en la forma de administración:

- La reducción de la dosis inyectada, permitiendo vacunar animales púberes sin consecuencias serológicas duraderas.
- El uso de la vía conjuntival ha mostrado inducir buena inmunidad con una respuesta serológica de corta duración.

En el Cuadro. 3 resume las principales vacunas celulares de microorganismos vivos atenuados aglutinógenas desarrollados contra la *brucelosis* en animales.

Cepa	Características	Vía de Administración y Confiere Protección
<i>B. abortus</i> S19 (Cepa Lisa)	Presenta características muy estables.	*Vía Subcutánea *Ganado bovino vs <i>B. abortus</i>
<i>B. melitensis</i> Rev1 (Cepa Lisa)	Presenta características muy inestables: <ul style="list-style-type: none"> • Puede derivar hacia formas o variantes indeseables, una disociación hacia el fenotipo rugoso o hacia fenotipos lisos de mayor virulencia. • Es una cepa resistente a estreptomycin, uno de los antibióticos de elección para el tratamiento de brucelosis humana. • La Vacuna es capaz de inducir protección y estimular el desarrollo de Anticuerpos, la desventaja que puede interferir con las pruebas serológicas utilizadas para detectar animales infectados con <i>Brucella ovis</i>. 	*Vía Subcutánea *Ganado caprino vs <i>B. melitensis</i> *Ganado ovino vs <i>B. ovis</i>
<i>B. suis</i> 2 (Cepa Lisa)	Presenta características muy estables. <ul style="list-style-type: none"> • Se ha determinada resultados pobres obtenidos en ratón y en ovejas. • Su virulencia no supera a la de la cepa <i>B. abortus</i> S19. • La protección que confiere a ovejas preñadas contra <i>B. melitensis</i> y a carneros contra <i>B. ovis</i> es escasa 	*Vía Oral *Ganado caprino vs <i>B. melitensis</i> *Ganado ovino vs <i>B. ovis</i>

Cuadro. 3 Principales Vacunas Celulares de microorganismos vivos atenuados aglutinógenas (Chávez, 2004).

1.1.6.1.1.2 Vacunas No Aglutinógenas.

Son Cepas rugosas, con expresión limitada de Polisacárido-O (PSO), poseen una alteración en el gen *rfbU* que codifica para Enzima manosil-transferasa, necesaria para el ensamblaje de la Cadena-O que forma parte del LPS de *Brucella* por ende no inducen Anticuerpos que interfieran con las pruebas serológicas de rutina y si diferencia entre animales infectados y animales vacunados.

En el Cuadro. 4 resume las principales vacunas celulares de microorganismos vivos atenuados no aglutinógenas desarrollados contra la *brucelosis* en animales.

Cepa	Características	Vía de Administración y Confiere Protección
<i>B. abortus</i> 45/20 (Cepa Rugosa)	<p>Presenta características poco estables.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Con capacidad de revertir a formas virulentas, por esta razón se uso como vacuna muerta. • Ensayos realizados mostraron que su poder protector era mediocre y que sus lotes presentaban variación difícil de controlar. 	<p>*Vía Intravenosa</p> <p>*Ganado bovino vs <i>B. abortus</i></p>
<i>B. abortus</i> RB51 (Cepa Rugosa)	<p>Presenta Características muy estables.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Es un derivado obtenido <i>B. abortus</i> 2308 resistente en presencia de rifampicina. • La cepa RB51 se transformó para incrementar la Cadena-O, esto no induce Anticuerpos Anti-Cadena-O detectables por las pruebas serológicas en él diagnostico de brucelosis a pesar de la edad, dosis y aplicaciones. Además ha perdido características abortivas. 	<p>*Vía intravenosa</p> <p>*Ganado bovino vs <i>B. abortus</i></p> <p>*Ganado porcino vs <i>B. suis</i></p> <p>*Ganado caprino vs <i>B. melitensis</i></p> <p>*Ganado ovino vs <i>B. ovis</i></p>

Cuadro. 4 Principales Vacunas Celulares de microorganismos vivos atenuados no aglutinógenas (Chávez, 2004).

1.1.6.1.2 Vacunas de microorganismos enteros inactivados.

Suspensión bacteriana muerta por acción de desinfectantes (fenol) necesitando varias dosis (en mayor concentración) en diferentes periodos de tiempo para inducir inmunidad.

En el Cuadro. 5 resume las principales vacunas celulares de microorganismos enteros inactivados desarrollados contra la *brucelosis* en animales.

Cepa	Características	Vía de administración y Confiere Protección
<i>B. melitensis</i> H38 (Cepa Lisa)	<p>*Presenta características estables.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Induce niveles de protección contra la infección y el aborto similares a la vacunación con la Cepa <i>B. abortus</i> S19. • Se ha demostrado que en Ovinos no existe diferencia en la protección conferida por <i>B. melitensis</i> H38 y <i>B. melitensis</i> Rev1 • El empleo de esta vacuna inactivada no ha tenido consenso debido a las reacciones locales en el punto de inyección (Inflamación local) por el adyuvante oleoso (Mayolina/Arlacel A) incorporado y a la seropositividad persistente generada. 	<p>*Vía Subcutánea</p> <p>*Ganado caprino vs <i>B. melitensis</i></p> <p>*Ganado ovino vs <i>B. ovis</i></p>
<i>B. abortus</i> 45/20 (Cepa Rugosa)	<p>*Presenta características inestables</p> <ul style="list-style-type: none"> • Es una cepa poco inmunogénica con variaciones en los lotes de producción. • El empleo de esta vacuna inactivada no ha tenido consenso debido a las reacciones locales en el punto de inyección (Inflamación local) por el adyuvante oleoso (Lanolina/Parafina) incorporado. 	<p>*Vía Subcutánea</p> <p>*Ganado bovino vs <i>B. abortus</i></p>

Cuadro. 5 Principales Vacunas Celulares de microorganismos enteros inactivados (Chávez, 2004).

1.1.6.2 Identificación de Antígenos protectores (Determinantes Antigénicos o Epitopes) contra *Brucella ssp.*

La fuerte asociación entre el LPS y las OMP de *Brucella* impide que estas moléculas puedan ser purificadas a menos que se utilicen técnicas desnaturalizantes. Por ello se han empleado diferentes estrategias para la identificación de los Antígenos comprometidos en la protección mediada por Anticuerpos o por Células:

1. Ensayos de protección pasiva, mediante la administración de AcM / sueros policlonales o transferencia adaptativa de Linfocitos sensibilizados respectivamente.
2. Ensayos de Linfoproliferación o pruebas de Hipersensibilidad retardada con extractos citosólicos.
3. Inmunización activa con fracciones más o menos purificadas.

En la Brucelosis, la investigación de antígenos que induzcan inmunidad protectora, se han realizado en su mayoría a través de experimentos en el modelo murino en ratón Balb-c (Sulitzeanu, 1955).

Este modelo ha sido utilizado para describir los complejos mecanismos inmunitarios y para estimar la protección conferida, medida en términos de reducción significativa del número de unidades formadoras de colonia (UFC) de *Brucella* presentes en el bazo o hígado, respecto de un control no inmunizado.

Cabe destacar que en el ratón Balb/c, las bacterias del género *Brucella* se replican en el bazo y en el hígado, provocando una infección crónica y asintomática. La actividad protectora en el ratón ha mostrado estar bien correlacionada con la observada en los animales destinatarios de las vacunas y esto, tanto con las vacunas vivas (*Brucella abortus* B19, *Brucella melitensis* Rev1, *Brucella suis* 2) como inactivadas (*Brucella melitensis* H38). El desarrollo de este modelo junto con las “Vacunas Patrón de Referencia” ha permitido valorar la actividad no solo de “Vacunas Celulares Completas” si no también de “Vacunas Subcelulares” (Bosserey and Plommet, 1984).

1.1.6.3 Vacunas Subcelulares.

1. Son seguras e inocuas, ya que no existe posible reversión a la forma silvestre (Salvaje) como en las vacunas vivas atenuadas, ni peligro de transmisión a animales salvajes.
2. Son más específicas, ya que en su diseño deberán ser incluidos antígenos diferentes de los empleados en el Serodiagnóstico para poder distinguir de animales infectados de animales vacunados.
3. Son eficaces, debido a que solo incluyen aquellos antígenos capaces de inducir inmunidad protectora, adyuvantes y citocinas que mejoren su presentación, dirigiendo así mismo el impacto sobre el sistema inmune.

1.1.6.3.1 Vacunas No Recombinantes.

Se han identificado en el género *Brucella* antígenos capaces de inducir inmunidad protectora como LPS y OMPs que son potenciales inmunógenos vacunales, que han sido probados en el modelo murino.

En el Cuadro. 6 resume las principales vacunas subcelulares no recombinantes desarrollados contra la *brucelosis* en animales.

Inmunógeno	Características	Referencia
Fracción SDS-I	<ul style="list-style-type: none"> • Contiene OMP mayores (50%), PG (30%) y LPS-S (1%) e induce una actividad protectora en Modelo de ratón Balb-c comparable a la de <i>B. melitensis</i> H38 (S) inactivada. Dado que su principal componente son Proteínas, se atribuye a las OMP la capacidad de conferir protección. • La Fracción SDS-I obtenida de Cepas Rugosas de <i>Brucella</i> resulta menos protectora, las cuales indujeron elevados títulos Anticuerpos anti-LPS-S. • En bovinos, la inmunogenicidad de la Fracción SDS-I parece ser diferente de la observada en el Modelo ratón Balb-c ya que su poder protector en animales gestantes es inferior al obtenido con <i>B. abortus</i> S19. 	<p>*Dubray, 1987.</p> <p>*Limet et. al., 1987.</p>
Extracto HS (“Hot Saline”)	<ul style="list-style-type: none"> • Es obtenido a partir de <i>Brucella ovis</i> compuesto por OMP del grupo3 (55%) por LPS-R (33%) muestra eficacia próxima con <i>B. melitensis</i> Rev1 tanto Modelo ratón Balb-c como en ovinos. • La evaluación de la respuesta inmune contra Extracto HS demuestra que la transferencia Suero Hiper-inmune anti-HS confiere una protección mayor a aquella obtenida por la transferencia Linfocitos T sensibilizados obtenidos de Bazo. • Ensayos realizados en carneros se han demostrado la actividad inmunogénica y protectora del Extracto HS y OMP que lo componen, además se le atribuye al LPS-R en la protección <i>B. ovis</i> • Recientemente, se ha confirmado en ovinos la seguridad y eficacia del Extracto HS formulado en micropartículas respecto a <i>B. melitensis</i> Rev1. • Además, recientemente, se ha demostrado que el Extracto HS de <i>B. ovis</i> encapsulado en micropartículas confiere protección cruzada contra <i>B. melitensis</i> 	<p>*Gamazo et. al., 1989.</p> <p>*Murillo et. al., 2001.</p> <p>*Jiménez et. al., 1994.</p> <p>*Blasco et. al., 1993.</p> <p>*Muños et. al., 2005.</p> <p>*Estevan et. al., 2006</p>

Cuadro. 6 Principales Vacunas Subcelulares no recombinantes.

1.1.6.3.2 Vacunas Recombinantes.

Se han identificado en el género *Brucella* varias proteínas periplasmáticas y citoplasmáticas inmunogénicas del que genes ya han sido clonados, expresados en vectores adecuados. Estas proteínas recombinantes purificadas y formuladas con adyuvantes y/o citocinas estimuladoras, son potenciales inmunógenos vacunales, que han sido estudiados en el modelo murino.

Entre ellas, una proteína cuya función y estructura ha sido caracterizada es: p18 o BLS (Lumazina Sintetaza de *Brucella*). Esta proteína decaamérica constituye un excelente acarreador para las vacunas de subunidades, ya que acepta la inserción de péptidos o proteínas en el extremo amino terminal (NT) de cada monómero sin alterar el plegamiento o la estabilidad de la quimera.

Por otro lado el p18 o BLS es un potente estimulador de células presentadoras de antígeno (APC) siendo el principal blanco las células Dendríticas (Berguer et. al., 2006).

En el Cuadro. 7 resume las principales proteínas utilizadas en vacunas subcelulares recombinantes desarrollados contra la *brucelosis* en animales.

Proteína recombinante	Tipo de respuesta	Protección conferida	Referencia
*SOD Cu ⁺² /Zn ⁺²	IMAC	No	Tabatabai and Pugh, 1994
*HtrA	IMAC	No	Roop et al., 1994
*GroEL	IMC	No	Lin et al., 1996
*GroES	IMC	--	Oliveira et al., 1996
*UvrA	IMC	--	Oliveira et al., 1996
*L7/L12	IMC	Si	Olivieria et al, 1994
*YajC	IMC	--	Vemulapalli et al., 1998
*Proteína 22.9KDa	IMC	Si	Céspedes et al., 2000
*BFR	IMC	No	Al-Mariri et al., 2001
*P39+CpG	IMAC e IMC	Sí	Al-Mariri et al., 2001
*cp24	IMC	No	Cassataro et al., 2002
*GAPDH+IL-12	IMC	Sí	Rosinha et al., 2002
*BLS	IMAC e IMC	Sí	Velikovsky et al., 2003
*Omp31	IMAC e IMC	Sí	Cassataro et al., 2005

Cuadro. 7 Principales Vacunas Subcelulares recombinantes.

IMAC = Inmunidad Mediada por Anticuerpos

IMC = Inmunidad Mediada por Células

En la formulación de estas vacunas se han utilizado diferentes adyuvantes para potenciar la respuesta inmune. Entre ellos pueden mencionarse:

- Adyuvante Incompleto Freud (AFI)
- Dimicolato de Trealosa (DMT)
- Muramil Dipéptido (MDP)
- Monofosforil Lípido A (MPL)
- Bromuro Dimetil-Dioctadecil Amonio (DDA)

Todos son estimulantes de la respuesta Th1. Con el mismo propósito se han empleado las proteínas asociadas a dinucleótidos CpG no metilados de ADN bacteriano o genes que codifican para citocinas estimulantes (IL-12) (Schurig et al., 2002).

1.1.6.4 Vacunas de Nueva Generación

El aporte de la Biotecnología y la Ingeniería Genética a la Inmunología, han sido cruciales para el desarrollo de estas vacunas, se conciben a partir de un conocimiento detallado de los mecanismos de patogenicidad de los microorganismos y de la respuesta inmune del huésped susceptible.

1.1.6.4.1 Vacunas de microorganismos vivos atenuados genéticamente.

Implica la obtención de mutantes atenuadas a partir de mutaciones en genes de metabolismo o factores de virulencia presentes en cepas virulentas.

En el Cuadro. 8 resume las principales vacunas de nueva generación de microorganismos vivos atenuados genéticamente desarrollados contra la *brucelosis* en animales.

Cepa	Características	Referencia
<i>B. melitensis</i> purE201 (Aromático-dependiente)	<ul style="list-style-type: none"> • Es una mutante de <i>B. melitensis</i> 16M a pesar de su inmunogenicidad, resultado virulenta para pequeños rumiantes. 	*Cheville et al., 1996
<i>B. melitensis</i> VTRM1	<ul style="list-style-type: none"> • Usando la secuencia gen <i>rfbU</i> se han construido mutantes rugosos de <i>B. melitensis</i> 16M • La inmunización con la mutante VTRM1 protege parcialmente contra la infección y el aborto de cabras preñadas. 	*Elzer et al., 1998
<i>B. melitensis</i> WR201	<ul style="list-style-type: none"> • La administración parenteral y/o enteral de la mutante autotrófica WR201 protege contra el desafío intranasal con <i>B. melitensis</i> 16M. 	*Izadjoo et al., 2004

	<ul style="list-style-type: none"> • Cabe destacar que la administración enteral estimuló la respuesta inmune sistémica y una protección adicional a nivel de sistema inmune de mucosas. 	
<i>B. abortus</i> pgm	<ul style="list-style-type: none"> • A partir de <i>B. abortus</i> 2308 mediante una delección en el gen que codifica para la fosfoglucomutasa (pgm). • Esta vacuna ensayada Modelo ratón Balb-c estimula una respuesta Th1 confiriendo una protección similar a <i>B. abortus</i> S19 y además no induce Anticuerpos contra el PSO. 	*Ugalde et al., 2003
*Mutantes gen Omp25: B. abortus BA25 B. melitensis BM25 B. ovis BO25	<ul style="list-style-type: none"> • Se han desarrollado mutantes en genes que codifican para LPS y OMPs que resultaron atenuadas en el Modelo de ratón Balb-c. 	*Edmonds et al., 2002

Cuadro. 8 Principales Vacunas de Nueva Generación de microorganismos vivos atenuados genéticamente.

1.1.6.4.2 Vacunas de ADN.

La inmunización con ácido desoxirribonucleico (ADN) representa el enfoque para el desarrollo de vacunas. En la inmunización genética, el antígeno es naturalmente procesado y presentado por las vías endosómica y citosólica, promoviendo así respuestas mediadas por anticuerpos y células (Babiuk et. al., 1999).

Al inyectar el ADN las células del organismo vacunado son transfectadas con el plásmido *in vivo* e inician la síntesis del Antígeno en cuestión, cuyo nivel de expresión esta en el orden nanogramos y picogramos.

El empleo de estas vacunas tiene la ventaja de generar una respuesta específica contra la(s) proteína(s) codificadas por el ADN en la célula, eliminando por lo tanto el riesgo de infección; son muy estables y resistentes a los cambios de temperatura a diferencia de las vacunas convencionales.

En la brucelosis, el empleo experimental de este tipo de vacunas incluye estudios de protección utilizando el modelo de ratón Balb-c con plásmidos codificando para: L7/L2, P39, BFR, SOD Cu⁺²/Zn⁺²-IL-2 y Omp31. Aunque estas vacunas inducen una respuesta inmune de perfil Th1 no se han logrado los niveles de protección obtenidos con las vacunas vivas atenuadas (Schurig et al., 2002).

1.1.7 ADYUVANTES

La clásica definición de adyuvante “como sustancias que se emplean en combinación con un antígeno específico que produce una respuesta inmune más robusta que el antígeno por sí solo”.

Unos de los retos más importantes en el campo de la “Vacunología” es la selección adecuada de los adyuvantes y sistemas de liberación (emulsiones, micropartículas y liposomas). Las “Vacunas tradicionales” a menudo contienen elementos que pueden activar al sistema inmune y mejorar la respuesta inmune contra antígenos de la vacuna, incluyendo una variedad de componentes celulares de bacterias. Sin embargo, estos se han eliminado a partir de las “Vacunas de nueva generación” para mejorar la seguridad y reducir su reactogenicidad.

Los adyuvantes actualmente aprobados para el uso humano son de **Aluminio** basados en sales minerales (Alumbre) y **MF59** (es parte de la vacuna de subunidades de la influenza) en una emulsión de escualeno/aceite/agua.

El Aluminio es el único adyuvante aprobado por la FDA en EE.UU. aunque tiene un excelente historial de seguridad, estudios comparativos muestran que es un adyuvante pobre para la inducción de anticuerpos en proteínas recombinantes y en vacunas DNA. Induce más bien una respuesta de citocinas Th2 que Th1. Además, el aluminio no es efectivo para la inducción de una respuesta de anticuerpos IgA de mucosas y estar asociado con reacciones alérgicas en algunos casos.

Una cuestión clave en el desarrollo de los adyuvantes es su toxicidad. Por norma de inmunización profiláctica en individuos sanos, solo los adyuvantes que induzcan efectos adversos mínimos serán aceptados. Adicionalmente las cuestiones prácticas que son importantes para el desarrollo de adyuvantes incluyen: biodegradable, estabilidad, costos de manufactura y aplicable a una amplia gama de vacunas.

El mecanismo de la mayoría de los adyuvantes aun se desconoce, ya que a menudo la inmunización activa una cascada compleja de respuestas y el principal elemento del adyuvante es a menudo difícil de discernir con claridad. Sin embargo, si es aceptado el concepto de “reactividad inmune” (en la que los antígenos que no lleguen a los ganglios linfáticos locales no inducen respuesta). Se hace más fácil proponer la interpretación del mecanismo de los adyuvantes, en particular en los basados en los “sistemas de liberación” tales como las “nanopartículas y micropartículas”.

Si el antígeno no llega al ganglio linfático local, por lo tanto, no induce respuesta alguna, entonces cualquier adyuvante que mejore la liberación del antígeno en las células, en el que el tráfico al ganglio linfático puede aumentar la respuesta. Un subconjunto de células dendríticas (DCs) son las principales células que circulan en los tejidos periféricos y actúan como “centinelas” que se encargan de la captación del antígeno y su traslado a los ganglios linfáticos, en el que se presentan a los linfocitos T. Las DCs inmaduras circulantes son eficientes para la captación de antígenos, mientras maduran las DCs son eficientes en la presentación del antígeno a los linfocitos T. Por lo tanto, la promoción de captación de antígenos en DCs, el tráfico a los ganglios linfáticos y la maduración DCs se consideran los componentes clave para la generación de respuestas inmunes potentes. DCs se consideran las más eficientes células presentadoras de antígenos (APCs), aunque los macrófagos también pueden desempeñar esta función (Gupta et. al., 1995).

Se puede argumentar que la función de los adyuvantes para vacunas recombinantes es garantizar que la vacuna se asemeje a la infección suficientemente cerca como para iniciar una respuesta inmune potente. Además, el sistema inmune innato dirige el equilibrio mediado por la inmunidad celular y humoral y los adyuvantes controlan el tipo de respuesta inmune adquirida que es inducida. Los adyuvantes pueden ser clasificados en términos generales en dos categorías basados en su modo principal de acción, que depende de si tienen o no efectos inmunoestimuladores directos sobre APCs o función como sistemas de liberación promotores de captación de antígeno. Las partículas (adyuvantes) son: emulsiones, micropartículas, nanopartículas, liposomas, icosomas, virosomas, partículas parecidas a virus, tienen dimensiones comparables a los patógenos que el sistema inmune ha evolucionado para combatirlos (Gupta et. al., 1995).

Los adyuvantes inmunoestimuladores también pueden incluirse en los “sistemas de liberación” de partículas para mejorar el nivel de respuesta o centrar la respuesta a través de una ruta deseada como es Th1. Además, la formulación de adyuvantes inmunoestimuladores potentes en los sistemas de liberación a través de la restricción de la circulación sistémica de los adyuvantes pueden limitar los efectos adversos. Su función principal de las micropartículas y nanopartículas como un “sistema de liberación”, aunque los materiales con los que están hechos, pueden tener algunos de los efectos de adyuvantes (Manmohan et. al., 2007).

En el Cuadro. 9 resume los diversos métodos de preparación de nanopartículas usando polímeros diferentes utilizados en vacunas de adyuvantes.

Material	Métodos	Rango de tamaño	Tipo de antígeno	Comentarios
PLG o PLA	Evaporación y emulsificación	200nm-10µm	DNA, proteínas, moléculas pequeñas	Partículas pequeñas con incremento de concentración de surfactante
PLG o PLA	Desplazamiento del solvente	80nm-500nm	Proteínas, moléculas pequeñas	Partículas pequeñas con menor concentración de polímero
Poli(cianoacrilato)	Polimerización en cadena	90nm-800nm	Proteínas	
Biovectores supramoleculares	Entrecruzamiento	60nm	Proteínas.	
Quitosán	Precipitación con sulfato de sodio	300nm-1µm	Proteínas.	
Fosfato de calcio	Varios	100nm-1.2µm	DNA, proteínas	

CUADRO. 9 Métodos de preparación de diversas partículas usando polímeros diferentes (Manmohan et. al., 2007).

Nota: **PLG** = Poli (láctico-co-glicólico)
PLA = Ácido poli-láctico

En el Cuadro. 10 resume las principales características ideales de una vacuna frente a las enfermedades infecciosas.

<ul style="list-style-type: none"> ○ Que muestre un perfil de seguridad impecable en todas las poblaciones. ○ Que provoque un nivel alto de eficacia de larga vida. ○ Que solo requiera de una dosis única para conferir protección. ○ Que proporciones una protección estimulada dentro de las 2 semanas de administración. ○ Que su administración sin una aguja y jeringa; que sea oral, nasal, transcutánea o con un dispositivo libre de inyección de aguja. ○ Que se administre en combinación con (en la misma fórmula) con otras vacunas. ○ Que se puedan fabricar en gran escala y con un control de calidad, por relativamente sencillo y de procesos económicos. ○ Que su producción en la formulación sea resistente a altas y bajas temperaturas y por lo tanto, libre de estrictos requisitos de almacenamiento.
--

CUADRO. 10 Características de una Vacuna Ideal (Levine et. al., 2004).

1.2 JUSTIFICACIÓN.

Brucella ovis es el agente causal de la epididimitis contagiosa del carnero, es una enfermedad infecciosa de distribución mundial que causa un decremento en la fertilidad y finalmente causándole esterilidad del carnero con severas pérdidas económicas.

El empleo de inmunógenos contra *Brucella ovis* y el desarrollo de nuevas vacunas, ha tomado gran relevancia en cuanto a las campañas de erradicación y control de la enfermedad.

El empleo de diversos antígenos, entre los que se encuentran las vesículas de membrana externa (MVs) compuesto principalmente de Omp31 y LPS-R junto con la combinación de adyuvantes adecuados (quitosán y etil-2-cianoacrilato) que potencialicen la respuesta inmune celular, induciendo citocinas Th1 y logren una adecuada protección del ganado ovino, sin que existan los inconvenientes de las cepas lisas de *Brucella*, empleadas en el pasado como inmunógenos.

1.3 HIPÓTESIS.

Si se inmuniza a un grupo de ratones Balb-c con vesículas de membrana externa junto con la combinación de adyuvantes (quitosán y etil-2-cianoacrilato) se incrementará la respuesta inmune celular y humoral, para la protección contra *Brucella ovis*.

2.0 OBJETIVOS.

2.1 OBJETIVO GENERAL:

Desarrollar nuevos adyuvantes como sistemas de liberación para vacunas mediante un sistema nanoparticulado utilizando microvesículas de *Brucella ovis* para el estudio de la respuesta inmune celular en el modelo murino.

2.2 OBJETIVOS PARTICULARES:

1. Obtener microvesículas de membrana externa de *Brucella ovis* mediante el método de Sarcosyl determinando su perfil electroforético en PAGE-SDS.
2. Obtener un sistema nanoparticulado conteniendo microvesículas de membrana externa de *Brucella ovis* mediante la técnica de ión-gelación utilizando el polímero quitosán.
3. Obtener un sistema nanoparticulado conteniendo microvesículas de membrana externa de *Brucella ovis* mediante la técnica de polimerización utilizando el polímero etil-2-cianoacrilato.
4. Determinar la eficacia del proceso de encapsulación y morfología de los sistemas nanoparticulados preparados con proporciones de los polímeros.
5. Realizar la inmunización y preparación del cultivo celular a partir de células de bazo utilizando ratones de la cepa Balb/C.
6. Evaluar la respuesta inmune celular mediante la técnica de ELISA-DUOSET de los sistemas nanoparticulados en el modelo murino y determinar el posible uso de los polímeros como adyuvantes del inmunógeno.

3.0 MATERIAL Y MÉTODOS.

Microorganismo: *Brucella ovis cepa Reo 198*, una cepa de crecimiento independiente de CO₂, proporcionada por el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agropecuarias-SAGARPA: Carretera México-Toluca Km 15.5, Cuajimalpa, México, D.F Código postal 05110.

3.1 Obtención de vesículas de membrana externa de *Brucella ovis*.

a) **Cepa:** Se empleó la cepa de *Brucella ovis* REO198, la cual se mantuvo y desarrolló para la obtención de microvesículas en agar sangre (DIFCO) durante 40 horas a 37°C.

b) **Microvesículas:** Las bacterias se cosecharon de las placas de agar sangre a 50 ml de caldo soya-tripticosa y se mantuvieron en agitación 24 horas a 37°C. Después los 50 ml de caldo se transvasaron a 450 ml del mismo caldo para un volumen final de 500ml, el cual se mantuvo en agitación por 24 horas a 37°C. Posteriormente se centrifugó todo el volumen a 10,000 X g por 15 minutos. Se desechó la pastilla y se recolectó el sobrenadante. El sobrenadante se filtró a vacío con filtros de 0.22 µm. Después se ultracentrifugó a 150,000 X g por una hora a 4°C. Se desechó el sobrenadante y se conservó la pastilla en la cual están contenidas las microvesículas. Se resuspendió la pastilla con el mínimo volumen posible de agua desionizada. Se guardó en congelación hasta su uso.

3.2 Determinación de proteínas de Vesículas de Membrana Externa por el Método de Bradford.

Se empleó el Método de Bradford para conocer la concentración de las proteínas de las vesículas de Membrana Externa (Bradford, 1976).

- Se preparó una Curva de Calibración de Albúmina utilizando los reactivos en las cantidades que se incluyen a continuación:

Tubo	Blanco	1	2	3	4	5	6	Sol. Problema
Std. BSA 0.01%	*****	10	20	40	60	80	100	*****
Muestra	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	100
H ₂ O destilada	100	90	80	60	40	20	*****	*****
Reactivo Bradford	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000

Nota: Todas las cantidades están referidas en µl

- A continuación los tubos se dejaron en reposo durante 10 min. a temperatura ambiente y se midió su absorbancia a 595nm.

La unión del colorante a la proteína es un proceso muy rápido, aproximadamente 2min y el complejo colorante-proteína permanece estable en solución por un tiempo relativamente largo, aproximadamente 60min.

3.3 Electroforesis en Gel de Poliacrilamida de las proteínas de Vesículas de Membrana Externa.

Se empleó el Método Estándar de Laemmli para la separación de proteínas de Vesículas de Membrana Externa por tipo SDS-PAGE (Laemmli, 1970).

a) Preparación del Gel:

- ❖ Para la preparación de los Geles se calculó el volumen de la Cámara Bio-Rad y basándose en el volumen (ml o cm³) se utilizaron las siguientes:

Reactivo	Gel Concentrador [5%]	Gel Separador [10%]
BAG	0.490	1.140
H ₂ O	1.810	1.410
Tris 6.8/8.8	0.620	0.860
SDS 10%	0.052	0.070
PSA	0.023	0.019
TEMED	0.007	0.002
Volumen Total	3.002ml	3.501ml

- ❖ Adicionar la mezcla del Gel Separador al 10% en la Cámara de Electroforesis aproximadamente 2cm del borde superior y posteriormente adicionar un pequeño volumen de Alcohol Isopropílico, evita el contacto con el Aire y además ayuda a que el gel no tenga bordes irregulares, una vez que gelifique la mezcla, se elimina el Alcohol Isopropílico.
- ❖ Adicionar la mezcla del Gel Concentrador al 8% en la Cámara de Electroforesis sobre el Gel Separador, posteriormente se colocara la Peineta para formar los Pozos y esperar a que Gelifique el Gel Concentrador para extraer la Peineta.

b) Tratamiento de la Muestra:

- ❖ Se prepara la Muestra y los Marcadores PM, siguiendo los pasos siguientes:

Tubo	Muestra (μL)	Regulador Muestra (μL)
1	50	50
2	10 μl de Marcador PM	

- ❖ Los tubos se ponen a hervir durante 5min. Se llena la Cámara de Electroforesis con la Solución de Corrimiento, cuidando que el Gel este completamente cubierto con la solución.

REGULADOR DE CORRIMIENTO (Tris 25mM, Glicina 192mM, SDS 0.1%) pH=8.3	
✓ Trizma-Base	3.02gr
✓ Glicina	14.4gr
✓ SDS al 10%	10ml
✓ H ₂ O bidestilada	1000ml
No se debe de ajustar el pH. El regulador del tanque inferior puede reutilizarse 4-5 veces. El regulador del tanque superior debe desecharse cada vez.	

- ❖ Se agrega 10 μl del Marcador de Pesos Moleculares en un extremo del Gel (Lado Izquierdo) y posteriormente adicionan 20 μl de las Muestras (Lado Derecho).

c) Corrimiento del Gel

- ❖ Se conecta el Aparato a una Fuente de poder y se enciende, siguiendo las siguientes condiciones:
 - Voltaje de 120 Volts (Tiempo de 1hrs. Aproximado)
- ❖ Transcurrido este tiempo, se desconecta la Fuente de poder y se desmonta el Aparato, se extrae el Gel cuidando de hacer una marca en la parte superior y recordando de qué lado se realizo.

d) Tinción con Azul de Coomasie

Al Gel extraído se le realiza la tinción con Azul de Coomasie que contenga 20ml del Colorante y dejar reposar 24hrs. Esto es para que se haga evidente las Bandas de Separación de las Muestras, esta tinción sirve para teñir proteínas a concentraciones altas o normales.

COLORANTE DE TRABAJO PARA
TINCIÓN DE PROTEÍNAS (AZUL DE
COOMASIE 0.125%)

✓ Solución Madre AC R250	62.5ml
✓ Metanol Absoluto	250ml
✓ Ácido acético glacial	50 ml
H ₂ O bidestilada	500ml

e) Destinción del Gel

Una vez transcurrido el tiempo de la Tinción, retirar el colorante y adicionar 20ml de Decolorante I, agitar cuantas veces sea necesario, hasta que el Gel se observe transparente y se observe la aparición de las Bandas. Posteriormente adicionar 20ml de Decolorante II para rehidratar el Gel.

DECOLORANTE I

✓ Metanol Absoluto	0.5ml
✓ Ácido acético glacial	100ml
H ₂ O bidestilada	1000ml

12. DECOLORANTE II

✓ Ácido acético glacial	7.0ml
H ₂ O bidestilada	100ml

- ❖ Retirar el Decolorante II del Gel y adicionar 20ml H₂O destilada para preservar el Gel y posteriormente medir cada una de las Bandas obtenidas mediante un Vernier.

3.4 Formación de un sistema nanoparticulado con inmunógeno de *Brucella ovis* mediante la técnica de ión-gelación utilizando el polímero quitosán.

El sistema nanoparticulado de quitosán fue proporcionado por el Laboratorio de Biotecnología. Coordinación de Estudios de Posgrado. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Campo 1, para posteriormente integrarlo con las microvesículas de *Brucella ovis*.

3.5 Formación de un sistema nanoparticulado con inmunógeno de *Brucella ovis* mediante la técnica de polimerización continua utilizando el polímero etil-2-cianoacrilato.

a) Preparación del sistema nanoparticulado encapsulando inmunógeno de *Brucella ovis*.- En 10 ml de medio conteniendo las microvesículas de *Brucella ovis* se agregó una proporción de 5% de tensoactivo PLURONIC F-68 (SIGMA). Este se mantuvo 2 horas para una humectación total a temperatura ambiente. Se homogeneizó cuidando que la agitación no generara espuma. Se tomó una muestra de 300µl que se utilizó para calcular la eficiencia de encapsulación. Después se agregó 50 µl del polímero etil-2-cianoacrilato (SIGMA) gota a gota cuidando que cayera directamente en el medio sin tocar propela o vaso. Se homogeneizó 20 minutos con agitación leve cuidando no generar espuma ni corriente turbulenta (Díaz et. al., 2005).

b) Preparación del sistema nanoparticulado con inmunógeno de *Brucella ovis* adherido exteriormente.- En 9 ml de medio se agregó una proporción de 5% de tensoactivo PLURONIC F-68 (SIGMA). Este se mantuvo 2 horas para una humectación total a temperatura ambiente. Se homogeneizó cuidando que la agitación no generara espuma. Después se agregó 50 µl del polímero etil-2-cianoacrilato (SIGMA) gota a gota cuidando que cayera directamente en el medio sin tocar propela o vaso. Se homogeneizó 20 minutos con agitación leve cuidando no generar espuma ni corriente turbulenta. Por ultimo se agregó 1 ml de suspensión de microvesículas de *Brucella ovis* para un volumen final de 10ml. Se homogeneizó otros 20 minutos con agitación leve-moderada (Díaz et. al., 2005).

c) Evaluación de la eficacia de encapsulación de inmunógeno de *Brucella ovis* en el sistema nanoparticulado.- El sistema nanoparticulado con inmunógeno de *Brucella ovis* encapsulado se centrifugó a 10,000 X g por una hora. Se desechó la pastilla y se recolectó el sobrenadante. Con esto nos aseguramos de separar las nanopartículas con el inmunógeno encapsulado, de las microvesículas de *Brucella ovis* que permanecieron en el sobrenadante y que no fueron encapsuladas, ya que estas a velocidades de centrifugación tan bajas no son capaces de sedimentarse. Se realizó la cuantificación de proteínas mediante el *método de Bradford* (Bradford, 1976) a las muestras que se tomaron antes de encapsular (inciso a) y a las muestras que se tomaron después de haber centrifugado y separado el paquete nanoparticulado. Se realizó el cálculo de % de proteína encapsulada y el cálculo de µg de proteína encapsulada por 100µl de polímero utilizado mediante la diferencia de concentraciones entre ambas muestras.

3.6 Evaluación de la eficacia del proceso de encapsulación y morfología de los sistemas nanoparticulados preparados con los polímeros.

Se determinó la estabilidad y tamaño de partícula de los sistemas nanoparticulados mediante el aparato ZetaSizer® o por técnicas de Microscopía Electrónica de Barrido.

a) Microscopía Electrónica de Barrido.- Se tomaron muestras de los sistemas nanoparticulados conteniendo microvesículas de *Brucella ovis* de los polímeros quitosán y etil-2-cianoacrilato. Si las muestras se encuentran muy concentradas se debe efectuar una dilución 1/50 - 1/100. Posteriormente se les fijó con gluteraldehído al 3% durante dos horas. Se aplicó una gota a través de un filtro millipore de 0.1µm. Posteriormente se dejaron secar a temperatura ambiente por 24 horas bien cubiertas para evitar contaminación por polvo o partículas del medio ambiente. Después se cubrieron con una capa de oro para su observación en el microscopio electrónico de barrido JEOL JSM-25SII (González et. al., 2003).

b) Determinación del tamaño de partícula por medio del aparato Zetasizer®.- Se tomaron muestras de los sistemas nanoparticulados de los polímeros quitosán y etil-2-cianoacrilato y de las microvesículas de *Brucella ovis*. Si las muestras se encuentran muy concentradas se debe realizar diluciones. Se evaluó el tamaño de partícula por medio del aparato Zetasizer®.

3.7 Inmunización y preparación del cultivo celular de células de bazo utilizando ratones de la cepa Balb/C.

a) Protocolo de inmunización y sangrado.- Se inmunizaron 4 grupos con 5 ratones c/u de la cepa Balb/C, hembras de 4 a 8 semanas de edad, los grupos se constituyeron de la manera siguiente: 1) con solución salina fisiológica, 2) microvesículas de *Brucella ovis*, 3) sistema nanoparticulado de quitosán y el 4) sistema nanoparticulado de quitosán conteniendo microvesículas de *Brucella ovis* adheridas exteriormente, todos fueron inoculados por vía intramuscular. Se inmunizaron otros 5 lotes con 5 ratones c/u de la cepa Balb/C, pero ahora con las muestras del polímero etil-2-cianoacrilato, los grupos se constituyeron de la manera siguiente: 1) con solución salina fisiológica, 2) microvesículas de *Brucella ovis*, 3) sistema nanoparticulado de etil-2-cianoacrilato, 4) sistema nanoparticulado de etil-2-cianoacrilato conteniendo microvesículas de *Brucella ovis* adheridas exteriormente y 5) sistema nanoparticulado de etil-2-cianoacrilato conteniendo microvesículas de *Brucella ovis* encapsuladas. La dosis única fue de 0.25 ml. Se sangraron los ratones a partir de la vena plexo retro orbital del ojo. Los lotes de ratones se conservaron durante 15 días con dieta normal para realizar después el sacrificio y posteriormente el cultivo celular.

b) Preparación del cultivo primario de células de ratón Balb/c.- La preparación de linfocitos se llevó a cabo de la siguiente manera: se disecaron los bazos de los ratones singénicos (de la cepa Balb/c) para la obtención de células presentadoras de antígeno (CPA), todo el procedimiento se llevó a cabo bajo condiciones de esterilidad en campanas de flujo laminar. Los bazos se lavaron por lo menos 3 veces con solución balanceada de Hanks (HBSS), posteriormente se colocaron en una caja de petri que contenía 5 ml de medio RPMI 1640 (Gibco) con 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina (Gibco), y con un pedazo de gasa, los bazos se envolvieron totalmente, la cual sirvió como tamiz para retener los restos de tejido. Los bazos se maceraron cuidadosamente con el émbolo de una jeringa estéril con el fin de disgregarlos; la suspensión celular se colocó en un tubo cónico estéril de 15 ml y se le agregó 5 ml de medio RPMI con antibióticos; se dejaron 5 minutos en reposo para que sedimenten los restos de tejidos, posteriormente se pasaron a otro tubo cónico teniendo en cuenta no tomar el sedimento y escurriendo la suspensión de células por las paredes del tubo para no maltratarlas, se centrifugó 10 minutos a 400 x g a temperatura ambiente; se decantó el sobrenadante y el botón celular se resuspendió con 1 ml de Cloruro de amonio 0.17 M (NH₄Cl) por cada bazo, durante 5 minutos a 4°C para lisar los eritrocitos. Se centrifugó nuevamente y el botón celular se resuspendió en medio RPMI con antibióticos y se hicieron dos lavados más, después del último lavado el botón se resuspendió en medio RPMI con antibióticos. Se debe estandarizar el número de linfocitos por pozo a una concentración de 6.5X10⁶ linfocitos/ml.

c) Inoculación del cultivo primario de células del bazo de ratón Balb/c: Cada pozo de la placa de cultivo celular se inoculó con 10 µl de microvesículas y la placa se incubó a 37°C con 5% CO₂. Un control positivo se incubó con concanavalina A. Los sobrenadantes se colectaron a las 24, 48, 72, 96, 120 y 144 horas post-inoculación y se congelaron hasta su uso.

3.8 Cuantificación de IL-2, IL-4 e IFN-γ por el Sistema ELISA Duo Set® para cada sistema nanoparticulado.

Para la medición de citocinas se empleó los estuches comerciales (DUOSET Mouse IFN-γ, DUOSET Mouse IL-2, DUOSET Mouse IL-4) de ELISA Development System (R&D System) y a continuación se describe brevemente la técnica ya establecida:

a) Preparación de la placa.

1. Diluya el anticuerpo de captura a la concentración de trabajo en PBS sin proteína acarreadora. Inmediatamente cubra una placa de 96 pozos con 100µl por pozo del anticuerpo de captura diluido. Selle la placa e incube toda la noche a temperatura ambiente.
2. aspire cada pozo y lave con buffer de lavado, repitiendo el proceso 2 veces para un total de 3 lavados. Lave llenando cada pozo con buffer de lavado (400µl). La remoción completa de líquido para cada paso es esencial para buenos resultados. Después del último lavado, remueva el buffer de lavado que queda aspirando o por inversión de la placa y secando con una toalla de papel limpia.
3. Bloquee las placas añadiendo 300 µl de buffer bloqueador a cada pozo. Incubar a temperatura ambiente por un mínimo de 1 hora.
4. Repita la aspiración / lavado como el paso 2. Las placas ahora están listas para la adición de las muestras. Alternadamente, el buffer bloqueador puede ser aspirado después del paso 3 y las placas pueden ser secadas bajo vacío. Cuando se sella, las placas pueden ser almacenadas de 2-8°C por lo menos 2 meses.

b) Procedimiento del ensayo.

1. Añada 100 µl de muestra o Standard en reagente diluyente, o en un diluyente apropiado. Cubra con una tira adhesiva e incube 2 horas a temperatura ambiente.
2. Repita la aspiración / lavado como en el paso 2 de la preparación de la placa.
3. Añada 100 µl del anticuerpo de detección, diluido con agente diluyente a cada pozo. Cubra con nueva cinta adhesiva e incube 2 horas a temperatura ambiente.
4. Repita la aspiración / lavado como en el paso 2 de la preparación de la placa.

5. Añada 100 μ l de la dilución de trabajo de Streptavidin–HRP a cada pozo. Cubra la placa e incube por 20 minutos a temperatura ambiente. Evite poner la placa en la luz directa.
6. Repita la aspiración / lavado como en el paso 2 de la preparación de la placa.
7. Añada 100 μ l de la solución de sustrato a cada pozo. Incubar por 20 minutos a temperatura ambiente. Evite poner la placa en la luz directa.
8. Añada 50 μ l de la solución stop a cada pozo. Cuidadosamente golpee la placa para asegurar una mezcla minuciosa.
9. Determine la densidad óptica de cada pozo inmediatamente, usando un lector micro placa a 450 nm. Si la longitud de onda está disponible, lea a 540nm o 570nm. Si la corrección de la longitud de onda no está disponible, reste lecturas a 540nm o 570 nm de las lecturas a 450 nm. Esta resta corregirá imperfecciones ópticas en la placa. Las lecturas hechas directamente a 540nm sin corrección pueden ser altas y menos precisas.

4.0 RESULTADOS.

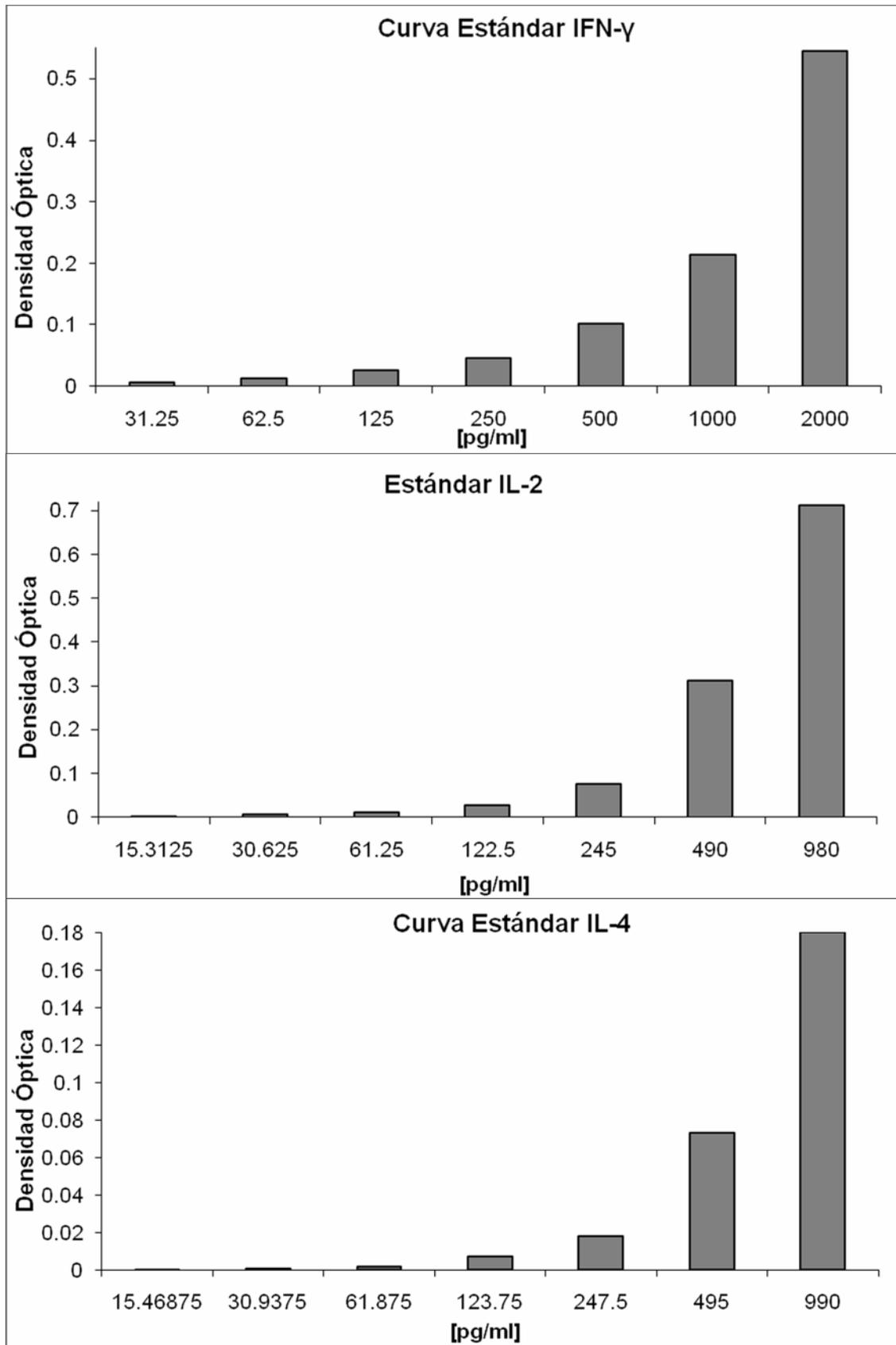
4.1 Determinación de la Concentración de la Curva Estándar de Interleucinas (IL-2, IL4, INF- γ) de los Adyuvantes (Quitosan y Etil-2-Cianoacrilato).

En todos los casos se realizó una curva patrón de cada estándar de citocinas (IL-2, IL4, INF- γ), para después extrapolar los resultados. Los datos obtenidos pueden linearizarse usando papel log-log y el análisis de regresión puede ser aplicado por la transformación log o la regresión por computadora mediante Microsoft Office Excel 2007 puede ser aplicada.

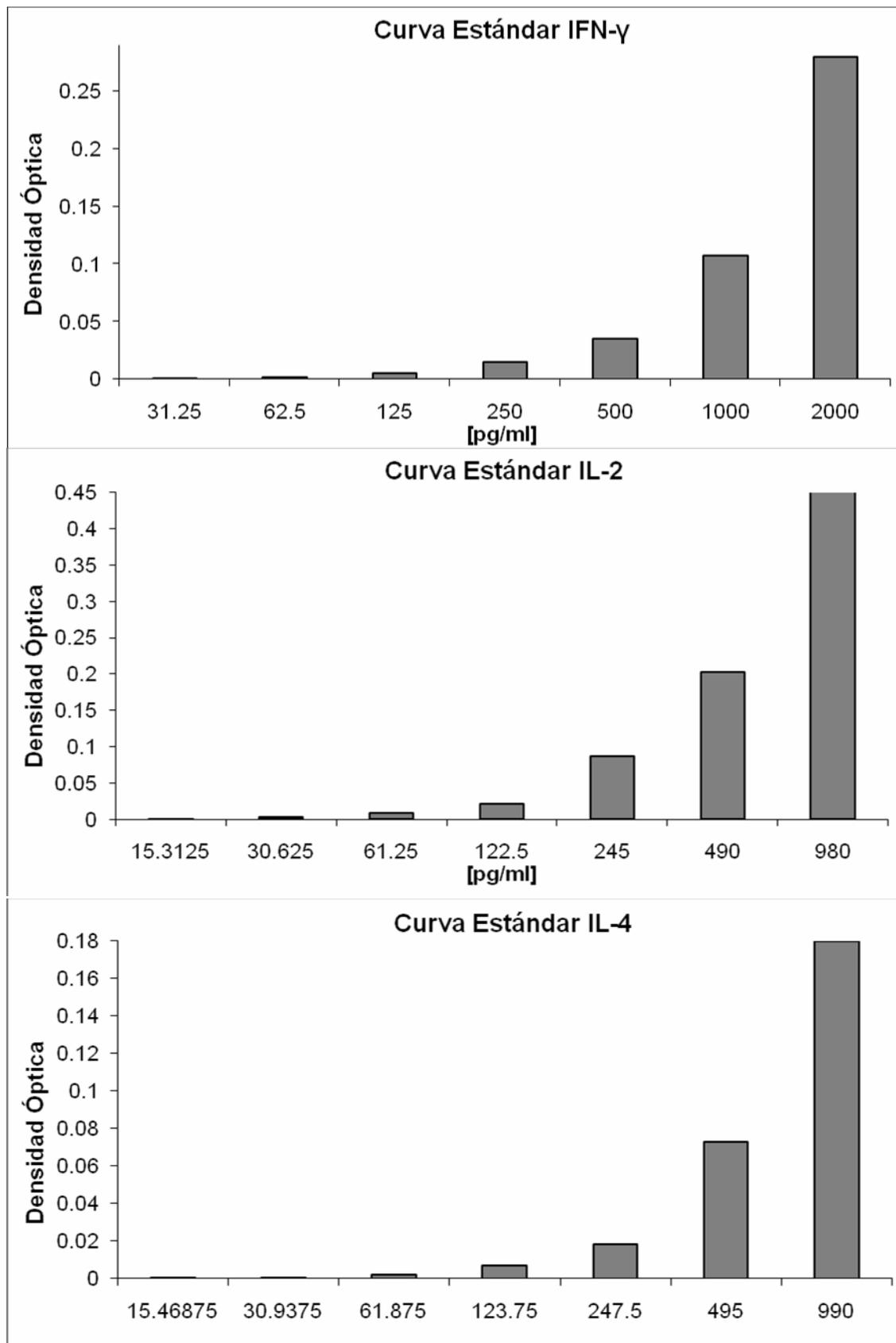
Se determinaron las concentraciones de IL-2, IL-4 e IFN- γ de cada muestra, primero se encontraron los valores de absorbancia en el eje de las Y y se extrapolaron en el eje de las X. Si las concentraciones son diluidas, se debe multiplicar por el factor de dilución. Como se muestran a continuación: **Gráfica.1, Gráfica.2 y Tabla. 1.**

INF - γ		
	Quitosán	Etil-2-Cianoacrilato
CONCENTRACIÓN [pg/ml]	DENSIDAD ÓPTICA	
2000	0.007	0.0007
1000	0.013	0.0019
500	0.027	0.0053
250	0.045	0.015
125	0.102	0.035
62.5	0.214	0.107
31.2	0.544	0.280
COEFICIENTE CORRELACION LINEAL	r = 0.98	r = 0.99
IL - 2		
	Quitosán	Etil-2-Cianoacrilato
CONCENTRACIÓN [pg/ml]	DENSIDAD ÓPTICA	
980	0.002	0.001
490	0.005	0.003
245	0.011	0.008
122.5	0.027	0.021
61.25	0.075	0.087
30.62	0.313	0.203
15.31	0.713	0.522
COEFICIENTE CORRELACION LINEAL	r = 0.99	r = 0.99
IL - 4		
	Quitosán	Etil-2-Cianoacrilato
CONCENTRACIÓN [pg/ml]	DENSIDAD ÓPTICA	
990	0.0002	0.0002
495	0.0006	0.0006
247.5	0.002	0.002
123.7	0.007	0.007
61.87	0.018	0.018
30.93	0.073	0.073
15.46	0.180	0.180
COEFICIENTE CORRELACION LINEAL	r = 0.99	r = 0.99

TABLA. 1 Concentración de la Curva Estándar de Interlucinas (IL-2, IL-4, INF- γ) de los Adyuvantes.



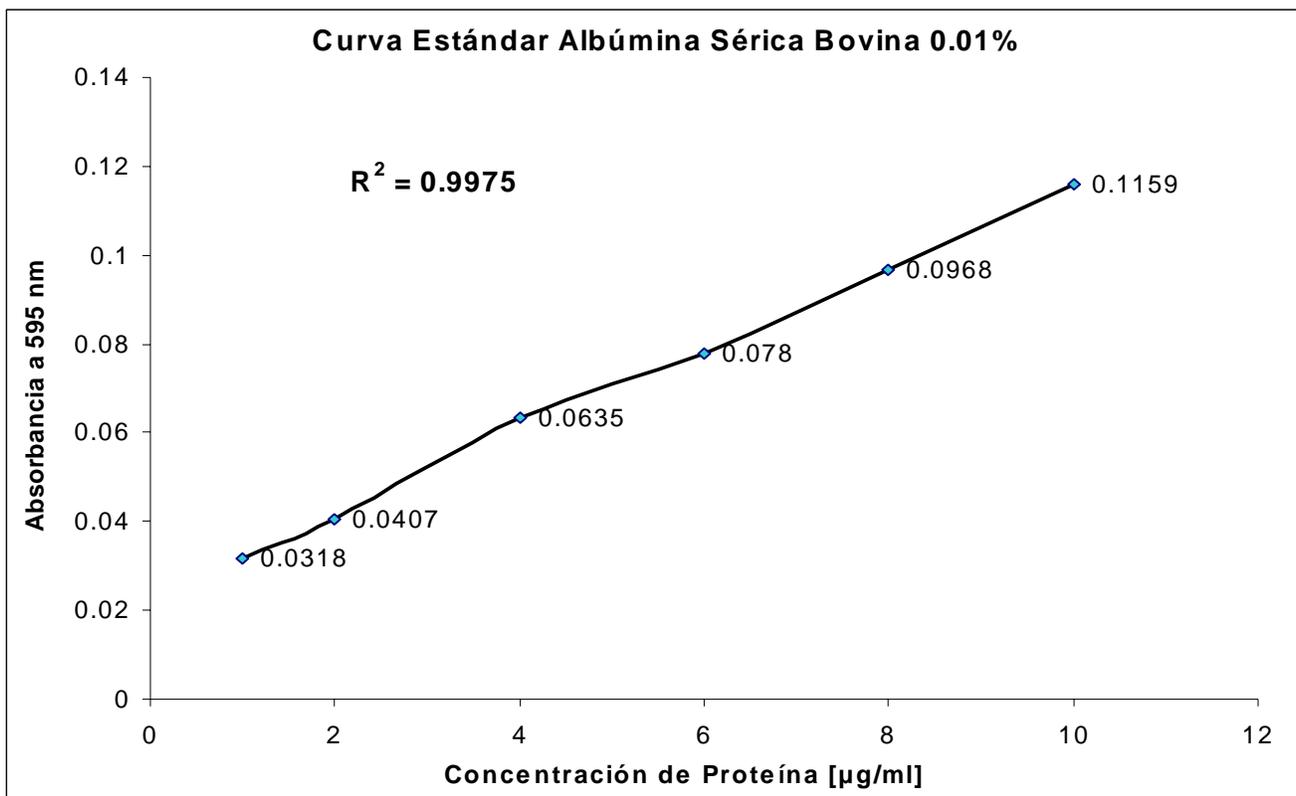
GRÁFICA. 1 Curva Estándar de Interleucinas (IL-2, IL-4, INF- γ) del Quitosán.



GRÁFICA. 2 Curva Estándar de Interleucinas (IL-2, IL-4, INF- γ) del Etil-2-Cianoacrilato.

4.2 Evaluación de las Vesículas de Membrana Externa (MVs) de *Brucella ovis*.

Para determinar el perfil proteico de MVs de *Brucella ovis* se realizó la Cuantificación de Proteínas por el Método de Bradford [Gráfica. 3]. Para corroborar la presencia y los Pesos Moleculares correspondientes y compararlos con los reportados en la literatura (Cloeckaert, et al., 2002) se realizó Electroforesis SDS-PAGE al 12% y su posterior Tinción con Azul de Coomasie [Figura. 4]. Específicamente en los “Carriles 2, 3 y 4” se observan el patrón de proteínas de las MVs en donde puede notarse la presencia de Proteínas de Membrana Externa (OMP) del Grupo 3 (OMP de 25-27KDa, OMP de 31-34KDa), OMP del Grupo 2 (OMP de 36-38KDa), y OMP del Grupo 1 (OMP de 88-94KDa). La concentración de proteína presente en la muestra fue de 107.13µg/ml y 66.28µg/ml respectivamente, a partir de ellas se elaboró el inmunógeno que se evaluó en el Modelo Murino [Tabla. 2] .



GRÁFICA. 3 Cuantificación de Proteínas por el Método de Bradford

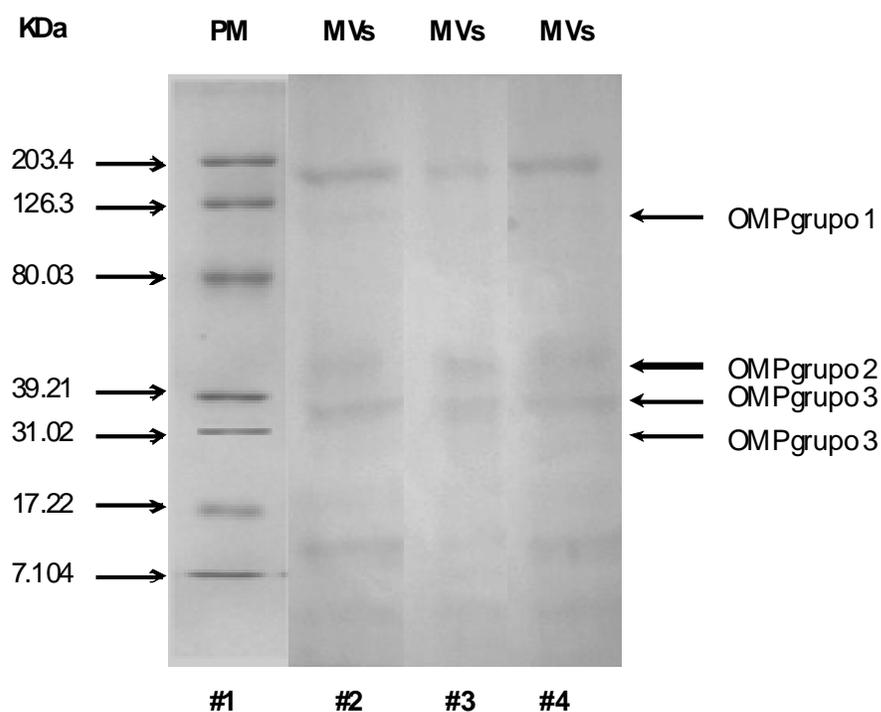


FIGURA. 4 Electroforesis SDS-PAGE al 12% de Vesículas de Membrana Externa (MV) de *Brucella ovis*. Las flechas indican los Marcadores de Peso Molecular (\rightarrow) y las OMP (\leftarrow).

Nanopartículas	Colocación del Antígeno (MV)	Dilución	Concentración Final [$\mu\text{g/ml}$]
Quitosa [107.13 $\mu\text{g/ml}$]	Exteriores	1ml de vesículas / 1ml de Nanopartículas de Quitosa	53.56
Etilcianoacrilato [66.28 $\mu\text{g/ml}$]	Exteriores	1ml de vesículas / 10 ml de Nanopartículas de Etilcianoacrilato	10.71
	Interiores	1ml de vesículas / 5ml de Nanopartículas de Etilcianoacrilato	17.34

Tabla. 2 Concentración de proteína (MV) contenida en las diferentes Nanopartículas evaluadas mediante el Modelo Murino.

4.3 Determinación del Tamaño de Partícula y Morfología: a) Del Antígeno “Vesículas de Membrana Externa de *Brucella ovis*” b) De los Adyuvantes “Quitósán y Etil-2-Cianoacrilato” c) Del Inmunógeno “MVs-Quitósán y MVs-Etil-2-Cianoacrilato”.

Las características Físico-Químicas de las partículas (Antígeno, Adyuvantes e Inmunógenos) son descritos en la **Tabla. 3**. La determinación de este estudio se realizó por Microscopía Electrónica [**Figura. 5**], las partículas resultaron ser de morfología esférica y con tamaños de media similares como aquellos obtenidos por el Aparato Zetasizer®. Las partículas de MVs (350 nm) resultaron ser de tamaños parecidos a las partículas de Quitósán (700 nm) y de partículas de Etil-2-Cianoacrilato (431 nm). La eficiencia de encapsulación de las partículas interiores de MVs-Etil-2-Cianoacrilatos fue del 42% ($\mu\text{g/ml}$ de MVs-Etil-2-Cianoacrilatos). Por otra parte, la adhesión de las partículas de MVs a las partículas de Quitósán (partículas exteriores MVs-Quitósán) y Etil-2-Cianoacrilato (partículas exteriores MVs-Etil-2-Cianoacrilato) se realizó por medio de cargas electrostáticas de ambas partículas.

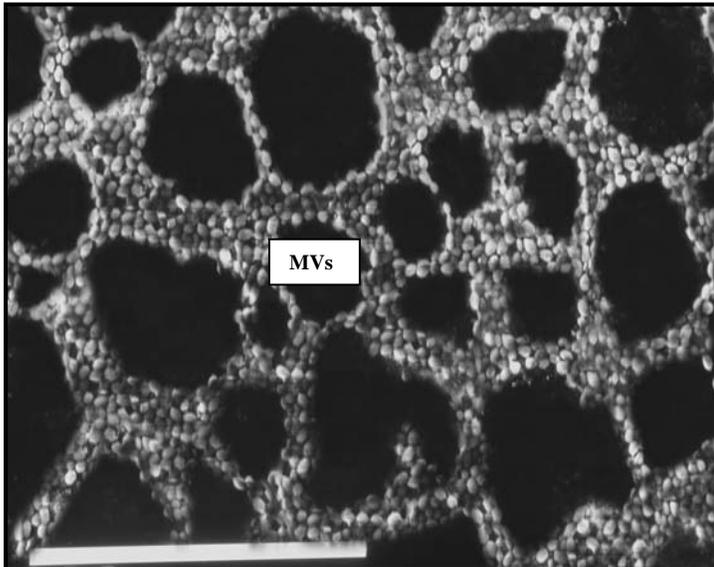
Nanopartículas	pH del Medio	Tamaño (nm) por el Aparato Zetasizer®	% Eficiencia de Encapsulación
MVs	6.65	350	NPD
Quitósán	5.50	700	NPD
Quitósán-MVs [Exterior]	6.10	NPD	NPD
Etil-2-Cianoacrilato	6.82	431	NPD
Etil-2-Cianoacrilato [Interiores]	6.56	ND	42
Etil-2-Cianoacrilato [Exteriores]	ND	NPD	NPD

TABLA. 3 Propiedades Físico-Químicas de las partículas determinadas (Antígeno, Adyuvante, Inmunógeno).

Nota: 100 μl de polímero etil-2-cianoacrilato (SIGMA) encapsulan 910 μg de proteína para las nanopartículas interiores de MVs-Etil-2-Cianoacrilatos.

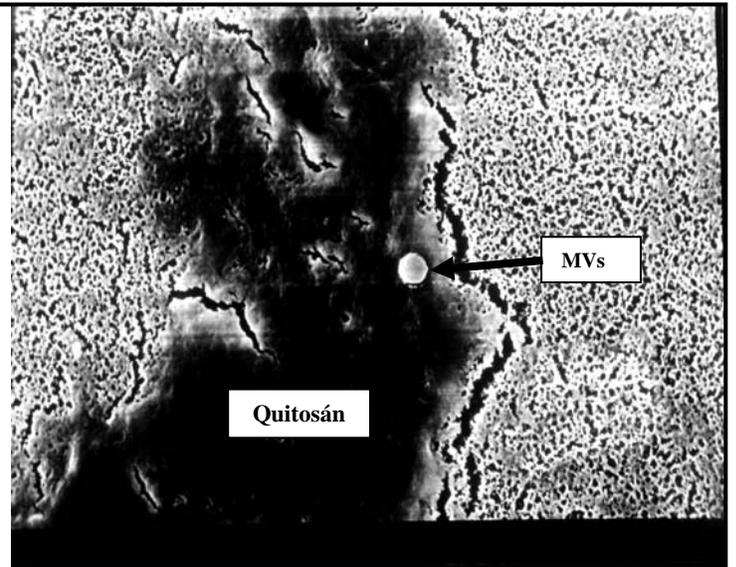
ND = No se Determinó.

NPD = No se Puede Determinar.



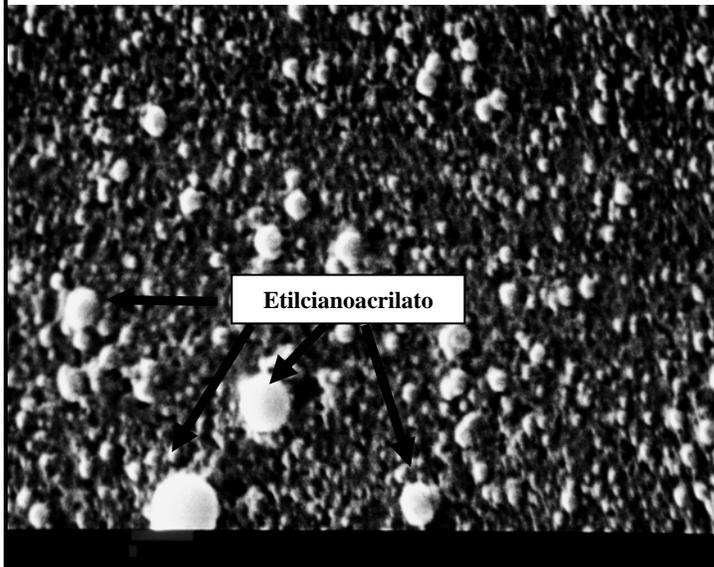
1000x

a) MVs



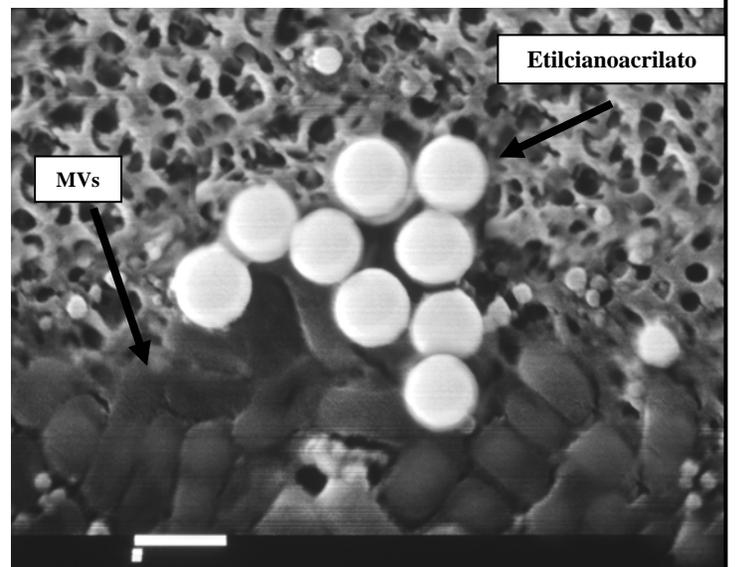
3000x, 1 μ m

b) Qitosán-MVs Ext



10000x, 500 nm

a) ETILCIANOACRILATO-MVs Int



10000x, 500 nm

d) ETILCIANOACRILATO-MVs Ext

FIGURA. 5 Microscopía Electrónica de Barrido de las partículas.

a) MVs (Vesículas de *B. ovis* conglomeradas en forma de malla, donde se puede observar su forma ovalada) **b)** Qitosán-MVs Exterior (Se puede observar en la parte central una solitaria vesícula de *B. ovis* de un tamaño aproximado a 1 μ m posada sobre restos del polímero qitosán, que forma una mancha oscura) **c)** Etilcianoacrilato-MVs Interior (Nanopartículas interiores de etilcianoacrilato de un tamaño aprox. a 500 nm sobre el campo) **d)** Etilcianoacrilato-MVs Exterior (Se puede observar en la parte central nanopartículas de etilcianoacrilato de tamaño aproximado a 500 nm de color blanquecino junto con un cúmulo de vesículas de *B. ovis* en la parte inferior).

4.4 Perfil de Citocinas producidas por las Partículas (Antígeno, Adyuvantes e Inmunógenos) en ratones inmunizados por Vía Intramuscular.

Todas las bacterias patógenas para el hombre y animales en cierto grado poseen estructuras antigénicas que activan el “Sistema Inmune” generando respuesta ante el estímulo antigénico, lo que ha permitido conocer los mecanismos de defensa que se activan al ingresar al organismo. Al evaluar la concentración de la cantidad de producción de interlucinas por células derivadas del bazo de ratón (Linfocitos T) en cultivo celular, que previamente fueron sensibilizados (MVs, Quitosán, Etil-2-Cianoacrilato, Mvs-Quitosán, MVs-Etil-2-Cianoacrilato), el comportamiento de las concentraciones de interlucinas presentes en los sobrenadantes recolectados a las 24, 48, 72, 96, 120 y 144 horas se muestran en las **Tabla. 4** y **Tabla. 5**.

INF - γ			
	Quitosán	Quitosán-MVs Ext.	MVs
HORAS	CONCENTRACIÓN [pg / ml]		
24	62.50	34.72	141.2
48	64.81	104.1	46.29
72	43.98	25.46	78.70
96	111.1	90.27	97.22
IL - 2			
	Quitosán	Quitosán-MVs Ext.	MVs
HORAS	CONCENTRACIÓN [pg / ml]		
24	-----	-----	29.29
48	-----	7.98	77.22
72	15.9	6.54	31.95
96	5.32	5.32	-----
120	-----	-----	-----
IL - 4			
	Quitosán	Quitosán-MVs Ext.	MVs
HORAS	CONCENTRACIÓN [pg / ml]		
24	100.19	20.50	-----
48	-----	87.78	-----
72	-----	72.86	-----
96	-----	105.7	92.13
120	-----	100.1	-----

TABLA. 4 Concentración de Interlucinas obtenidas del sobrenadante de células de bazo de ratón Balb/c estimuladas con MVs, nanopartículas de Quitosán y Quitosán-MVs exteriores.

<i>INF - γ</i>				
	Etil-2-Cianoacrilato	MVs	Etil-2-Cianoacrilato-MVs Int.	Etil-2-Cianoacrilato-MVs Ext.
HORAS	CONCENTRACIÓN [pg / ml]			
24	65.25	-----	178.3	-----
48	156.2	303.7	132.9	83.87
72	94.52	214.7	-----	90.20
96	-----	144.7	-----	93.43
120	-----	65.25	-----	119.9
144	-----	244.1	-----	234.2
IL - 2				
	Etil-2-Cianoacrilato	MVs	Etil-2-Cianoacrilato-MVs Int.	Etil-2-Cianoacrilato-MVs Ext.
HORAS	CONCENTRACIÓN [pg / ml]			
24	120.9	206.7	214.2	-----
48	160.0	222.8	253.4	48.74
72	199.0	188.6	222.8	70.68
96	137.0	80.67	200.3	56.87
120	49.30	137.0	201.6	56.87
144	138.6	248.8	72.24	-----
IL - 4				
	Etil-2-Cianoacrilato	MVs	Etil-2-Cianoacrilato-MVs Int.	Etil-2-Cianoacrilato-MVs Ext.
HORAS	CONCENTRACIÓN [pg / ml]			
24	-----	105.6	-----	-----
48	39.43	-----	-----	77.26
72	60.28	-----	-----	-----
96	-----	-----	-----	-----
120	-----	-----	-----	-----
144	-----	-----	-----	-----

TABLA. 5 Concentración de Interlucinas obtenidas del sobrenadante de células de bazo de ratón Balb/c estimuladas con MVs, nanopartículas de Etil-2-Cianoacrilato y Etil-2-Cianoacrilato-MVs (interiores y exteriores).

4.4.1 EMPLEO DE QUITOSÁN COMO ADYUVANTE.

4.4.1.1 Vesículas de Membrana Externa (MVs).

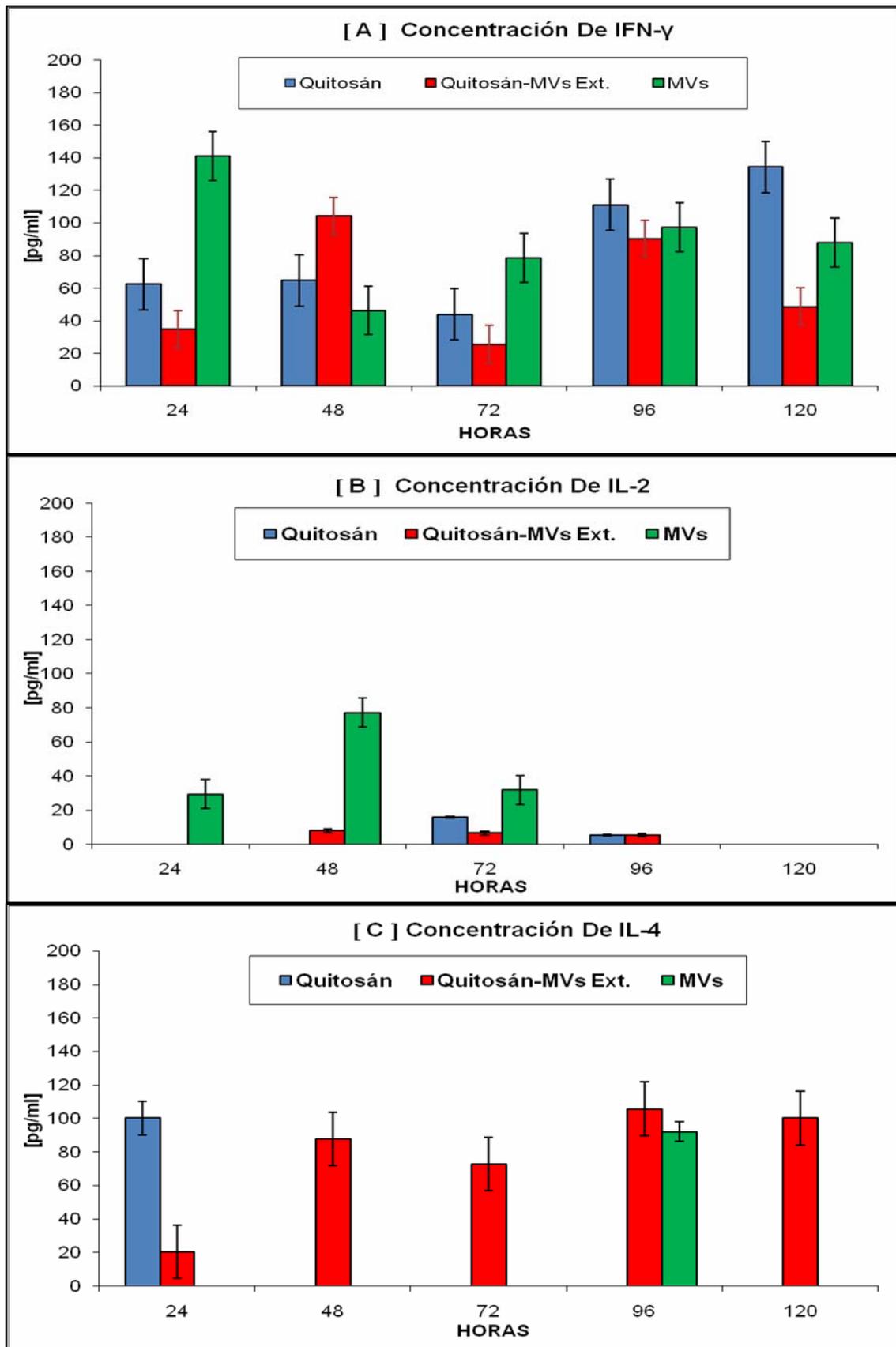
Las Nanopartículas de MVs inducen una fuerte y rápida respuesta de INF- γ a las 24 hrs, existe una ligera disminución a las 48 hrs, sin embargo, se mantiene estable la respuesta hasta las 120 hrs [Gráfica. 4A]. En el caso de IL-2 muestra concentraciones bajas a las 24 hrs, obteniendo su máxima concentración a las 48 hrs, disminuyendo drásticamente la respuesta a las 72 hrs y su desaparición posterior a las 96 hrs [Gráfica. 4B]. Se observó una respuesta de IL-4 la cual se presentó a las 96 hrs durante todo el muestreo [Gráfica. 4C].

4.4.1.2 Nanopartículas de Quitosán.

Las Nanopartículas de Quitosán inducen una pobre respuesta de INF- γ a las 24 hrs, manteniéndose estable hasta las 72 hrs, posteriormente se incrementó gradualmente a las 96 hrs, obteniendo su máximo nivel a las 120 horas [Gráfica. 4A]. Se observó una pobre respuesta de IL-2 iniciando a las 72 hrs y manteniéndose constante hasta las 96 hrs [Gráfica. 4B]. En el caso de IL-4 muestra concentraciones altas a las 24 hrs y su desaparición posterior [Gráfica. 4C].

4.4.1.3 Nanopartículas de Quitosán con MVs exteriores.

Las Nanopartículas de MVs-Quitosán inducen una pobre respuesta de INF- γ a las 24 hrs, obteniendo su máxima concentración a las 48 hrs, disminuyendo drásticamente la respuesta a las 72 hrs e incrementando de nuevo la respuesta a las 96 hrs y posteriormente su disminución de la respuesta a las 120 hrs [Gráfica. 4A]. Se observó una pobre respuesta de IL-2 la cual inicio a las 48 hrs y permaneció constante a concentraciones bajas hasta las 96 hrs [Gráfica. 4B]. En el caso de IL-4 muestra concentraciones bajas a las 24 hrs e incrementado considerablemente las concentraciones a las 48 horas y posteriormente manteniéndose constante hasta las 120 hrs [Gráfica. 4C].



GRÁFICA. 4 Inducción de [A] INF- γ , [B] IL-2 e [C] IL-4 en células de bazo de ratón Balb/c estimuladas con MVs, nanopartículas de Quitosán y Quitosán-MVs exteriores.

4.4.2 EMPLEO DE ETIL-2-CIANOACRILATO COMO ADYUVANTE.

4.4.2.1 Vesículas de Membrana Externa (MVs).

Las Nanopartículas de MVs inducen una fuerte y rápida respuesta de INF- γ a las 48 horas alcanzando su máximo nivel, posteriormente sufre un decremento gradual hasta las 120 hrs e incrementando considerable las concentraciones a las 144 hrs [Gráfica. 5A]. Sin embargo, IL-2 muestra excelentes concentraciones iniciando a las 24 hrs, manteniéndose constante hasta las 72 hrs y posteriormente sufre una disminución drástica a las 96 hrs e incrementado gradualmente a las 120 hrs, obteniéndose el máximo nivel a las 144 hrs [Gráfica. 5B]. Se observó una buena respuesta de IL-4 la cual solo se presentó a las 24 hrs durante todo el muestreo [Gráfica. 5C].

4.4.2.2 Nanopartículas de Etil-2-Cianoacrilato.

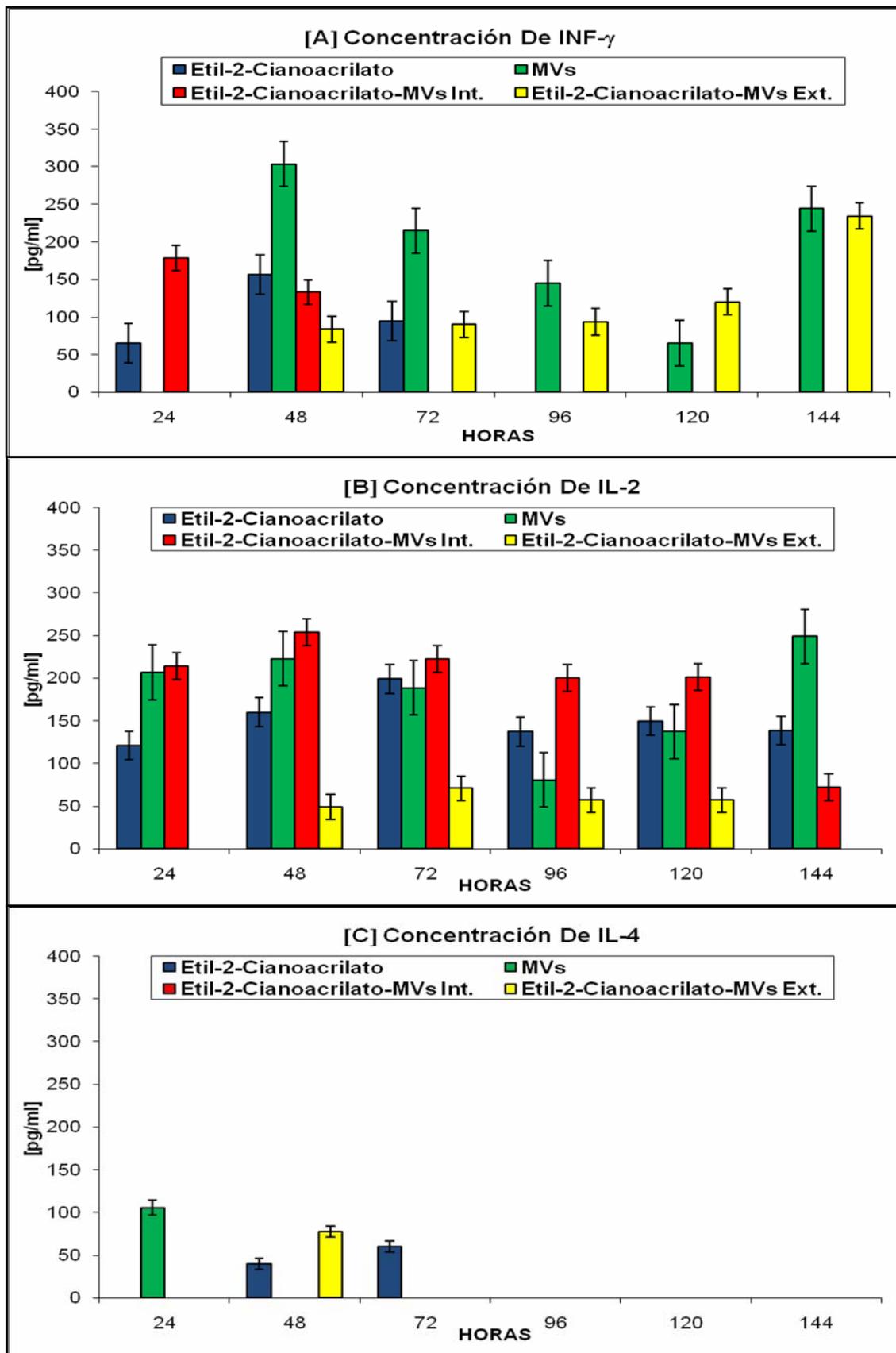
Las Nanopartículas de Etil-2-Cianoacrilato inducen una buena respuesta de INF- γ a las 24 horas, alcanzando su máximo nivel a las 48 hrs y un decremento significativo a las 72 hrs [Gráfica. 5A]. En el caso de IL-2 muestra excelentes concentraciones iniciando a las 24 hrs, manteniéndose constante sus concentraciones hasta las 144 hrs [Gráfica. 5B]. Sin embargo, IL-4 muestra concentraciones buenas a las 48 hrs e incrementando considerablemente a las 72 hrs para su posterior desaparición [Gráfica. 5C].

4.4.2.3 Nanopartículas de Etil-2-Cianoacrilato con MVs interiores.

Las Nanopartículas de MVs-Etil-2-Cianoacrilato inducen una fuerte y rápida respuesta de INF- γ alcanzando su máximo nivel a las 24 hrs, manteniéndose constante hasta las 48 hrs para su posterior desaparición [Gráfica. 5A]. Se observó excelentes concentraciones de IL-2 a las 24 hrs y se mantuvo constante hasta las 120 hrs, posteriormente un decremento de la concentración a las 144 hrs [Gráfica. 5B]. No obstante, no hay inducción en la respuesta de IL-4 [Gráfica. 5C].

4.4.2.4 Nanopartículas de Etil-2-Cianoacrilato con MVs exteriores.

Las Nanopartículas de MVs-Etil-2-Cianoacrilato inducen una buena respuesta de INF- γ iniciando a las 48 hrs, manteniéndose constante hasta las 120 horas y alcanzando su máximo nivel a las 144 hrs [Gráfica. 5A]. En el caso de IL-2 muestra buenas concentraciones iniciando a las 48 hrs y manteniéndose estable hasta las 120 hrs para su posterior desaparición [Gráfica. 5B]. Sin embargo, se observó una buena respuesta de IL-4 la cual solo se presentó a las 48 hrs durante todo el muestreo [Gráfica. 5C].



GRÁFICA. 5 Inducción de [A] INF- γ , [B] IL-2 e [C] IL-4 en células de bazo de ratón Balb/c estimuladas con MVs, nanopartículas de Etil-2-Cianoacrilato y Etil-2-Cianoacrilato-MVs (interiores y exteriores).

5.0 DISCUSIÓN.

La brucelosis es una enfermedad infectocontagiosa de distribución mundial que afecta a especies animales domésticos, animales de vida silvestre y al hombre, cuyos agentes etiológicos son las bacterias del género *Brucella* (Cloeckert et al. 2002). *Brucella ovis* es una bacteria intracelular que se replica efectivamente en bazo para producir una infección crónica y asintomática que puede ser combatida a través de una respuesta inmune, induciendo un perfil de citocinas TH1 en el Modelo Murino (ratones Balb-c) en Linfocitos T (LT) de ovinos y humanos (Jiménez et al., 1994). Por lo tanto, la activación de Linfocitos T (LT) que promueve niveles de IL-2 e INF γ para la vacunación, parece ser un decisivo mecanismo mediado por células que proporciona resistencia a la infección por *Brucella*. Preferentemente en *Brucella ovis* suscita la producción de IL-2 e INF- γ pero no la producción de IL-4 (Murillo et al., 2002).

Por lo tanto, el propósito de este estudio fue determinar la mejor formulación de nanopartículas de quitosán y etil-2-cianoacrilato para encapsular y presentar adecuadamente a las Vesículas de Membrana Externa (MVs) para inducir una respuesta inmune, en el desarrollo de una inmunidad protectora contra *Brucella ovis*.

En recientes investigaciones en *Brucella ovis* se han tenido que encontrar el “Inmunógeno Ideal”, el cual produzca un alto nivel de protección, sin producir efectos indeseables. En el desarrollo de nuevas vacunas contra la brucelosis, se desea evitar los inconvenientes de la “Vacunas de microorganismos vivos atenuados” (como su baja virulencia en el Modelo de ratón y la interferencia en el diagnóstico con pruebas serológicas) (Bowden et al., 2000). Uno de los requerimientos para diseñar y preparar una nueva vacuna, que resulte segura e eficiente, debe estar basado en el empleo de componentes subcelulares y utilizando adyuvantes adecuados. Los antígenos protectores contra esta enfermedad se han definido en el modelo de ratón y se han localizado en la membrana externa de otras especies de *Brucella* (Murillo et al., 2001).

Los perfiles de proteínas de las Vesículas de Membrana Externa (MVs) de *Brucella ovis* obtenidos en este estudio fueron similares a los reportados en la literatura (Salas et al., 2005). Por lo cual, ellos demuestran la efectividad de las MVs en cuanto a la activación de un perfil de citocinas tipo TH1 (Respuesta Inmune Celular *in vitro*) y el grado de protección obtenido (Inmunidad Protectora).

Las MVs (solas) de *Brucella ovis* que se emplearon en este estudio mostraron una importante inducción de citocinas en el modelo de ratón. Se obtuvo una fuerte y rápida respuesta de INF- γ a las 48 horas alcanzando su máximo nivel de 303.78 pg/ml, posteriormente sufre un decremento gradual hasta las 120 hrs de 65.25 pg/ml e incrementando considerable las concentraciones a las 144 hrs de 244.17 pg/ml. Sin embargo, IL-2 muestra excelentes concentraciones de 206.74 pg/ml iniciando a las 24 hrs, manteniéndose constante hasta las 72 hrs de 188pg/ml y posteriormente sufre una disminución drástica a las 96 hrs de 80.67 pg/ml e incrementado gradualmente a las 120 hrs de 137.09 pg/ml, obteniéndose el máximo nivel a las 144 hrs de 248.89 pg/ml. Este perfil de citocinas se considera una respuesta clásica de Linfocitos TH1, la cual está directamente involucrada en la respuesta inmune celular y en la hipersensibilidad retardada (DTH) (Salas et al., 2005). Posteriormente, se observó una buena respuesta de IL-4 la cual solo se presentó a las 24 hrs de 105.61 pg/ml durante todo el muestreo, demostrando una activación de Linfocitos TH2, los cuales están involucrados en la respuesta inmune humoral, debido a que las Vesículas de Membrana Externa (MV) están compuestas principalmente de Omp-31 y LPS-R ya que ambos producen anticuerpos anti-Omp-31 (Cloekaert et al., 1990) y anti-LPS-R (Murillo et al., 2002). La OMP-31 aparece como “Antígeno Inmunodominante” en el curso de la infección por *Brucella ovis* en carneros y han resultado ser “Antígeno Protector” en el Modelo Murino desafiado con *Brucella ovis* (Cloekaert et al., 1990). Además, se han encontrado anticuerpos circulantes contra el LPS-R durante la enfermedad y juegan un papel en la inmunidad dependiente de anticuerpos (Bowden et al., 1995).

Con base en la capacidad de inducir una excelente producción de citocinas (INF- γ , IL-2, IL-4) y promover la respuesta de hipersensibilidad retardada (DTH), se considera que las MVs de *Brucella ovis* funciona como un excelente Antígeno, por lo que se decidió combinarlo con el adyuvante (Quitosán ó Etil-2-Cianoacrilato) y evaluarlo en el Modelo de ratón.

El Antígeno específico (MV) y la combinación del Adyuvante (Quitosán ó Etil-2-Cianoacrilato) debe ser capaz de inducir preferentemente una respuesta de citocinas del tipo TH1 ó TH2. El subgrupo TH1, asiste en la respuesta inmune celular y la secreción de citocinas, incluyendo IL-2 y INF- γ que contribuye a la generación de opsoninas del isotipo IgG2a. El subgrupo TH2, asiste preferentemente la respuesta inmune humoral y la secreción de citocinas incluyendo IL-4 y IL-10. La naturaleza de la progresión del proceso infeccioso realiza un equilibrio TH1-TH2 para su control. En la brucelosis, la inmunidad protectora es conferida por Anticuerpos opsonizantes (respuesta TH2) y Celular (respuesta TH1) (Murillo et al., 2002).

En los estudios de Kreuter *et al.*, 1976 describe el uso de nanopartículas poliméricas (50-300nm) como adyuvantes para la adsorción y encapsulación de vacunas (Manmohan *et. al.*, 2007). Como un clásico inmuno-adyuvante, las nanopartículas pueden modular el tipo de respuesta inmune (TH1 y TH2) dirigida al acompañamiento del antígeno. Es decir, el uso de nanopartículas como adyuvantes de vacunas y de sistemas de liberación. Una respuesta inmune fuerte se suscita cuando un antígeno es asociado con nanopartículas en comparación con un antígeno soluble. Por lo tanto, estos polímeros (Quitósán y Etil-2-Cianoacrilato) juegan un importante papel en la determinación de la “Inmunidad Conferida” por una vacuna basada en nanopartículas. Los polímeros no solo afectan a la encapsulación del antígeno, sino también interactúan con macrófagos y otras células presentadoras de antígeno (APC), que conduzca a una presentación antigénica. En consecuencia, la promoción de inducción de un tipo diferente de respuesta inmune con perfiles de citocinas característicos (Murillo *et al.*, 2002).

Cabe mencionar, que el efecto de tamaño de partícula sobre la inmunogenicidad, probablemente, puede ser una consecuencia de mayor captación en los ganglios linfáticos y mayor captación en células presentadoras de antígeno (APCs) de las partículas de menor tamaño, ya que solo las partículas menores de 5µm serán transportadas al bazo. Debido a que las nanopartículas poseen una mayor área de superficie de adsorción, permitiendo un mayor radio antígeno-polímero y su posible aumento de la inmunogenicidad (la eficacia de partículas submicrométricas de 200-500nm en comparación con partículas submicrométricas de 1-2µm) (Manmohan *et. al.*, 2007). Nuestros resultados indican el tamaño de partículas que poseen: las nanopartículas de quitósán (≈700nm); las nanopartículas de etilcianoacrilato (431nm) y por lo cual permite inducir una respuesta inmune específica detectable (inmunogenicidad), cuando se mezclan con un antígeno (MVs) y se administra por vía intramuscular (*i. m*) con él, mejoran la inmunogenicidad del antígeno.

Las nanopartículas podrían servir para orientar a las Células Dendríticas (DCs) y de liberar localmente, por lo tanto, la eliminación de efectos secundarios sistémicos. Las nanopartículas de Poli (láctico-co-glicólico) (PLG) de 511.7-533.4nm que encapsula TT (toxoides tetánico) y CpG, se utilizaron para inmunizar a ratones Balb/c e inducir una respuesta fuerte de linfocitos T en dosis tan bajas como 500ng. La inmunización con una mezcla de nanopartículas de TT y CpG ODN en solución (5µg) mostro una activación de linfocitos T con un índice de estimulación de 100 y niveles de INF-γ de 95.9±9.0pg/ml mientras que la misma dosis de CpG cuando se encapsula con TT en nanopartículas de PLG mostraron un índice de estimulación de 248 y niveles de 207.8±8.3pg/ml. Además de 3-5 veces mayores niveles de TNF-β e IL-2 fueron observados con el sistema de liberación de las nanopartículas (Diwan *et. al.*, 2004).

Esto indica que existe la posibilidad de utilizar a las nanopartículas como adyuvantes como sistema de liberación localizables y para obtener una mayor respuesta inmune a bajas dosis de adyuvante y limitar los efectos secundarios sistémicos (Diwan et. al., 2004).

La inducción de la respuesta inmune mediante citocinas (INF- γ , IL-2 e IL-4) por *Brucella ovis* ha sido estudiado por Murillo et. al., 2002. Donde el antígeno HS (Hot Saline) fue encapsulado en micropartículas con tamaños de 5 μ m de poly- ϵ -caprolactona (HS-PEC) de 5.2 μ g/mg y poly-láctico-co-ácido glicólico (HS-PLGA) de 3.8 μ g/mg que fueron administrados por vía subcutánea/vía oral en ratones Balb/c y se probó como vacuna contra *Brucella ovis* y *Brucella abortus*. Por consiguiente, la inmunización por vía oral con HS-PLGA induce una respuesta inmune insignificante mientras con HS-PEC se obtiene una respuesta TH1 de baja intensidad. La inmunización por vía subcutánea con HS-PEC induce altos niveles de INF- γ e IL-2 en cambio las micropartículas de HS-PLGA inducen perfiles característicos de TH2 con importantes niveles de IL-4. Estos resultados sugieren que el HS posee por si mismo propiedades inmunopotenciadoras TH1 necesarias para el control de la brucelosis, que pueden ser específicamente incrementadas por la encapsulación en micropartículas de PEC en contraste las microparticulas de PLGA y su respuesta hacia el tipo TH2.

En 2005 el grupo de Salas et. al., probaron a las MVs resultando como un inmunopotenciador de la respuesta inmune. En contraste, nosotros empleamos mismo antígeno (MV) pero en combinación de un diferente adyuvante (Quitósán ó Etil-2-Cianoacrilato), para inducir la respuesta de citocinas (INF- γ , IL-2, IL-4), además los tiempos de evaluación fueron más largos (24 hrs a 144 hrs). Los resultados aportan un mayor conocimiento con respecto a los efectos que se producen a largo tiempo en la respuesta inmune celular y humoral contra *Brucella ovis*.

En este trabajo el antígeno MVs fue encapsulado (42% de eficiencia) en nanopartículas con tamaños de \approx 500nm de Etil-2-Cianoacrilato (Etil-2-Cianoacrilato-MVs interiores) de 17.34 μ g/ml de proteína que fueron administrados por vía intramuscular en ratones Balb/c, induciendo una fuerte y rápida respuesta de INF- γ alcanzando su máximo nivel a las 24 hrs de 178.37pg/ml, manteniéndose constante hasta las 48 hrs de 132.92pg/ml para su posterior desaparición. Se observó excelentes concentraciones de IL-2 a las 24 hrs de 214.26pg/ml y se mantuvo constante hasta las 120 hrs de 201.65pg/ml, posteriormente un decremento de la concentración a las 144 hrs de 72.24pg/ml. No obstante, no hay inducción en la respuesta de IL-4. Estos resultados sugieren las nanopartículas de Etil-2-Cianoacrilato-MVs interiores, modula la respuesta hacia la respuesta inmune celular (tipo TH1).

Debido a la importancia fundamental de nuevas vacunas terapéuticas para el tratamiento del cáncer y enfermedades virales, una serie de sistemas basados en partículas coloidales son considerados como vehículos para la liberación de agentes antitumorales y antivirales. Los sistemas estudiados en este trabajo son las nanopartículas de poli(etil-2-cianoacrilato) de gran interés por la elevada reactividad de sus monómeros de acrilatos capaces de polimerizar fácilmente en agua, a sus propiedades mecánicas, a su biocompatibilidad y compatibilidad con fármacos, a su permeabilidad, a su baja toxicidad (DL_{50} en ratas de 242 mg/kg), a su rápida velocidad de degradación comparado con otros polímeros utilizados en el transporte de fármacos como el PLA y PLGA (Arias et. al., 2008). Estudios sugieren que la administración vía transcutánea (TC) pueden ser pertinentes en la inducción de la respuesta inmune celular. Anteriormente se ha demostrado que la vía transcutánea en la aplicación de nanopartículas de poli (alquilocianoacrilatos) en explantes de piel humana, permite la orientación de células dendríticas epidérmicas, posiblemente a través de los folículos pilosos. En este estudio, se investigó la respuesta inmune celular contra una proteína de influenza, basada como vacuna por vía transcutánea, en comparación con la vacunación por vía intramuscular (i. m.) en humanos. Se encontró un aumento significativo de $INF-\gamma$ que producen los linfocitos T específicos para la vacuna contra la influenza. Curiosamente, la vacuna por vía transcutánea induce ambos efectores $CD4^+$ y $CD8^+$ (respuesta de células T), mientras que la vía intramuscular induce la inyección de fuertes efectores de linfocitos T $CD4^+$ en ausencia de linfocitos T $CD8^+$, proponiendo nuevas perspectivas para el desarrollo de nuevas estrategias de vacunación que activan la respuesta inmune de células T en humanos (Vogt et. al., 2008).

No existe un solo informe, acerca del uso de las nanopartículas de poli (etil-2-cianoacrilato) como posible vacuna terapéutica por vía intramuscular (i.m) para enfermedades bacterianas y de la inducción de la respuesta inmune mediante citocinas ($INF-\gamma$, IL-2, IL-4) por *Brucella ovis*. En este trabajo se observó que las nanopartículas de Etil-2-Cianoacrilato-MVs exteriores de 10.71 μ g/ml de proteína, inducen una buena respuesta de $INF-\gamma$ iniciando a las 48 hrs de 83.87pg/ml, manteniéndose constante hasta las 120 horas de 119.94pg/ml y alcanzando su máximo nivel a las 144 hrs de 234.21pg/ml. En el caso de IL-2 muestra buenas concentraciones iniciando a las 48 hrs de 48.74pg/ml y manteniéndose estable hasta las 120 hrs de 56.87pg/ml para su posterior desaparición. Sin embargo, se observó una respuesta de IL-4 solo a las 48 hrs de 77.26pg/ml durante todo el muestreo. Estos resultados sugieren las nanopartículas de Etil-2-Cianoacrilato-MVs exteriores modula preferentemente la respuesta hacia la respuesta inmune celular (tipo TH1).

En las condiciones de seguridad, en el desarrollo de nuevos adyuvantes, es necesario maximizar la eficacia de nuevas y/o vacunas disponibles. El quitosán es un polímero biocompatible, biodegradable, polisacárido natural de exoesqueletos de crustáceos e insectos y su baja toxicidad (DL₅₀ en ratas de >16gr/Kg). Además es usado como excipiente farmacéutico, su alta viscosidad y su actividad inmunológica, lo convierten en un excelente candidato como adyuvante para la vacunación (I.M. van der Lubben. Et. al., 2001). En estudios recientes, sugieren el uso del quitosán en solución como adyuvante para la vacunación vía subcutánea en ratones con el modelo antígeno proteico (β -galactosidasa 2 μ g/ μ l). Se encontró un aumento de títulos de anticuerpos de más de 5 veces y la proliferación de linfocitos T CD4⁺ de más de 6 veces, junto con una respuesta de hipersensibilidad retardada (DTH), reveló que el quitosán induce tanto una respuesta inmune celular como humoral. En comparación con los adyuvantes tradicionales, el quitosán es equipotente al Adyuvante Incompleto de Freud (IFA) y superior al Hidróxido de Aluminio (David A. Zaharoff. et al., 2007).

En este trabajo se observó que las nanopartículas de Quitosán-MVs exteriores de 56.53 μ g/ml de proteína inducen una pobre respuesta de INF- γ a las 24 hrs de 34.72pg/ml, obteniendo su máxima concentración a las 48 hrs de 104.16pg/ml, disminuyendo drásticamente la respuesta a las 72 hrs de 25.76pg/ml e incrementando de nuevo la respuesta a las 96 hrs de 90.27pg/ml y posteriormente su disminución de la respuesta a las 120 hrs de 48.61pg/ml. Se observó una pobre respuesta de IL-2 la cual inicio a las 48 hrs de 7.98pg/ml y permaneció constante a concentraciones bajas hasta las 96 hrs de 5.32pg/ml. En el caso de IL-4 muestra concentraciones bajas a las 24 hrs de 20.5pg/ml e incrementado considerablemente las concentraciones a las 48 horas de 87.78pg/ml y posteriormente manteniéndose constante hasta las 120 hrs de 100.19pg/ml. Estos resultados sugieren que las nanopartículas de Quitosán-MVs exteriores modulan ambas, tanto la respuesta inmune celular (tipo TH1) y la humoral (tipo TH2).

Por último, cabe destacar el uso de nanopartículas que permitan una presentación y una liberación controlada del antígeno que han tenido buenos resultados en el grado de protección conferida contra el desafío de *Brucella ovis* en el modelo murino, resta comprobar si se comporta de forma igual en el hospedero natural (Salas et. al., 2005). El éxito de una vacuna subcelular dependerá de tipo de adyuvante, el tamaño de la partícula, el antígeno, la ruta de administración y el punto exacto del estudio (Manmohan et. al., 2007).

6.0 CONCLUSIONES.

1. La vacunación es probablemente la medida de control más eficaz contra la brucelosis. En el desarrollo de nuevas vacunas, el problema con los antígenos recombinantes y los antígenos sintéticos, utilizados en las vacunas de hoy en día, es que son en general mucho menos inmunogénicos al igual que los antígenos provenientes de fracciones subcelulares del patógeno, es decir, las vacunas subcelulares formuladas con antígenos que inducen una respuesta inmune protectora. Por lo que se requieren desarrollar nuevos adyuvantes que en combinación con el antígeno puedan evocar y aumentar una respuesta inmune que pueda ser modulada de manera selectiva hacia TH1 (respuesta celular) o TH2 (respuesta humoral).
2. En general, las vesículas de membrana externa (MVs) fueron capaces de inducir *in vitro* la respuesta inmune celular (tipo TH1), al estimular la producción de IL-2 y posteriormente la de INF- γ . Además, se observó una buena respuesta de IL-4, demostrando una activación de Linfocitos TH2, los cuales están involucrados en la respuesta inmune humoral. Esto demuestra que las MVs por si solas son inmunogénicas capaces de inducir una respuesta inmune protectora contra *Brucella ovis* en el modelo murino.
3. En consecuencia, tanto el antígeno (MVs) en combinación de los adyuvantes (Quitósán y Etil-2-Cianoacrilato) al ser administrados por vía intramuscular, mostraron excelentes niveles de producción de citocinas. En donde se demuestra que las nanopartículas de Etil-2-Cianoacrilato-MVs exteriores inducen una buena respuesta de INF- γ . Por otro lado, las nanopartículas de Etil-2-Cianoacrilato-MVs interiores inducen una excelente respuesta de IL-2. Además, las nanopartículas de Quitósán-MVs exteriores inducen una buena respuesta de IL-4. Puede resultar que la combinación de las tres formulaciones de nanopartículas sirvan como un excelente inmunógeno como posible “Vacuna Subcelular” y su eficacia deberá ser evaluada a campo en el hospedero susceptible (ganado ovino) en contra de la infección por *Brucella ovis*.

7.0 BIBLIOGRAFÍA.

[A]

- Al-Mariri A., Tibor A., Mertens P., De Bolle X., Michel P., Godefroid J., Letesson J. J. Protection of BALB/c mice against *Brucella abortus* 544 challenge by vaccination with bacterioferritin or P39 recombinant proteins with CpG oligodeoxynucleotides as adjuvant. *Infect. Immun.* 2001; 69, 4816-4822.
- Alton G.G., Jones L.M., Pietz D.E. Las técnicas de laboratorio en la brucelosis. FAO/OMS Serie de monografías 55. Edición 1976. Ginebra Suiza.
- Araya L.N. and Winter A.J. Comparative protection of mice against virulent and attenuated strains of *Brucella abortus* by passive transfer of immune T cells or serum. *Infect. Immun.* 1990; 58, 254-256.
- Arias JL, Ruiz MA, López-Viota M, Delgado AV. Poly (alkylcyanoacrylate) colloidal particles as vehicles for antitumour drug delivery: A comparative study. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2008 Mar 15; 62(1):64-70.
- Aspden TJ. et. al. Chitosan as a nasal delivery system: the effect of chitosan solutions on in vitro and in vivo mucociliary transport rates in human turbinates and volunteers. *J Pharm Sci*, 1997; 86:509-13.
- Azftal M. and Scott J. Isolation and antigenic reactivity of *Brucella ovis* outer membrane proteins. *J. Clin. Microbiol*, 1987; 25:2132-2135.

[B]

- Babiuk L. A, Babiuk S. L. Immunization of animals. From DNA to the dinner plate. *Review Vet. Immunopathol*, 1999; 189-202.
- Bergey. Manual of Systematic Bacteriology. *The Williams & Wilkins Co, Baltimore*, 1984; 1:254-256.

- Berguer P.M, Mundiñano J, Piazzon I, Goldbaum F.A. A polymeric bacterial protein activates dendritic cells via TLR4. *J. Immunol*, 2006; 176, 2366-2372.
- Biagini G, Bertani A, Muzzarelli R, Damadei A, Dibenedetto G, Belligolli A, Ricotti G, Zucchinni C. Wound management with N-carboxybutyl chitosan. *Biomaterials*, 1991; 12:281-6.
- Blasco, J. M. and R. Díaz. *Brucella melitensis* Rev-1 vaccine as a cause of human brucellosis. *Lancet*, 1993; 342, 805.
- Blasco, J.M. A review of the use of *B. Melitensis* Rev1 vaccine in adult sheep and goats. *Prev. Vet. Med*, 1997; 31, 275-283.
- Bosseray N. and Plommet M. Proposed general method of controlling the activity of *Brucella* vaccines. *Dev Biol Stand*, 1984; 56, 247-255.
- Bowden, R.A., Cloeckert, A., Zygmunt, M.S., Bernad, S., Dubray, G. Surface exposure of outer membrane protein and lipopolysaccharide epitopes in *Brucella* species by enzyme linked immunosorbent assay and flow cytometry. *Infect Immun*. 1995; 63, 3945-3952.
- Bowden, R.A., Estein, S.M., Zygmunt, M.S., Dubray, G., Cloeckert, A. Identification of protective outer membrane antigens of *Brucella ovis* by passive immunization of mice with monoclonal antibodies. *Microbes Infect*, 2000; 2, 481-488.
- Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding. *Anal. Biochemistry*, 1976; 72:248-254.
- Bricker B. J. ; Tabatabai L. B. ; Ludge B. A. ; Deyoe B. L. ; Mayfield J. E. Cloning, expression, and occurrence of the *Brucella* Cu-Zn superoxide dismutase. *Infect. Immun*, 1990; 58, 2935-2939.
- Buddle M.B and Boyes B.W. A *Brucella* mutant causing genital disease of sheep in New Zealand and Australia. *Aust. Vet. J.*, 1953; 29:245-253.

- Buddle M.B. Observations on the transmission of *Brucella* infections in sheep. *New. Zel. Vet. J.*, 1955; 3:10-14.
- Bulguin, M.S. and Anderson, B.C. Association of sexual experience with isolation of various bacteria in cases of ovine epididymitis. *JAVMA*, 1983; 182 (4): 372-374.

[C]

- Canning P.C., Deyoe B.L., Roth J.A. Opsonin dependent stimulation of bovine neutrophil oxidative metabolism by *Brucella abortus*. *Am. J. Vest. Res*, 1988; 49,160-162.
- Cassataro J., Velikovsky A., Estein S. M. Bowden R. A. A DNA vaccine coding for the *Brucella* outer membrane protein 31 confers protection against *B. melitensis* and *B. ovis* infection by eliciting a specific cytotoxic response. *Infect. Immun.* 2005; 73, 537-546.
- Cassataro J., Velikovsky C. A., Giambartolomei G. H., Estein S. M., Bowden R. A., Bruno L., Spitz M., Fossati C. A. Immunogenicity of the *Brucella melitensis* recombinant ribosome recycling factor homologous protein and its cDNA. *Vaccine*. 2002; 20, 1660-1669.
- Céspedes S., Andrews E., Folch H., Oñate A. Identification and partial characterization of a new protective antigen of *Brucella abortus*. *J. Med. Microbiol.* 2000; 49(2):165-170.
- Cloeckaert A.; Verger J. M.; Grayon M.; Zygmunt M. S.; Vizcaíno N. Minireview: Molecular and immunological characterization of the major outer membrane proteins of *Brucella*. *Fems Microbiol*, 1996; Lett. 145, 1-8.
- Cloeckaert A. ; Vizcaíno N. ; Paquet J-Y ; Bowden R. A. ; Elzer P. H. Major outer membrane proteins of *Brucella ssp*: past, present and future. *Vet. Microbiol*, 2002; 90,229-247.
- Cloeckaert, A. “Antigens of *Brucella*” 50th Anniversary Meeting of Brucellosis Research Conference. November 8-9. Blooklet publishing sponsored by IDEXXX Laboratories, In. 1997.

- Cloeckaert A., de Wergifosse P., Dubray G., Limet J.N., Identification of seven surface-exposed *Brucella* outer membrane proteins by use of monoclonal antibodies: immunogold labeling for electron microscopy and enzyme linked immunosorbent assay. *Infect. Immun.* 1990; 58, 3980-3987.
- Corbel, J. M. and Brinley-Moorgan, W. J. Proposal for minimal standards for descriptions of new species and biotypes of the genus *Brucella*. *Int. J. Sys. Bact*, 1975; 25:83-89.

[CH]

- Chávez Castillo, A. Tesis de Maestría. “Elaboración de un inmunógeno de membrana externa de *B. ovis* utilizando ADN como aadyuvante y su evaluación en un sistema murino”. UNAM. Cuautitlán Izcalli, Edo. de México, 2004. 1-4
- Cheers, C. Cell mediated immunity to murine Brucellosis and the role of cytokines. Ln: 50th Anniversary Meeting of Brucellosis Research Conference. Chicago. 1997.
- Cheville N. F., Olsen S. C., Jensen A. E. Bacterial persistence and immunity in goats vaccinated with a *purE* deletion mutant or the parental 16M strain of *Brucella melitensis*. *Infect. Immun*, 1996; 64, 2431-2439.

[D]

- David A. Zaharoff, Connie J. Rogers, Kenneth W. Hance, Jeffrey Schlom, and John W. Greiner. Chitosan solution enhances both humoral and cell-mediated immune responses to subcutaneous vaccination. *Vaccine*. 2007 March 1; 25(11): 2085–2094.
- Díaz R. and Léviex D. Role respectif en sérologie de la brucellose bovine desantigènes et de immunoglobulines G1 et G2 dans les tests d’agglutination, de Coobs et au Rose de Bengale ainsi que dans le phénomène de zone. *C.R. Acad. Sci*, 1972; 274, 1503-1596.
- Diaz R., Jones L.M., Wilson J.B. Antigenic relationship of *Brucella ovis* and *Brucella melitensis*. *J. Bacteriol.*, 1967; 93:1262-1268.

- Díaz Torres R., Castaño V.M., Ganem Quintanar A., Quintanar Guerrero D., Rodríguez Romo S. Oscillations in the kinetics of ethylcyanoacrylate nanoparticles intended as skin drug carriers. *Nanotechnology*, 2005; 16. 2612-2618.
- Diwan M, Elamanchili, Cao M, Samuel J. Dose sparing of CpG oligodeoxynucleotide vaccine adjuvants by nanoparticle delivery. *Curr. Drug. Deliv.* 2004; 1, 405-412.
- Dubray G. and Bezard G. Isolation of three protective cell-wall antigens of *Brucella abortus* in experimental brucellosis in mice. *Ann. Rech. Vét*, 1980; 11,367-373.
- Dubray G. and Charriaut C. Evidence of three major polypeptide species and two major polysaccharide species of the *Brucella* outer membrane protein. *Ann. Rech. Vet*, 1983; 11, 367-373.
- Dubray G. Protective antigens in brucellosis. *Ann. Inst. Pasteur Microbiol*, 1987; 138, 84-87.

[E]

- Edmonds M. D., Cloeckert A., Booth N. J., Elzer P. H. *Brucella* species lacking the major outer membrane protein Omp25 are attenuated in mice and protect against *Brucella melitensis* and *Brucella ovis*. *Vet. Microbiol.* 2002; 88, 205-221.
- Elzer P. H., Enright F. M., Macquiston J. R., Boyle S. M., Schurig G. G. Evaluation of a rough mutant of *Brucella melitensis* in pregnant goats. *Res Vet Sci.* 1998; 64, 259-260
- Enright FM. The pathogenesis and pathobiology of *Brucella* infection in domestic animals. *In: Animal brucellosis*, 1990; 301,320.
- Estevan M, Gamazo C, Grillo M. J, Del Barrio G. G, Blasco J. M, Irache j. M. Experiments on a subunit vaccine encapsulated in microparticles and its efficacy against *Brucella melitensis* in mice. *Vaccine*, 2006; 02, 203-213.

- Eze M. O, Yuan L, Crawford R. M. Effects of opsonization and gamma interferon on growth of *Brucella melitensis* 16M in mouse peritoneal macrophages in vitro. *Infect. Immun*, 2000; 68, 257-63.

[F]

- Fernandez Prada C.M. and Nikolich M. Deletion of who enhances activation of the lectin pathway of complement in *Brucella abortus* and *Brucella melitensis*. *Infect. Immun*, 2001; 69, 4407-4416.

[G]

- Gamazo, C., Winter, A.J., Moriyon, L., Riezu-Boj, J.L., Blasco, J.M. y Diaz, R. Comparative analysis of proteins extracted by hot saline or released spontaneously into outer membrane blebs from field strains of *Brucella ovis* and *Brucella melitensis*. *Infect. Immun*. 1989; 57:1419-1426.
- Golding B, Scott D.E, Scharf O, Huang L.Y, Zaitseva M. Immunity and protection against *Brucella abortus*. *Microbes Infect*, 2001; 3, 43-48.
- Gomez Miguel M. J.; Moriyón I.; Lopez J. *Brucella* outer membrane lipoprotein shares antigenic determinants with Escherichia coli Braun lipoprotein and its exposed on the cell surface. *Infect. Immun*, 1987; 55,258-262.
- Gómez Miguel M. J. and Moriyón I. Demonstration of a peptidoglycan-linked lipoprotein and characterization of its trypsin fragment in the outer membrane of *Brucella ssp*. *Infect. Immun*, 1986; 53, 678-684.
- González Gallardo, Sofía; Ruiz Venegas M; Hernández Baumgarten E. Guía de Microscopía Electrónica. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. (UNAM). México. Octubre 2003. 59-60
- Gupta RK, Siber GR. Adjuvants for human vaccines--current status, problems and future prospects. *Vaccine*. 1995; 13(14): 1263–76.

[H]

- Haussler, W.J.; Herrmann, K.L. Isenberg, H.D. and Shadomy, H.J. *Manual of Clinical Microbiology*. 5th De. P457-461. American Society for Microbiology. Washington, D.C. 1991.
- Hoyer B.H. and Mc Cullough N.B. Polynucleotide homologies of *Brucella* deoxyribonucleic acids. *J. Bacteriol.* 1968; 95,444-448.

[I]

- I.M. van der Lubben, J.C. Verhoef, G. Borchard, H.E. Junginger. Chitosan for mucosal vaccination. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2001; 52, 139–144.
- Inoue S, Golding B, Scott D. Programming of CTL with heat killed *Brucella abortus* and antigen allows soluble antigen alone to generate effective secondary CTL. *Vaccine*, 2005; 23, 1730-1738.
- Izadjoo M. J., Bhattacharjee A. K., Paronavitana C. M., Hadfield T. L., Hoover D. L. Oral vaccination with *Brucella melitensis* WR201 protects mice against intranasal challenge with virulent *Brucella melitensis* 16M. *Infect Immun.* 2004; 72, 4031-4039.

[J]

- Jabbal-Gill I, Fisher AN, Rappuoli R, Davis SS, Illum L. Stimulation of mucosal and systemic antibody responses against *Bordetella pertussis* filamentous haemagglutinin and recombinant pertussis toxin after nasal administration with chitosan in mice. *Vaccine*, 1998; 16: 2039-46.
- Jiang X., Leonard B., Benson R., Baldwin C.L. Macrophage control of *Brucella abortus*: role of reactive oxygen intermediates and nitric oxide. *Cell Immunol*, 1993; 151, 309-319.
- Jimenez de Bagués M.P, Elzer P.H., Marin C.M., Gamazo C., Winter A.J. Protective immunity to *brucella ovis* in Balb/c mice following recovery from primary infection or immunization with subcellular vaccines. *Infect. Immun.*, 1994; 62, 632-638.
- Jiménez de Bagues, M.P., Barberán, C.M. Marín, y J.M. Blasco. The *Brucella abortus* RB51 vaccine does not confer protection against *Brucella ovis* in rams. *Vaccine*, 1995; 13, 301-304.

- Jones L.M. Report to the International Comité on Nomenclature of bacteria by the Subcommittee on Taxonomy on *Brucellae*. *Int. J. System. Bact.*, 1967; 17:371-375.

[K]

- Kittelberger R., Diack D. S., Vizcaíno N., Zygmunt M.S, Cloeckaert A. Characterization of an immune dominant antigen in *Brucella ovis* and evaluation of its use in an enzyme linked immunosorbent assay. *Vet. Microbiol*, 1998; 59, 2-3.
- Kennedy P.C., Frazier L.M., Mc Gowan B. Epididymitis in rams. Pathology and bacteriology. *Cornell Vet.*, 1956; 46:303-319.
- Ko, J. and Splitter, G. A. Molecular host pathogen interaction in brucellosis: current understanding and future approaches to vaccine development for mice and humans. *Clin Microbiol. Rev*, 2003; 16, 65-78.
- Kreuter J., Speiser PP. New adjuvants on a polymethylmethacrylate base. *Infect. Immun.* 1976; 13(1), 204-210.

[L]

- Laemmli, U.K. Cleavage of structural protein during assembly of bacteriophage T4. *Nature (London)*, 1970; 227:680-685.
- Levine MM, Sztein MB. Vaccine development strategies for improving immunization: the role of modern immunology. *Nat Immunol.* 2004 May; 5(5): 460-4.
- Limet J. N., Plommet A. M., Dubray G. Immunity conferred upon mice by anti-LPS monoclonal antibodies in murine brucellosis. *Ann. Inst. Pasteur-Immunol*, 1987; 138, 417-424.
- Lin J., Adams L. G., Ficht T. A. Immunological response to the *Brucella abortus* GroEL homolog. *Infect. Immun.* 1996; 64, 4396-4400.

[M]

- Manmohan Singh, Aravind Chakrapani, Derek Ó Hagan. Nanoparticles and microparticles as vaccine-delivery systems. *Expert Review of Vaccines*, 2007; 6:5, 797-808.
- Mc Farland D., Jebson J.L., Hatley W.J., Salisbury R.M., Mc Cutle T.J., Osborne H.G. Ram epididymitis, ewe abortion and lamb neonatal mortality. *Aust. Vet. J*, 1952; 28:221-226.
- Moreno, E.; Cloeckert, A.; Moriyon, I. *Brucella* evolution and taxonomy. *Vet. Microbiol*, 2002; 90, 209-227.
- Moreno, E.; Jones L. M.; Berman D. T. Immunochemical characterization of rough *Brucella* lipopolysaccharides. *Infect. Immun*, 1984; 31, 362-370.
- Muñoz P. M, Estevan M, Marin C. M, Jesus de Miguel M. *Brucella* outer membrane complex loaded microparticles as a vaccine against *Brucella ovis* in rams. *Vaccine*, 2005; 23, 2081-2087.
- Murillo M., Grilló M.J., Reñe J., Marín C.M., Barberán M., Goñi M.M., Blasco J.M., Irache J.M., Gamazo C. A *Brucella ovis* antigenic bearing poly-ε-caprolactone microparticle confer protection against experimental brucellosis in mice. *Vaccine*, 2001; 19: 4099 – 4106.
- Murillo, M., Goñi, MM., Irache, JM., Arangoa, MA., Blasco, JM and Gamazo, C. Modulation of the cellular immune response after oral or subcutaneous immunization with microparticles containing *Brucella ovis* antigens. *Journal of Controlled release*, 2002; 85, 237-246.

[Ñ]

- Núñez T.E., Díaz A.E., Velásquez Q.F., Trigo T.F., Suárez G.F. Presencia de anticuerpos contra diferentes especies de *Brucella* en sementales ovinos jóvenes. 1997. *Vet. Méx.* 28(3):241-245.

[O]

- Oliveira S. C., Zhu Y., Splitter G. A. Recombinant L7/L12 ribosomal protein and gamma irradiated *Brucella abortus* induce a T helper 1 subset response from murine CD4⁺ T cells. *Immunology*. 1994; 83, 659-664.

- Oliveira S. C., Harms J. S., Banai M., Splitter G. A. Recombinant *Brucella abortus* proteins that induce proliferation and gamma interferon by CD4/T cells from *Brucella* vaccinated mice and delayed type hypersensitivity in sensitized guinea pigs. *Cell. Immunol.* 1996; 172, 262-268.

[P]

- Pérez E., Flores C.R., De la Huerta J.A., Trigo T.F.J. Diagnóstico y descripción de un brote de epididimitis ovina en México originado por *Brucella ovis*. *Vet. Méx.* 1979; 10:221-226.
- Petrovsky N, Aguilar JC. Vaccine adjuvants: current state and future trends. *Immunol Cell Biol.* 2004; 82(5): 488–96.
- Plommet M. Brucellosis and immunity: humoral and cellular components in mice. *Ann. Inst. Pasteur Microbiol*, 1987; 138, 105-109.

[R]

- Reyes Aguayo Maricruz. Tesis de Licenciatura. “Determinación de Vesículas de *Actinobacillus seminis* y *Brucella ovis* mediante microscopia electrónica de barrido y transmisión”. UNAM. Cuautitlán Izcalli, Edo. De México, 2002.
- Riezu-Boj, J.L., Moriyon, L., Blasco; Marin, C.M. y Diaz, R. Comparison of lipopolysaccharide extracts in an enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of *Brucella ovis* infection. *J. of Clin. Microbiology*, 1986; 23:938-942.
- Robinson A. and Melling J. Envelope structure and the development of new vaccines. *J. Appl. Bacteriol*, 1993; 74, 43S-51S.
- Robles, C. A. Epididimitis contagiosa de los carneros por *Brucella ovis*. *Revista de Medicina Veterinaria*, 1998; 79(1):pp. 67-71.

- Roop R. M., Fletcher T. W., Sriraganathan S. M., Boyle S. M., Schurig G. G. Identification of an immunoreactive *Brucella abortus* HtrA stress response protein homolog. *Infect. Immun.*, 1994; 62, 1000-1007.
- Rosinha G. M., Myioshi A., Azevedo V., Splitter G. A., Oliveira S. C. Molecular and immunological characterization of recombinant *Brucella abortus* glyceraldehydes-3-phosphate-dehydrogenase a T and B cell reactive protein that induces partial protection when co-administered with an IL-12 expressing plasmid in a DNA vaccine formulation. *J. Med. Microbiol.* 2002; 51, 661-671.

[S]

- Salas Téllez, E. Tesis de Doctorado. “Estudio de las respuesta inmune celular de fracciones subcelulares de *Brucella ovis*.” UNAM. Cuautitlán Izcalli. Edo. de México. 2004. (pp 5, 23, 30, 54-60)
- Salas-Téllez E, A Núñez del Arco , V Tenorio , E Díaz-Aparicio , M de la Garza , F Suárez-Güemes. Subcellular fractions of *Brucella ovis* distinctively induce the production of interleukin-2, interleukin-4, and interferon-gamma in mice. *Can J Vet Res.* 2005 Jan; 69 (1):53-7 15745223.
- Santos J.M., Verstrete D.R., Perera V.Y. & Winter A.J. Outer Membrane proteins from rough strains of four *Brucella* species. *Infect. Immun.*, 1984; 46, 188-194.
- Schurig G. G, N. Sriranganathan, M. J. Corbel. Brucellosis vaccines: past, present and future. *Vet. Microbiol.*, 2002; 90, 479-496.
- Simmons G.C. and Hall W.T. Epididymitis of rams. *Aust. Vet. J.*, 1953; 29:33-40.
- Suarez G.F., Martínez Y.E., Flores C.R., Presencia de anticuerpos con *B. ovis* en borregos tabasco o pelibuey. Resumen de la XI Reunión Anual del Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias. Pág 20. México D.F. 1974.
- Sulitzeanu D. Mechanism of immunity against *Brucella*. *Nature*, 1955; 205, 1086-1088.

- Susuki K, Okawa Y, Susuki M. Candidacidal effects of peritoneal exudate cells in mice administered with chitin or chitosan: the role of serine protease on the mechanism of oxygen – independent candidacidal effects. *Microbiol Immunol*, 1987; 31:375-9.

[T]

- Tabatabai L. B. and Pugh G. W. Modulation of immune responses in BALB/c mice vaccinated with *Brucella abortus* Cu-Zn superoxide dismutase synthetic peptide vaccine. *Vaccine*, 1994, 12, 919-924.
- Thayer, J. D. and Martín, J. E. A selective medium for cultivating *N. gonorrhoeae* and *N. meningitides*. *Publ Helath Dpto. U.S.* 1964; 79:49.
- Timoney J., Gillespie J., Scott F., Barlough J. Hagan and Bruner's Microbiology and Infectious Diseases of Domestic Animals with reference to Etiology, Epizotiology, Pathogenesis, Immunity, Diagnosis and antimicrobial susceptibility. 8a Ed., Comstock Publishing Associates (Cornell University Press) London, 1992.

[U]

- Ugalde J. E., Comerci D. J., Leguizamón M. S. Ugalde R. A. Evaluation of *Brucella abortus* phosphoglucosyltransferase (*pgm*) mutant as a new live rough phenotype vaccine. *Infect Immun.* 2003; 71 6264-6269.

[V]

- Velikovsky C. A., J. Cassataro, S. Estein, L. Bruno. *Brucella* lumazine synthase elicits a mixed Th1-Th2 immune response and reduces infection in mice challenged with *Brucella*. *Infect Immun.* 2003; 71, 5750-5755.
- Vemulapalli R., Duncan A. J., Boye S. M., Toth T. E., Shurig G. G. Cloning and sequencing of *yajC* and *secD* homologs of *Brucella abortus* and demonstration of immune responses to *yajC* in mice vaccinated with *Brucella abortus* RB51. *Infect. Immun.* 1998; 66, 5684-5691.

- Venegas Cureño, E. Tesis de Licenciatura. Evaluación de la respuesta inmune humoral generada en cobayos inmunizados con péptidos sintéticos de proteínas de la membrana externa de *Brucella ssp.* UNAM. México, D.F, 2007.
- Vizcaíno N.; Verger J. M.; Grayon. M.; Zygmunt M. S.; Cloeckaert A. DNA polymorphism at the Omp31 locus of *Brucella ssp.*: evidence for a large deletion in *Brucella abortus*, and other species-specific markers. *Microbiology*, 1997; 143, 2913-2931.
- Vogt A, Mahé B, Costagliola D, Bonduelle O, Hadam S, Schaefer G, Schaefer H, Katlama C, Sterry W, Autran B, Blume-Peytavi U, Combadiere B. Transcutaneous anti-influenza vaccination promotes both CD4 and CD8 T cell immune responses in humans. *J Immunol.* 2008 Feb. 1; 180 (3):1482-9.

[W]

- Wyckoff J. H. Bovine T lymphocyte responses to *Brucella abortus*. *Vet Microbiol*, 2002; 90, 395-415.
- Wyckoff J. H. Howland J. L., Confer A. W. Comparison of *Brucella abortus* antigen preparations for in vitro stimulation of immune bovine T lymphocyte cell lines. *Vet Immunol Immunopathol*, 1993; 36: 45-64.

[Z]

- Zaharoff, D., Rogers, C. et. al. Chitosan solution enhances both tumoral and cell-mediated immune responses to subcutaneous vaccination. *Vaccine*, 2006; 25. 2085-2094.
- Zhan Y. and Cheers C. Endogenous interleukin-12 (IL-12) is involved in the resistance to *Brucella abortus* infection. *Infect. Immun*, 1995; 63, 1387-1390.
- Zygmunt, M. S., Debarh, H. S., Cloeckaert, A., Dubray G. To *Brucella melitensis* outer membrane antigens in naturally infected and Rev1 vaccinated sheep. *Vet. Microbiol*, 1994; 39, 33-46.