



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

INDUCCIÓN DE RESPUESTA INMUNE SISTÉMICA Y  
MUCOSA EN RATONES BALB/C POR  
ADMINISTRACIÓN DE PET Y PETS260I DE  
*Escherichia coli* ENTEROAGREGATIVA

**T E S I S   P R O F E S I O N A L**  
PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
**B I O L O G O**  
P R E S E N T A:  
**A T Z I N   C A R R E Ñ O   M E J I A**





Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Inmunidad en Mucosas de la Unidad de Biotecnología y Prototipos de la Facultad de Estudios Superiores de la U.N.A.M. bajo la tutoría de la Dra. Leticia Moreno Fierros con apoyo de PAPIIT IN207800 y CONACYT 34834 y en el laboratorio 51 del departamento de Biología Celular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del I.P.N. bajo la tutoría del Dr. Fernando Navarro García, como parte del proyecto: Caracterización de la estructura - función de las proteínas serin proteasa autotransportadoras de Enterobacteriaceae (SPATEs: sistema de secreción - virulencia), con apoyo de CONACyT 31028-M.

*A los que no están.*

*La ciencia es un intento de entender el mundo,  
de alcanzar el dominio de nosotros mismos,  
de dirigirnos a un camino seguro.*

*El hecho de entender algo,  
es una verdadera celebración de la unión,  
la mezcla, aunque sea a una escala muy modesta,  
con la magnificencia del cosmos.*

*Cuando reconocemos nuestro lugar  
en una inmensidad de años luz  
y en el paso de las eras,  
cuando captamos la complejidad,  
belleza y sutileza de la vida,  
entonces la ciencia  
trasciende más allá de una actividad intelectual,  
nos enseña una forma de vivir,  
buscando la verdad con humildad.*

*A Eddhito,  
el viento que cambió mi vida,  
el viento que impulsa mis días.*

## **Agradecimientos:**

Mi más sincero agradecimiento a la Dra. Leticia Moreno Fierros por todo su apoyo incondicional durante la realización de este trabajo y que con su ejemplo, enseñanzas y paciencia me ha permitido conocer lo complejo pero fascinante mundo de la investigación.

Al Dr. Fernando Navarro por su apoyo, ayuda y paciencia brindados durante el desarrollo de este trabajo y por transmitirme el gusto por la investigación.

A todos los compañeros del Laboratorio de Inmunidad en Mucosas de la F.E.S. Iztacala, a la M. en C. Leticia Verdín por sus acertadas observaciones sobre este trabajo, a Marco, por sus consejos, al Saúl, al Aldo, a Xavier, Rita, Jenni, etc. por hacer más agradable mi estancia en el lab., por su ayuda en el trabajo experimental y por haber contribuido de alguna forma en mi formación académica.

A los integrantes del Laboratorio 51 del departamento de Biología Celular del CINVESTAV, por su compañerismo. A Rocío Huerta por su ayuda y a Filiberto Hernández por su apoyo técnico.

Agradezco a mis papás por su ejemplo de lucha y superación, por haberme guiado a lo largo de todo el camino, por su apoyo incondicional en todas mis inquietudes y decisiones y sobre todo por demostrarme que la vocación de padres es para siempre.

A Rubén por que marcaste una nueva etapa en mi vida, por tu apoyo, comprensión y compañía.

A mis hermanos, a Itzel por ser una buena amiga, por sus ánimos y su ejemplo, a Itzam por ser un amigo protector y un tío tierno.

A mis dos grandes amigos: Meztli y Diana por darme ánimos y por su forma tan especial de ver la vida.

A todos los familiares y amigos que me apoyaron y contribuyeron de alguna forma a conducir con éste trabajo.



## ÍNDICE

---

ÍNDICE DE FIGURAS	I
ABREVIATURAS	II
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	3
Sistema Inmune de Mucosas	3
Inmunoglobulinas en Mucosas	6
Inducción de la Respuesta Inmune en Mucosas	7
ANTECEDENTES	8
<i>Escherichia coli</i> diarreogénica	8
Las proteínas Pet y PetS260I de <i>E. coli</i> enteroagregativa	10
OBJETIVO GENERAL	13
OBJETIVOS PARTICULARES	13
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	14
METODOLOGÍA	15
Transformación de pCEF1-2 en <i>E. coli</i> HB101	15
Obtención de Pet y PetS260I	15
Cuantificación de Proteína	15
Electroforesis en gels de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio	16
Inmunizaciones	16
Obtención de muestras	16
Análisis de la respuesta de anticuerpos	17
Análisis estadístico	18
RESULTADOS	19
Obtención de PetS260I y Pet	19
Respuesta de anticuerpos anti-Pet y anti-PetS260I en suero	19
Respuesta de anticuerpos anti-Pet y anti-PetS260I en líquidos de intestino grueso	19
Respuesta de anticuerpos anti-Pet y anti-PetS260I en líquidos de intestino delgado	20
Respuesta de anticuerpos anti-Pet y anti-PetS260I en lavados traqueopulmonares	20
Respuesta de anticuerpos anti-Pet y anti-PetS260I en lavados vaginales	20
DISCUSIÓN	28
CONCLUSIONES	40
BIBLIOGRAFÍA	41

## ÍNDICE DE FIGURAS

---

Figura 1.	Modelo de migración de células linfoides estimuladas de sitios inductores a sitios efectores en el sistema inmune de mucosas	5
Figura 2.	Patrón de adherencia de <i>E. coli</i> enteroagregativa	9
Figura 3.	Topología de una proteína autotransportadora	12
Figura 4.	Electroforesis de Pet y PetS260I	21
Figura 5.	Anticuerpos séricos anti-Pet y anti-PetS260I	23
Figura 6.	Anticuerpos anti-Pet y anti-PetS260I en líquidos de intestino grueso	24
Figura 7.	Anticuerpos anti-Pet y anti-PetS260I en líquidos de intestino delgado	25
Figura 8.	Anticuerpos anti-Pet y anti-PetS260I en lavados traqueopulmonares	26
Figura 9.	Anticuerpos anti-Pet y anti-PetS260I en lavados vaginales	27

## ABREVIATURAS

AAF	fimbrias de adherencia agregativa
Arg	Arginina
BALT	bronchus-associated-lymphoid tissue
CFA	células formadoras de anticuerpos
CT	toxina de cólera
EAEC	<i>Escherichia coli</i> enteroagregativa
EHEC	<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica
EIEC	<i>Escherichia coli</i> enteroinvasiva
ELISA	prueba de inmunoadsorción ligada a enzimas
EPEC	<i>Escherichia coli</i> enteropatógena
ETEC	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigénica
GALT	gut-associated-lymphoid tissue
Gu	Ácido glutámico
Gly	Glicina
i.n.	intranasal
i.p.	intraoperitoneal
IgA	inmunoglobulina A
IgG	inmunoglobulina G
IgM	inmunoglobulina M
J	cadena de unión
LB	medio de cultivo Luria-Bertani
LP	lámina propia
LT	enterotoxina termolábil
Lys	Lisina
MALT	mucosa-associated-lymphoid tissue (tejido linfático asociado a mucosas)
MHC	complejo principal de histocompatibilidad
NALT	nasal-associated-lymphoid tissue
NLI	nódulos linfáticos iliacos
NLTB	nódulos linfáticos traqueobronquiales
pAA	plásmido de virulencia de 65 MDa
PBS	solución amortiguadora de fosfatos
PBS-T	solución amortiguadora de fosfatos adicionado con tween 20 al 0.05%
pCEF1-1	plásmido que codifica para Pet (Carlos Eslava, Fernando Navarro)
pCEF1-2	plásmido que codifica para PetS260I (Carlos Eslava, Fernando Navarro)
Pet	toxina codificada por el plásmido
PetS260I	toxina codificada por el plásmido con mutación dirigida en sitio de serina por isoleucina
Pic	proteína implicada en colonización intestinal
plgA	inmunoglobulina A polimérica
plgR	receptor Ig polimérico
PP	placas de Peyer
SC	componente secretor
SDS-PAGE	gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio
S-IgA	inmunoglobulina A secretora
S-IgM	inmunoglobulina M secretora
ST	enterotoxina termoestable
TALT	tejido linfático asociado al tubo de eustaquio
tgf	tracto genital femenino
tp	traqueopulmonar
VHS	virus de inmunodeficiencia humana y en simios

## RESUMEN

---

En el sistema mucoso se encuentran un gran número de moléculas efectoras de respuesta inmune que incluyen anticuerpos, especialmente del isotipo S-IgA, citocinas, quimiocinas y receptores de quimiocinas que actúan en sinergia con factores innatos como las defensinas. Debido a que las superficies mucosas constituyen la principal ruta de entrada de agentes infecciosos, es necesario desarrollar estrategias capaces de conferirles protección. Dentro de los estudios encaminados al desarrollo de vacunas, se ha utilizado la inserción de epítopes de interés médico en proteínas ancladoras. La proteína Pet es un buen candidato para vector de epítopos, ya que al ser autosecretada por *E. coli* enteroagregativa, permite una fácil purificación, además de expresar los epítopos que inducirán anticuerpos contra determinados patógenos en mucosas. Sin embargo, se ha encontrado que esta proteína produce efectos enterotóxicos adjudicados al motivo de serin-proteasa. Para comprobarlo, una mutación sitio dirigida fue introducida en el residuo catalítico de la serina 260, sustituyendo este aminoácido por isoleucina. La proteína mutante PetS260I no presentó actividad proteolítica en geles de sustrato, además de ser incapaz de causar efectos citopáticos ni enterotóxicos pero sí conserva su mecanismo de autosecreción. Debido a esto, se planteó como objetivo determinar si la administración intraperitoneal, intranasal, rectal y oral de Pet y PetS260I induce respuesta de anticuerpos en mucosas intestinales, del tracto genital femenino y respiratorio en ratones Balb/c. Para ello, aplicamos 3 dosis de 50µg de Pet y PetS260I respectivamente, a grupos de 5 ratones hembra, 1 cada semana y la respuesta de anticuerpos IgA, IgG e IgM se determinó por ELISA indirecto. En este trabajo encontramos que Pet y PetS260I son altamente inmunogénicas a nivel sistémico y de mucosas. La magnitud e isotipo de respuesta inmune inducida por estas dos proteínas varía en función de la vía de administración utilizada y el sitio analizado, aportando evidencias de la compartimentalización del sistema inmune de mucosas. PetS260I resultó ser más inmunogénica que la proteína nativa a nivel sistémico, en de mucosas traqueopulmonares y vaginales. Con respecto a las vías de inmunización, determinamos que la administración intraperitoneal de PetS260I fue la ruta más eficaz en inducir respuesta de anticuerpos IgG específica en suero y en las distintas mucosas analizadas. Sin embargo, su administración vía intranasal, resultó igualmente eficaz en la mucosa del tracto genital femenino. Por su parte, la administración oral e intranasal de PetS260I promueve inmunidad sistémica y en mucosa del tracto respiratorio, lo que permite sugerir estas rutas potenciales para la vacunación, mientras que la inmunización rectal es menos eficiente. El isotipo predominante de anticuerpos inducido en la mayoría de los sitios analizados fue IgG a diferencia de IgA e IgM.

La proteína PetS260I es un potencial acarreador vacuol de epítomos, ya que es inocua, presenta un mecanismo de autosecreción que permite obtenerla pura y a bajos costos, es altamente inmunogénica a nivel sistémica y de mucosas del tracto genital femenino y respiratorio y debido a su capacidad de internalizarse en células epiteliales, podría inducir respuesta de células T CD8+ antígeno-espeíficas, confiriendo inmunidad contra patógenos intracelulares tales como virus.

## INTRODUCCIÓN

La principal causa de mortalidad humana a nivel mundial es por enfermedades infecciosas, tanto gastrointestinales, respiratorias como urogenitales.

La mayoría de los agentes patógenos (virus, bacterias, hongos y protozoarios) causantes de estas enfermedades, tienen como principal ruta de entrada al organismo, las superficies mucosas, ya que éstas están en contacto permanente con el medio externo e interno y han desarrollado mecanismos protectores ante patógenos y absorción de antígenos foráneos (Margni, 1996).

### Sistema Inmune de Mucosas

La protección inmune de las superficies mucosas es medida por el Sistema Inmune de Mucosas, que comprende al tejido linfoides asociado a superficies mucosas (mucosa-associated lymphoid tissue, MALT) y glándulas exócrinas (McGhee *et al.*, 1999). El MALT está compuesto por: tejido linfoides asociado a intestinos (gut-associated lymphoid tissue, GALT); el tejido linfoides asociado a bronquios (bronchus-associated lymphoid tissue BAL) que incluye folículos linfoides de los bronquios y tejido linfoides asociado a nasofaringe (nasal-associated lymphoid tissue, NALT) (McGhee *et al.*, 1999; Fujimura, 2000). Funcionalmente el MALT puede ser dividido en sitios inductores y efectores que se encuentran separados pero interconectados (Nugent *et al.*, 1998) (fig 1).

**1. Sitios Inductores de la mucosa.** Estos sitios facilitan la captación del antígeno que será procesado y presentado a células B y T, dándose una activación inicial de éstas. Los principales sitios inductores del tracto gastrointestinal son: placas de Peyer (PP), apéndices, nódulos linfáticos aislados, nódulos mesentéricos y linfocitos intraepiteliales que colectivamente, comprenden el GALT. Mientras que las amígdalas y adenoides, constituyen el NALT, sirviendo como sitios inductores del tracto respiratorio y de la cavidad nasal y oral (Nugent *et al.*, 1998; Kiyono y McGhee, 1999).

El tejido inductor más extensamente estudiado está constituido por las PP del tracto gastrointestinal murino. Las PP presentan una región en forma de domo, debajo de la cual se encuentran los folículos que contienen células B con centros germinales, así como una región parafolicular enriquecida con células T y macrófagos. La superficie de la región del domo, está cubierta por epitelio asociado a folículo, el cual está compuesto de células M (McGhee *et al.*, 1999). Estas células, que son funcional y morfológicamente distintas de otras células epiteliales

del tracto gastrointestinal, se caracterizan por presentar microvellosidades irregulares en su parte apical, pequeñas vesículas citoplásmicas y pocas lisosomas. Las células M son capaces de endocitar y transportar antígenos proteicos, partículas inertes y microorganismos, incluyendo bacterias, virus y protozoarios al GALT. Su función primordial es la de captar, internalizar y transportar antígenos de la membrana luminal de superficie, hacia la región inductiva mucosa del GALT, específicamente al interior de las PP. Esto conduce a la estimulación de las células T cooperadoras (Th) y a las células B precursoras de inmunoglobulina A (IgA) en las PP así como a la diseminación de células B y T, a tejidos efectores mucosos tales como las regiones de la lámina propia (LP) del intestino, bronquios, tracto genitourinario y varias glándulas secretoras para subsecuentes respuestas de anticuerpo IgA secretora (S-IgA) antígeno-específico (Nugent *et al.*, 1998).

**2. Sitios Efectores de la mucosa.** Los sitios efectores para la respuesta inmune de mucosas, incluyen las células linfoides de la LP en los tractos gastrointestinales, respiratorios y reproductivos, así como tejidos de glándulas secretoras como las mamarias, salivales y lagrimales.

Después de una exposición inicial del antígeno en el MALT, los linfocitos de la mucosa dejan los sitios inductores para dirigirse hacia los tejidos mucosos efectores. Esta ruta de distribución de células desde sitios inductores IgA, hacia sitios efectores IgA, se conoce como Sistema Inmune Común de Mucosas. Las células efectoras mucosas antígeno específicas incluyen células plasmáticas productoras de IgA, así como linfocitos B y T. La S-IgA es producida en tejidos efectores y es la principal inmunoglobulina implicada en la protección de superficies mucosas tanto en sitios locales como en mucosas distales (Nugent *et al.*, 1998; Kiyono y McGhee, 1999).

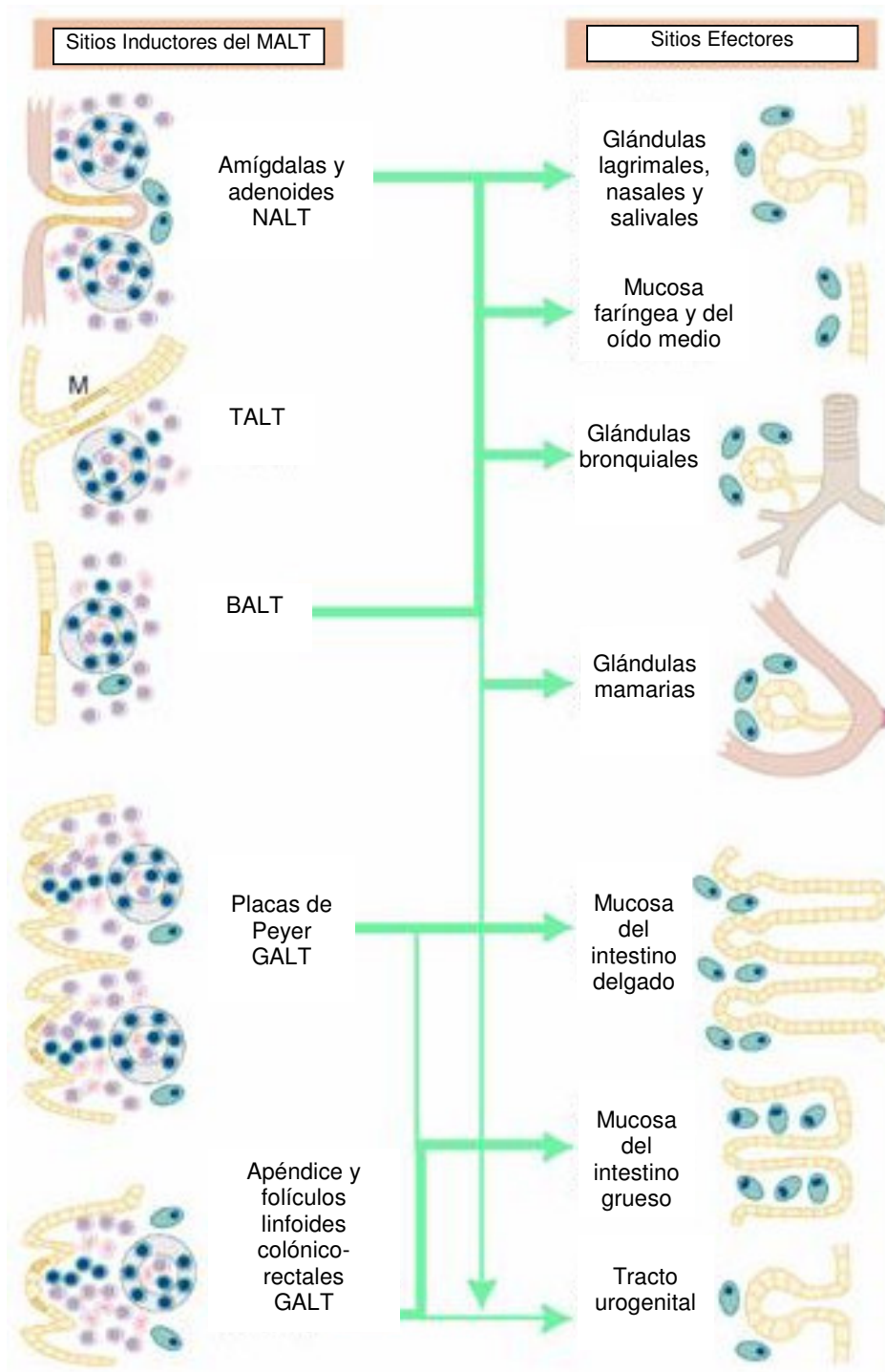


Fig. 1. Modelo de migración de células linfoides estimuladas de sitios inductores a sitios efectores en el sistema inmune de mucosas. Las flechas más gruesas representan las vías de comunicación preferenciales (Brandtzaeg y Farstad, 1999).



## Inmunoglobulinas en Mucosas.

Los anticuerpos presentes en secreciones mucosas, particularmente IgA, se unen con microorganismos para reducir su motilidad y sus propiedades adhesivas dentro del lumen de la mucosa y su superficie. Estas funciones disminuyen la habilidad de los microorganismos de unirse al epitelio y subsecuentemente entrar en el medio interno del cuerpo (Mestecky *et al.*, 1999). Se ha demostrado que durante el transporte al lumen mucoso de anticuerpos IgA polimérica (pIgA), ésta puede unirse con antígenos y virus que hayan entrado a células mucosas epiteliales (Mazanec *et al.*, 1992). Así mismo, a través de la formación de complejos inmunes, los anticuerpos de mucosas previenen la absorción de antígenos provenientes del alimento en las superficies mucosas.

IgA está presente en la mayoría de las secreciones mucosas en mayor concentración que los otros isotipos de inmunoglobulinas. La importancia de IgA en secreciones mucosas está basada en la predominancia de ésta en secreciones intestinales y en saliva de humanos, así como en la presencia de una estructura antigénica adicional en S-IgA, que es conocida como componente secretor (SC). Este componente es sintetizado por células epiteliales de la mucosa y se expresa en sus superficies basal y lateral. Subsecuentemente el SC fue reconocido como parte del receptor Ig polimérico (pIgR) que transporta IgA del tejido mucoso a sus secreciones. Así mismo un polipéptido llamado cadena de unión (J) fue identificado como componente de IgA e inmunoglobulina M (IgM) en suero y mucosas de muchas especies de vertebrados. Esta cadena J permite la unión de dos moléculas de IgA formando un dímero, ambos son secretados a la LP y transportados a través de las células epiteliales a la luz intestinal mediante el SC (Mestecky, 1999; Abbas *et al.*, 1998).

La IgM secretora (S-IgM) en secreciones externas, está asociada también con el SC, sin embargo su concentración es substancialmente menor a la de S-IgA debido a una menor proporción de células productoras de IgM en tejidos mucosas. Así mismo IgM no puede ser tan efectivamente transportada como IgA debido a una restricción en su peso molecular en el transporte dependiente de SC (Mestecky, 1999).

Por otra parte, se ha observado un incremento compensatorio de IgM en tejidos mucosas y en secreciones en individuos IgA-deficientes. En estos casos de deficiencias, la inmunoglobulina G (IgG) también juega un rol compensatorio. En la mayoría de las especies la concentración de IgG en secreciones mucosas, es aproximadamente similar o ligeramente mayor que IgM (Underdown *et al.*, 1992).

## Inducción de Respuesta Inmune en Mucosas.

El sistema mucoso es de gran importancia para la protección del huésped, ya que en él se encuentran un mayor número de moléculas efectoras que las que se encuentran sistémicamente. Estas moléculas incluyen anticuerpos, especialmente del isotipo S-IgA, citocinas, quimiocinas, receptores de quimiocinas, que actúan en sinergia con factores innatos como las defensinas (McGhee *et al.*, 1999).

Numerosos estudios han demostrado que la inducción de respuesta inmune en mucosas en el sitio inicial de infección representa la principal protección contra patógenos. Las inmunizaciones por vías mucosas dan como resultado la estimulación de respuesta inmune tanto sistémica como mucosa a diferencia de las inmunizaciones parenterales (Nugent *et al.*, 1998). Además, la administración de determinados antígenos por vías mucosas puede estimular cualquier tipo de respuesta inmune: S-IgA, anticuerpos IgG séricos neutralizantes contra toxinas y virus, así como respuesta mediada por células, que comprende proliferación de linfocitos, producción de citocinas y actividad de linfocitos T CD8+ citotóxicos (Levine, 2003).

Entre las estrategias exploradas para incrementar las respuestas en mucosas se ha utilizado tecnología genética para crear derivados de adyuvantes de mucosas no tóxicos; también se ha experimentado con la coexpresión de un antígeno y una citocina específica que sea importante en la modulación y control de la respuesta inmune de mucosa; otra alternativa es la inactivación genética de antígenos con una delección en un gen esencial (Nugent *et al.*, 1998). De la misma manera, se ha desarrollado el uso de minigenes, es decir, secuencias de epítomos insertados en péptidos bacterianos, que induzcan anticuerpos. La problemática al desarrollar esta última metodología es que cuando una bacteria Gram negativa expresa genes que codifican polipéptidos antigénicos, estos pueden ser degradados por proteasas propias de la célula, se acumulan en el periplasma o en el citoplasma en forma de gránulos insolubles conocidos como cuerpos de inclusión, cuya acumulación conduce a la muerte celular, fracasando en su papel vacunal (Klauser *et al.*, 1991). Además, para purificar estos polipéptidos endógenos, se requiere realizar una fragmentación celular, incrementando el riesgo de contaminación. Una solución a dicha problemática, sería utilizar una proteína de autosecreción, que al ser liberada al medio, secretará el epítomo de interés vacunal que tiene insertado, permitiendo que se induzca una respuesta anti-epítomo. Este modelo de autosecreción, además evitaría la manipulación celular para su fragmentación, evitando de esta manera, el riesgo de contaminación de la proteína antigénica. Una proteína que reúne estas características es Pet (plasmid encoded toxin) la cual es autosecretada por *Escherichia coli* enteroagregativa.

## ANTECEDENTES

### ***Escherichia coli* diarreogénica.**

*Escherichia coli* es el anaerobio facultativo predominante en la flora colónica humana. Este organismo típicamente coloniza al recién nacido para desarrollar una relación de mutuo beneficio. Generalmente *E. coli* no produce ningún daño, sin embargo, ciertas clones de esta bacteria han desarrollado la habilidad de causar un amplio espectro de enfermedades humanas presentando tres síndromes generales: infección del tracto urinario, sepsis/meningitis o enfermedades diarreicas/entéricas.

Dentro de las *E. coli* diarreogénicas se han distinguido cinco categorías que comprenden: *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), enteropatógena (EPEC), enterohemorrágica (EHEC), enteroinvasiva (EIEC) y enteroagregativa (EAEC).

Tres estrategias generales han sido descritas por las cuales *E. coli* puede causar diarrea: i) producción de enterotoxinas (ETEC y EAEC), ii) invasión (EIEC), iii) y/o adherencia con señalizadores de membrana (EPEC y EHEC) (Nataro y Kaper, 1998).

***E. coli* enterotoxigénica.** Es causante de diarrea sin sangre, moco o pus. Coloniza el intestino, a través de fimbrias, después de adherirse a los enterocitos para posteriormente liberar la enterotoxina termolábil (LT), termoestable (ST) o ambas, provocando secreción de fluido intestinal.

***E. coli* enteropatógena.** Es la primera causa de diarrea infantil en países en desarrollo. Produce vómito y en menor grado fiebre. Esta bacteria coloniza el intestino mediante fimbrias, otorgando la característica de adherencia localizada.

La señal de infección debido a EPEC es la adherencia y destrucción de la membrana apical, este fenotipo es caracterizado por destrucción de las microvellosidades y por tener una adherencia íntima entre la bacteria y el epitelio de la membrana celular. Existe un marcado cambio en el citoesqueleto, que incluye acumulación de actina polimerizada debajo de la bacteria adherida.

***E. coli* enteroinvasiva.** Esta relacionada bioquímica, genética y patogénicamente con *Shigella* sp. El sitio de infección de *Shigella* y EIEC es la mucosa colónica, provocando abundante diarrea y sólo en algunos casos diarrea con sangre y moco, además de producir poca fiebre. La característica más importante de esta bacteria es la penetración del epitelio celular, lisis de

vacuola endocítica, multiplicación intracelular y movimiento direccional a través del citoplasma (Nataro y Kaper, 1998).

***E. coli* enteroagregativa.** Estas bacterias se distinguen de las antes descritas por su patrón de adherencia en forma de ladrillos (fig. 2), en la superficie de las células epiteliales intestinales. EAEC está asociada con diarrea persistente en niños, la cual se presenta con moco, usualmente sin sangre y los pacientes son generalmente afebriles (Hicks *et al.*, 1996; Nataro y Kaper, 1998). La virulencia de estas cepas diarreogénicas es conferida por plásmidos o islas de patogenicidad en el cromosoma. Los genes de virulencia son transferidos entre bacterias vía transformación, transferencia de fagos, o transmisión de plásmidos. De esta forma es muy probable que una solución adaptativa a un obstáculo impuesto por el hospedero sea compartido con otros procariontes (Nataro y Kaper, 1998).



Fig. 2 Patrón de adherencia en forma de ladrillos apilados de *Escherichia coli* enteroagregativa en mucosa intestinal (Hicks *et al.*, 1996).

Se han reportado tres eventos básicos en la patogénesis de EAEC.

1. Adherencia inicial a la mucosa. Ésta es mediada por fimbrias de adherencia agregativa (AAF), de las cuales se han identificado dos diferentes en EAEC. Una de ellas corresponde a AAF/I en la cepa 17-2, que consiste en una estructura flexible en forma de rollo que media la adherencia a HEP-2 y hemoaglutinación con eritrocitos humanos (Nataro *et al.*, 1992; Nataro y Kaper, 1998). La segunda estructura fimbrial es AAF/II en la cepa 042 que le confiere la adherencia agregativa a la bacteria (Czezulín *et al.*, 1997).
2. Formación de una película bacteria-moco en la superficie del intestino. EAEC característicamente aumenta la secreción de moco por la mucosa, formando conjuntamente una biopelícula de moco. La colonización por esta bacteria podría ser aumentada por la interacción entre el moco y el patrón hidrofóbico de la fimbria AAF, así como por la elaboración de toxinas que puedan aumentar la elaboración de moco (Nataro *et al.*, 1992).
3. Elaboración de toxinas. Se han identificado tres toxinas secretadas por EAEC: La **enterotoxina 1 termoestable** (EAST 1) que es codificada por el gen *astA* en el plásmido bacteriano. Esta toxina produce un incremento en la producción de iones por segmentos intestinales montados en cámara de Ussing (incremento de corriente de corto circuito y diferencia de potencial) (Czezulín *et al.*, 1999; Savarino *et al.*, 1993). La **proteína implicada en colonización intestinal** (Pic), es una toxina de 116 kDa codificada en el cromosoma de la bacteria. Se ha descrito que tienen un motivo serin-proteasa que degrada gelatina y puede ser inhibido por ruptura del sitio activo. Así mismo, se ha reportado que Pic tiene actividad mucínasa, resistencia al suero y hemoaglutinación (Henderson *et al.*, 1999). Pero no tiene efecto citotóxico en células epiteliales, no se une ni degrada a fodrina *in vivo*, no es internalizada por células epiteliales, por lo que no causa daño en el citoesqueleto de actina (Navarro-García *et al.*, 1998; Arciniega, 2002). Otra toxina secretada por EAEC es la **toxina codificada por el plásmido** (Pet).

### Las proteínas Pet y PetS260I de *E. coli* enteroagregativa.

Pet es una toxina codificada por el gen *Pet* presente en el plásmido de virulencia de 65 MDa (pAA). Pet está constituida por 1 295 aminoácidos cuya masa molecular está calculada en 140 kDa. Esta toxina es miembro de la familia de proteínas autotransportadoras (secreción tipo V) (Eslava *et al.*, 1998; Henderson y Nataro, 2001). El sistema de secreción V, originalmente descrito para la proteasa de IgA, es utilizado en la secreción de proteínas en *Neisseria*, *Haemophilus*, *Bordetella* y *Helicobacter*, así como varios miembros de la familia

Enterobacteriaceae, incluyendo *Shigella* y *E. coli*. Hasta el momento no se ha reportado que alguno de los miembros de esta familia degraden IgA1. Este sistema es un mecanismo de secreción altamente eficiente. La toxina Pet, tiene tres dominios relacionados con su secreción; una secuencia señal, un dominio pasajero que posee un motivo de serin-proteasa (108 kDa) y un dominio  $\beta$  (30 kDa) (Navarro-García *et al.*, 1998). La proteína de 140 kDa atraviesa la membrana interna a través del aparato general de secreción, con ayuda de la secuencia señal; una vez en el periplasma, el extremo carboxil-terminal (dominio- $\beta$ ) de la proteína se ensambla como un poro barril dentro de la membrana externa. La porción N-terminal de la molécula se inserta a través de este poro para ser secretada al medio externo (fig. 3) (Eslava *et al.*, 1998; Navarro-García *et al.*, 1999).

Se ha encontrado que la toxina Pet induce efectos enterotóxicos, observados en preparaciones de yeyuno de rata montadas en cámara Ussing, donde esta toxina provoca un incremento en la secreción de iones por las células epiteliales, determinado por un aumento de corriente de corto circuito y de la diferencia de potencial. Así mismo el tejido intestinal expuesto a Pet exhibe los cambios patológicos caracterizados por incremento en la liberación de moco, exfoliación de células, desarrollo de abscesos de las criptas y acortamiento de las vellosidades (Navarro-García *et al.*, 1998). Se ha demostrado citotoxicidad causada por Pet en células epiteliales, debido a que provoca redondeamiento, contracción del citoesqueleto y pérdida de las fibras de estrés. Los efectos citopáticos que produce Pet son debido al motivo serin-proteasa, ya que esta proteína induce proteólisis en geles de sustrato, y la preincubación con inhibidor de serin-proteasa resulta en la completa anulación de los efectos citopáticos. Para determinar el papel de la actividad de proteasa de Pet, una mutación sitio-dirigida fue introducida en el residuo catalítico de serina S260, convirtiendo este aminoácido en isoleucina. PetS260I fue procesada y secretada en sobrenadantes de HB101 y fue detectada en inmunoblots con anticuerpos dirigidos contra la proteína Pet. Sin embargo, PetS260I no presentó actividad proteolítica en geles de sustrato. Además se encontró a esta proteína incapaz de causar redondeamiento y efectos citopáticos en células HEp-2 o HT29. Así mismo, se utilizaron sobrenadantes con PetS260I para comprobar sus efectos enterotóxicos en tejido yeyunal de rata montados en cámara Ussing, encontrando que no hubo incremento en la corriente de corto circuito, ni una disminución en la conductancia del tejido (Navarro-García *et al.*, 1999).

Conjuntamente, se ha observado que la toxina Pet produce daño a las células epiteliales, donde su sitio blanco de acción es la fodrina, la cual es parte del esqueleto de la membrana y permite la unión del citoesqueleto a la membrana citoplasmática (Bennett y Gilligan, 1993). De ésta manera, la fodrina mantiene la conexión de la membrana plasmática con la red de actina citoplasmática como un mecanismo para la generación de la forma celular y estabilidad mecánica.

La proteólisis de la fodrina dentro de las células, podría inducir una disgregación del esqueleto de la membrana, así como de la conexión con la red de actina citoplásmica, conduciendo esto a alteraciones de la membrana y finalmente a la muerte celular (Dieder, 1991). Se ha determinado que Pet purificada produce degradación de  $\alpha$ -y  $\beta$ -espectrina en membranas de eritrocitos y en  $\alpha$ -y  $\beta$ -fodrina en células HEP-2. Por el contrario, la mutante PetS260I no tiene efecto sobre la degradación de fodrina y espectrina no eritroide. Esto comprueba que el efecto de la degradación de fodrina producido por Pet es debido al motivo serin-proteasa. (Villaseca *et al.*, 2000).

Los estudios comparativos que se han realizado entre Pet y PetS260I, han demostrado que la mutante carece de efectos enterotóxicos y citopáticos, sin embargo conserva el mismo mecanismo de secreción que la proteína nativa. Esto permite que la proteína sea purificada fácilmente, implicando bajos costos y evitando el riesgo de contaminación con otros componentes celulares. Estas dos características; ser inocua y autotransportarse, le confieren a PetS260I la posibilidad de utilizarse como un potencial adyuvante vacunal, al insertarle epítopos de interés médico, por lo que es necesario estudiar su carácter inmunogénico para establecer la viabilidad de esta estrategia de inmunización mucosa. Debido a esta necesidad, en el presente trabajo se caracterizó y comparó la inmunogenicidad de ambas proteínas a nivel sistémico y en los distintos sitios mucosos al administrar Pet y PetS260I por las distintas vías de inmunización.

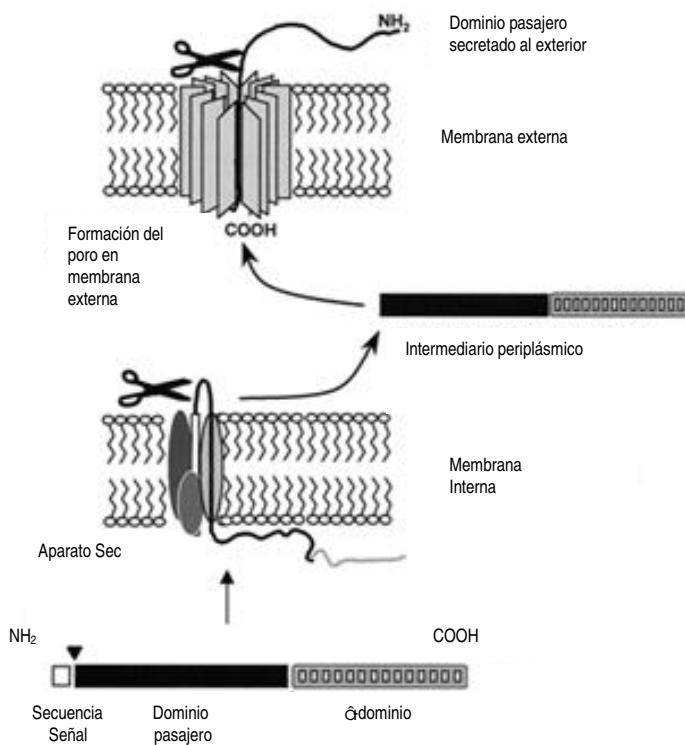


Fig.3 Topología de una proteína autotransportadora. La toxina tiene 3 dominios: secuencia señal, dominio pasajero que posee un motivo serin proteasa y el dominio  $\alpha$ . La proteína de 140 kDa atraviesa la membrana interna a través del aparato general de secreción sec. Una vez en el periplasma el dominio  $\alpha$  se ensambla como un poro barril dentro de la membrana externa. La porción N-terminal se inserta y se mueve a través del poro. La secuencia líder es cortada en la membrana por una peptidasa señal, liberando la proteína madura al periplasma (Henderson y Nataro, 2001).

## **OBJETIVO GENERAL**

Determinar si las proteínas Pet y PetS260I inducen una respuesta de anticuerpos a nivel sistémico y de mucosas en ratones Balb/c.

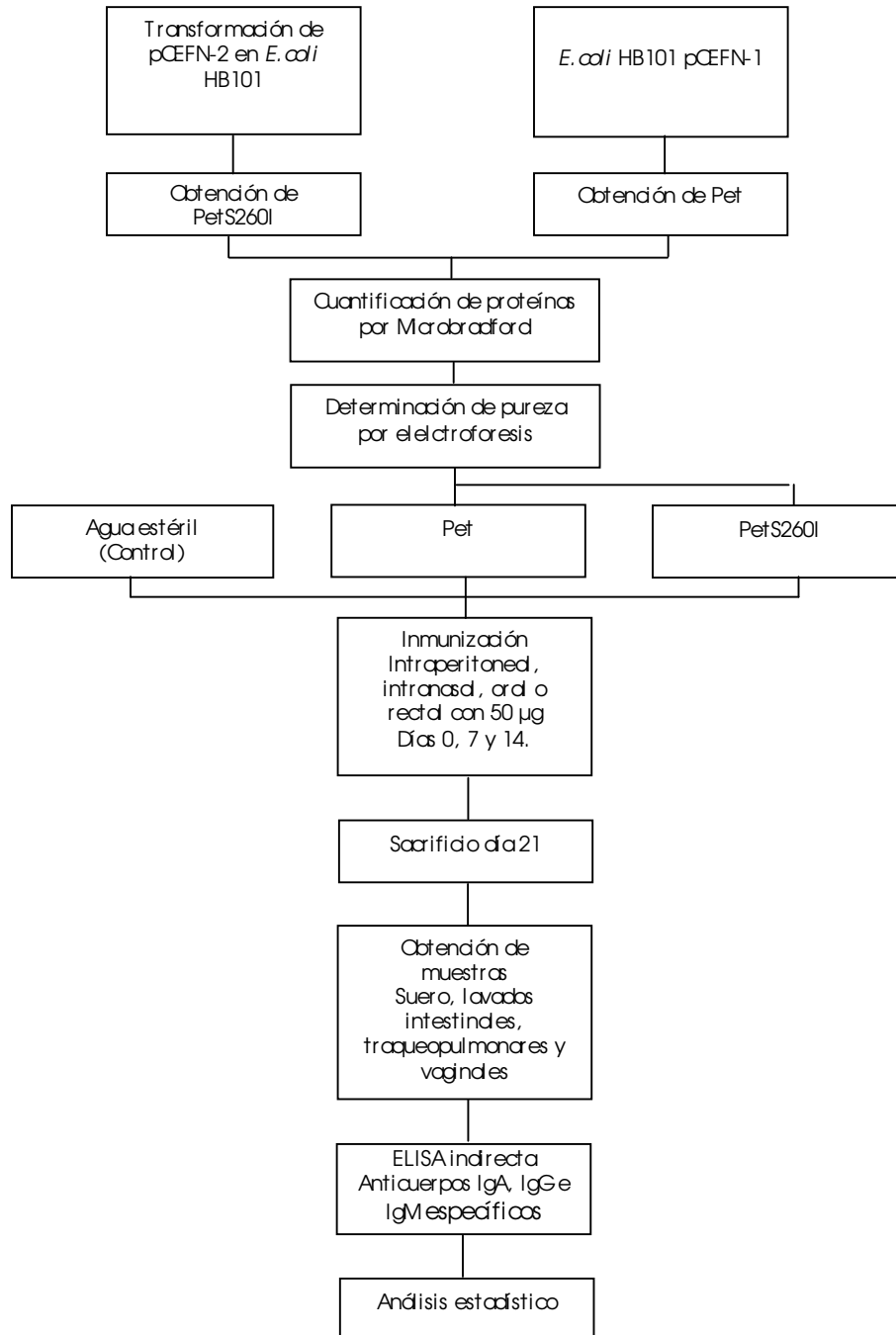
## **OBJETIVOS PARTICULARES**

- Comparar la respuesta inmune anti-Pet con la respuesta anti-PetS260I en los isotipos IgA, IgG e IgM, inducida a través de las distintas vías de administración.
- Establecer cuál es la vía de administración que induce la mayor respuesta inmune para ambas proteínas.
- Determinar en qué mucosa se induce la mayor respuesta inmune con cada una de las proteínas administradas por las distintas vías.
- Establecer qué isotipo; IgA, IgG o IgM, anti-Pet y anti-S260I, presenta una mayor magnitud al ser inducidos por cada una de las proteínas por las distintas vías de administración.





## Estrategia Experimental





## **METODOLOGÍA**

### **Transformación de pCEF2 en *E. coli* HB101**

Se colocaron 0.3 ml de cultivo de células competentes en un tubo de 1.5 ml en hielo. Posteriormente se les agregaron 3  $\mu$ l de pCEF2 (plásmido que codifica para la proteína PetS260I). Se mezcló y se dejó en hielo por 60 minutos. Transcurrido el tiempo se les dio a las células un shock térmico de 3 minutos, poniendo la dífuota a 42°C en baño de agua y se regresaron a hielo por 3 minutos. Para cada transformación se mezcló la dífuota con 1 ml de medio de cultivo Luria-Bertani (LB) caldo y se incubó con agitación por 1 hora a 37°C. De este cultivo se esparcieron de 100 a 150  $\mu$ l en una placa de LB suplementada con 100  $\mu$ g/ml de ampicilina. Las bacterias cultivadas de la manera descrita, se utilizaron para la obtención de la proteína PetS260I.

### **Obtención de Pet y PetS260I**

Se inoculó una azada de *E. coli* HB101(pCEF2) (plásmido que codifica para la proteína Pet) y pCEF2, respectivamente, en una placa agar LBA, incubándose toda la noche a 37°C. Una azada de estos cultivos fue traspasada a 2 matraces de 500 ml de caldo LBA, incubándose a 37°C y 150 rpm durante 16–18 hrs. Al concluir este tiempo, el contenido de los matraces se centrifugó en botellas Sorvall a 4°C y 6700 rpm en rotor GSA durante 20 min. Se desechó la pastilla de bacterias y el sobrenadante se manejó en todo momento en hielo. Se filtró en condiciones asépticas utilizando un filtro de 0.22  $\mu$  y recibiendo el filtrado en botellas estériles. Posteriormente el volumen se concentró 100 veces utilizando filtros Ultrafree –15 (Biomax 100-kDa, Millipore), centrifugando a 4°C y 3300 rpm (en rotor de 1462). El concentrado se almacenó a –20°C.

### **Quantificación de Proteína**

Se determinó la concentración de Pet y PetS260I por el método de Marbradford (Bradford, 1976), utilizando una curva de albúmina sérica bovina a partir de una solución madre de 1mg/ml en solución amortiguadora de fosfatos (PBS) como estándar. Las muestras problema fueron analizadas por triplicado utilizando PBS como blanco. La lectura se realizó en lector de ELISA a una absorbancia a 595 nm. La concentración de las proteínas se calculó obteniendo la ecuación de la curva estándar por regresión lineal con mínimos cuadrados.

## **Electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE)**

Las muestras de proteína se prepararon utilizando regulador de muestra 2x pH 6.8 en condiciones reductoras ( $\beta$ - mercaptoetanol al 5%, glicerol 25%, azul de bromofenol 0.2%, Tris-HCl 100mM (pH 6.8) y SDS 4%) con PBS como diluyente, se sumergieron en agua hirviendo por 4 minutos y se sometieron a SDS-PAGE (Laemmli, 1970) usando marcadores de peso molecular preteñidos. Para llevar a cabo esta técnica se utilizó un sistema Mini-PROTEAN III de Bio-Rad, donde se prepararon geles con poliacrilamida al 10% que consta de una gel separador en la parte inferior y uno concentrador en la parte superior y juntos cobran las dimensiones de 10 cm x 7.3 cm x 0.75 mm. El gel con las muestras de proteína colocadas en los respectivos pozos, se introdujo en la cámara de electroforesis con amortiguador de corrida. La electroforesis se llevó a cabo a 60 V por 30 minutos y a 100 V por 2 – 2.5 h. El gel se tiñó con colorante de Fairbanks (0.25 g de azul de Coomassie R-250, 125 ml de isopropanol, 50 ml de ácido acético glacial, 325 ml de agua) por 2 – 4 horas, se enjuagó con agua y se incubó con solución desteñidora (50 ml de ácido acético, 225 ml de isopropanol, 225 ml de agua) por toda la noche.

## **Inmunizaciones**

Los grupos experimentales estuvieron formados por 5 ratones hembra Balb/c de 6 – 8 semanas. Se utilizaron dos grupos como control, un grupo no recibió ninguna administración y el otro recibió 3 aplicaciones, una cada semana de 80  $\mu$ l de agua destilada estéril vía oral. Se aplicaron 3 dosis de 50  $\mu$ g, 1 cada semana, de Pet y PetS2601 respectivamente, por vía intraperitoneal en un volumen de 100-250  $\mu$ l, intranasal de 20 - 30  $\mu$ l, rectal y oral de 50 – 90  $\mu$ l. Los ratones fueron sacrificados 7 días después de la última inmunización.

## **Obtención de muestras**

Se obtuvieron muestras de suero, líquidos de mucosas vaginales, de intestino delgado, grueso y traqueopulmonares como se describe a continuación.

\* *Lavados vaginales.* Antes de sacrificar a los ratones se realizaron 5 lavados vaginales con 50  $\mu$ l de medio RPMI – 1640 adicionado con gentamicina (50 mg/ml). El fluido se colectó en tubos Eppendorf y se centrifugó a 4°C, 9500 rpm por 10 minutos. Los sobrenadantes se almacenaron a -70°C.

\* *Sueros*. Los ratones se anestesiaron con éter y se obtuvieron muestras de sangre por punción cardiaca. Estas se dejaron coagular por 2 horas y se centrifugaron y almacenaron de igual que las muestras anteriores.

\* *Líquidos intestinales*. Se disecaron sobre un congelante los intestinos delgado y grueso y se colocaron por separado en cajas de Petri. Se lavaron internamente utilizando una cánula con RMPI-G adicionado con ácido p-hidroximercuribenzoico (10 mM) como inhibidor de proteasas. Utilizando 3 ml para intestino grueso y 5 ml para el delgado. Se disgregaron las excretas de las muestras, se centrifugaron y almacenaron como las muestras anteriores.

\* *Lavados traqueopulmonares*. Se disecaron sobre un congelante los pulmones unidos a la tráquea, y se colocaron en una caja Petri. El exterior se lavó exhaustivamente con medio RMPI-G. Con una jeringa con cánula conectada a la tráquea se pasaron 1.5 ml de medio en dos ocasiones y el líquido se colectó en tubos Eppendorf. Las muestras se centrifugaron y almacenaron de igual forma que las anteriores.

### **Análisis de la Respuesta de anticuerpos**

La respuesta de anticuerpos de clase IgA, IgG e IgM anti-Pet y anti-PetS260I en las distintas muestras de las inmunizaciones intraperitoneal, intranasal e intrarectal, se analizaron por la prueba de inmunoadsorción ligada a enzimas (ELISA indirecta).

Se reabrieron placas de 96 pozos con 100 µl/pozo de una solución de 20 µg/ml de Pet y PetS260I en buffer bicar (bicarbonato de sodio 0.5 M, carbonato de sodio 0.5 M, pH 9.5), incubándose toda la noche a 4°C. Las placas se lavaron tres veces con solución amortiguadora de fosfatos adicionada con tween 20 al 0.05% (PBS-T) y se bloquearon los sitios reactivos con 120 µl PBS-T con leche descremada (Sveltis, Nestle) al 6%, incubándose 3 horas a temperatura ambiente. Posteriormente se realizaron tres lavados con PBS-T y se colocaron los primeros anticuerpos. Las diluciones de las muestras se realizaron con PBS-T con leche libre de grasa al 3%, de la siguiente forma: suero 1:100, intestino grueso, delgado y lavados traqueopulmonares 1:2. Estos junto con los lavados vaginales no diluidos, se incubaron toda la noche a 4°C. Las placas se lavaron tres veces con PBS-T. Se adicionaron 100 µl del segundo anticuerpo conjugado a peroxidasa HRP previamente titulado para su uso a las siguientes diluciones en PBS-T: 1:1000 para anti-IgA, 1:6000 para anti-IgG y 1:2000 para anti-IgM, incubándose 2 horas a temperatura ambiente. Nuevamente se realizaron tres lavados con PBS-T y la reacción enzimática se realizó con solución de sustrato para ELISA (6.25 ml de ácido cítrico 0.1 M, 6.42 ml de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.2 M, 10 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%, 10 mg de ortofenilendamina en 12.5 ml de H<sub>2</sub>O) durante 30 minutos en la oscuridad. La reacción se detuvo con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1.5 M y se midió la absorbancia a 492 nm en el lector de ELISA.

## **Análisis Estadístico**

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

## RESULTADOS

### Obtención de PetS260I y Pet.

Se obtuvo un rendimiento de 9.15 mg ( $\pm$  4.03) de PetS260I y de 10.4 mg ( $\pm$  2.4) de Pet por cada litro de cultivo purificado y concentrado de *E. coli* HB101 (pCEF2) ó (pCEF1) respectivamente. El peso molecular de ambas proteínas, 108 kDa, observado en SDS-PAGE, coincidió con lo esperado (Eslava *et al.*, 1998) (Fig. 4).

### Respuestas de anticuerpos anti-Pet y anti-PetS260I en suero.

En general, la administración de ambos antígenos por cualquiera de las vías de inmunización indujo altas respuestas de IgG anti-Pet y anti-PetS260I significativamente mayores con respecto al grupo control ( $p < 0.05$ ). La magnitud de la respuesta de anticuerpos IgG anti-PetS260I es aún mayor a la de IgG anti-Pet al inmunizar vía intraperitoneal y oral ( $p < 0.05$ ). La administración rectal de estos antígenos, no produjo ninguna respuesta. La administración intraperitoneal de PetS260I, es la más eficaz en inducir altas respuestas de anticuerpos IgG con respecto a las demás vías de inmunización ( $p < 0.05$ ). La administración intranasal y oral de PetS260I resultaron igualmente eficaces en promover altos niveles de IgG específico. No se observó respuesta de anticuerpos IgA e IgM en ninguno de los casos. (Fig.5)

### Respuestas de anticuerpos anti-Pet y anti-PetS260I en líquidos de intestino grueso.

Por vía intraperitoneal, PetS260I induce una moderada respuesta de anticuerpos IgG anti-PetS260I, que es significativamente mayor con respecto al grupo sin inmunizar, pero menor a la alta respuesta de IgG anti-Pet inducida al administrar Pet por esta misma vía ( $p < 0.05$ ). La administración intraperitoneal de Pet induce una moderada respuesta de anticuerpos de IgA que es significativamente mayor con respecto al control y al grupo inmunizado con PetS260I ( $p < 0.05$ ). Pet y PetS260I vía intranasal, rectal y oral, no inducen respuesta de anticuerpos específicos de ninguno de los isotipos analizados, por lo que no se muestra en gráficas (Fig. 6).



### **Respuestas de anticuerpos anti-Pet y anti-PetS260I en líquidos de intestino delgado.**

Pet intraperitonealmente indujo una alta respuesta de anticuerpos IgA e IgG anti-Pet, significativamente mayor con respecto al control y al grupo inmunizado con PetS260I ( $p < 0.05$ ). Aplicando cada uno de los antígenos por esta misma vía, también se inducen anticuerpos IgM anti-Pet y anti-PetS260I respectivamente, con una menor magnitud que los isotipos anteriores, pero presentando niveles superiores a los del control ( $p < 0.05$ ).

Por vía intranasal Pet induce únicamente anticuerpos IgM anti-Pet mayores respecto al control y al grupo inmunizado con PetS260I ( $p < 0.05$ ). La inmunización por vía rectal de Pet S260I induce una moderada respuesta de anticuerpos IgG e IgM anti-PetS260I similares entre sí, pero mayores a las inducidas por la administración de Pet y del grupo sin inmunizar ( $p < 0.05$ ).

PetS260I por vía oral, muestra una tendencia a inducir mayores niveles de anticuerpos IgA, IgG e IgM, que los inducidos por la administración de Pet. Sin embargo la gran dispersión de datos que se generan al inmunizar por esta vía, no permite que se establezca una diferencia significativa entre los distintos grupos (Fig. 7).

### **Respuestas de anticuerpos anti-Pet y anti-PetS260I en lavados traqueo pulmonares.**

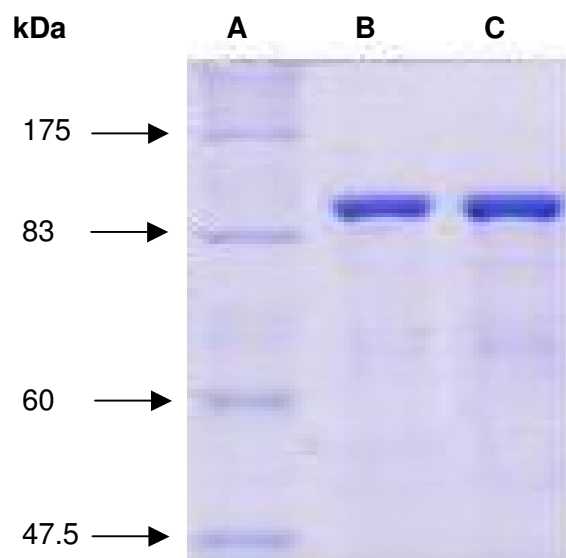
La administración de PetS260I por cualquiera de las vías de administración indujo altas respuestas de anticuerpos IgG específicas mayores a los inducidos por Pet y el grupo control ( $p < 0.05$ ), siendo la ruta intraperitoneal la más eficaz, seguida por la ruta intranasal y oral que resultaron igualmente eficaces ( $p < 0.05$ ). Sin embargo, no se observó ninguna respuesta al inmunizar con cualquiera de los dos antígenos por la vía rectal. No se obtuvo respuesta de IgA en ninguno de los casos, y de IgM anti-PetS260I únicamente al administrar este antígeno intraperitonealmente (Fig. 8).

### **Respuestas de anticuerpos anti-Pet y anti-PetS260I en lavados vaginales.**

La administración intraperitoneal e intranasal de PetS260I induce una alta respuesta de IgG anti-PetS260I significativamente mayor con respecto al grupo control y al inmunizado con Pet ( $p < 0.05$ ). Este último antígeno, por vía intraperitoneal genera una moderada respuesta de IgG anti-Pet mayor que el control, pero menor que la respuesta inducida por PetS260I ( $p < 0.05$ ).

Los niveles de IgG anti-PetS260I al inmunizar vía oral, muestran una tendencia a ser mayores que los inducidos por Pet, sin embargo, la gran dispersión de datos, no permite que se establezca una diferencia significativa entre los distintos grupos.

No se observó ninguna respuesta al administrar cualquiera de los dos antígenos por vía rectal. Tampoco se observaron niveles significativos de anticuerpos IgA ni IgM específicos (Fig 9).



**Fig.4 Electroforesis de Pet y PetS260I purificada.**  
Carril A, marcadores de peso molecular. Carril B, 2 µg de Pet. Carril C, 2.4 µg de PetS260I.

En la tabla 1 se resumen los resultados de los grupos que fueron significativamente diferentes.

Muestra	Isotipo	Vía	Resultado
Suero	IgG	Intraperitoneal	PetS260I > Pet > control
		Intranasal	PetS260I y Pet > control
		Oral	PetS260I > Pet y control
Líquidos de Intestino Grueso	IgA	Intraperitoneal	Pet > PetS260I y control
	IgG→	Intraperitoneal	Pet > PetS260I > control
Líquidos de Intestino Delgado	IgA→	Intraperitoneal	Pet > PetS260I y control
	IgG	Intraperitoneal	Pet > PetS260I y control
		Rectal	PetS260I > Pet y control
	IgM	Intraperitoneal	Pet y PetS260I > control
Intranasal		Pet > PetS260I y control	
Lavados Traqueo pulmonares	IgG	Intraperitoneal	PetS260I > Pet > control
		Intranasal	PetS260I > Pet y control
		Oral	PetS260I > Pet > control
	IgM	Intraperitoneal	Pet > PetS260I y control
Lavados vaginales	IgG	Intraperitoneal	PetS260I > Pet > control
		Intranasal	PetS260I > Pet y control

Vía de inmunización que induce mayor respuesta de anticuerpos específica dentro de la muestra analizada.

→ Isotipo que presenta mayores niveles de respuesta específica dentro de la misma muestra.

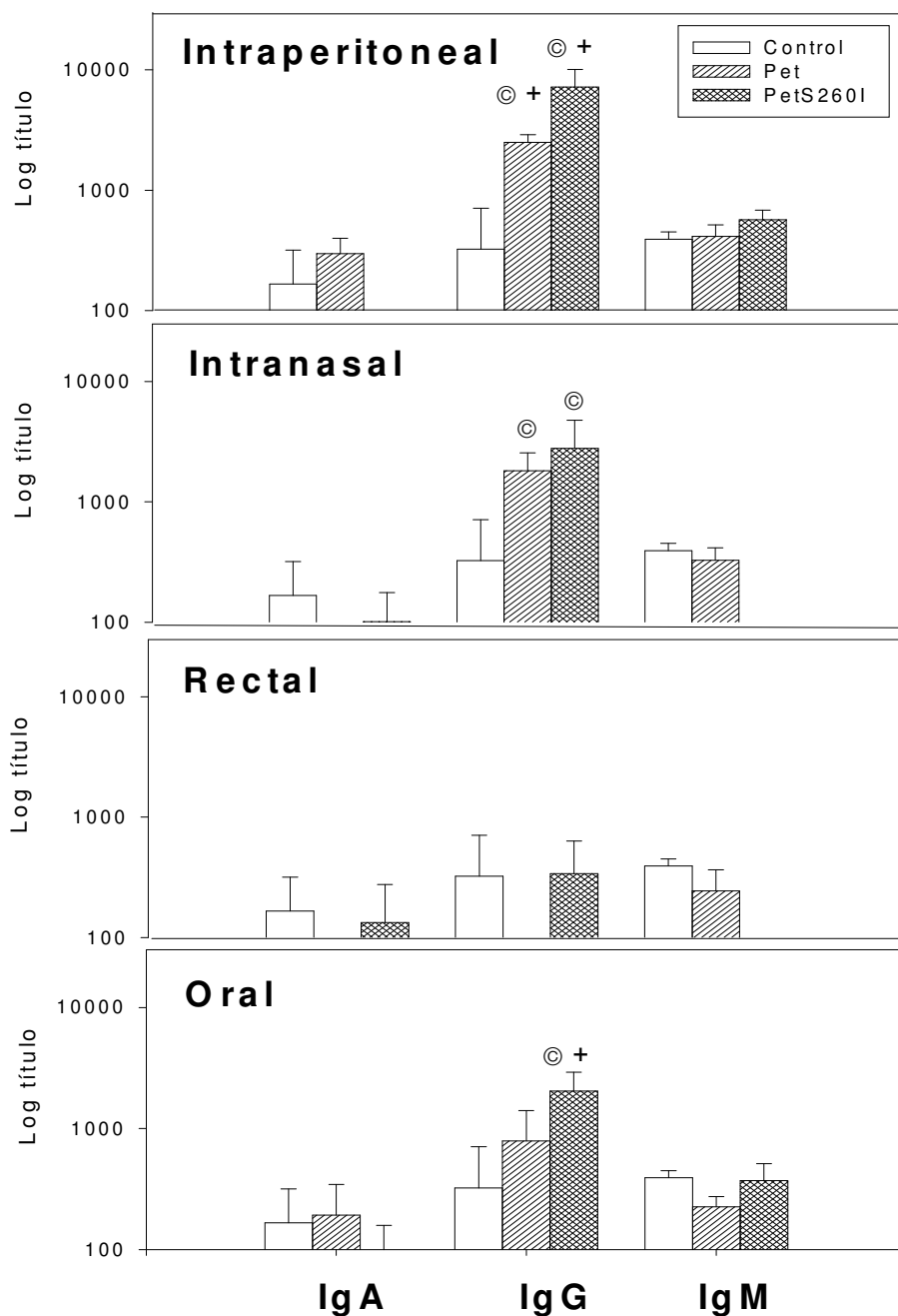


Fig. 5 **Anticuerpos séricos anti-Pet y anti-PetS260I.** Tres dosis semanales de 50  $\mu$ g de Pet o PetS260I fueron administradas a grupos de 5 hembras ratón Balb/c por distintas vías: intraperitoneal, intranasal, rectal y oral. Un grupo sin inmunizar se utilizó como control. La respuesta de anticuerpos IgA, IgG e IgM anti-Pet y anti-PetS260I se analizó por ELISA indirecto y sus valores se expresan como logaritmo del título, que se definió como los valores recíprocos de las máximas diluciones a punto final que tuvieron una  $A_{492nm}$  a 0.16 nm. Las barras indican el promedio  $\pm$  la desviación estándar. Los asteriscos  $\odot$  indican diferencia significativa respecto al grupo control. Los signos + indican una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) entre ambos antígenos.

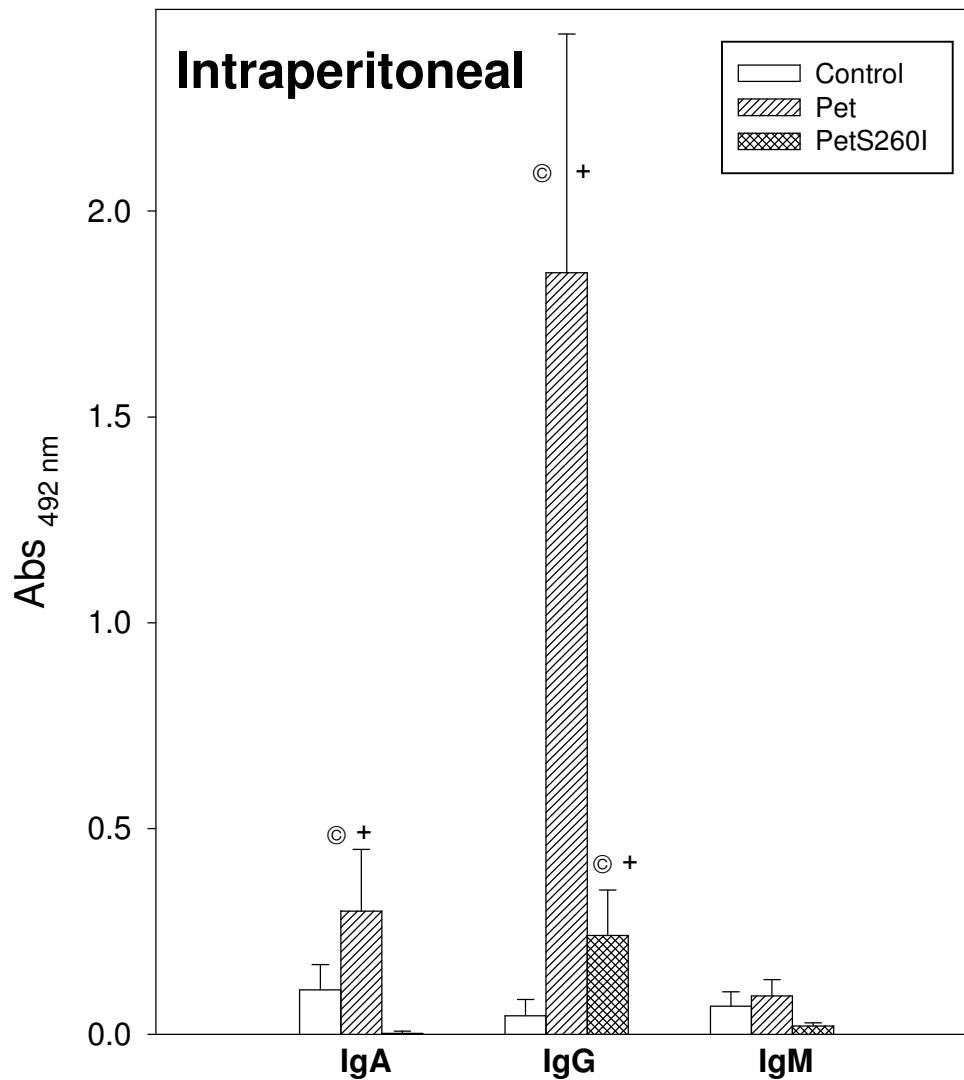


Fig. 6 **Anticuerpos anti-Pet y anti-PetS260I en líquidos de intestino grueso.** Tres dosis semanales de 50 µg de Pet o PetS260I fueron administradas a grupos de 5 hembras ratón Balb/c por distintas vías: intraperitoneal, intranasal, rectal y oral (éstas últimas no se muestran). Un grupo sin inmunizar se utilizó como control. La respuesta de anticuerpos IgA, IgG e IgM anti-Pet y anti-PetS260I se analizó por ELISA indirecto en muestras diluidas 1:1 y sus valores se expresan como lecturas de  $A_{492nm}$ . Las barras indican el promedio  $\pm$  la desviación estándar. Los asteriscos © indican diferencia significativa respecto al grupo control. Los signos + indica una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) entre ambos antígenos.

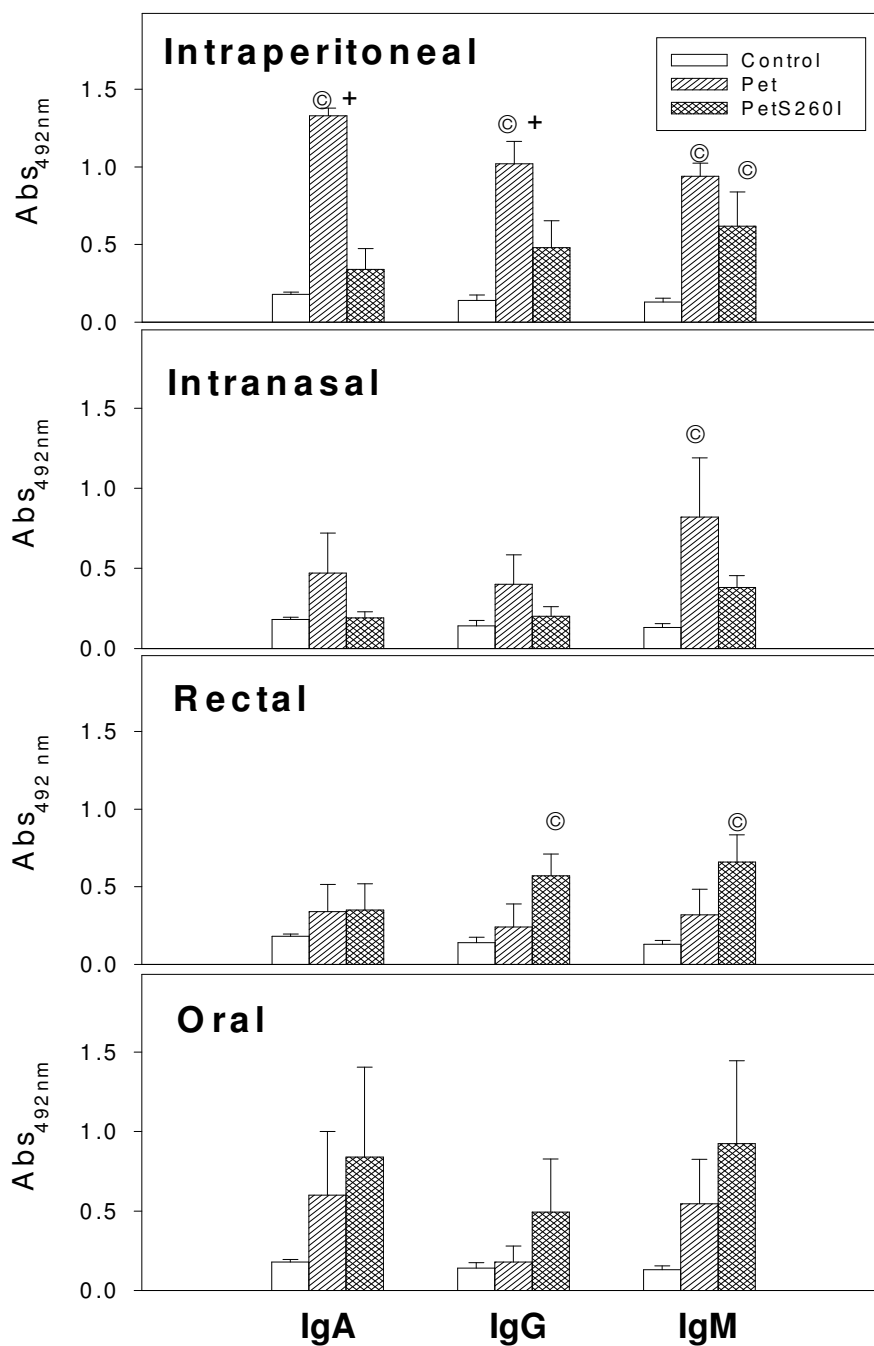


Fig. 7 **Anticuerpos anti-Pet y anti-PetS260I en líquidos de intestino delgado.** Tres dosis semanales de 50µg de Pet o PetS260I fueron administradas a grupos de 5 hembras ratón Balb/c por distintas vías: intraperitoneal, intranasal, rectal y oral. Un grupo sin inmunizar se utilizó como control. La respuesta de anticuerpos IgA, IgG e IgM anti-Pet y anti-PetS260I se analizó por ELISA indirecto en muestras diluidas 1:1 y sus valores se expresan como lecturas de  $A_{492nm}$ . Las barras indican la media  $\pm$  el error estándar. Los asteriscos © indican diferencia significativa respecto al grupo control. Los signos + indican una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) entre ambos antígenos.

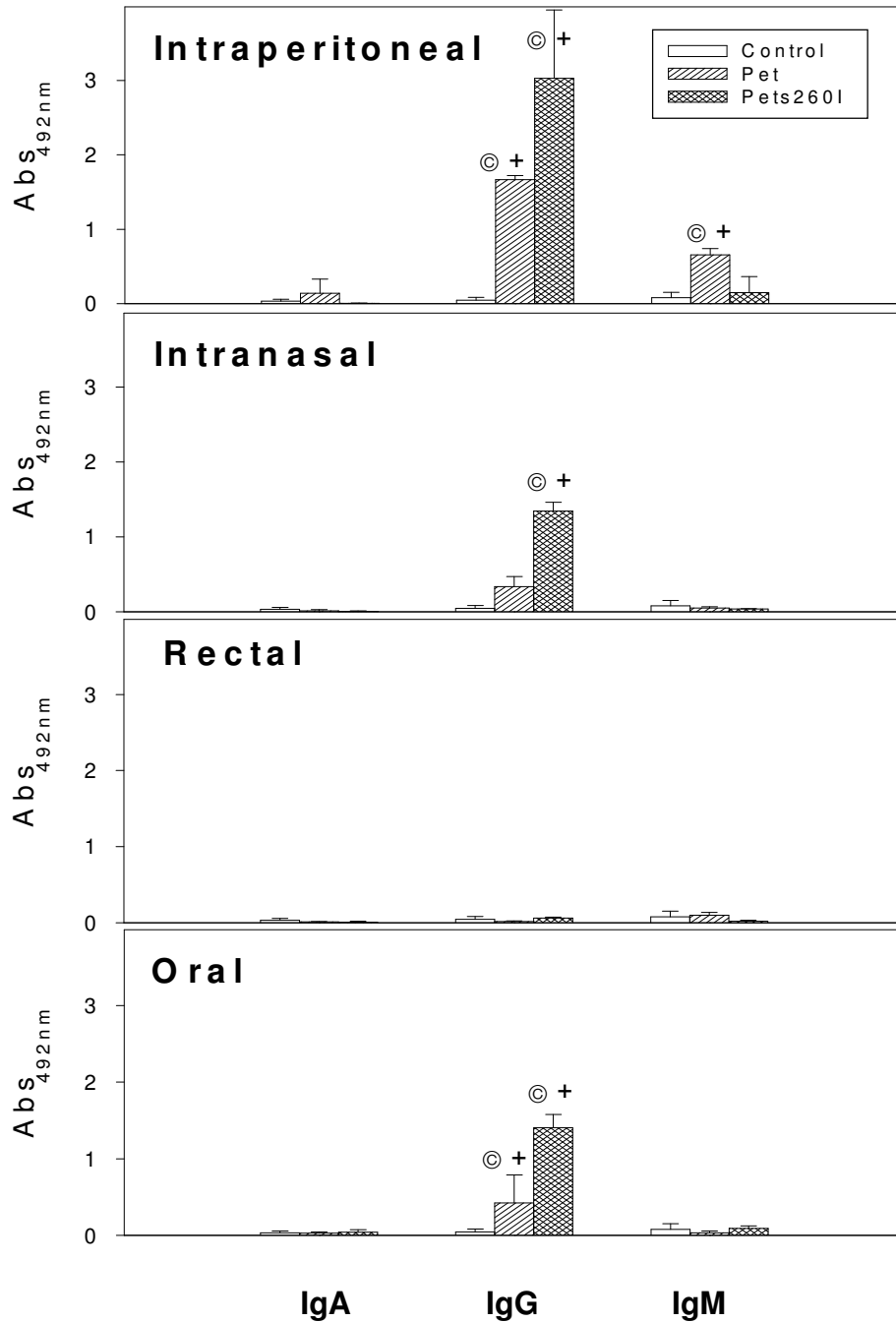


Fig. 8 **Anticuerpos anti-Pet y anti-PetS260I en lavados traqueo pulmonares.** Tres dosis semanales de 50 µg de Pet o PetS260I fueron administradas a grupos de 5 hembras ratón Balb/c por distintas vías: intraperitoneal, intranasal, rectal y oral. Un grupo sin inmunizar se utilizó como control. La respuesta de anticuerpos IgA, IgG e IgM anti-Pet y anti-PetS260I se analizó por ELISA indirecto y sus valores se expresan como lecturas de  $A_{492nm}$ . Las barras indican la media  $\pm$  la desviación estándar. Los asteriscos © indican diferencia significativa respecto al grupo control. Los signos + indican una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) entre ambos antígenos.

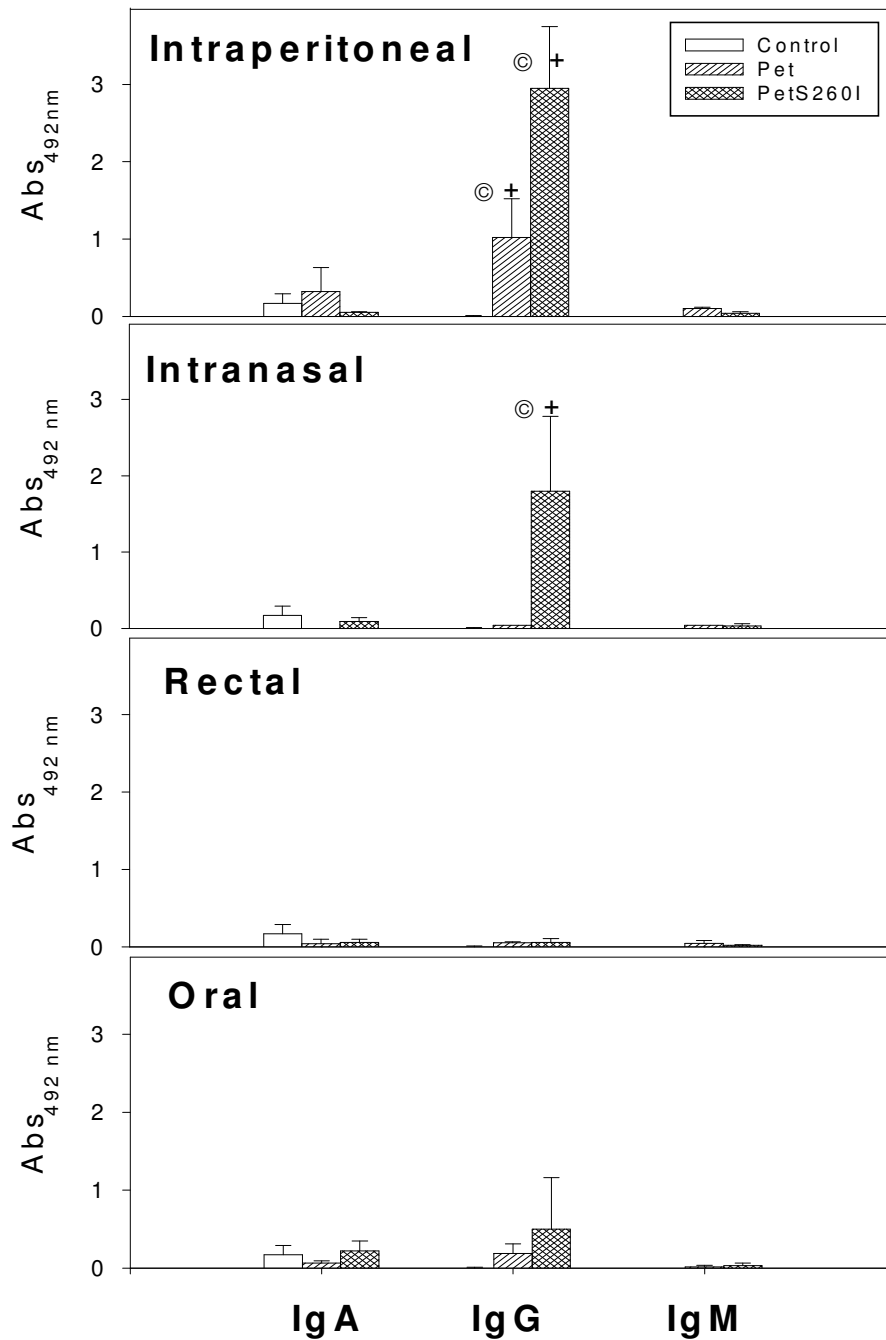


Fig. 9 **Anticuerpos anti-Pet y anti-PetS260I en lavados vaginales.** Tres dosis semanales de 50  $\mu$ g de Pet o PetS260I fueron administradas a grupos de 5 hembras ratón Balb/c por distintas vías: intraperitoneal, intranasal, rectal y oral. Un grupo sin inmunizar se utilizó como control. La respuesta de anticuerpos IgA, IgG e IgM anti-Pet y anti-PetS260I se analizó por ELISA indirecto y sus valores se expresan como lecturas de A<sub>492nm</sub>. Las barras indican el promedio  $\pm$  la desviación estándar. Los asteriscos ⊙ indican diferencia significativa respecto al grupo control. Los signos + indican una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) entre ambos antígenos.





## DISCUSIÓN

La habilidad de inducir una respuesta inmune sistémica y secretora está determinada por una serie de factores, los cuales incluyen: el tipo y forma de los antígenos administrados, la ruta y método de inmunización, la naturaleza de los distintos compartimentos mucosos y el modelo animal donde se llevará a cabo el estudio (Ogra *et al.*, 2001; Ryan, 2001).

Los resultados del presente trabajo demuestran que: (i) la administración de la toxina Pet y la proteína PetS260I (que carece del motivo serin proteasa), difiere significativamente en magnitud e isotipo de la respuesta inmune estimulada en los distintos sitios mucosos; (ii) la respuesta inmune varía dependiendo de la ruta de inmunización utilizada; (iii) la respuesta de anticuerpos IgG anti-PetS260I en suero, lavados traqueopulmonares y vaginales, resultó significativamente mayor que la respuesta de otros isotipos; (iv) la variación de respuesta inmune en los diferentes sitios mucosos analizados (tracto respiratorio, intestinal y genital) aporta evidencias sobre la regionalización de la respuesta inmune en mucosas; (v) la carencia de toxicidad de PetS260I, así como su carácter inmunogénico, permite proponerlo como un candidato para vector vacunal de epítomos.

El desarrollo de vacunas ha utilizado el recurso de las toxinas bacterianas como adyuvantes o bien como vectores de epítomos. Estas toxinas se encuentran entre las diversas estrategias desarrolladas por las bacterias para colonizar a su hospedero. Las toxinas bacterianas son proteínas compuestas por dos unidades funcionales: una tiene como función unirse a estructuras especializadas en la membrana celular, la otra unidad presenta actividad enzimática (Del Giudice y Rappudì, 1999). La expresión de los genes que codifican para algunas de estas toxinas, ha sido bien estudiada, permitiendo eliminar parcial o totalmente la actividad enzimática y tóxica. Esto permite que las proteínas genéticamente destoxificadas sean viables para el desarrollo de nuevas vacunas.

Se han realizado estudios relacionados al tema utilizando la toxina de *Bordetella pertussis*, donde al substituir el residuo 9 (Arg → Lys) y el 129 (Glu → Gly) se obtuvo una mutante desprovista de actividad enzimática y de toxicidad *in vitro*. Interesantemente se requirieron dosis muy bajas de esta mutante para inducir altos títulos de anticuerpos neutralizantes en ratones y puercos de guinea (Del Giudice y Rappudì, 1999). Así mismo se ha trabajado con mutantes genéticamente destoxificados de LT de *Escherichia coli*, tales como G192 (Arg 192 → Gly) (LT-G192). Tras inmunizar ratones vía intranasal con esta mutante se observaron títulos de anticuerpos específicos tan altos como los inducidos por la toxina nativa en muestras de suero (Ig) y de lavados pulmonares (IgA). Al inmunizar vía oral con esta misma mutante, indujo respuestas específicas ligeramente inferiores a las inducidas por la toxina nativa, tanto en suero (Ig), como en lavados intestinales (IgA) (Douce *et al.*, 1999).

El objetivo central de este trabajo consistió en caracterizar la inmunogenicidad de la toxina nativa Pet de *E. coli* enteroagregativa y comparar su efecto con el de la proteína mutante inocua PetS260I. De acuerdo con los estudios anteriormente mencionados, también encontramos que la proteína mutante puede ser en ocasiones igual o mayormente inmunogénica que la proteína nativa. Entre estos resultados cabe destacar que la proteína inocua promueve una mayor respuesta de anticuerpos IgG específicos que la toxina Pet en suero, mucosa vaginal y traqueopulmonar, al administrarse vía intranasal (i.n.) e intraperitoneal (i.p.) y en lavados traqueopulmonares (tp) tras inmunizar oralmente.

Los trabajos donde la respuesta inmune inducida varía al utilizar las proteínas nativas o mutantes (Del Giudice y Rappudi, 1999; Douce *et al.*, 1999) demuestran que, la posición y el tipo del aminoácido sustituido pueden influir significativamente en la estabilidad de la estructura de la toxina, ya que en PetS260I se cambia un aminoácido polar por uno no polar. Consecuentemente, la estabilidad de la proteína puede influir la habilidad de las moléculas candidato a actuar como inmunogénicas o adyuvantes mucosas. Estos factores tendrán un mayor impacto en antígenos presentados vía oral que aquellos por vía nasal (Douce *et al.*, 1999; Pizza *et al.*, 2001). Evidencias del cambio de comportamiento de una toxina en el hospedero al sustituirle tan solo un aminoácido, se demuestran con las pruebas de toxicidad que se han hecho con Pet. La proteína nativa induce efectos enterotóxicos y citotóxicos después de internalizarse en la célula, uniéndose a fodrina, que es su sitio blanco de acción y transportándose a través del sistema vesicular (Navarro-García *et al.*, 1999; Villaseca *et al.*, 2000). Sin embargo la ausencia de toxicidad de PetS260I, sugiere que el motivo serin-proteasa no es indispensable para el autotransporte e internalización de Pet, pero sí es esencial para causar los efectos citopáticos y enterotóxicos (Navarro-García *et al.*, 2001). Así mismo, nuestros resultados sugieren que la actividad enzimática del motivo serin proteasa no es necesaria para inducir una respuesta inmune humoral a nivel sistémico, de mucosa vaginal y traqueopulmonar.

En base a esto se podría explicar la inmunogenicidad de la proteína mutante, ya que independientemente de carecer del motivo serin proteasa, puede internalizarse en la célula al igual que la nativa, y tener también un correcto transporte a través de los compartimentos vesiculares como el aparato de Golgi. No obstante, sería de gran importancia entender si algún tipo de interacción del antígeno con los diferentes compartimentos celulares, contribuye al incremento de la respuesta inmune.

Por lo tanto, la proteína PetS260I, al ser inocua, conservar su capacidad de autosecretarse y ser de los pocos antígenos no replicativos inmunogénicos en suero, mucosa vaginal y tp, reúne las características para proponerla como un potencial vector vacunal de epítomos para enfermedades tanto sistémicas, como venéreas y de vías respiratorias.

Además de la naturaleza inmunogénica de una sustancia, la ruta por la que es administrado un antígeno tiene un importante efecto en la respuesta inmune inducida. Por lo tanto uno de los objetivos de este trabajo fue determinar cuál de las cuatro vías de inmunización es más efectiva para promover una respuesta de anticuerpos a nivel sistémico y de mucosas.

Nosotros encontramos que la vía i.p. es la más efectiva para que ambos antígenos promuevan los niveles más altos de anticuerpos específicos en suero, mucosas intestinales, tp, y además en el tracto genital femenino (tgf) donde la respuesta inmune es tan alta como la inducida por la vía intranasal (Tabla 1).

Tras inmunizar intraperitonealmente, se obtuvieron valores más altos de IgG anti-Pet y anti-PetS260I en suero, que por cualquier vía mucosa. Esto se debe posiblemente a que la administración i.p. de antígenos, al ser una ruta parenteral de inmunización, asegura que cantidades exactas y adecuadas de la vacuna, puedan alcanzar la circulación sistémica, resultando una efectiva respuesta inmune en suero contra los patógenos invasores (Nugent *et al.*, 1998). De igual manera, se encontró que al inmunizar por esta vía, se indujeron importantes respuestas de anticuerpos IgG para ambos antígenos en lavados traqueopulmonares y vaginales. Estos datos coinciden con los obtenidos en otros trabajos, donde al inmunizar vía i.p. una mayor dosis de la protoxina Cry 1Ac, se obtienen respuestas de IgG menores que las promovidas por Pet y PetS260I (Mreno-Fierros *et al.*, 2000).

Así mismo se encontró que la administración i.p., fue la única vía eficaz por la que ambos antígenos indujeron niveles significativos de IgA anti-Pet en intestino delgado, y anti-PetS260I en intestino grueso. El hecho de que la administración de un antígeno por vía sistémica otorgara mayor inmunidad en intestinos (y en general en todas las mucosas) que la vía de inmunización local (oral o rectal) o nasal, es un resultado inesperado, ya que la mayoría de las rutas parenterales fallan cuando se requiere una respuesta inmune protectora en las superficies mucosas por donde entran gran parte de agentes patógenos al organismo (Nugent *et al.*, 1998). Sin embargo, existen estudios más recientes donde se ha encontrado que la administración i.p. de trofozoitos de *Entamoeba histolytica* fijados con glutaraldehído o de proteínas amebianas, puede inducir una intensa respuesta de anticuerpos tanto a nivel sistémico, como de mucosas aún mayor que al administrarlos vía oral o rectal (Mreno-Fierros *et al.*, 1999; Mreno-Fierros *et al.*, 2002(a)). Debido a que el peritoneo tiene la facultad de inducir respuesta inmune en intestinos y otras mucosas, es considerado como un sitio inductor. El mecanismo por el cual esto es posible, se debe a la población de células B-1, que constituyen la mayor fracción de células B en la cavidad peritoneal y pleural. Estas células producen gran cantidad de inmunoglobulinas del suero y debido a su temprana aparición ontogénica, se cree que juegan un papel crucial en la primera línea de defensa contra organismos patógenos. También están implicadas en la generación de células plasmáticas de IgA de la lámina propia intestinal, contribuyendo significativamente a la respuesta inmune de esta mucosa. Sin embargo, las células B-1 se caracterizan por su predominante localización fuera de tejidos linfoides, incluyendo el epitelio mucoso. Por lo tanto la proliferación de este linaje celular debe tener lugar fuera de la cavidad peritoneal, antes de diferenciarse en células secretoras de IgA, para dar lugar al gran número de células plasmáticas de IgA requeridas diariamente. Posiblemente las células B-1 dejen la cavidad peritoneal a través del nódulo linfático o de la cavidad pleural, hacia la circulación. No obstante a la amplia documentación que se tiene sobre las células B-1, sigue sin conocerse el sitio y la forma por la cual estas células reciben el primer estímulo antigénico, donde se da el switch de la expresión de IgM a IgA y el sitio donde éstas células se expanden (Blewenga *et al.*, 1993; Kroese *et al.*, 1999).

Aunque la administración i.p. de antígenos confiere una protección eficiente tanto a nivel sistémico como de mucosas, puede presentar algunas de las desventajas de otras vías parenterales. Las rutas parenterales de inmunización son administradas por inyección, lo cual representa una desventaja con respecto a las rutas mucosas, ya que se eleva su costo y además se requiere de personal capacitado para poder aplicarla. Aunado a esto, se complica la ejecución de los calendarios de vacunación infantil, ya que a excepción de la inmunización contra poliomielitis, que es aplicada vía oral, un niño requiere alrededor de 20 a 25 vacunas inyectadas durante sus primeros 18 meses de vida (Ogra *et al.*, 2001; Ryan *et al.*, 2001). Estos inconvenientes indican que es necesario explorar alternativas de inmunización a las vacunas parenterales, por lo que se ha probado la ruta oral, i.n., ocular, rectal-colónica e intravaginal para la administración de antígenos (Nugent *et al.*, 1998).

Numerosos estudios han comprobado que las vacunas administradas por vías mucosas, pueden estimular cualquier tipo de respuesta inmune, como IgA secretora, anticuerpos IgG séricos neutralizantes (contra toxinas y virus) y respuesta celular como proliferación de linfocitos, producción de citocinas y actividad citotóxica de CD8+ (Levine, 2003).

Se ha registrado que la administración de antígenos vía oral o nasal, tiene el potencial de estimular inmunidad tanto sistémica como mucosa, utilizando el sistema común de mucosas, el cual confiere protección inducida en un sitio mucoso, para ser expresado en otros sitios similares (Isaka *et al.*, 1998). En el presente trabajo encontramos que tanto la ruta i.n., como la oral confieren el mismo nivel de respuesta en suero, incluyendo igual magnitud del índice de anticuerpos IgG anti-Pet y anti-PetS260I ( $p < 0.05$ ). La carencia de IgA sérica específica tras inmunizar vía oral o nasal, coincide con otros estudios donde al inmunizar por estas mismas rutas con toxina de cólera (CT), únicamente se detectaron anticuerpos IgG1 e IgG2a anti-CT en suero (Heritage *et al.*, 1997). Esto sustenta que incluso, uno de los antígenos más inmunogénicos, como es CT, induce únicamente una respuesta específica de tipo IgG en suero.

Por otra parte, observamos que la administración i.n. y oral de cada uno de los antígenos, no fue capaz de inducir respuesta de tipo IgA ni IgG específica en intestinos, únicamente se detectó una moderada respuesta de anticuerpos IgM anti-Pet en intestino delgado tras la administración i.n. La ausencia de IgA posterior a la aplicación i.n. de antígenos, concuerda con los resultados obtenidos por Heritage y colaboradores (1997), donde tras inmunizar por esta misma vía con CT se logró estimular respuesta de IgA anti-CT en mucosa nasal, pero no en mucosa intestinal. Así mismo se ha demostrado que posterior a la inmunización i.n., es posible detectar la presencia de células formadoras de anticuerpos (CFA) IgA, IgG e IgM anti-CT en el tejido linfático asociado a la mucosa nasal (NALT), glándulas salivales y en sitios efectoras como lámina propia (LP), pero muy pocas o ninguna en sitios inductores como en placas de Peyer (PP). Además, a diferencia de las PP, en algunos estudios se ha encontrado que el NALT no contiene células B para switch de IgA (IgM-IgA+) y consecuentemente no es tan activo como éstas para inducir IgA (Wu *et al.*, 1997; Heritage *et al.*, 1997), siendo una posible

explicación a no haber encontrado respuesta de anticuerpos IgA en mucosas intestinales. Sin embargo, se ha encontrado en gran cantidad de trabajos (Isaka *et al.*, 1998; Isaka *et al.*, 2000, Moreno-Fierros *et al.*, 2003) respuesta de IgA específica en intestinos al inmunizar intranasalmente. Esto confirma que la calidad y magnitud de respuesta inmune va a depender del tipo y cantidad de antígeno entre otros factores implicados.

Numerosos estudios han demostrado que la ruta intranasal es más efectiva que otras vías mucosas al obtener respuesta inmune local en tracto respiratorio y pulmones (Nugent *et al.*, 1998). Nosotros encontramos que la inmunización de PetS260I i.n. y oral, además de conferir protección a nivel sistémico, es capaz de inducir una importante respuesta de IgG anti-PetS260I en mucosas locales como es el contenido tp, ligeramente menor a la conseguida por la administración i.p. ( $p < 0.05$ ). La IgG en lavados tp puede ser producida localmente, sin embargo, no debe ser descartado que éstos anticuerpos provengan del suero al atravesar la barrera epitelial por trasudación.

A diferencia de otras vías mucosas, la administración intranasal de antígenos, fue la única con la facultad de promover respuesta inmune en mucosas distales como el tracto genital femenino. En este sitio se registró una importante respuesta de anticuerpos IgG anti-PetS260I tan alta como la inducida por la vía intraperitoneal ( $p < 0.05$ ). Estos resultados coinciden con otros estudios donde se ha reportado que al aplicar toxina de cólera (CT) intranasalmente con antígenos virales y bacterianos se induce una abundante respuesta inmune en secreciones externas como la saliva y sorprendentemente en las secreciones del tracto genital femenino de roedores, chimpancés y humanos (Underdown y Plotkin, 1999), por lo que esta ruta de inmunización se ha considerado como el método más efectivo para que ciertos antígenos promuevan inmunidad en el tracto genital (Balmelli *et al.*, 2002). Tomando en cuenta que las secreciones del tracto respiratorio inferior y las del tracto reproductivo femenino contienen cantidades similares de IgG e IgA, no es extraño haber encontrado anticuerpos específicos únicamente de tipo IgG en estos sitios. Sin embargo, también se ha reportado la presencia de anticuerpos IgA en lavados vaginales, después de administrar determinados antígenos intranasalmente (Moreno-Fierros *et al.*, 2002(b); Yao *et al.*, 2002; Moreno-Fierros *et al.*, 2000; Di Tommaso *et al.*, 1996). Ambos isotipos de anticuerpos se encuentran normalmente en esta mucosa y tienen un papel fundamental en su protección.

La presencia de S-IgA en líquidos vaginales, se debe principalmente al transporte activo del SC a través del epitelio uterino, mientras que se cree que la IgG en secreciones cervicovaginales se debe generalmente a la trasudación por el epitelio vaginal (Gallichan y Rosenthal, 1996). La ausencia de respuesta inmune del isotipo IgA en lavados vaginales después de inmunizar con Pet o PetS26I tanto por vía intraperitoneal como intranasal, puede atribuirse a la falta generalizada de nódulos linfoides secundarios en el tracto genital (Parr y Parr, 1994). Otra posible explicación de la carencia de IgA, se basa en la influencia que ejerce el ciclo estral de ratones hembra sobre la migración de linfocitos en el tracto genital y consecuentemente en la inmunidad humoral local.

Al administrar ciertos antígenos i.n. o intraperitonealmente, se ha registrado que los niveles más altos de IgA específica se presentan durante el estro, a diferencia de IgG, cuyo máximo nivel es alcanzado durante el diestro o proestro.

Por lo tanto, la variación inversa de ambos isotipos, implica que al momento de estar IgG en su mayor magnitud, IgA se encuentra en un nivel no detectable (Gallichan y Rosenthal, 1996; Moreno *et al.*, 2002(b)). Así mismo, Gallichan y colaboradores (1996), examinaron la presencia de CFA en nódulos linfáticos iliacos (NLI) y en tracto genital, después de inmunizar intranasalmente con la glicoproteína B del virus herpes simple-2. Encontraron que en NLI el 65% de CFA es de IgA y el 35% de IgG, en contraste con los resultados obtenidos en tracto genital, donde el 8% es de CFA IgA, e interesantemente el 92% es del CFA IgG. Debido a que los anticuerpos IgG del tracto genital femenino provienen posiblemente de trasudación sérica, estos alcanzan su mayor nivel durante el diestro, que es cuando el epitelio vaginal se encuentra más delgado, facilitando la filtración de anticuerpos al tracto reproductor. Por su lado, IgA secretora se encuentra en los niveles más altos durante el estro, que es la época de apareamiento, con el fin de proteger las superficies mucosas y combatir la carga de patógenos comúnmente incrementada durante esta época. El hecho de que los cambios cíclicos en el componente secretor y el nivel total de anticuerpos también se haya observado en humanos (Gallichan y Rosenthal, 1996), aunado a que la permeabilidad y el grosor del epitelio vaginal influyen en la captación de antígenos y penetración de patógenos (Moreno-Fierros *et al.*, 2002(b)), son aspectos que deben ser considerados para determinar el momento de inmunización durante los calendarios de vacunación.

La inducción de inmunidad en la mucosa vaginal, es necesaria para prevenir infecciones bacterianas y virales transmitidas sexualmente como el SIDA. Es destacable la magnitud de la respuesta de anticuerpos obtenidos en la superficie vaginal tras administrar PetS2601 intranasalmente, tomando en cuenta que generalmente, la inducción de una respuesta significativa de anticuerpos en el tracto reproductor femenino, no puede ser promovida por proteínas solubles. Además, se ha demostrado que la ruta intranasal es más eficiente que la vaginal para inducir respuesta de IgA de larga duración en secreciones vaginales (Di Tommaso *et al.*, 1996).

La ruta o el mecanismo que siguen los antígenos al ser aplicados vía nasal para inducir inmunidad sistémica y en mucosas locales y distales inicia cuando pequeños antígenos solubles penetran el epitelio nasal para interactuar con linfocitos intraepiteliales y submucosas, células dendríticas y macrófagos, mientras que los antígenos particulados son captados por células M para llegar al NALT. El flujo linfocitario de la mucosa nasal se da principalmente a los nódulos linfáticos cervicales superficiales, a diferencia del NALT, donde se da principalmente hacia los nódulos linfáticos cervicales posteriores, que es el sitio de generación de CFA IgA (Sminia y Kradl, 1999; Tamura *et al.*, 1998).

Se ha reportado que al anestésicar a los ratones al momento de la inmunización, como lo hicimos en este trabajo, se facilita que el antígeno sea inhalado y tenga contacto con otras superficies mucosas como tráquea y pulmones, donde células dendríticas captarán el antígeno y migrarán hacia nódulos linfáticos. Estas superficies mucosas, así como los nódulos linfáticos traqueobronquiales (NLTB), son considerados los principales responsables de promover respuesta inmune en tracto genital, ya que las células secretoras de anticuerpos reducidas en los NLTB pueden adquirir señales para

transitar hacia el tracto genital, sugiriendo que los NLTB actúan como sitios inductores sistémicos y mucosos (Balmelli *et al.*, 2002).

Está ampliamente documentado que la administración nasal de antígenos es eficaz en la inducción de respuesta inmune sistémica y mucosa. Esto se debe a las ventajas que ofrece esta vía de inmunización sobre otras vías mucosas, tales como: la baja exposición de antígenos a condiciones adversas (pH bajo, enzimas proteolíticas, etc); la amplia superficie de esta mucosa que se encuentra abundantemente provista de vasos sanguíneos; que actúa con dosis bajas de antígeno; que induce memoria de larga duración y es de fácil aplicación (Isaka *et al.*, 2000; Isaka *et al.*, 1998; Di Tommaso *et al.*, 1996). Por lo tanto la inmunización i.n. de PetS260I representa una relevante alternativa para inducir respuesta inmune a nivel sistémico, de mucosas locales como el tracto respiratorio y mucosas distales como tgf.

Cabe mencionar que la administración i.n. de antígenos, debe manejarse con precaución y observar cuidadosamente los efectos adversos que esto pueda provocar, ya que se ha reportado que mutantes de LT y CT son captados por fibras del nervio olfatorio y transportados a los lóbulos olfatorios del cerebro (Levine, 2003; Kuper *et al.*, 2003; van Ginkel *et al.*, 2000).

La eficacia de la administración oral de la vacuna contra la poliomielitis, es una evidencia de los beneficios que ofrece la inmunización por esta vía. Nosotros encontramos que la ruta oral permite obtener altos niveles de anticuerpos IgG anti-PetS260I mayores que anti-Pet tanto en suero como en lavados tp ( $p < 0.05$ ). Aunque estos valores son menores a los obtenidos al inmunizar i.p., la ruta oral resultó ser tan efectiva como la i.n. ( $p < 0.05$ ). Esto coincide con numerosos trabajos donde se ha conseguido inducir una respuesta sistémica del isotipo IgG y niveles muy bajos o indetectables de IgA al aplicar por esta vía distintos antígenos, tales como proteínas recombinantes de malaria (Wang *et al.*, 2003), partículas tipo virus de papilomavirus humano (Rose *et al.*, 1999) o de hepatitis E (Li *et al.*, 2001). En algunos casos, los altos índices de anticuerpos IgG específicos fueron capaces de proteger contra dosis letales de patógenos (Wang *et al.*, 2003) o bien presentaron un carácter neutralizante de virus (Rose *et al.*, 1999). Se ha reportado que la inmunización oral con antígenos heterólogos y CT como adyuvante puede afectar diferencialmente la respuesta inmune sistémica y mucosa, incluyendo respuestas tipo Th2 en tejidos mucosos, y Th1 en el compartimiento sistémico (McGhee *et al.*, 1999). La IgG sérica inducida vía oral, es transferida de la sangre a los pulmones y aunque los anticuerpos sistémicos no protegen contra la colonización de patógenos al tracto respiratorio superior, dichos anticuerpos son suficientes para proteger los pulmones (Rudin *et al.*, 1999).

Los antígenos, después de ser administrados oralmente, tiene acceso al GALT al ser captados por el epitelio intestinal o por células M y transportarlos a sitios inductores como las placas de Peyer. Esto conduce a la estimulación tanto de células T cooperadoras como a células B precursoras de IgA en PP y a la diseminación de células B y T a sitios mucosos efectores como la LP, las bronquias, el tracto genitourinario y distintas glándulas secretoras para subsecuentes respuestas S-IgA específicas (Nugent *et al.*, 1998; Rose *et al.*, 1999).



A pesar de que la administración oral de PetS260I resultó eficiente al inducir respuesta inmune a nivel sistémico y de mucosa tp, fue incapaz de promover una respuesta intestinal y en tracto genital femenino. La ausencia de respuesta inmune en mucosa intestinal se ha mencionado con anterioridad en algunos trabajos (Moreno-Fierros *et al.*, 1999; Ruiz, 2001; Moreno-Fierros *et al.*, 2002(a)). Esto se debe posiblemente a la degradación intestinal de las proteínas Pet y PetS260I por su exposición a condiciones adversas tales como pH bajas, además de la falta de coadministración de buffer con cada uno de los antígenos, siendo absorbidos en cantidades insuficientes por el tejido mucoso. Así mismo se ha observado que algunas vacunas orales son menos inmunogénicas en individuos de países en vías de desarrollo que en los industrializados debido al sobrecrecimiento bacteriano (Mwat y Weiner, 1999) y helmintos intestinales además de la competitividad entérica viral (Levine, 2003). Otra posible explicación a la falta de respuesta intestinal podría ser por tolerancia inducida tras la administración oral de estos antígenos. Esto se debe a que la naturaleza del tracto gastrointestinal por su continua exposición a antígenos, requiere desarrollar sistemas únicos para poder discriminar entre sustancias u organismos potencialmente dañinos de los inocuos para el organismo (Panja y Mayer, 1999; Smith *et al.*, 2000). Los mecanismos causantes de la tolerancia a ciertos antígenos pueden ser: la deleción clonal de células T antígenoespecíficas, por anergia o por alguna forma de regulación activa dependiente de la frecuencia y dosis (Smith *et al.*, 2000). La dosis exacta para inducir tolerancia, depende de la proteína estudiada, a la cual los distintos miembros del sistema inmune son diferencialmente susceptibles (Mwat y Weiner, 1999).

La administración oral de PetS260I, además de conferir protección sistémica y en mucosas del tracto respiratorio inferior, al utilizarse como un potencial acarreador de epítomos de interés vacunal, ofrecería la ventaja de ser la vía de administración más segura, es fácil de administrar y puede ser menos pura que las vacunas formuladas para inyectarlas, reduciendo los costos de producción.

La mucosa rectal está densamente poblada de folículos linfoides cubiertos de epitelio en forma de domo, cuya ultraestructura es similar a la de las células M en el GALT. Estas células encontradas en la mucosa rectal juegan un papel importante en la captación de antígenos (Nugent *et al.*, 1998). Diversos estudios han sugerido la importancia de estos tejidos como una fuente de precursores de células plasmáticas de IgA y como sitios inductores de S-IgA en el área rectal y en mucosas distales del tracto respiratorio, genital y gastrointestinal vía el Sistema Común Inmune de Mucosas (McGhee *et al.*, 1999). Por tal motivo, se ha explorado la vía de inmunización rectal, tomando en cuenta que evita las barreras proteolíticas y de acidez que presenta el tracto gastrointestinal superior.

En algunos estudios se ha demostrado que la administración rectal de diversos antígenos induce respuesta de anticuerpos IgA o IgG en las superficies mucosas rectales, vaginales y/o fecales, (Nugent *et al.*, 1998; McGhee *et al.*, 1999; Moreno-Fierros *et al.*, 2000; Kato *et al.*, 2000) así como a nivel sistémico, indicando que en algunos sitios, la respuesta inmune es mayor que la obtenida al utilizar la ruta intragástrica o intravaginal (Moldoveanu *et al.*, 1995; Kato *et al.*, 2000).

Al inmunizar rectalmente, encontramos respuesta de anticuerpos IgG e IgM anti-PetS260I únicamente en intestino delgado, no así en intestino grueso, suero y en las demás mucosas analizadas. Esta diferencia de respuesta entre intestino grueso y delgado al inmunizar por vía rectal e i.p., está relacionada con las distintas funciones que realizan, como es la absorción de nutrientes y el contenido bacteriano en el lumen. Esto es una evidencia de las diferencias regionales en los sitios efectores intestinales.

La dificultad para inducir inmunidad a nivel sistémico, en mucosa tp y vaginal, al inmunizar con ambos antígenos vía rectal, se debe posiblemente a la rapidez de eliminación de las heces por el organismo. Otra posible causa, y que es más factible, es la inducción de tolerancia al administrar proteínas rectalmente, ya que la inhibición de la actividad de enzimas pancreáticas, no tienen efecto alguno en la inducción de tolerancia al utilizar la vía oral. Esto indica que las proteínas no necesitan sufrir proteólisis para inducir tolerancia (Mowat y Weiner, 1999). Kato y colaboradores (2000), observaron que numerosas inmunizaciones no incrementaban el título de anticuerpos, por lo que sugieren que posiblemente la tolerancia mucosa había sido inducida al utilizar determinadas dosis de antígeno.

En estudios más recientes se ha encontrado que la administración rectal de dosis bajas de antígenos promueve una mayor respuesta de anticuerpos específicos que al utilizar dosis altas o por vía intraperitoneal (Mitchell y Galum, 2003). En base a esto, podemos sugerir el uso de distintas dosis de Pet y PetS260I vía rectal, para promover respuestas tan altas como las conseguidas por otras vías mucosas.

Las variaciones de respuesta en los sitios analizados, obtenidas al inmunizar con la proteína inocua por las distintas vías, deben tomarse en consideración para estudios encaminados al diseño de vacunas. Al utilizar PetS260I como un vector de epítomos de interés vacunal, se deberá elegir la ruta de administración más apropiada que confiera la mayor protección en el sitio mucoso donde se lleva a cabo la infección del patógeno de interés.

Los resultados obtenidos en este estudio nos permiten confirmar que la magnitud e isotipo de la respuesta específica de anticuerpos en los distintos sitios mucosos, depende de la ruta de inmunización, además de aportar evidencias de la compartimentalización del sistema inmune de mucosas. Los diversos compartimentos localizados en los tractos gastrointestinal, pulmonares y genitourinarios así como en glándulas exocrinas, están conectados en el sistema inmune de mucosas. Esta interconexión es posible debido a la comunicación entre tejidos y especialmente al tráfico linfocitario a través de la diferencia en la expresión de moléculas de adhesión en el endotelio microvascular local y en células linfoides estimuladas en diferentes estructuras del MALT y posiblemente por la diferencia local de quimioquinas (McGhee *et al.*, 1999; Moreno-Fierros *et al.*, 2002(a)).

Se ha demostrado que las distintas vías de inmunización utilizadas, tienen una determinante influencia sobre las CFA para la expresión de distintas combinaciones de moléculas de adhesión. Principalmente  $\alpha 4\beta 7$ , que es la integrina implicada en el asentamiento de células T de memoria en los tejidos linfoides mucosos y L-selectina, que es el receptor de asentamiento más importante en las células T vírgenes en órganos linfoides periféricos (Quiding *et al.*, 1997; Ogra *et al.*, 2001). Quiding y colaboradores encontraron que al administrar por vía sistémica determinados antígenos, la mayoría de CFA en sangre fueron inducidas para la expresión de L-selectina, y una minoría de estas células expresaron  $\alpha 4\beta 7$ . Por el contrario, la expresión de estas moléculas fue inversamente inducida en CFA tras inmunizar oralmente, mientras que casi todas las CFA inducidas vía nasal coexpresaron  $\alpha 4\beta 7$  y L-selectina. Esta expresión diferencial de moléculas de adhesión de CFA circulantes, sugiere la base molecular que evidencia la compartimentalización de la respuesta inmune en mucosas.

La clase de anticuerpo prominente en superficies mucosas, está representada por IgA y es el isotipo de segunda abundancia en suero humano. La S-IgA contribuye a la homeostasis normal, sirviendo como primera línea de defensa en los sitios mucosos al inhibir la adhesión de microorganismos patógenos así como la absorción de antígenos homólogos. Esta inmunoglobulina es un eficaz neutralizante intracelular y extracelular de antígenos biológicamente activos tales como virus, bacterias, toxinas y enzimas. Además incrementa la actividad antibacteriana innata en secreciones externas de otros sistemas efectores inmunes, como es la lactoferrina, peroxidasa y lisozima. La IgA no es susceptible a proteólisis debido a la presencia del componente secretor. Es considerada un anticuerpo no inflamatorio ya que es incapaz de activar la vía clásica y alternativa del complemento. Así mismo la IgA sérica humana puede iniciar el proceso de fagocitosis. Por su parte la S-IgA juega un papel importante en las infecciones parasitarias al reabrir partículas demasiado grandes para ser fagocitadas (Brandtzaeg *et al.*, 1997; Nugent *et al.*, 1998; Van Eegmond *et al.*, 2001).

A pesar de la importancia de IgA en la protección de mucosas, el papel que desempeña IgG e IgM en la inmunidad de estos sitios no debe ser excluido, considerando que la deficiencia selectiva de IgA representa una enfermedad bastante común en humanos, ya que uno de cada 500 individuos de poblaciones occidentales la padecen (O'Neil *et al.*, 2000).

La IgM al ser polimérica, se une al pIgR, lo cual le proporciona un transporte selectivo a través de las secreciones mucosas. Esta inmunoglobulina es un potente activador del sistema de complemento (Lamm, 1997), además de tener un efecto protector, al promover la fagocitosis por los macrófagos peritoneales (Taborda y Casadevall, 2001).

La presencia de IgG en concentraciones relativamente altas en algunos sitios mucosos, particularmente en el tracto respiratorio y reproductivo femenino, reflejan el transporte paracelular-transcelular de esta inmunoglobulina desde el compartimiento sistémico. Adicionalmente, el proceso inflamatorio al ser desencadenado durante la primera etapa de una infección, puede promover la trasudación de IgG sistémica a secreciones mucosas (Underdown y Plotkin 1999). Así mismo, la IgG mucosa puede originarse de células plasmáticas locales (Bouvet *et al.*, 1994).

Se han realizado numerosos estudios que demuestran la importancia de la IgG en la protección de mucosas. Mbscala y colaboradores (2000) encontraron que la transferencia pasiva por vía sistémica, de una mezcla de anticuerpos IgG anti- VIH en macacos, fue capaz de conferir protección contra la exposición vaginal de un virus patógeno de inmunodeficiencia humana y en simios (VHS). En forma similar, se demostró que la inmunización pasiva con anticuerpos monodondres IgG1 humanos, en primates neonatos, antes y después de la infección, es capaz de proteger contra la administración parenteral y oral de un virus quimérico de VHS sugiriendo una estrategia potencialmente efectiva para inhibir la transmisión vertical del VIH de madres a hijos (Baba *et al.*, 2000). Por su parte, O'Neil y colaboradores (2000) reportaron la presencia de mayores niveles de IgG e IgM en suero y secreciones gastrointestinales de ratones IgA-knockout (organismos genéticamente modificados con una delección en la región del switch de IgA), comparados con ratones normales. Los altos niveles de IgG antirrotavirus en suero, se mantuvieron estables por 10 meses y fueron capaces de proteger totalmente contra el reto con este virus. Estos estudios sugieren que el relevante papel que desempeña la IgG en la protección de mucosas comprende respuestas inmunes de larga duración y la actividad neutralizante de virus que es capaz de realizar (O'Neil *et al.*, 2000).

En base a esto, la respuesta inmune de IgG antiespecífica inducida por PetS260I en suero, tracto respiratorio, y principalmente en tracto genital femenino, puede ser de un elemento importante para el diseño de vacunas contra enfermedades de transmisión sexual tales como el SIDA, papilomavirus humano entre otras.

Está ampliamente documentado que la administración de distintas dosis de un mismo antígeno, inducen una variación en el isotipo de respuesta de anticuerpos (Li *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2003). Debido a que en este estudio utilizamos una misma dosis de antígeno, sugerimos que en estudios posteriores se prueben distintas dosis de Pet y PetS260I, con el fin de determinar si alguna de ellas es capaz de inducir respuesta de IgA específica.

La estrategia para conferir inmunidad contra cualquier virus que atraviese el epitelio mucoso comprende: células B secretoras de anticuerpos antiespecíficos, células T CD4+ productoras de citocinas y células CD8 citotóxicas (Lehener *et al.*, 1999). Estas últimas son estimuladas por antígenos endógenos tales como virus y bacterias, presentados en asociación con moléculas MHC clase I (Ryan *et al.*, 2001). Se ha reportado que en infecciones por VIH-1, las células T citotóxicas CD8+ VIH-1 específicas, están implicadas en la prevención tanto de la proliferación del virus, como en el progreso de la enfermedad. Estos efectos antivirales de CD8 VIH-1 específicas, son conseguidos por la lisis de la célula blanco (Lehener *et al.*, 1999; Takahashi *et al.*, 2001). En referencia a estos estudios, sugerimos que PetS260I, al internalizarse en las células epiteliales, podría inducir la producción de células T CD8.

Esto, aunado a la facultad de PetS260I de producir altos niveles de IgG específicos con un probable papel de neutralizante viral (O'Neil *et al.*, 2000), le confiere a esta proteína inocua una posibilidad más para ser considerada potencialmente en el desarrollo de vacunas contra virus y bacterias intracelulares.

La proteína PetS260I de *E. coli* enteroagregativa, representa una interesante alternativa en la búsqueda de vacunas contra enfermedades infecciosas, ya que es inocua, tiene un mecanismo de autosecreción que permite obtener la proteína purificada fácilmente, implicando bajos costos y evitando riesgos de contaminación, es altamente inmunogénica a nivel sistémico, como de mucosas del tracto respiratorio y genital femenino además de internalizarse en células epiteliales, permitiendo la posibilidad de inducir células CD8 específicas contra determinados antígenos intracelulares. Por lo que podemos confirmar la viabilidad de PetS260I para ser utilizada como un potencial acarreador vacunal de epítomos.

## CONCLUSIONES

- Las proteínas Pet y PetS260I son altamente inmunogénicas a nivel sistémico y de mucosas.
- PetS260I resultó ser más inmunogénica que Pet a nivel sistémico y de mucosas del tracto respiratorio y genital femenino, a diferencia de Pet que induce mayor respuesta inmune en mucosa intestinal que la proteína mutante.
- La respuesta inmune inducida por Pet y PetS260I varía según la vía de administración utilizada y el sitio mucoso analizado, aportando evidencias sobre la regionalización del sistema inmune de mucosas.
- La inmunización intraperitoneal e intranasal de PetS260I, resultaron igualmente eficaces en inducir altas respuesta de anticuerpos IgG anti-PetS260I en mucosas del tracto genital femenino.
- La administración nasal y oral son rutas potenciales para la vacunación, ya que la inmunización de PetS260I por estas vías promueve el incremento de inmunidad sistémica y de mucosa del tracto respiratorio, mientras que la inmunización rectal es menos eficiente.
- La proteína PetS260I es un potencial acarreador vacunal de epítomos, ya que es inocua, presenta un mecanismo de autosecreción que permite obtenerla pura y a bajos costos, es altamente inmunogénica a nivel sistémico y de mucosas del tracto genital femenino y respiratorio y su capacidad de internalizarse en células epiteliales, podría inducir respuesta de células T CD8+ antígeno-específicas, confiriendo inmunidad contra patógenos intracelulares tales como el virus VIH, papilomavirus humano, entre otros.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Abbas, A.K., A.H. Lichtman y J.S. Pober, 1998, Imunología Celular y Molecular, 2ª edición, McGraw Hill-Interamericana, p. 257-267.
2. Arciniega M.I.M., 2002, Efecto de pic, proteína involucrada en la colonización intestinal de *Escherichia coli* enteroagregativa, sobre células epiteliales, Tesis licenciatura, UNAM, México, p. 65.
3. Baba, W.T., V. Liska, R. Hofmann-Lehmann, J. Masak, W. Xu, S. Ayehunie, A.L. Cavacini, R.M. Posner, H. Katinger, G. Stiegler, J.B. Bernacky, A.T. Rizvi, R. Schmidt, R.L. Hill, E.M. Keeling, Y. Lu, E.J. Wright, T. Chou and M.R. Ruprecht, 2000, Human neutralizing monoclonal antibodies of the IgG1 subtype Project against mucosal simian-human immunodeficiency virus infection, Nature Medicine, 6(2):200-2006.
4. Balmelli, C., S. Demetz, H. Acha-Orbea, P. De Grande and D. Nardelli-Haeffliger, 2002, Trachea, lung and tracheobronchial lymph nodes are the major sites where antigen-presenting cells are detected after nasal vaccination of mice with human papillomavirus type 16 virus-like particles, Journal of Virology, 76(24):12596-12602.
5. Bennett, V. and D.M. Gilligan, 1993, The spectrin-based membrane skeleton and microscale organization of the plasma membrane, Annu Rev Cell Biol, 9: 27-66.
6. Biewenga, J., E.P. van Rees and T. Sminia, 1993, Induction and regulation of IgA responses in the microenvironment of the gut, Clin Immunol Immunopathol, 67(1):1-7.
7. Bouvet, J.P., L. Bélec, R. Pirés and J. Pillot, 1994, Immunoglobulin G antibodies in human vaginal secretions after parenteral vaccination, Infection and Immunity, 62(9):3957-3961.
8. Bradford, M.M., 1976, A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding, Anal Biochem, 72:248-254.
9. Brandtzaeg, P. and I.N. Forstad, 1999, The human mucosal B-cell system. In: Ogra, P.L., J. Mestecky, M.E. Lamm, W. Strober, J. Bienenstock and J.R. McGhee (eds), Mucosal Immunology, second edition, Academic Press, San Diego, CA, p. 439-468.
10. Brandtzaeg, P., F.L. Johnsen, I.N. Forstad and G. Haraldsen, 1997, Mucosal immunology of the upper airways: an overview, Annals New York Academy of Sciences, 29(830) 1-18.
11. Czebulin, J.R., S. Bolepur, S. Hicks, A. Phillips, R. Hall, M.H. Kothary, F. Navarro-Garcia and J.P. Nataro, 1997, Aggregative adherence fimbria II, a second fimbrial antigen mediating aggregative adherence in enteroaggregative *Escherichia coli*. Infection and Immunity, 65(10):4135-4145.

12. Czezulín, J.R., Whittam, T.S. Henderson, I.R., Navarro-García, F. And J.P. Nataro, 1999, Phylogenetic analysis of enteroaggregative and diffusely adherent *Escherichia coli*, Infection and Immunity, 67(6): 2692-2699.
13. Del Giudice, and G. R. Rappudi, 1999, Genetically derived toxoids for use as vaccines and adjuvants, Vaccine, 17: S44-S52.
14. Didier D., 1991, The spectrin super-family. Biol Cell, 71: 249-254.
15. Di Tommaso, A., G Saletti, M Pizza R. Rappudi, G. Dougan, S. Abrignani, G. Douce and MT. De Magistris, 1996, Induction of antigen-specific antibodies in vaginal secretions by using a nontoxic mutant of heat-labile enterotoxin as a mucosal adjuvant, Infection and Immunity, 64(3):974-979.
16. Douce, G., V. Giannelli, M Pizza, D. Lewis, P. Everest, R. Rappudi and G. Dougan, 1999, Genetically detoxified mutants of heat-labile toxin from *Escherichia coli* are able to act as oral adjuvants, Infection and Immunity, 67(9):4400-4406.
17. Eslava, C. Navarro-García F., Czezulín R.J., Henderson R.I. Cravioto A., and Nataro J.P., 1998, Pet, an autotransporter enterotoxin from enteroaggregative *Escherichia coli*, Infection and Immunity, 66:7, 3155-3163.
18. Fujimura, Y., 2000, Evidence of M cells as portals of entry for antigens in the nasopharyngeal lymphoid tissue of humans, Virchows Arch 436: 560-566.
19. Gallichan, S.W. and K.L. Rosenthal, 1996, Effects of the estrous cycle on local humoral immune responses and protection of intranasally immunized female mice against herpes simplex virus type 2 infection in the genital tract, Virology, 224(2):487-497.
20. Henderson, R.I., Hicks S., Navarro-García F., Elias P.W., Phillips D.A. and Nataro J.P., 1999, Involvement of enteroaggregative *Escherichia coli* toxin in causing human intestinal damage, Infection and Immunity 67(10): 5338-5344.
21. Henderson, R.I. and Nataro J.P., 2001, Virulence functions of autotransporter proteins, Infection and Immunity 69(3): 1231-1241.
22. Heritage, P.L., Underdown J.B., A.L. Arsenault, D.P. Snider and MR. McDermont, 1997, Comparison of murine nasal-associated lymphoid tissue and peyer's patches, Am J Respir Crit Care Med, 156: 1256-1262.
23. Hicks, S., D.C. Candy and A.D. Phillips, 1996, Adhesion of enteroaggregative *Escherichia coli* to pediatric intestinal mucosa in vitro, Infection and Immunity, 64(11):4751-4760.
24. Isaka, M., Y. Yasuda, S. Kozuka, Y. Mura, T. Taniguchi, K. Matano, N. Goto and K. Tochikubo, 1998, Systemic and mucosal immune responses of mice to aluminium-adsorbed or aluminium-non-adsorbed tetanus toxoid administered intranasally with recombinant cholera toxin B subunit, Vaccine, 16(17): 1620-1626.



25. Isaka, M., Y. Yasuda, S. Kozuka, T. Taniguchi, K. Matano, J. Maeyama, T. Komiya, K. Chkuma, N. Goto and K. Tochikubo, 2000, Induction of systemic and mucosal antibody responses in mice immunized intranasally with aluminium-non-adsorbed diphtheria toxoid together with recombinant cholera toxin B subunit as an adjuvant, Vaccine, 18:743-751.
26. Kato, H., H. Bukawa and E. Hagiwara, X. Ke-Qin Xin, K. Hamajima, S. Kawamoto, M. Sugiyama, E. Noda, M. Nishizaki and K. Okuda, 2000, Rectal and vaginal immunization with a molecular multicomponent peptide vaccine candidate for HIV-1 infection induces HIV-specific protective immune responses, Vaccine, 18(13):1151-1160.
27. Kiyono, H. and McGhee J.R., 1999, The mucosal immune system. In: Paul W.E.(eds), Fundamental Immunology, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, p.909-940.
28. Klauser, T., J. Pohlner and F. Meyer, 1991, Extracellular transport of cholera toxin B subunit using *Neisseria* IgA protease  $\beta$  domain: conformation dependent outer membrane translocation, EMBOJ., 9:1991-1999.
29. Kroese, G.M.F., A.B.Kantor and L.A. Herzenberg, 1999, The role of B-1 cells in mucosal immune responses. In: Ogra, P.L., J. Mestecky, M.E. Lamm, W. Strober, J. Bienenstock and J.R. McGhee (eds), Handbook of Mucosal Immunology, second edition, Academic Press, San Diego, CA, p.217-224.
30. Kuper, C.F., J.H. Arts and V.J. Feron, 2003, Toxicity to nasal-associated lymphoid tissue, Toxicology Letters, 11(140-141):281-285.
31. Laemmli, U.K., 1970, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, Nature, 227: 680-685.
32. Lamm, E.M., 1997, Interactions of antigens and antibodies at mucosal surfaces, Annual Reviews of Microbiology, 51:311-340.
33. Lehner, T., L. Bergmeier and Y. Wang, 1999, A rational basis for mucosal vaccination against HIV infection, Immunological Reviews, 170:183-196.
34. Levine, M.M., 2003, Can needle-free administration of vaccines become the norm in global immunization?, Nature Medicine 9(1):99-103.
35. Li, T., N. Takeda and T. Myamura, 2001, Oral administration of hepatitis E virus-like particles induces a systemic and mucosal immune response in mice, Vaccine, 19:3476-3484.
36. Margni R. A., 1996, Inmunología e Inmunquímica: Fundamentos, Editorial Médica Panamericana, Argentina, p.179-183.
37. Mascala, R.J., G. Siegler, T.C. VanCott, H. Katinger, C.B. Carpenter, C.E. Hanson, H. Beary, D. Hayes, S.S. Frankel, D.L. Brix and M.G. Lewis, 2000, Protection of macaques against vaginal transmission of a pathogenic HIV-1/SIV chimeric virus by passive infusion of neutralizing antibodies, Nature Medicine, 6(2):207-210.

38. Mazanec, M.B., Kaetzel C.S., M.E. Lamm and D. Fletcher, J.G. Nedrud 1992, Intracellular neutralization of virus by immunoglobulin A antibodies. Proc. Nat. Acad. Sci., 89(15):6901-6905.
39. McGhee, J.R., M.E. Lamm and W. Strober, 1999, Mucosal immune responses: an overview. In: Ogra, P.L., J. Mestecky, M.E. Lamm, W. Strober, J. Bienenstock and J.R. McGhee (eds), Mucosal Immunology, second edition, Academic Press, San Diego, CA, p.485-506.
40. Mestecky, J., I. Mro, B.J. Underdown, 1999, Mucosal Immunoglobulins. In: Ogra, P.L., J. Mestecky, M.E. Lamm, W. Strober, J. Bienenstock and J.R. McGhee (eds), Mucosal Immunology, second edition, Academic Press, San Diego, CA, p.133-152.
41. Mitchell, L.A. and E. Gdum, 2003, Rectal immunization of mice with hepatitis A vaccine induces stronger systemic and local immune responses than parenteral immunization, Vaccine, 21:1527-1538.
42. Moldoveanu, Z., M.L. Clements, S.J. Prince, B.R. Murphy and J. Mestecky, 1995, Human immune responses to influenza virus vaccines administered by systemic or mucosal routes, Vaccine, 13:1006-1012.
43. Moreno-Fierros, L., A.A. Reséndiz-Albor, and R. López-Revilla, 1999, Different antiamebic antibody isotype patterns in the large and small intestine after local and systemic immunization of mice with glutaraldehyde fixed *Entamoeba histolytica* trophozoites, Life Sciences, 64(13):1079-1089.
44. Moreno-Fierros, L., N. García, R. Gutiérrez, R. López-Revilla and R.I. Vázquez-Padrón, 2000, Intranasal, rectal and intraperitoneal immunization with protoxin Cry 1Ac from *Bacillus thuringiensis* induces compartmentalized serum, intestinal, vaginal and pulmonary immune responses in Balb/c mice, Microbes and Infection, 2:885-890.
45. Moreno-Fierros, L., R. López-Revilla and A.A. Reséndiz-Albor, 2002(a), Differences between the large and small intestine in the immunodominant amoebic proteins recognized by IgG and IgA antibodies in Balb/c mice, Scandinavian Journal of Immunology, 55:458-469.
46. Moreno-Fierros, L., I. Pérez-Ordóñez and M. Páramar-Mardes, 2002(b), Slight influence of the estrous cycle stage on the mucosal and systemic antibody response induced after vaginal and intraperitoneal immunization with protoxin Cry1Ac from *Bacillus thuringiensis* in mice, Life Sciences, 71:2667-2680.
47. Moreno-Fierros, L., E.J. Ruiz-Medina, R. Esquivel, R. López-Revilla and S. Piña-Cruz, 2003, Intranasal cry1Ac protoxin is an effective mucosal and systemic carrier and adjuvant of *Streptococcus pneumoniae* polysaccharides in mice, Scandinavian Journal of Immunology, 57:47-55.

48. Mowat, M.A. and L.H. Weiner, 1999, Oral Tolerance. In: Ogra, P.L., J. Mestecky, M.E. Lamm, W. Strober, J. Bienenstock and J.R. McGhee (eds), Mucosal Immunology, second edition, Academic Press, San Diego, CA, p.587-616.
49. Nataro, J.P., Y. Deng, D.R. Moneval, A.L. German, W.C. Martin and M.M. Levine, 1992, Aggregative adherence fimbriae I of enteroaggregative *Escherichia coli* mediate adherence to HEP-2 cells and hemagglutination of human erythrocytes. Infect Immun, 60(6):2297-304.
50. Nataro, J.P. and Kaper J.B., 1998, Diarrheagenic *Escherichia coli*, Clinical microbiology Reviews 11(1): 142-186.
51. Navarro-García, F., Eslava C., Villaseca M.J., López-Revilla R., Czezulín R.J., Srinivas S., Nataro J.P. and Cravioto A., 1998, In vitro effects of a high-molecular-weight heat-labile enterotoxin from Enterocaggregative *Escherichia coli*, Infection and Immunity, 66(7): 3149-3154.
52. Navarro-García, F., Sears C., Eslava C., Cravioto A., and Nataro J.P., 1999, Cytoskeletal effects induced by Pet, in the serine protease enterotoxin of enteroaggregative *Escherichia coli*, Infection and Immunity, 67(5): 2184-2192.
53. Navarro-García, F., A. Canizalez-Roman, J. Luna, C. Sears and J.P. Nataro, 2001, Plasmid-encoded toxin of enteroaggregative *Escherichia coli* is internalized by epithelial cells, Infection and Immunity, 69(2):1053:1060.
54. Nugent, J., A.L. Wan Po and E.M. Scott, 1998, Design and delivery of non-parenteral vaccines. Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics, 23: 257-285.
55. Ogra, P.L., H. Faden and R.C. Welliver, 2001; Vaccination strategies for mucosal immune responses, Clinical Microbiology Reviews, 14(2):430-445.
56. O'Neil, C.M., G.R. Harriman and M. E. Conner, 2000, Protection of the villus epithelial cells of the small intestine from rotavirus infection does not require immunoglobulin A. Journal of Virology, 74(9):4102-4109.
57. Panja, A., L. Mayer, 1999, Diversity and function of antigen-presenting cells in mucosal tissues. In: : Ogra, P.L., J. Mestecky, M.E. Lamm, W. Strober, J. Bienenstock and J.R. McGhee (eds), Handbook of Mucosal Immunology, second edition, Academic Press, San Diego, CA, p.177-183.
58. Parr, M.B., and E.L. Parr, 1994, Mucosal immunity in the female and male reproductive tracts. In: Ogra, P.L., J. Mestecky, M.E. Lamm, W. Strober, J. Bienenstock and J.R. McGhee (eds), Handbook of Mucosal Immunology, Academic Press, San Diego, CA, p.677-689.
59. Pizza, M., M.M. Giuliani, M.R. Fontana, E. Monaci, G. Douce, K.H.G. Mills, R. Rappuoli and G. Del Giudice, 2001, Mucosal vaccines: non toxic derivatives of LT and CT as mucosal adjuvants, Vaccine, 19:2534-2541.

60. Quiding-Järbrink, M., I. Norström, G. Granström, A. Kilander, M. Jertborn, E.C. Butcher, A.I. Lazarovits, J. Holmgren and C. Czerkinsky, 1997, Differential expression of tissue adhesion molecules on human circulating antibody-forming cells after systemic, enteric and nasal immunization, J. Clin. Invest., 99(6):1281-1286.
61. Rose, C.R., C. Lane, S. Wilson, J.A. Suzich, E. Rybicki and A. Williamson, 1999, Oral vaccination of mice with human papillomavirus-like particles induces systemic virus-neutralizing antibodies, Vaccine, 17:2129-2135.
62. Rudin, A. G. C. Riise and J. Holmgren, 1999, Antibody responses in the lower respiratory tract and male urogenital tract in humans after nasal and oral vaccination with cholera toxin B subunit, Infection and Immunity, 67(6): 2884-2890.
63. Ruiz, M.E.J., 2001, La protoxina Cry1Ac de *Bacillus thuringiensis* HD73 como adyuvante y adyuvante de polisacáridos de *Streptococcus pneumoniae*, Tesis Licenciatura, UNAM, México, p.96.
64. Ryan, E.J., L.M. Daly and K.H.G. Mills, 2001, Immunomodulators and delivery systems for vaccination by mucosal routes, TRENDS in Biotechnology, 19(8):293-304.
65. Savarino, S.J., A. Fasano, J. Watson, B.M. Martin, M.M. Levine, S. Guadagnini and P. Guerry, 1993, Enterocaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 represents another subfamily of *E. coli* heat-stable toxin, Proc Natl Acad Sci, 90(7):3093-3097.
66. Sminia, T. and G. Krad, 1999; Nasal-associated lymphoid tissue. In: Ogra, P.L., J. Mestecky, M.E. Lamm, W. Strober, J. Bienenstock and J.R. McGhee (eds), Mucosal Immunology, second edition, Academic Press, San Diego, CA, p.357-364.
67. Smith, K.M., A.D. Eaton, L.M. Findlyson and P. Garside, 2000, Oral tolerance, Am J Respir Crit Care Med, 162:S175-S178.
68. Taborca, C.P. and A. Casadevall, 2001, Immunoglobulin M efficacy against *Cryptococcus neoformans*: mechanism, dose dependence and prazone-like effects in passive protection experiments, Journal of Immunology, 166:2100-2107.
69. Takahashi, M., Y. Nakagama, and J.A. Berzofsky, 2001, Counter regulation of cytotoxic activity and cytokine production in HIV-1 specific murine CD8+ cytotoxic T lymphocytes by free antigenic peptide, International Immunology, 13(1):43-51.
70. Tamura S., T. Iwasaki, A.H. Thompson, H. Asanuma, Z. Chen, Y. Suzuki, C. Aizawa and T. Kurata, 1998, Antibody-forming cells in the nasal-associated lymphoid tissue during primary influenza virus infection, Journal of General Virology, 79:291-299.
71. Underdown, B.J., I. Switer, and G.D. Jackson, 1992, Rat secretory component binds poorly to rodent IgM, J. Immunology 149(2):487-491.

72. Underdown, J.B. and S.A. Plotkin, 1999, The induction of mucosal protection by parenteral immunization. In: Ogra, P.L., J. Mestecky, M.E. Lamm, W. Strober, J. Bienenstock and J.R. McGhee (eds), Mucosal Immunology, second edition, Academic Press, San Diego, CA, p.717-726.
73. Van Egmond, M., C.A. Damen, A.B. van Spruel, G. Vidarsson, E. Van Garderen and J.G.J. van de Winkel, 2001, IgA and the IgA Fc receptor, TRENDS in Immunology, 22(4):205-211.
74. Van Ginkel, F.W., R.J. Jackson, Y. Yuki and J.R. McGhee, 2000, Cutting edge: The mucosal adjuvant cholera toxin redirects vaccine proteins into olfactory tissues, Journal of Immunology, 165:4778-4782.
75. Villaseca, J.M., F. Navarro-Garcia, G. Mendoza-Hernandez, J.P. Nataro, A. Cravioto and C. Eslava, 2000, Pet toxin from enteroaggregative *Escherichia coli* produces cellular damage associated with fodrin disruption, Infection and Immunity, 68(10):5920-5927.
76. Wang, L. L. Kedzierski, S.L. Wesselingh and R.L. Coppel, 2003, Oral immunization with a recombinant malaria protein induces conformational antibodies and protects mice against lethal malaria, Infection and Immunity, 71(5):2356-2364.
77. Wu, H.Y., H.H. Nguyen and M.W. Russell, 1997, Nasal lymphoid tissue (NALT) as a mucosal immune inductive site, Scandinavian Journal of Immunology, 46:506-513.
78. Yao, Q., V. Vuong, M. Li and R.W. Compans, 2002, Intranasal immunization with SIV virus-like particles (VLPs) elicits systemic and mucosal immunity, Vaccine, 20:2537-2545.