



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**“EFECTO DE LA INMUNIZACIÓN
INTRAPERITONEAL CON LA PROTOXINA Cry1Ac
EN EL PATRÓN DE CITOCINAS INDUCIDO EN
LINFOCITOS DE DISTINTOS COMPARTIMENTOS
DE MUCOSAS EN RATONES BALB/C”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO
DE

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)**

P R E S E N T A

BIOL. IRMA RIVERA MONTOYA

DIRECTORA DE TESIS: DRA. LETICIA MORENO-FIERROS

MÉXICO, D.F.

MAYO 2008



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.

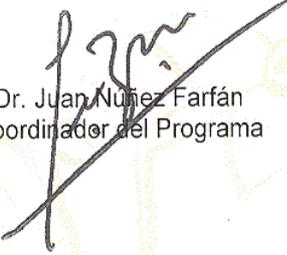
Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 5 de Noviembre de 2007, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)** de la alumna **IRMA RIVERA MONTOYA** con número de cuenta **94060955** con la tesis titulada **"Efecto de la inmunización intraperitoneal con Cry1Ac en el patrón de citocinas inducido en linfocitos de distintos compartimentos de mucosas en ratones Balb/c"**, realizada bajo la dirección de la **DRA. LETICIA MORENO FIERROS**.

Presidente: DRA. MARTHA LEGORRETA HERRERA
Vocal: DRA. MIRIAM RODRÍGUEZ SOSA
Secretario: DR. EDUARDO ALBERTO GARCÍA ZEPEDA
Suplente: DR. FERNANDO NAVARRO GARCÍA
Suplente: DRA. LIBIA VEGA LOYO

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F. a, 13 de Marzo de 2008.


Dr. Juan Núñez Farfán
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente de la interesada.

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Inmunidad en Mucosas de la Unidad de Biomedicina de la FES Iztacala, UNAM, la dirección estuvo a cargo de la Dra. Leticia Moreno Fierros y con el apoyo de la técnico M. en C. Leticia Verdín Terán.

Este proyecto de investigación fue apoyado por:

CONACYT 340834 M

Proyectos: **PAPPIT IN207800, PAPIIT IN213903, PAPIIT IN221807.**

y

SEP-CONACYT 2003 43102-M

Durante el desarrollo de los créditos y la escritura de la presente tesis la autora contó con las becas: CONACYT, DGEP y beca COMECyT para escribir tesis de posgrado.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Leticia Moreno Fierros por su apoyo y sus conocimientos

A los miembros del jurado:

Dra. Martha Legorreta Herrera

Dra. Miriam Rodríguez Sosa

Dr. Eduardo Alberto García Zepeda

Dr. Fernando Navarro García

Dra. Libia Vega Loyo

Por sus valiosos comentarios y sugerencias en la revisión y realización de este trabajo.

A mi amiga Leticia Verdín por todo su apoyo incondicional, los momentos agradables que me ha brindado y por su valiosa amistad.

A mis compañeros del laboratorio de inmunidad en mucosas por su apoyo y tiempo.

DEDICATORIAS

A mi hijo José Arturo, por ser el motor de mi vida y el motivo constante de superación. Espero este sea para ti un estímulo para continuar con tus estudios y lograr tu propias metas, no te conformes, no te rindas y siempre sigue adelante.

Gracias por tu infinita paciencia y comprensión.

A mi madre y hermanos, por su apoyo, en las buenas y en las malas, por apoyarme en mis decisiones y estar a mi lado en la adversidad.

A todos mis amigos, que han estado siempre conmigo apoyándome, por ser la familia que elegí y aunque no nombre a cada uno (Chucho, Carlitos, Paty, a las Letys, Gina, Karen, Lau, Arlett, Alex, Gaby) saben que los quiero mucho a cada uno de ustedes y por eso a todos y cada uno.

Infinitamente...

GRACIAS

ABREVIATURAS

| | |
|--------------------------------|---|
| B | Bazo |
| BALT | Tejido linfoide asociado a bronquios |
| BSA | Albúmina sérica bovina |
| Bt | <i>Bacillus thuriangiensis</i> |
| CFDA-SE | Carboxifluoresceindiacetato succinimidil ester |
| CFSE | Carboxifluoresceinsuccinimidil ester |
| CSF | Factor estimulante de colonias (por sus siglas en ingles) |
| CT | Toxina de cólera |
| DNA | Ácido desoxirribonucleico |
| E. coli | <i>Escherichia coli</i> |
| Fig. | Figura |
| FITC | Isocianato de fluoresceína |
| GALT | Tejido linfoide asociado al intestino |
| HbsAg | Antígeno de superficie de la hepatitis B |
| ID | Intestino delgado |
| IEL | Linfocitos intraepiteliales |
| IEL ID | Linfocitos intraepiteliales de Intestino delgado |
| IEL IG | Linfocitos intraepiteliales de Intestino grueso |
| IFN-γ | Interferon gamma |
| IG | Intestino grueso |
| Ig's | Anticuerpos |
| IL | Interleucina |
| IN | Intranasal |
| iNOS | Sintasa de oxido nítrico inducible |
| IP | Intraperitoneal |
| IPTG | Isopropil b-D tiogalactopiranosido |
| IV | Intravaginal |
| kDa | Kilo Dalton |
| Lc | Linfocitos |
| LPL | Linfocitos de lamina propia |
| LPL ID | Linfocitos de lamina propia de intestino delgado |
| LPL IG | Linfocitos de lamina propia de intestino grueso |
| LT | Toxina termolábil de <i>Escherichia coli</i> |
| mRNA | Ácido ribonucleico mensajero |
| O | Oral |
| PCR | Reacción en cadena de la polimerasa |
| pCry1Ac | Protoxina Cry1Ac |
| PE | Ficoeritrina |
| PERCP | Proteína de clorofila-peridina |
| PLN | Ganglios linfáticos periféricos |
| PP | Placas de Peyer |
| R | Rectal |

| | |
|------------------------|--|
| RNA | Acido ribonucleico |
| RNA_m | Ácido ribonucleico mensajero |
| rpm | Revoluciones por minuto |
| SDS-PAGE | Electroforesis en gel de acrilamida/duodecilsulfato de sodio |
| SFB | Suero fetal bovino (por sus siglas en ingles) |
| SIgA | Inmunoglobulina A secretora |
| SIgM | Inmunoglobulina M secretora |
| TGF-β | Factor transformador del crecimiento beta |
| Th | Linfocitos T cooperadores |
| TNF-α | Factores de necrosis tumoral alfa |
| TRF | Tracto reproductor femenino de ratón, Vagina (V) |

RESUMEN

“Efecto de la inmunización intraperitoneal con la protoxina Cry1Ac en el patrón de citocinas inducido en linfocitos de distintos compartimentos de mucosas en ratones BALB/c”

En el sistema inmune de mucosa se producen una gran variedad de moléculas de la respuesta inmune, que incluyen anticuerpos, citocinas, quimiocinas y sus receptores que participan en las respuestas tanto innata como adquirida y en su regulación. Su presencia genera un microambiente que determina los tipos de respuesta (humoral y/o celular). Debido a que las superficies de las mucosas constituyen la principal ruta de entrada de los agentes infecciosos, es necesario desarrollar estrategias capaces de generar la expresión de éstas moléculas protectoras en los sitios adecuados para conferir protección.

Diversos estudios han demostrado que la protoxina Cry1Ac (pCry1Ac) de *Bacillus thuringiensis* es inmunogénica y presenta efectos adyuvantes en la respuesta de anticuerpos, sin embargo, se desconoce el mecanismo de acción celular por el cual confiere estos efectos y en virtud de que la mayoría de los agentes adyuvantes ejercen su actividad a través de la inducción y regulación de citocinas, en el presente trabajo nos planteamos caracterizar el efecto de la pCry1Ac en la inducción de citocinas en linfocitos de diversos compartimentos de mucosas.

Se encontró que pCry1Ac induce o modifica la expresión de citocinas, se observó que los linfocitos de mucosas producen constitutivamente mRNA's de citocinas como IL-4 e IFN- γ , mientras que los linfocitos estimulados *in vitro* presentan un perfil de citocinas complejo y de diferente intensidad dependiendo de los compartimentos analizados, lo que complementa la caracterización de la compartimentalización del sistema inmune intestinal y confirma que la mucosa presenta una regulación compleja.

De manera interesante se observó que pCry1Ac induce la expresión de citocinas reguladoras IL-10 y TGF- β , los cuales participan en el equilibrio de la

respuesta inmune e impiden la inflamación y el daño a tejido, lo que sugiere que pCry1Ac induce la producción de células efectoras/reguladoras en las mucosas.

Los ensayos de proliferación que surgieron como parte complementaria del trabajo indican que pCry1Ac induce proliferación sugiriendo que esta protoxina actúa como un mitógeno.

ABSTRACT

pCry1Ac intraperitoneal immunization effect in the lymphocyte cytokine pattern induced in different mucosal compartment in BALB/c mice

A great variety of molecules are produced in the mucosal immune system, like antibodies, cytokines, chemokines and their receptors that regulate and participate in the innate and acquired immune system. The presence of these molecules generates a microenvironment that determines the immune type response (humoral and cellular). Because mucosal surfaces are the main route of entry of infectious agents, strategies in the induction of protective molecules in these sites are necessary.

Several studies have demonstrated that the protoxin Cry1Ac (pCry1Ac) of *Bacillus thuringiensis* has adjuvant and immunogenic effects in the humoral immune response however the cellular mechanism is unknown and the fact that most adjuvant activity is through induction and regulation of cytokines, we characterized the effect of pCry1Ac in cytokines production by lymphocyte in different mucosal compartments.

We found that cytokine expression is induced or modified by pCry1Ac, mucosal lymphocytes express constitutively IL-4 and IFN- γ mRNA's *in vitro*, stimulated lymphocytes express a different complex cytokine profile depending of the site analyzed, and this complements the characterization of the GALT and supports the idea of a complex regulation of the mucosal tissue.

Interestingly, pCry1Ac induces expression of regulatory cytokines such as IL-10 and TGF- β these cytokines are involved in the immune response balance and have anti-inflammatory properties which in turn protect from tissue damage.

Proliferation assays revealed that pCry1Ac induces proliferation, suggesting that this protoxin Cry1Ac acts like a mitogen.

| | |
|--|------------|
| Abreviaturas | <i>i</i> |
| Resumen | <i>iii</i> |
| Abstract | <i>v</i> |
| 1. Introducción | 1 |
| La organización del sistema inmune en mucosas | 2 |
| Papel de las citocinas | 9 |
| Los efectos de las de las proteínas pCry1Ac de <i>Bacillus thuringiensis</i> | 12 |
| Antecedentes | 14 |
| 2. Objetivos | 18 |
| 3. Metodología | 19 |
| 3.1. Producción y purificación de la pcry1ac a partir de <i>E. coli</i> | 19 |
| 3.2. Análisis de la pureza de la proteína | 19 |
| 3.3. Ruta y esquema de inmunización | 20 |
| 3.4. Obtención de linfocitos de distintos compartimentos de mucosas | 21 |
| 3.4.1. Obtención de linfocitos de bazo | 21 |
| 3.4.2. Obtención de linfocitos de placas de Peyer (PP) | 21 |
| 3.4.3. Obtención de linfocitos intraepiteliales de intestino grueso, delgado y tracto genital (TRF) | 21 |
| 3.4.4. Obtención de linfocitos de lámina propia de intestino grueso, delgado y tracto genital (TRF) | 22 |
| 3.5. Gradientes de separación de linfocitos | 22 |
| 3.6. Conteo y viabilidad celular | 23 |
| 3.7. Citometría de flujo | 23 |
| 3.8. Cultivos celulares y estimulación <i>in vitro</i> | 24 |
| 3.9. Extracción RNA de linfocitos | 24 |
| 3.10. Determinación de la concentración y pureza del RNA | 25 |
| 3.11. Determinación de citocinas por RT-PCR semicuantitativo | 26 |
| 3.12. Ensayos de proliferación | 28 |
| 3.12.1. Ensayo de proliferación mediante kit AlamarBlue | 28 |
| 3.12.2. Ensayo de proliferación mediante tinción (CFSE) | 30 |
| 3.13. Análisis estadístico | 31 |
| 4. Resultados | 32 |
| 4.1. Obtención de pCry1Ac | 32 |
| 4.2. Efecto de la administración intraperitoneal de la pCry1Ac modifica las proporciones celulares en los distintos compartimentos | 32 |
| 4.3. Efecto de la administración intraperitoneal de la pCry1Ac en la cantidad de mRNA obtenido | 33 |
| 4.4. El efecto de la administración de la pCry1Ac en los perfiles de citocinas (Th1, Th2, Tr) | 35 |
| 4.4.1. Perfil de citocinas inducidos por pCry1Ac detectado por RT-PCR | 35 |
| 4.4.2. Citocinas inducidas por pCry1Ac en linfocitos intraepiteliales (IEL) de ambos intestino | 36 |

| | |
|--|-----------|
| 4.4.3. Citocinas inducidas por pCry1Ac en linfocitos de lámina propia (LPL) de ambos intestinos | 42 |
| 4.4.4. Citocinas inducidas por pCry1Ac en placas de Peyer (PP) y tracto reproductor femenino (TRF) | 45 |
| 4.4.5. Citocinas inducidas por pCry1Ac en bazo | 47 |
| 4.5. Proliferación celular inducida por pCry1Ac en cultivos <i>in vitro</i> | 48 |
| 4.5.1. Ensayo de proliferación mediante tinción con CFSE | 50 |
| 5. Discusión | 54 |
| 5.1. El efecto de la administración de la pCry1Ac en los perfiles de citocinas | 54 |
| 5.2. Efecto de la administración intraperitoneal de la pCry1Ac en la cantidad de mRNA total | 62 |
| 5.3. Proliferación celular al administrar pCry1Ac | 63 |
| 5.4. Relación entre la producción de citocinas y la proliferación | 65 |
| 6. Conclusiones | 69 |
| Referencias | 70 |
| Anexo-1 | 75 |
| Anexo-2 | 78 |

1. INTRODUCCIÓN

La mayoría de los agentes infecciosos penetran al organismo a través de las superficies mucosas de los tractos gastrointestinales, respiratorios y genitourinarios, por lo que se requiere desarrollar estrategias de vacunación que induzcan respuestas inmunes protectoras en los sitios mucosos donde invaden los patógenos (Eriksson y Holmgren 2002).

Aunque las diferentes superficies mucosas están íntimamente comunicadas existen evidencias de que existe alto grado de compartimentalización dentro del sistema inmune asociado a mucosas (Brandtzaeg 1999). Ya que en varios estudios se ha observado que la magnitud y especificidad de la respuesta generada son variables en los distintos sitios mucosos y dependen de la ruta de inmunización y de la naturaleza del antígeno utilizado (Hopkins *et al.* 1995, Kantele *et al.* 1998, Vázquez *et al.* 1999, Moreno-Fierros *et al.* 2000, 2002, 2003, Esquivel, *et al.* 2005).

La organización y regulación de la inmunidad en mucosas es más compleja de lo que inicialmente se pensó, por lo que el diseño racional de vacunas depende de la disponibilidad de mayor información acerca de las compartimentalización regional de la función del sistema inmune en mucosas.

Para tratar de dilucidar como lograr inducir y regular las respuestas inmunes protectoras en los sitios adecuados, dependiendo de los sitios de infección de los diferentes patógenos; hacen falta más estudios que tomen en consideración las diferencias regionales del sistema inmune de mucosas. Por lo que se requieren estudios funcionales que evalúen en linfocitos de distintos compartimentos mucosos las respuestas inmunes efectoras.

Por lo tanto en este trabajo se analizó la producción de citocinas en linfocitos de diferentes compartimentos de mucosas en condiciones basales y después de estimular *in vitro* o *in vivo* mediante inmunización, utilizando como inmunógeno a la protoxina Cry1Ac de *Bacillus thuringiensis*, una proteína inmunogénica que tiene propiedades adyuvantes, pero se desconoce el mecanismo por el que ejerce estos efectos.

Antes de presentar los antecedentes directos del presente trabajo a continuación se describen brevemente algunos conceptos generales de: 1) la organización del sistema inmune en mucosas, 2) los efectos de las citocinas y 3) los efectos de las de las proteínas Cry de *Bacillus thuringiensis*.

1) LA ORGANIZACIÓN DEL SISTEMA INMUNE EN MUCOSAS

Una persona durante su vida se enfrenta a cientos de agentes infecciosos diferentes y una de las principales rutas de entrada son las mucosas. En condiciones normales, el sistema inmune (SI) es capaz de proteger contra una amplia variedad de agentes infecciosos (bacterias, hongos, parásitos y virus) de forma rápida y efectiva frente a estos agentes potencialmente patógenos. Para ello es capaz de reconocer a los componentes del agente patógeno e iniciar una serie de respuestas encaminadas a eliminarlo y cuyas características fundamentales son la especificidad y la memoria.

Las mucosas juegan un papel muy importante en la defensa inmunológica, ya que un gran número de agentes patógenos utilizan a las mucosas como vía de entrada al organismo (Sánchez-Vizcaino, *et al.* 1981). En la entrada de antígenos (Ag) intervienen barreras inespecíficas como el ácido gástrico, el moco, las enzimas digestivas y el peristaltismo así como por las estructuras físicas, el sistema común de mucosas protege mediante el propio epitelio y por mecanismos inmunológicos inespecíficos en el tracto gastrointestinal, así como por la barrera inmunológica constituida por la IgA e IgM secretoras (IgAs e IgMs). La misión principal del sistema inmune es reconocer a las moléculas extrañas y dirigir un ataque concertado contra ellas (Mayer, 2000).

El tejido linfoide asociado a las mucosas (mucosa-associated-lymphoid tissue, **MALT**) forma parte del sistema inmune y junto con las glándulas exocrinas (McGhee *et al.* 1999); es el encargado de proteger las mucosas del ataque de los agentes patógenos, tanto en una respuesta primaria como secundaria. Esta formado por nódulos de tejido linfoide que, según su localización, se denominan: Tejido linfoide asociado al intestino (gut-associated-lymphoid tissue, GALT) y tejido linfoide asociado a bronquios (bronchus-associated-lymphoid tissue, BALT); que incluye folículos linfoides de los bronquios y tejido linfoide asociado a la nasofaringe (nasal-associated lymphoid tissue, NALT) (McGhee *et al.* 1999; Fujimura, 2000). El sistema inmune

común de mucosas a su vez se divide en sitios inductores, en donde el antígeno se localiza, endocita, procesa y presenta a los linfocitos T y B; y en sitios efectores donde ocurre la secreción de anticuerpos y las respuestas de células T efectoras (McGhee *et al.* 1999a; Czerkinsky *et al.* 1999).

En cuanto a su organización el sistema inmune asociado a las mucosas puede dividirse en tres compartimentos:

- 1) Agregados linfoides organizados como las placas de Peyer (PP)
- 2) Tejido linfoide difuso (lamina propia, LP) y
- 3) Linfocitos intraepiteliales (IEL).

El principal tejido linfoide que se ha estudiado son las PP que se localizan en el intestino delgado.

Las placas de Peyer del intestino delgado se han considerado la parte más importante del tejido linfoide organizado del sistema inmune y el sitio inductor de la mucosa intestinal. Son permeables a la entrada de antígenos y son las responsables de la regulación de la respuesta inmune frente a antígenos alimentarios y bacterianos. Las PP contienen una región en forma de domo que se encuentra altamente enriquecida por linfocitos, macrófagos, células dendríticas y células plasmáticas. Este tejido se encuentra recubierto por el epitelio, que contiene un folículo asociado al epitelio y a las células M, son altamente especializados para la absorción y transporte de antígenos intactos (proteínas, bacterias, virus y pequeños parásitos) hacia el tejido linfoide inferior. Por debajo del domo de las PP los diferentes folículos contienen centros germinales donde ocurre la división de células B. Las áreas de células T son adyacentes a los folículos y proporcionan funcionalidad a los linfocitos T citotóxicos CTL) y células Th que apoyan a las respuestas de IgA. Dentro de estos sitios inductivos también se encuentran las células presentadoras de antígeno (macrófagos, células dendríticas y linfocitos B) (Sabbaj *et al.* 1997). Los linfocitos en la proximidad de la superficie basal de las células M son principalmente células T CD8+. Existen también células T CD4+ que cuando se activan migran a los ganglios linfáticos y al conducto torácico. Los linfocitos de las PP expresan integrina $\alpha 4\beta 7$ en su superficie, que es el ligando de la adhesina vascular específica del intestino MAdCAM-1 y las células T y B migran a través del endotelio hacia la lámina propia.

La respuesta inmune frente a antígenos requiere de un sistema inmune capaz de reconocer y responder frente a los antígenos de la luz intestinal, por lo que, las células linfoides del tracto gastrointestinal comprenden la población de linfocitos más abundante en los mamíferos, estos linfocitos a lo largo del tracto intestinal constituyen el 20% del total en el organismo (Sanz, 2001) Estas células están ubicadas en compartimentos incluyendo los folículos linfoides (PP) y en tejido difuso como son: el epitelio y la lámina propia de las mucosas Brandtzaeg, *et al.* 1999; Guy-Grand, *et al.* 2002), los cuales se diferencian en su ubicación anatómica, fenotipo y función (Resendiz-Albor, 2000). El intestino delgado (ID) e intestino grueso (IG) difieren en la adsorción de nutrientes y bacterias luminarias a los que tienen contacto, dichas diferencias podrían explicar la especialización regional.

Linfocitos de la lámina propia (LPL). Distintas células linfocitarias conforman la lámina propia, incluyendo a las células dendríticas, a los macrófagos y a los linfocitos B y T (LPL). Estos últimos se encuentran por debajo de la membrana basal, los LPL (aproximadamente 1/3) son TCR $\alpha\beta$ CD4+ y CD8+. En la lámina propia también se encuentran células productoras de IgA, IgG e IgM. Los macrófagos y células dendríticas participan en la presentación de antígenos *in situ* (Fig. 1).

Linfocitos intraepiteliales (IEL), forman una extensa población de linfocitos T con características propias, se ubican sobre la membrana basal del epitelio intestinal, intercalados con los enterocitos. Son las primeras células inmunocompetentes en encontrar antígenos por la vía oral y se cree que son capaces de diferenciar entre antígenos inocuos y patógenos. Son linfocitos de mediano tamaño la mayoría tienen fenotipo CD3+CD8+ (70-90%) y expresan el receptor de células T TCR $\alpha\beta$ + y una proporción <30% son TCR $\gamma\delta$ y fenotipo CD4-CD8- o CD4-CD8+. Carecen de marcadores CD5, CD6, CD28 y existe un pequeño grupo de células CD3- CD7+ no T que tampoco son NK (Arranz y Garrote, 2006) (Fig. 1).

Algunas IEL migran directamente desde la médula ósea al epitelio intestinal, pero la mayoría son células recirculantes que cruzan la membrana basal epitelial desde la lámina propia. Comparados con las células T periféricas los IEL precisan de una vía alternativa de activación en la que interviene el complejo CD2/LFA-3 y carecen de marcadores CD25 o MHC-II. Muchas son células de memoria CD45RO o

se encuentran semi-activadas, y pueden expresar Ki67 que es un marcador de células en mitosis. La expresión de moléculas de adhesión como LFA-1(CD11a/CD18) o VLA-4 (CD29) es baja, aunque más del 90% expresan la integrina $\alpha E\beta 7$ y algunas expresan VLA-1 (integrina $\beta 1$), implicadas en la fijación de estas células al epitelio.

A pesar de estar en contacto constante con antígenos por la vía oral, los IEL expresan un repertorio restringido de genes de la región V del TCR y por tanto, su capacidad de reconocimiento antigénico es restringida. Por otra parte los enterocitos expresan moléculas MHC-II haciendo imposible la interacción con IEL CD8+, sin embargo, estas células pueden reconocer moléculas no-polimórficas similares a las MHC-I (CD1). De esta forma, las células de memoria (CD45RO) podrían participar en el reconocimiento limitado de antígenos.

La actividad proliferativa de los IEL en respuesta a mitógenos convencionales de células T, IL-2 y anticuerpos anti-CD, es débil. Su capacidad citotóxica es también baja y no expresan marcadores asociados a células citotóxicas o NK (CD11a, CD16, CD56).

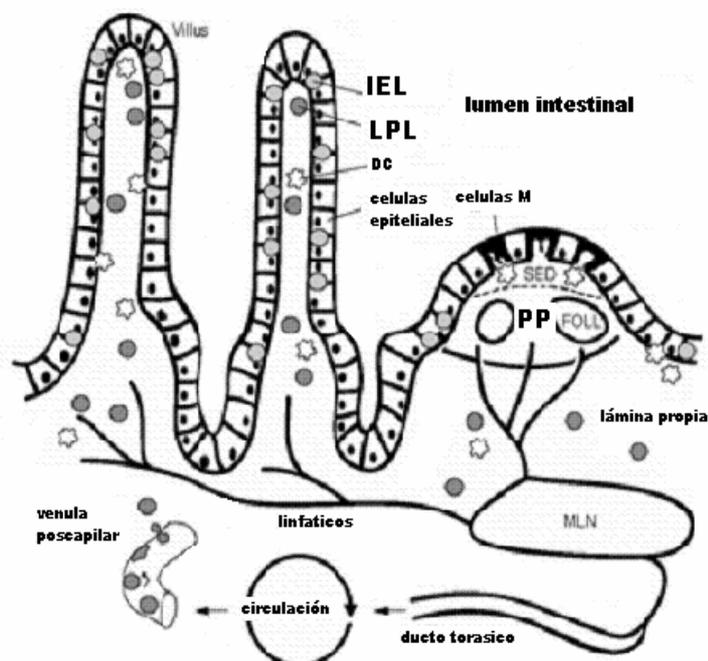


Figura 1. Ubicación de los linfocitos intraepiteliales (IEL) y linfocitos de lámina propia (LPL) en la mucosa intestinal.

Linfocitos Th1 Th2 y Th3/Tr. Los linfocitos T tienen diversas funciones y se agrupan en dos subpoblaciones diferentes: los linfocitos T CD8+ que tienen una función principalmente citotóxica (Tc) y destruyen células infectadas por agentes intracelulares; mientras los linfocitos CD4+ interactúan con células B y fagocitos mononucleares y se denominan células T cooperadoras (células Th, de helper), y actúan como cooperadoras e inductoras de la respuesta inmune.

Los linfocitos producen moléculas de diversa naturaleza que se denominan de un modo general mediadores solubles de la inmunidad; los principales son los anticuerpos y las citocinas, pero además producen diferentes sustancias séricas como el complemento, que actúa en procesos inflamatorios.

La clasificación de los linfocitos en clones Th1 y Th2 responde a una concepción funcional de producción de ciertas citocinas por similitud con el sistema murino, pero en humanos no existen marcadores fenotípicos que puedan diferenciar bien estas poblaciones por lo que se emplean diferentes modelos de estudio que no siempre conducen a los mismos datos. La regulación y el balance entre la respuesta inmune y la respuesta IgE se denominaron por Mosmann y Sada "desviación inmune celular", al observar una desviación de los linfocitos Th0 cooperadores hacia Th1 o Th2 (Mosmann y Sada, 1986). El sistema inmune está expuesto a múltiples antígenos de diversos tipos, sobre todo a través del tracto gastrointestinal, el cual, está en contacto con abundantes cantidades de antígeno frente a los que usa distintas estrategias para defender al organismo, sin embargo, actualmente son poco conocidos los mecanismos de desviación inmune que afectan a la mucosa intestinal y que inducen la producción de IgA y disminución de la producción de IgE. También, existen mecanismos implicados en la tolerancia oral (Hanson, *et al.* 1998; Halstensen, 1997; Simecka, 1998).

Las células T cooperadoras (Th) y T citotóxicas regulan la respuesta inmune de mucosas. Estudios sobre la producción de citocinas por las células Th han aportado evidencia directa de la existencia de subpoblaciones diferentes que pueden tener un precursor común (Th0). Las células Th1 producen selectivamente IL-2, IFN- γ y TNF- β , mientras que las células Th2 producen IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10. Estos diferentes patrones de secreción de citocinas contribuyen a presentar marcadas diferencias en

la función de células Th. La población de Th1 esta implicada en la inmunidad mediada por células, mientras que la Th2 es más efectiva en la regulación y soporte de la respuesta de células B (Mosmann y Coffman, 1989).

La producción de IL-4 o IL-13 es responsable del cambio de fenotipo de linfocitos B; estas interleucinas las pueden producir diversas células como: linfocitos T, eosinófilos y mastocitos: La síntesis de interleucinas IL-4/IFN- γ producidas durante la primera fase de contacto con un antígeno es esencial para la respuesta inmune subsiguiente, se conoce que la reacción cruzada entre los linfocitos Th1 y Th2, células que recíprocamente se inhiben las unas a las otras. Hoy se sabe que las células presentadoras de antígeno segregan IL-12, en respuesta a IFN- γ lo que provoca que las células Th0 se diferencien hacia Th1, que son células productoras de grandes cantidades de IL-2 e IFN- γ , que a su vez provocan la activación de los macrófagos. Por el contrario, las células presentadoras de antígeno en ausencia de IL-12, pero con IL-10 promueven el paso de Th0 a Th2 productoras de IL-4, IL-5, IL-10, responsables de la respuesta de tipo humoral. Las dosis elevadas de IL-4 no solo inducen el cambio de fenotipo de los linfocitos B inmaduros a células productoras de Ig's, sino que previenen a los linfocitos T de producir IFN- γ inducida por IL-12 al disminuir en ellos la expresión de la subunidad b2 de la IL-12.

Algunos estudios sobre la producción de citocinas en las células Th han aportado evidencia directa de la existencia de dos subpoblaciones diferentes que pueden tener un precursor común (Th0). Los trabajos de Mosmann, en las 80's permitieron identificar 2 subpoblaciones de linfocitos Th, distinguibles entre si por los patrones de producción de citocinas. El describió que las células Th1 producían selectivamente IL-2, IFN- γ , IL-3 y factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF), mientras que las células Th2 producían IL-4, IL-6, IL-10, IL-3, IL-5, IL-13 y GMCSF. Las células Th1 se reconocieron como las mediadoras de la inmunidad celular, mientras que una respuesta de tipo Th2 se acompaña de un incremento en la función de las células B (Rojas-Espinosa, 2001).

Estos diferentes patrones de secreción de citocinas contribuyen a marcadas diferencias en la función de las células Th. La subpoblación Th1 esta implicada en la inmunidad mediada por células, mientras que la Th2 es más efectiva en la regulación

y soporte de la respuesta de células B (Mosmann y Coffman, 1989). También se pueden agrupar en dos grandes categorías: las que participan en mecanismos de inflamación y daño tisular y las que estimulan la hemopoyesis. Pueden dividirse en aquellas involucradas en mecanismos inespecíficos (naturales) de inmunidad; en las que regulan la activación, crecimiento y diferenciación de células linfoides y en las que participan en procesos específicos de inflamación.

Desde el punto de vista de su participación en mecanismos de daño tisular, las citocinas que participan en la inmunidad natural conducen a las células efectoras de la inflamación, primordialmente macrófagos y linfocitos T citotóxicos, a reaccionar en forma inespecífica en respuesta hacia un antígeno, con participación mínima o nula de anticuerpos específicos.

Las células Th2 producen primordialmente las citocinas que regulan la inflamación con especificidad inmunológica, en la que participan los anticuerpos como principales protagonistas. En el curso de una respuesta inmunológica se activan ambos tipos de células pero tiende a existir predominio de una de las dos formas de respuesta, ya que uno y otro tipo de células producen citocinas que mutuamente pueden inhibir sus funciones: el interferón γ , producto de células Th1 inhibe a las células Th2, mientras que la IL-10, producida por las células Th2, inhibe la función de las células Th1. Cuando se pierde el balance entre la actividad de uno y otro tipo de células, estos circuitos inhibitorios determinan que exista predominio franco de uno de los dos tipos de respuesta. Desde el punto de vista inmunológico, la forma de presentación clínica, así como la gravedad de algunas enfermedades, parecerían estar definidas por el tipo de células que predominan. En otras enfermedades infecciosas y en la autoinmunidad, parece tan importante el papel del balance entre las células Th1 y Th2, que se vislumbra su manipulación como herramienta terapéutica a muy corto plazo.

Las células T reguladoras (Tr o Th3) se caracterizan por secretar niveles elevados de IL-10 y TGF- β , con escasa secreción de IL-2, y ausencia de IL-4, es decir, no son Th1 ni Th2, inhiben la producción de IgE (regulada por IL-4) sin afectar la producción de IgG2a modulada por IFN- γ (Rojas-Espinosa, 2001). Se sabe que a

tiempos cortos la IL-10 es necesaria para controlar la inflamación (Foussat, *et al.* 2003)

Linfocitos Th3, a nivel de la mucosa oral parece existir esta tercera vía de desviación del sistema inmune. En ella predomina la síntesis de IgA en detrimento de la IgG (IgG1 e IgG3), típica de la respuesta inmune tipo Th1. Por otra parte, el anticuerpo más importante en la defensa frente a los parásitos es la IgE. Las interleucinas IL-4 e IL-5, procedentes de los linfocitos Th2, son importantes en la reacción inmune mediada por IgE, pero también inducen la producción de IgA. Muy probablemente la discriminación entre respuesta frente a parásitos o frente a antígenos alimentarios incluya mecanismos de regulación cruzada similares a los conocidos para las respuestas Th1/Th2. Los linfocitos T productores de TGF- β o linfocitos Th3, pueden ser las células que promueven la síntesis de IgA en la mucosa. El factor TGF- β inhibe la producción de IgE inducida por IL-4; y el IFN- γ , producidos por Th1y en conjunto también con el TGF- β inhiben la producción de esta IgE (Lorente, *et al.* 1998).

2) PAPEL DE LAS CITOCINAS

Las citocinas son péptidos o glicoproteínas con peso molecular de 5-70 000 daltones (Da), que actúan como moléculas de señalización a muy baja concentración (picomoles ó femtomoles) y como mediadores de reacciones infecciosas e inflamatorias. Muchas citocinas ejercen su acción localmente, sin embargo, las de mayor importancia clínica actúan a nivel sistémico con efectos pleiotrópicos (efecto sobre diversos tipos celulares) (Velázquez, 2001)

Estos mediadores modulan las reacciones inmunológicas, así como la participación de otras células y sistemas durante el curso de una respuesta inmunitaria. A pesar de que son muchas y muy diversas las proteínas que se designan como citocinas, comparten ciertas propiedades que les permiten agruparse como tales y que son las siguientes:

- 1) se producen durante la fase efectora de la inmunidad, específica o inespecífica, desencadenan mecanismos inflamatorios y de autoregulación;
- 2) su secreción se autolimita y es de corta duración;
- 3) diversos tipos celulares pueden producir muchas citocinas individuales;

- 4) pueden actuar sobre distintas células u órganos blanco
- 5) pueden tener diversos efectos sobre una misma célula blanco
- 6) sus efectos pueden ser redundantes, es decir, varias citocinas pueden tener el mismo efecto sobre las mismas células
- 7) con frecuencia influyen en la síntesis y en los efectos de otras citocinas
- 8) análogamente a otras hormonas proteicas, sus efectos se inician cuando son captadas por un receptor específico en la membrana de las células blanco
- 9) la expresión de dichos receptores se regula por diversas señales, incluyendo a otras citocinas
- 10) la mayoría de las respuestas a citocinas implican la biosíntesis de novo de mRNA y proteínas,
- 11) para muchas células blanco, las citocinas actúan como reguladores de la división celular, es decir, como factores de crecimiento (Velásquez, 2001).

Las citocinas son mensajeros químicos u hormonas extremadamente potentes, a pesar de que actúan a concentraciones muy bajas. Son muy específicas, actúan sobre la célula diana gracias a su afinidad por los receptores de membrana.

La actuación de las citocinas es semejante a las de las hormonas, y están implicadas en la respuesta inmune innata o natural mediante la activación de los macrófagos y de las células NK induciendo procesos inflamatorios y quimiotácticos, así como en la respuesta inmune adquirida, tanto humoral como celular, actuando sobre los linfocitos T y los linfocitos B y facilitando la comunicación entre las diferentes poblaciones celulares (Velásquez, 2001).

Durante la respuesta inmune las citocinas transmiten señales a los diferentes tipos celulares; entre los principales tipos de citocinas se encuentran los interferones (IFN) que evitan la diseminación de algunas infecciones víricas, las interleucinas (IL) que fundamentalmente inducen la diferenciación y multiplicación de algunas células, los factores estimulantes de las colonias (CSF) que intervienen en la diferenciación y multiplicación de las células madre de la médula ósea, los factores de necrosis tumoral (TNF) o el factor transformador del crecimiento (TGF).

El análisis y cuantificación de las citocinas ha llegado a ser un procedimiento obligado en la investigación (Carson y Vignali, 2002).

Dentro de las citocinas producidas por las células Th1, el IFN- γ desempeña un papel importante por ser la citocina con mayor capacidad activadora de macrófagos. Los macrófagos parasitados por microorganismos responden al efecto del IFN- γ produciendo TNF- α que es un promotor de la síntesis de óxido nítrico mediante la síntesis de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS). El -NO es un metabolito tóxico para los microorganismos intracelulares.

La IL-4 se identificó por primera vez en 1982 y se le asignó la capacidad de inducir proliferación en las células B. La mayor fuente de esta interleucina son las células T cooperadoras cuando se estimulan por un antígeno, aunque también se produce por las células T CD4+, CD8+, CD4-CD8-, y células NK. Su producción se puede suprimir por la presencia del TGF- β . Es un importante regulador del desarrollo de timocitos (Smith, 1986); induce la diferenciación de células dendríticas (Kronenberg, 1991). Además ejerce un papel decisivo en la coordinación de la respuesta inmune y en la fisiología del intestino, ya que puede inducir respuestas inmunes protectoras contra parásitos particularmente helmintos (Kruse, 1993); tiene un papel importante en la regulación de la producción de anticuerpos, en la hematopoyesis, en la inflamación, y en el desarrollo de respuestas inmunes en las células T efectoras (Velásquez, 2001).

| Respuesta | citocina | Función principal |
|-----------|---------------|--|
| Th1 | IFN- γ | Diferenciación de células T citotóxicas. Inhibe la función de Th2. Favorece la producción de IgG2a por Lc B. |
| | IL-2 | Induce la proliferación de células T citotóxicas. |
| Th2 | IL-3 | Activa progenitores hematopoyéticos. |
| | IL-4 | Promueve el crecimiento de células B, la expresión de VCAM-1, en endotelios, inhibe la función de Th1 al bloquear RIL-2 y la producción de IFN- γ . Induce CD8 sobre CD4, aumenta la actividad citotóxica y en células B la producción de IgG1. |
| | IL-6 | Promueve la diferenciación de células B, inhibe la función de Th1. |
| Th3 | IL-10 | Promueve el crecimiento de células T, inhibe la producción de IFN- γ . |
| | TGF- β | Regulador del sistema inmune. |

Tabla 1. Citocinas y sus principales funciones.

La IL-10, se identificó inicialmente como un factor producido por clonas de células T cooperadoras tipo-2 (Th2) con capacidad de inhibir la producción de citocinas tipo Th1 cuando estas eran estimuladas por antígenos. También la producen monocitos/macrófagos, linfocitos B, queratinocitos y otros varios tipos celulares. Es la citocina inmunosupresora por excelencia, inhibe la síntesis de muchas otras citocinas, como el IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-12, y la expresión de MHC-II y moléculas de adhesión en monocitos. También tiene efectos antiproliferativos sobre muchos tipos celulares. La IL-10 ejerce además múltiples actividades inmunomoduladoras. Regula las funciones mediadas por linfocitos B induciendo la síntesis de IgG.

El TGF- β , factor de crecimiento transformante beta es un potente regulador del sistema inmune, de la proliferación y diferenciación celular y de la síntesis de la matriz extracelular. El TGF- β pertenece a una familia de 5 proteínas que se caracterizó inicialmente por su capacidad de promover el crecimiento de células normales, puede inhibir la producción de IL-4.

3) LOS EFECTOS DE LAS DE LAS PROTEÍNAS Cry DE *Bacillus thuringiensis*

Bacillus thuringiensis es una bacteria Gram positiva del suelo que produce cuerpos de inclusión paraesporales compuestos por una o mas δ -endotoxinas conocidas como proteínas Cry o Cyt (Cannon, 1996) que se encuentran en la naturaleza en forma de cristales, como protoxinas solubles y como toxinas insolubles y son el mayor bactericida utilizado como bioinsecticida. Las protoxinas son las subunidades de los cristales y cuando se tratan con proteasas similares a la tripsina se vuelven tóxicas para invertebrados. Las protoxinas Cry1Ac (pCry1Ac) tienen alto peso molecular (100-140 kDa) y son solubles a pH alcalino. En contraste, las toxinas pCry1Ac tienen peso molecular moderado (70 kDa), son resistentes a proteólisis y estables a pH extremos (Hofte y Whiteley, 1989; Knowles, *et al.* 1991). Las proteínas Cry tienen actividad entomopatogénica de gran importancia económica, por lo cual, se han expresado en vectores como *E.coli* y otros para incrementar su producción y estudiar su funcionalidad, patogenicidad-hospedero y su aplicación industrial como bioinsecticida. La expresión en *E. coli* JM103 (pOS9300) es un buen sistema para la expresión del gen de pCry1Ac de *B. thuringiensis* var. kurstaky HD73, ya que la cantidad producida es considerablemente mayor (284 μ g/ml; 48% de las proteínas

totales) que la del hospedero natural (58 $\mu\text{g/ml}$; 51% de las proteínas totales) (Ge, *et al.* 1990).

Estructura de las toxinas Cry. La protoxina Cry1Ac presenta cinco dominios conservados comunes en la mayoría de las proteínas Cry (Crickmore, *et al.* 1998), el dominio C-terminal que se encuentra en la mayoría de protoxinas no forma parte de la toxina activa (esta región es digerida por proteasas en el intestino medio del insecto), pero se cree que desempeña un papel fundamental en la formación del cristal (Schnepf, *et al.* 1998), mientras que los tres dominios del extremo N-terminal constituyen la forma activa de Cry1Ac. El dominio I que se localiza en la porción N-terminal consiste de siete α -hélices y está involucrado en la inserción a la membrana y en la formación del poro. El dominio II llamado " β -prisma", con tres pliegues simétricos consta de tres β -plegadas, está involucrado en la toxicidad a insectos. El dominio III localizado en el C-terminal está formado por dos β -plegadas antiparalelas y es importante para la especificidad al insecto. Lee (*et al.* 1999) sugiere que Cry1Ac se une al receptor, vía dos dominios diferentes. Los residuos en el dominio III podrían tener un papel importante en la unión inicial al receptor, y el dominio II podría ser el responsable de la unión secundaria e irreversible. Actualmente, existen tres receptores putativos para la toxina Cry1Ac que se han identificado como una N-aminopeptidasa (APN) de 120 kDa (Denolf, *et al.* 1997; Gill, *et al.* 1995; Knight, *et al.* 1994), una N-aminopeptidasa (APN) de 96 kDa (Shitomi, *et al.* 2006) y una proteína similar a caderina de 210 kDa. (Valaitis, *et al.* 1995 y 1997. Francis, *et al.* 1997). Estudios recientes del dominio III de pCry1Ac demostraron que tiene propiedades de lectina la cual se une a un azúcar N-acetilgalactosamina (GalNAc) (De Maagd, *et al.* 1999; Burton, *et al.* 1999).

Mecanismo de acción en invertebrados. La toxina produce sus efectos patológicos por la formación de poros iónicos en la membrana de células epiteliales en el intestino medio del insecto. Las toxinas de la clase Cry1, que son activas contra Lepidópteros, están formadas por protoxinas de 120-130 kDa, las cuales son solubles en el pH alcalino del intestino medio de los Lepidópteros. Después de la solubilización, el procesamiento por proteasas intestinales resulta en una toxina relativamente estable de 60 a 70 kDa. En insectos susceptibles, la toxina madura se une al epitelio intestinal y forma poros en la membrana, que resultan en la lisis de las

células epiteliales y eventualmente en la muerte del insecto (Knowles y Dow, 1993). Cada paso de este mecanismo se puede modular por un insecto en particular y además por la especificidad de la toxina. La solubilización de las protoxinas (la proteína aparece en forma de cristales, antes de la activación por proteasas intestinales) en el C-terminal depende del pH alcalino intestinal que presentan los dípteros y lepidópteros.

ANTECEDENTES

Protoxina Cry1Ac (pCry1Ac) en vertebrados. Las proteínas Cry se han estudiado ampliamente desde hace mucho tiempo para evaluar su actividad bioinsecticida pero sus propiedades inmunológicas en vertebrados han sido poco estudiadas a pesar de la homología de *B. thuringiensis* con la especie patógena de *B. cereus* (Zahner, *et al.* 1989). También se ha sugerido que la actividad antitumoral de estas proteínas contra el sarcoma de Yoshida posiblemente se deba a su capacidad de incrementar la inmunidad general (Prasad y Shethna, 1975).

Mayes *et al.*, (1989), realizaron estudios de toxicidad presentados por la US Environmental Protection Agency en donde probaron preparados de *B. thuringiensis* que contenían altas concentraciones de proteínas Cry y encontraron que estos no presentaban efectos adversos sobre ratas y ratones de laboratorio y no inducían inflamación intestinal cuando se administraban de forma oral.

Por estudios previos de Vázquez-Padrón y Moreno-Fierros, se sabe que la protoxina Cry1Ac (pCry1Ac) recombinante, clonada a partir de *B. thuringiensis* es altamente inmunogénica y posee efectos adyuvantes tanto a nivel sistémico como de mucosas; al menos tan potentes como los de la toxina del cólera (CT). Vázquez-Padrón, *et al.* 1999 demostraron que mediante una inmunización sistémica a ratones y conejos con la pCry1Ac coadministrada con el adyuvante completo de Freund se inducían altas respuestas de anticuerpos en suero. En estudios posteriores se demostró que la pCry1Ac en sus formas soluble y cristalina administrada oral (o) e intraperitonealmente (ip) (Vázquez-Padrón, *et al.* 1999) intranasal (in) y rectal (r) (Moreno-Fierros, *et al.* 2000) induce altas respuestas de anticuerpos a nivel intestinal y sistémico. Por la vía ip las dos formas de la pCry1Ac indujeron altas respuestas de anticuerpos en suero, intestino delgado y grueso, sin embargo por la vía oral ambas

formas indujeron respuestas sistémicas pero solo la forma soluble indujo respuesta inmune en mucosas. Los títulos de anticuerpos en suero fueron mayores a los producidos por la toxina del cólera (CT). Además, por las vías in y r se indujeron altas respuestas de anticuerpos en suero y en las diferentes secreciones vaginales, intestinales y de tracto respiratorio; aunque, el isotipo y la magnitud de las respuestas varia dependiendo de la ruta y de la secreción analizada. Las rutas in e ip indujeron mayores respuestas que por la ruta rectal.

La coadministración IP y O de la pCry1Ac con albúmina sérica bovina (BSA) y el antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg) aumenta principalmente la respuesta de IgG sérica e intestinal. Los efectos adyuvantes de la pCry1Ac se compararon con los producidos por la CT considerada como el más potente inmunógeno y adyuvante de mucosas. En general la pCry1Ac presenta más efectos adyuvantes sobre la respuesta anti-BSA. Por otra parte se ha demostrado que cuando la CT se coadministra con proteínas solubles no inmunogénicas incrementa la respuesta de IgA en mucosas y de IgG sistémica, sin embargo, en otros estudios se ha encontrado que los efectos adyuvantes de la CT (Wilson, *et al.* 1990) y de la pCry1Ac (Vázquez-Padrón, *et al.* 1999) no son universales ya que sus propiedades adyuvantes dependen de la ruta de inmunización, del antígeno coadministrado, y del sitio analizado.

En el 2005, Resendiz-Albor determinó diferencias en linfocitos intraepiteliales y de lamina propia de ambos intestinos, al determinar las poblaciones de linfocitos presentes encontró la presencia de una gran proporción de linfocitos B y linfocitos CD8+TCR $\alpha\beta$ + en LPL de IG, mientras que en el ID se encontraba una gran proporción de linfocitos T CD4+ TCR $\alpha\beta$ +. Además, analizó la presencia de células T que espontáneamente producían IL-2, IFN- γ e IL-4, aunque para IL-10 encontró una baja expresión; además encontró diferencias en la producción de estas citocinas en los diferentes compartimentos (IEL y LPL ambos intestinos),

La mayoría de los agentes infecciosos penetran al organismo a través de las superficies mucosas del tracto gastrointestinal, respiratorio y genitourinario, por lo que se requiere desarrollar estrategias de vacunación que induzcan respuestas inmunes protectoras en los sitios mucosos donde invaden los patógenos. Sin

embargo la organización y regulación de la inmunidad en mucosas es más compleja de lo que inicialmente se pensó, ya que está altamente compartimentalizada por lo que para tratar de dilucidar como lograr inducir y regular las respuestas inmunes protectoras en los sitios adecuados dependiendo de los sitios de infección de los diferentes patógenos hacen falta mucho más estudios, que tomen en consideración las diferencias regionales del sistema inmune de mucosas. Por lo tanto es importante evaluar en linfocitos de distintos compartimentos mucosos las respuestas inmunes efectoras.

Es importante estudiar nuevos adyuvantes capaces de estimular la respuesta inmune en mucosas, que no sean tóxicos para humanos, que sean estables y de bajos costos que puedan aplicarse por vías mucosas. Las proteínas Cry1Ac de *Bacillus thuringiensis*: reúnen estas características; ya que presentan alta resistencia a proteólisis, son estables en pH alcalino, no son tóxicas en vertebrados y sus costos de producción son bajos. Además en reportes previos del laboratorio hemos demostrado que la protoxina Cry1Ac recombinante es altamente inmunogénica y posee efectos adyuvantes tan potentes como los de la toxina del cólera tanto a nivel mucoso como sistémico. Además hemos encontrado también que la pCry1Ac tiene un papel adyuvante protector en un modelo de meningoencefalitis amibiana primaria en ratón. Para definir la utilidad de pCry1Ac como adyuvante vacunal es necesario comprender cuales son las bases celulares del mecanismo inmunogénico y adyuvante de pCry1Ac en las superficies mucosas y tomando en cuenta que la mayoría de los adyuvantes ejercen al menos parte de su actividad adyuvante a través de la inducción de citocinas, pretendimos tratar de comprender las bases celulares del mecanismo inmunogénico y adyuvante de pCry1Ac, en este trabajo para contribuir al conocimiento de la descripción y función del sistema inmunitario de las mucosas, realizamos la caracterización de los efectos inmunomoduladores de pCry1Ac en linfocitos aislados de diferentes compartimentos de mucosas analizando el patrón de citocinas inducido por la estimulación con pCry1Ac como una forma de evaluar las respuestas funcionales de los linfocitos.

Las citocinas producidas durante la respuesta inmune transmiten señales entre diferentes tipos celulares y actúan como mediadores de la respuesta inmune, así mismo, el microambiente que producen estas citocinas es importante para establecer

el tipo de respuesta que induce la pCry1Ac; ya que las citocinas de tipo Th1 son importantes promotores de la respuesta inmune mediada por células, mientras que las citocinas Th2 inducen una respuesta mediada por anticuerpos (Trinchieri, 1994); además, como parte de la respuesta contra Ag es necesaria la participación de estas citocinas, las cuales son producidas principalmente por linfocitos T y juegan un papel muy importante en la fase de activación de células T y pueden regular el crecimiento y diferenciación de diferentes poblaciones de linfocitos (De Zubiria, 2000).

Por lo tanto en este trabajo consideramos importante analizar el patrón de citocinas inducido por pCry1Ac, para establecer el tipo de respuesta inducido en los diferentes compartimentos de mucosas

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las citocinas producidas durante la respuesta inmune transmiten señales entre diferentes tipos celulares y actúan como mediadores de la respuesta inmune, así mismo, el microambiente que producen estas citocinas es importante para establecer el tipo de respuesta que induce la pCry1Ac; ya que las citocinas de tipo Th1 son importantes promotores de la respuesta inmune mediada por células, mientras que las citocinas Th2 inducen una respuesta mediada por anticuerpos (Trinchieri, 1994); además, como parte de la respuesta contra Ag es necesaria la participación de estas citocinas, las cuales son producidas principalmente por linfocitos T y juegan un papel muy importante en la fase de activación de células T y pueden regular el crecimiento y diferenciación de diferentes poblaciones de linfocitos (De Zubiria, 2000).

Por lo tanto en este trabajo consideramos importante analizar el patrón de citocinas inducido por pCry1Ac, para establecer el tipo de respuesta inducido en los diferentes compartimentos de mucosas

ANTECEDENTES

Protoxina Cry1Ac (pCry1Ac) en vertebrados. Las proteínas Cry se han estudiado ampliamente desde hace mucho tiempo para evaluar su actividad bioinsecticida pero sus propiedades inmunológicas en vertebrados han sido poco estudiadas a pesar de la homología de *B. thuringiensis* con la especie patógena de *B. cereus* (Zahner, *et al.* 1989). También se ha sugerido que la actividad antitumoral de estas proteínas contra el sarcoma de Yoshida posiblemente se deba a su capacidad de incrementar la inmunidad general (Prasad y Shethna, 1975).

Mayes *et al.*, (1989), realizaron estudios de toxicidad presentados por la US Environmental Protection Agency en donde probaron preparados de *B. thuringiensis* que contenían altas concentraciones de proteínas Cry y encontraron que estos no presentaban efectos adversos sobre ratas y ratones de laboratorio y no inducían inflamación intestinal cuando se administraban de forma oral.

Por estudios previos de Vázquez-Padrón y Moreno-Fierros, se sabe que la protoxina Cry1Ac (pCry1Ac) recombinante, clonada a partir de *B. thuringiensis* es altamente inmunogénica y posee efectos adyuvantes tanto a nivel sistémico como de mucosas; al menos tan potentes como los de la toxina del cólera (CT). Vázquez-Padrón, *et al.* 1999 demostraron que mediante una inmunización sistémica a ratones y conejos con la pCry1Ac coadministrada con el adyuvante completo de Freund se inducían altas respuestas de anticuerpos en suero. En estudios posteriores se demostró que la pCry1Ac en sus formas soluble y cristalina administrada oral (o) e intraperitonealmente (ip) (Vázquez-Padrón, *et al.* 1999) intranasal (in) y rectal (r) (Moreno-Fierros, *et al.* 2000) induce altas respuestas de anticuerpos a nivel intestinal y sistémico. Por la vía ip las dos formas de la pCry1Ac indujeron altas respuestas de anticuerpos en suero, intestino delgado y grueso, sin embargo por la vía oral ambas formas indujeron respuestas sistémicas pero solo la forma soluble indujo respuesta inmune en mucosas. Los títulos de anticuerpos en suero fueron mayores a los producidos por la toxina del cólera (CT). Además, por las vías in y r se indujeron altas respuestas de anticuerpos en suero y en las diferentes secreciones vaginales, intestinales y de tracto respiratorio; aunque, el isotipo y la magnitud de las respuestas varía dependiendo de la ruta y de la secreción analizada. Las rutas in e ip indujeron mayores respuestas que por la ruta rectal.

La coadministración IP y O de la pCry1Ac con albúmina sérica bovina (BSA) y el antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg) aumenta principalmente la respuesta de IgG sérica e intestinal. Los efectos adyuvantes de la pCry1Ac se compararon con los producidos por la CT considerada como el más potente inmunógeno y adyuvante de mucosas. En general la pCry1Ac presenta más efectos adyuvantes sobre la respuesta anti-BSA. Por otra parte se ha demostrado que cuando la CT se coadministra con proteínas solubles no inmunogénicas incrementa la respuesta de IgA en mucosas y de IgG sistémica, sin embargo, en otros estudios se ha encontrado que los efectos adyuvantes de la CT (Wilson, *et al.* 1990) y de la pCry1Ac (Vázquez-Padrón, *et al.* 1999) no son universales ya que sus propiedades adyuvantes dependen de la ruta de inmunización, del antígeno coadministrado, y del sitio analizado.

En el 2005, Resendiz-Albor determinó diferencias en linfocitos intraepiteliales y de lamina propia de ambos intestinos, al determinar las poblaciones de linfocitos presentes encontró la presencia de una gran proporción de linfocitos B y linfocitos CD8+TCR $\alpha\beta$ + en LPL de IG, mientras que en el ID se encontraba una gran proporción de linfocitos T CD4+ TCR $\alpha\beta$ +. Además, analizó la presencia de células T que espontáneamente producían IL-2, IFN- γ e IL-4, aunque para IL-10 encontró una baja expresión; además encontró diferencias en la producción de estas citocinas en los diferentes compartimentos (IEL y LPL ambos intestinos),

La mayoría de los agentes infecciosos penetran al organismo a través de las superficies mucosas del tracto gastrointestinal, respiratorio y genitourinario, por lo que se requiere desarrollar estrategias de vacunación que induzcan respuestas inmunes protectoras en los sitios mucosos donde invaden los patógenos. Sin embargo la organización y regulación de la inmunidad en mucosas es más compleja de lo que inicialmente se pensó, ya que está altamente compartimentalizada por lo que para tratar de dilucidar como lograr inducir y regular las respuestas inmunes protectoras en los sitios adecuados dependiendo de los sitios de infección de los diferentes patógenos hacen falta mucho más estudios, que tomen en consideración las diferencias regionales del sistema inmune de mucosas. Por lo tanto es importante

evaluar en linfocitos de distintos compartimentos mucosos las respuestas inmunes efectoras.

Es importante estudiar nuevos adyuvantes capaces de estimular la respuesta inmune en mucosas, que no sean tóxicos para humanos, que sean estables y de bajos costos que puedan aplicarse por vías mucosas. Las proteínas Cry1Ac de *Bacillus thuringiensis*: reúnen estas características; ya que presentan alta resistencia a proteólisis, son estables en pH alcalino, no son tóxicas en vertebrados y sus costos de producción son bajos. Además en reportes previos del laboratorio hemos demostrado que la protoxina Cry1Ac recombinante es altamente inmunogénica y posee efectos adyuvantes tan potentes como los de la toxina del cólera tanto a nivel mucoso como sistémico. Además hemos encontrado también que la pCry1Ac tiene un papel adyuvante protector en un modelo de meningoencefalitis amibiana primaria en ratón. Para definir la utilidad de pCry1Ac como adyuvante vacunal es necesario comprender cuales son las bases celulares del mecanismo inmunogénico y adyuvante de pCry1Ac en las superficies mucosas y tomando en cuenta que la mayoría de los adyuvantes ejercen al menos parte de su actividad adyuvante a través de la inducción de citocinas, pretendimos tratar de comprender las bases celulares del mecanismo inmunogénico y adyuvante de pCry1Ac, en este trabajo para contribuir al conocimiento de la descripción y función del sistema inmunitario de las mucosas, realizamos la caracterización de los efectos inmunomoduladores de pCry1Ac en linfocitos aislados de diferentes compartimentos de mucosas analizando el patrón de citocinas inducido por la estimulación con pCry1Ac como una forma de evaluar las respuestas funcionales de los linfocitos.

OBJETIVO GENERAL

Determinar si la protoxina Cry1Ac de *Bacillus thuringiensis* induce o modifica el patrón de citocinas en linfocitos de distintos compartimentos de mucosa mediante RT-PCR.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Aislar y determinar las poblaciones de linfocitos presentes en cada uno de los sitios de estudio en animales control e inmunizados i.p. con pCry1Ac.
2. Analizar la expresión semicuantitativa de mRNA's de citocinas constitutivas e inducidas por pCry1Ac en linfocitos de distintos compartimentos, mediante RT-PCR.
 - 2.1. Determinar la expresión constitutiva de citocinas en linfocitos de distintos compartimentos de mucosas.
 - 2.2. Determinar si el tratamiento *in vivo* con la pCry1Ac induce o modifica el patrón de citocinas en linfocitos en distintos compartimentos de mucosas.
 - 2.3. Determinar la producción de citocinas que es inducido tras un estímulo *in vitro* con pCry1Ac en linfocitos de animales no inmunizados.
 - 2.4. Determinar que patrón de citocinas induce el estímulo *in vitro* con pCry1Ac en linfocitos de animales previamente inmunizados.

Objetivo complementario

Determinar *in vitro* la presencia de proliferación celular en distintos compartimentos de mucosas, en ausencia y presencia de un estímulo o re-estímulo con la pCry1Ac.

HIPOTESIS

La inmunización intraperitoneal con la protoxina Cry1Ac modificará la expresión de citocinas Th1 (IFN- γ) Th2 (IL-4) e inmunomoduladoras (IL-10 y TGF- β), producidas principalmente por células T, generando un microambiente diferente para las células residentes en cada uno de los diversos sitios de las mucosas, lo que les permitirá responder de manera diferencial en cada compartimento, según el efecto de las citocinas que se expresen.

3. METODOLOGÍA

3.1. Producción y Purificación de la pCry1Ac a partir de *E. coli*

La protoxina Cry1Ac se obtuvo a partir de una cepa recombinante de *E. coli* JM103 (pOS4201) donada por el Dr. Donald Dean de la Ohio State University (Columbus, EEUU), el cultivo se mantuvo en agitación constante a 37°C durante 48 h en medio Luria-Bertani (LB) al cual se le adicionó ampicilina (50 µg/ml) y Kanamicina (30 µg/ml). La síntesis de pCry1Ac se indujo con 300µl isopropil β-D-tiogalactopiranosido (IPTG) 1 mM por litro manteniendo el cultivo en agitación a 37°C hasta que la absorbancia a 540 nm (A₅₄₀) de una muestra del cultivo fue de 0.5-1.0, en ese momento se cosecharon las bacterias por centrifugación a 12,000 rpm por 20 min a 4°C, la pastilla resultante se lavó dos veces con 50 ml de buffer TE (Tris-HCl 50 mM, EDTA 10 mM, pH 8.0). Posteriormente se incubaron a 37°C durante 1 h con 4 mg de lisozima y se sonicaron (Fisher Sonic Dismembrator modelo 300) durante 5 min por tres ocasiones mientras se mantenían en hielo, para promover la ruptura de las bacterias y liberar los cuerpos de inclusión que se recuperaron por centrifugación a 10,000 rpm por 20 min a 4°C, se resuspendió la pastilla en 50 ml de NaCl 0.5 M y Tritón X-100 1 %, se centrifugó a 10 000 rpm por 15 min a 4°C, se resuspendió la pastilla en 50 ml de NaCl 0.5 M y Tritón X-100 al 1% se centrifugó a 10,000 rpm por 15min a 4° C, nuevamente se resuspendió la pastilla en 50 ml de NaCl 0.5 M, se centrifugó a 10,000 rpm por 15 min a 4°C, y se resuspendió en 30ml de H₂O estéril fría, se centrifugó a 10,000 rpm por 15 min a 4°C, se solubilizó la pastilla en 10 ml de buffer de carbonatos 0.1 M pH 9.6 y 50 µl de mercaptoetanol 30 min a 37°C en agitación, por último se centrifugó a 10,000 rpm 15 min a 4°C, se recuperó el sobrenadante y se almacenó a 4°C y la concentración de proteínas se determinó por el método de Bradford (1976) mediante una curva tipo de proteínas empleando albúmina sérica bovina como estándar y se calculó la concentración de proteínas (0.05<A₆₂₀<0.5). Las muestras problema se analizaron por duplicado.

3.2. Análisis de la pureza de la proteína

La pureza se determinó mediante una electroforesis en un gel de SDS-PAGE (Laemmli, 1970) para separar la proteína en función de su tamaño. Las muestras de la pCry1Ac se sometieron a electroforesis SDS-PAGE, en condiciones reductoras que le confirieron carga negativa permitiendo su separación en una matriz de

poliacrilamida cuando se aplica un campo eléctrico. Se utilizó el sistema de electroforesis Miniprotean II (Bio-Rad), con geles de SDS-poliacrilamida de dos fases: un gel concentrador (stacking) de baja porcentaje de acrilamida (5%), que distribuyó las proteínas de las muestras antes de su separación, y un gel separador (*running*) con un mayor porcentaje de acrilamida 10% (acrilamida mezcla 30%, buffer Tris-HCl pH 8.8, SDS 0.1%, persulfato de amonio 10%, TEMED), que separó las proteínas en función de su peso molecular.

Se realizó una mezcla de la muestra de proteínas con el buffer de carga 2X que contenía 250 mM Tris-HCl (pH 8.0), 50% glicerol, 10% SDS, 0.05 azul de bromofenol, 2% DTT, 1 mM 13-mercaptoetanol (Sigma). Se hirvió la mezcla durante 5 min y se dejó enfriar por 5 min antes de cargar 10 µl por pozo, en el gel se cargó también un marcador de peso molecular preteñido de BioRad para determinar el peso de la proteína (albúmina sérica bovina 68000; ovoalbumina; anhidrasa carbónica 29000; 13-galactosidasa 18400 y lisozima 14300 kDa). La electroforesis vertical se realizó empleando el tampón de corrida de Laemmli (25 mM Tris.HCl, 192 mM glicina, 0.1% SDS en agua MilliQ). Se prepararon geles de 80x73x0.75 mm con poliacrilamida al 10%, se montaron en una cámara de electroforesis (Mini-Protean II, Bio-Rad) conectada a una fuente de poder (Bio-Rad, Modelo 1000/500). Se inició la electroforesis a 90 V y aproximadamente después de 30 min, hasta que el colorante indicador llegó a 0.5 cm del extremo inferior del gel separador. El gel se colocó en un recipiente con colorante (0.259 g de azul de Coomassie R-250, 125 ml de metanol, 50 ml de ácido acético glacial, 325 ml de H₂O) por toda la noche, se lavaron con solución desteñidora rápida (45% de metanol, 45% de H₂O, 10% ácido acético) por 25 min. Las imágenes de los geles teñidos se capturaron en un digitalizador de imágenes (Alpha Imagen) para determinar la presencia de una banda de proteína y el peso de la pCry1Ac.

3.3. Ruta y esquema de inmunización

La inmunización se realizó en ratones hembra de 8-10 semanas que fueron mantenidos libres de pirógenos, con agua y alimento (Lab diet 5015, OMI Nutrition International) y microchips como material de cama. Las inmunizaciones se realizaron vía intraperitoneal (i.p.) con 50 µg de pCry1Ac en 0.1 ml de PBS por ratón, cada 7

días por tres veces consecutivas y 7 días posteriores a la última inmunización se sacrificaron.

3.4. Obtención de linfocitos de distintos compartimentos de mucosas

Se siguieron distintos protocolos para la obtención de linfocitos de distintos compartimentos según el tejido del cual se extrajeron:

3.4.1. Obtención de linfocitos de bazo

A los individuos sacrificados se les extirpó completamente el bazo (B), que se colocó una caja de Petri con 10 ml de media RPMI-1640 se tamizó en una rejilla metálica de 5 x 5 cm con una abertura de 1 mm y se disgregó con el émbolo de una jeringa para separar los componentes celulares y se recuperó la suspensión celular, que se filtró en tela de organza de 10 x 10 cm con una abertura de 1 mm el filtrado se recuperó en tubos cónicos de 15 ml. La suspensión celular se dejó reposar por 10 min a 4°C, al cabo de los cuales se recuperó el sobrenadante por decantación y se eliminaron los eritrocitos (la pastilla roja). El sobrenadante se centrifugó a 2500 rpm a 4°C por 10 min y la pastilla celular se resuspendió en 4 ml de Percoll al 40% con 200 µl de suero fetal bovino (FBS).

3.4.2. Obtención de linfocitos de placas de Peyer (PP)

Se extirpó el intestino tanto grueso (IG) como el delgado (ID) de este último se removieron cuidadosamente las placas de Peyer (PP) y se colocaron en cajas Petri con 5 ml de medio RPMI-1640; posteriormente se tamizaron en una rejilla de metal de 5x5 cm con una abertura de malla de 1 mm y se disgregaron con el émbolo de una jeringa, la suspensión celular se filtró con organza de 10 x 10 cm con una abertura de 1 mm y recuperó en tubos cónicos de 15 ml. Se centrifugó la muestra a 2500 rpm por 10 min a 4°C, se removió el sobrenadante y la pastilla resultante se resuspendió en 4 ml de Percoll al 40% con 200 µl de FBS.

3.4.3. Obtención de linfocitos intraepiteliales de intestino grueso, delgado y tracto genital (TRF)

Una vez obtenidos los intestinos se lavaron con 5 ml de RPMI-1640 desechando el contenido intestinal, se expuso el lumen y se colocan en tubos cónicos de 50 ml con RPMI+EDTA+DTT 10 ml por intestino, para vagina se empleó íntegro el

aparato reproductor femenino, una vez extraídas se cortaron en dos extremos para exponer la mucosa, los tejidos se incubaron por 30 min a 37°C en agitación para obtener los linfocitos intraepiteliales, adicionalmente se agregaron 200 µl de suero por intestino para mantener vivos los linfocitos. Los tubos se mantuvieron en agitación a 300 rpm durante la incubación, la suspensión celular (liquido obtenido) se filtró con organza de 5X5 cm con malla de 1 mm en un tubo cónico de 50 ml y se centrifugaron a 2500 rpm a 4°C por 10 min para obtener una pastilla que se sometió a gradiente de Percoll como se indica posteriormente.

3.4.4. Obtención de linfocitos de lámina propia de intestino grueso, delgado y tracto genital (TRF)

Posterior a la obtención de linfocitos intraepiteliales, los intestinos se colocaron en cajas Petri con medio RPMI-1640 en donde se lavaron para eliminar el exceso de EDTA, los intestinos lavados se colocaron de nuevo en tubos cónicos de 50 ml con 10 ml de colagenasa (colagenasa 13.3 mg, RPMI-1640 100 ml, 200 µl suero a pH 7.4), se incubaron nuevamente por 30 min a 37°C en agitación constante para obtener los linfocitos de la lámina propia. Una vez transcurrida la incubación se extrajeron los intestinos y se lavaron con RPMI-1640 la suspensión celular (liquido obtenido) se filtró con fibra de vidrio y se recupero en un tubo cónico de 50 ml, se adicionaron 200 µl de suero y se centrifugó a 2500 rpm a 4°C por 10 min para obtener una pastilla que se sometió a gradiente de Percoll.

Nota: Para las muestras del TRF aunque se realizaron obtención de ambos linfocitos, intraepiteliales y de lamina propia, estos se reunieron en una sola muestra debido a su bajo número de células.

3.5. Gradientes de separación de linfocitos

Las muestras resuspendidas en 4ml de Percoll al 40% se colocaron en tubos cónicos de 15 ml que contenían 4 ml de Percoll al 75% y se centrifugaran a 2500 rpm por 25 min. Se recuperó la interfase por aspiración con una pipeta Pasteur y se coloco en tubos cónicos que contenían 200 µl de suero y se llevaron a 10 ml con medio RPMI-1640, se centrifugaron inmediatamente a 2500 rpm 4°C por 10 min, se desechó el sobrenadante y se agregaron 200 µl de suero por muestra y 1 ml de medio RPMI-1640.

3.6. Conteo y viabilidad celular

Para conocer el número de células obtenidas se realizaron conteos celulares en cámara de Neubauer, se resuspendieron perfectamente las muestras y se tomó una alícuota de 10 μ l que se mezcló con 10 μ l de azul Tripano para obtener el número de células viables. El azul tripano es un colorante vital que penetra en la célula cuando estas presentan la membrana dañada (células no viable) y permanece en el exterior en células viables. Las células vivas (células brillantes) que se observaron en el microscopio, se contaron y se les aplicó la fórmula siguiente:

$$\frac{\text{Número de células vivas}}{\text{Superficie de recuento (mm) X profundidad (mm) X}} = \# \text{ de células/mL de muestra}$$

El resultado se empleó para determinar el # de células/mL y finalmente estas se ajustaron a 1×10^6 o 5×10^6 células por mililitro, según el requerimiento.

Nota: Solo se emplearon los valores de células viables para el ajuste.

3.7. Citometría de flujo

Para el análisis de inmunofluorescencia FAC's se emplearon anticuerpos monoclonales (Becton Dickinson Technologies) α CD3-FITC, α CD3-PerCP, α CD45RO-PE, α CD4-FITC, α CD8-PE, como control de isotipos para determinar la autofluorescencia se emplearon IgG2a-PE e IgG2b-FITC. Para realizar la tinción se centrifugaron 500,000 células a 2500 rpm por 10 min a 4°C, para posteriormente decantar el sobrenadante y obtener una pastilla celular, los anticuerpos utilizados se diluyeron a una concentración de 0.2 μ g/ 1×10^6 células en PBA (PBS adicionado con 1% de Albúmina) para favorecer la tinción, se incubaron por 30 min a 4°C en oscuridad, se lavaron con 1 mL de PBA para eliminar los anticuerpos no adheridos, se centrifugaron a 2500 rpm 10 min a 4°C y se fijaron con 300 μ l de paraformaldehído al 4% disuelto en PBS.

El análisis de citometría de flujo se realizó utilizando la combinación de 2 o 3 fluorocromos por muestra en un citómetro FAC's Calibur (Becton Dickinson) equipado con un láser de argón. Se adquirieron 100,000 eventos por muestra y se determinaron las poblaciones celulares positivas a cada uno de los marcadores empleados con respecto al grupo control de isotipo. Los datos se analizaron con el

programa CellQuestPro (Becton Dickinson), el programa calculó los porcentajes de células positivas y negativas a cada marcador de acuerdo a la intensidad de fluorescencia relativa. Los datos obtenidos se realizaron por triplicado. Se calculó la proporción de CD4/CD8 para determinar una posible redistribución de las poblaciones celulares, ya que una disminución de los ratios de CD4/CD8 se presenta en los procesos inflamatorios agudos y severos e involucra una extravasación masiva de los linfocitos a los tejidos inflamados y a los órganos linfoides secundarios asociados.

3.8. Cultivos celulares y estimulación *in vitro*

Para la estimulación (ratones no inmunizados) y re-estimulación *in vitro* (ratones previamente inmunizados) se ajustaron las células a una concentración de 1×10^6 células/ml de medio RPMI-1640 estéril y se colocaron en placas de cultivo de 24 pozos, un mililitro por pozo, para obtener cinco pozos por muestra; se les agregó a cada pozo 10 μ g de pCry1Ac para estimular o re-estimular las células según el caso y se incubaron en condiciones de esterilidad por cuatro horas a 37°C con 5% de CO₂.

3.9. Extracción RNA total de linfocitos

El RNA total se utilizó para determinar los efectos en la transcripción de las citocinas en los diferentes compartimentos de mucosas al inmunizar vía i.p. con 50 μ g de pCry1Ac. Se obtuvieron muestras celulares de cinco individuos, para obtener un total de 5×10^6 células de cada grupo de muestras: no inmunizados (**Control**), inmunizados (**Cry i.p.**), cultivos estimulados (**Control+Cry**) y re-estimulados (**Cry i.p.+Cry**) *in vitro* se centrifugaron a 1500 rpm durante 10 min se les agregó 1 ml de PBS para lavar las células y eliminar los restos del medio de cultivo que pudieran interferir con la extracción y se centrifugaron nuevamente a 1500 rpm durante 10 min; a cada pastilla linfocitaria de distintos compartimentos (5×10^6 células/ml) se les realizó una extracción del RNA de acuerdo a las especificaciones del kit de extracción AquaPure RNA Blood (BIO-RAD). El procedimiento consistió en lisar las células agregando 900 μ l de RBL *Lysis Solution* a la pastilla celular, se mezcló suavemente para homogenizar, se centrifugó 20 seg a 9,000 rpm, se removió el sobrenadante dejando aproximadamente de 10-20 μ l de solución para resuspender la muestra, se mezcló en vortex para homogenizar, se agregaron 300 μ l de *RNA Solution* y 100 μ l de *Protein-DNA precipitation Solution* para permitir la disociación completa de los complejos nucleoproteicos, se mezcló suavemente varias veces; las muestras se

mantienen en hielo por 5 min, transcurridos los cuales se centrifugaron a 9,000 rpm por 3 min, las proteínas y el DNA se precipitan, mientras que el RNA permanece en la fase acuosa que se colectó en tubos nuevos que contenían 300 µl de isopropanol al 100% y se mezclaron suavemente hasta que se homogenizó, se centrifugaron a 9,000 rpm durante 3 min, después de esta centrifugación se dejó secar la pastilla translúcida de 10-15 min para después hidratarla con 5 µl de *RNA Hydration Solution* que contiene inhibidor de RNAsas, dejando hidratar por 30 min en hielo y finalmente se almacena a -70°C hasta su uso.

Toda la técnica se realizó en condiciones RNase-free (trabajar con guantes, autoclavar el material y preparar las soluciones necesarias con H₂O DEPC*) para evitar la degradación del RNA.

Nota: H₂O DEPC: agua libre de RNAsas: realizar una dilución 1/500-1/100 de DEPC (dietilpirocarbonato, Sigma) en agua milliQ, en una campana de flujo laminar, agitar de 4 a 16 horas con un agitador magnético y autoclavar dos veces para inactivar los restos de DEPC.

Nota: DEPC es un agente carcinógeno, por este motivo es necesario utilizar guantes y trabajar en una campana de flujo.

3.10. Determinación de la concentración y pureza del RNA

La concentración y pureza del RNA se determinó mediante la lectura espectrofotométrica a 260 y 280 nm. Se puede determinar la concentración de los ácidos nucleicos, considerando que 1 unidad de absorción a 260 nm equivalente 50 µg de DNA de doble cadena por ml y a 40 µg de RNA por ml, mediante las siguientes formulas:

$$[\text{RNA}] = A_{260 \text{ nm}} \times [(40 \text{ } \mu\text{g RNA/ml}) / 1 A_{260 \text{ nm}}] \times 1 \times D$$

Donde, 1= paso de luz de la cubeta en cm (normalmente 1 cm)

D =factor de dilución

A_{260nm}= absorbancia a 260 nm

La relación entre A260nm /A280nm permite determinar la calidad (pureza) de los ácidos nucleicos. Se considera que el RNA puro tiene una relación de 2, y consideramos un buen grado de pureza el intervalo de relaciones comprendidas entre 1.2 y 2 (Sambrook, *et al.*, 1989). La concentración del RNA total se calculó realizando diluciones de 5 µl de RNA en 1 ml de H₂O DEPC en cubetas de cuarzo y se leyeron las muestras en un espectrofotómetro UV a OD260 y OD280 nm y se calculo el radio de las muestras, los radios óptimos se consideraron por arriba de 1.2.

La determinación de la integridad del RNA total se realizó por electroforesis de una alícuota de 5µl en gel de agarosa al 1% con amortiguador de corrida [(0.25% (p/v) azul de bromofenol, 0.25% (p/v) xilen cianol, 30% (p/v) glicerol), el gel se tiñó con bromuro de etidio (0.5 µg/ml) y preparó con TE (Tris-HCl 50 mM, EDTA 10 mM, pH 8.0) como disolvente], se realizó la corrida de electroforesis a 90V, 100 mA por 30 min, las imágenes se analizaron con luz UV y con un fotodocumentador Kodak System 120, una vez asegurada la integridad de la muestra se realizaron alícuotas y se almacenó a -70° C, hasta su posterior utilización.

3.11. Determinación de citocinas por PCR reverso semicuantitativo

Para que la defensa contra el antígeno (Ag) se inicie de manera eficaz es necesaria la participación de las citocinas, que son producidas principalmente por linfocitos T y juegan un papel muy importante en la fase de activación de la respuesta dependiente de células T y pueden regular el crecimiento y diferenciación de diferentes poblaciones de linfocitos (De Zubiria, 2000). Su acción depende del momento de su liberación, del lugar en el que actúan, de la presencia de otros elementos competitivos o sinérgicos, de la densidad de sus receptores y de la capacidad de respuesta de ese tejido a cada citocina (Sánchez, *et al.* 2005).

Para estimar de forma semicuantitativa la abundancia relativa de los transcritos de diferentes mRNA's de citocinas se utilizó una mezcla de PCR de un paso SuperScript First-Strand (Invitrogen) a partir de 3 µg de RNA total se empleó 1 µl de oligo dT₍₁₂₋₁₅₎ 1.5 mM de acuerdo con las recomendaciones de manufactura del producto la reacción de PCR se realizó a un volumen final de 25 µl, con una mezcla de *Buffer de reacción 2X*, 1.5 mM MgCl₂, 2 mM *dNTPs*, 1 U *Taq Platinum DNA polymerase*, 5 U transcriptasa reversa (todos de Invitrogen).

Mediante una búsqueda bibliográfica se seleccionaron los cebadores (amplificadores) empleados, se utilizó como referencia a un control interno (β -actina), las secuencias de los oligonucleótidos que se utilizaron son las siguientes:

| Gen | | Secuencia (5'-3') | Amplicón (pb) | Referencia |
|-----------------|-------------|------------------------------------|---------------|---------------|
| β -actina | Sentido | TGG AAT CCT GTG GCA TCC ATG AAA C | 348 | Ulett, 2000 |
| | Antisentido | TAA AAC GCA GCT CAG TAA CAG TCC G | | |
| IFN- γ | Sentido | AGC GGC TGA CTG AAC TCA GAT TGT AG | 243 | Murray, 1998 |
| | Antisentido | GTC ACA GTT TTC AGC TGT ATA GGG | | |
| IL-4 | Sentido | CGA AGA ACA CCA CAG AGA GTG AGC T | 180 | Murray, 1998 |
| | Antisentido | GAC TCA TTC ATG GTG CAG CTT ATC G | | |
| IL-10 | Sentido | ACC TGG TAG AAG TGA TGC CCC AGG CA | 237 | Ulett, 2000 |
| | Antisentido | CTA TGC AGT TGA TGA AGA TGT CAA A | | |
| TGF- β | Sentido | GCC CTT CCT GCT CCT CAT | 195 | Okamura, 2004 |
| | Antisentido | TTG GCA TGG TAG CCC TTG | | |

Tabla 2. Secuencias empleadas como cebadores para la amplificación por PCR.

La transcripción reversa y la amplificación por PCR se realizaron en un solo paso, utilizando cebadores específicos para amplificar el mRNA de cada citocina. En cada corrida se amplificaban simultáneamente los mRNAs correspondientes al gen constitutivo β -Actina (control interno) y al gen de interés, pudiéndose normalizar las señales obtenidas en cada caso. Los cebadores se resuspendían en agua milliQ para que tuvieran una concentración final de 50 μ M cada uno.

Se preparó una mezcla que contenía todos los componentes necesarios para la reacción, a excepción de los RNAs moldes. Se preparaba una cantidad de mezcla correspondiente a $n+1$ reacciones, siendo n el número de muestras a analizar, se emplearon 3 μ g de RNA molde a cada tubo, de manera que las reacciones tuvieran lugar en un volumen final de 25 μ l ajustados con H₂O tratada con DEPC, las reacciones se mezclaron y se mantuvieron en hielo hasta el momento de que fueran llevadas al termociclador (Eppendorf, Mastercycler gradient) y proceder a la reacción de PCR reverso, utilizando el siguiente programa:

- Transcripción reversa: 60 minutos a 42°C.
- Inactivación de la transcriptasa reversa y activación de las DNA polimerasas: 5 minutos a 95°C.

- Reacción de PCR:
 - Desnaturalización: 1 minuto a 94°C.
 - Alineación: 1 minuto a 56°C.
 - Extensión: 1 minuto a 72°C.Por 30 ciclos

Las amplicones (productos de la amplificación) se resolvieron en un gel de agarosa al 1.2% y se tiñeron con bromuro de etidio, las imágenes se analizaron con luz UV y con un fotodocumentador Kodak System 120, el tamaño e intensidad de las bandas se cuantificó usando el programa Kodak Digital Science ID.

3.12. Ensayos de proliferación

La prueba de proliferación de linfocitos indica la presencia de un mitógeno o la presencia de células específicas que responden a un antígeno *in vitro* y se utiliza para evaluar la inmunidad celular (Ramayo, *et al*, 2005). En el presente trabajo se comparó la proliferación celular obtenidos con el método de CFSE (carboxifluoresceindiacetato succinimidil ester) y el kit de proliferación celular AlamarBLUE™, empleando condiciones de esterilidad y linfocitos obtenidos de LPL ID, IEL ID, IEL IG y bazo.

3.12.1. Ensayo de proliferación mediante kit ALAMARBLUE

El componente principal del ensayo es el resazurin y se basa en reacciones Redox en la cuál al ser metabolizado el resazurin a resorufin mediante el metabolismo celular se transforma en un reactivo fluorescente, esta transformación solo puede ocurrir en células vivas y se llevó acabo al aplicar únicamente al reactivo del kit AlamarBlue (Biosource) al cultivo celular y medir las densidades ópticas (excitación = 530-570 nm, emisión = 590-620 nm). Las células vivas pueden reducir fácilmente este reactivo no toxico y el aumento que resulta de la intensidad de fluorescencia se puede detectar en un espectrofotometro o lector de ELISAS. Las células no viables no tienen capacidad metabólica y no producen la transformación del resazurin, mientras que la intensidad de fluorescencia observada en el ensayo es una medida confiable de las células viables. El reactivo es compatible con la mayoría de medios de cultivo comerciales. Se realizo la lectura de las muestras en un lector de ELISA que se mantuvo en esterilidad a 620nm para determinar la oxidación y a 540nm determinar la reducción.

Se ajustaron los linfocitos obtenidos a una concentración de 1×10^6 células en medio RPMI-1640 adicionado con 10% de SFB y antibióticos (Antibac $1 \mu\text{l}/\text{mL}$), se sembraron $100 \mu\text{l}$ de cada suspensión celular en placas de 96 pozos para obtener un volumen celular de 100,000 células por pozo se sembraron 6 pozos de cada muestra y se le agregaron $100 \mu\text{l}$ de AlamarBlue™ por pozo al 4% en buffer de fosfatos se resuspendieron y se mantuvieron en condiciones de esterilidad por 18 horas a 37°C con 0.5% de CO_2 durante las cuales se realizaron lecturas a intervalos de (0, 2, 4, 11, 18, 21, 23, 40 y 44 horas) a una OD de 620 y 540 nm.

De la misma manera como indica el protocolo se utilizaron pozos en los cuales se agregó únicamente medio de cultivo así como otros que contenían el reactivo y medio de cultivo, para ser empleados como controles internos.

La transformación del resazurin y la proliferación se determinó mediante la ecuación:

$$\frac{(\epsilon_{\text{OX}}) \lambda_2 A \lambda_1 - (\epsilon_{\text{OX}}) \lambda_1 A \lambda_2}{(\epsilon_{\text{RED}}) \lambda_2 A' \lambda_1 - (\epsilon_{\text{RED}}) \lambda_1 A' \lambda_2} \times 100$$

En donde:

$$\lambda_1 = 540\text{nm} \quad \lambda_2 = 620\text{nm}$$

$$(\epsilon_{\text{OX}}) \lambda_1 = 47,619$$

$$(\epsilon_{\text{OX}}) \lambda_2 = 34,798$$

$$(\epsilon_{\text{RED}}) \lambda_1 = 104,395$$

$$(\epsilon_{\text{RED}}) \lambda_2 = 5,494$$

$A \lambda_1$ = lectura de absorbancia de la muestra problema a 540nm

$A \lambda_2$ = lectura de absorbancia de la muestra problema a 620 nm

$A' \lambda_1$ = lectura de absorbancia del control negativo a 540nm

$A' \lambda_2$ = lectura de absorbancia del control negativo a 620nm

Los resultados obtenidos se graficaron para determinar la presencia de proliferación celular a diferentes tiempos de estímulo in vitro, con $10 \mu\text{g}$ de pCry1Ac/millón de células.

3.12.2. Ensayo de proliferación mediante tinción (CFSE)

La tinción con carboxifluoresceinsuccinimidil ester (CFSE) permite hacer un seguimiento de la proliferación celular (Parish, 1999). El carboxifluoresceindiacetato succinimidil ester (CFDA-SE) es una molécula no fluorescente que atraviesa la membrana plasmática por transporte pasivo y se acumula en el citoplasma. Las esterasas intracelulares presentes en el citoplasma de las células viables procesan los grupos carboxilo del CFDA-SE, convirtiéndolo en CFSE que es una molécula fluorescente, el CFSE no puede atravesar la membrana plasmática, por lo que queda retenido en el interior de la célula. Cuando las células teñidas con CFSE se dividen, el colorante se hereda de manera equitativa a las células hijas, por lo que, la intensidad de la fluorescencia se reduce a la mitad en cada generación como consecuencia de la proliferación celular (Fig. 2), pudiéndose analizar mediante citometría de flujo (Holleweguer, J. E. Ernst, D. Guenther, C., 2002)

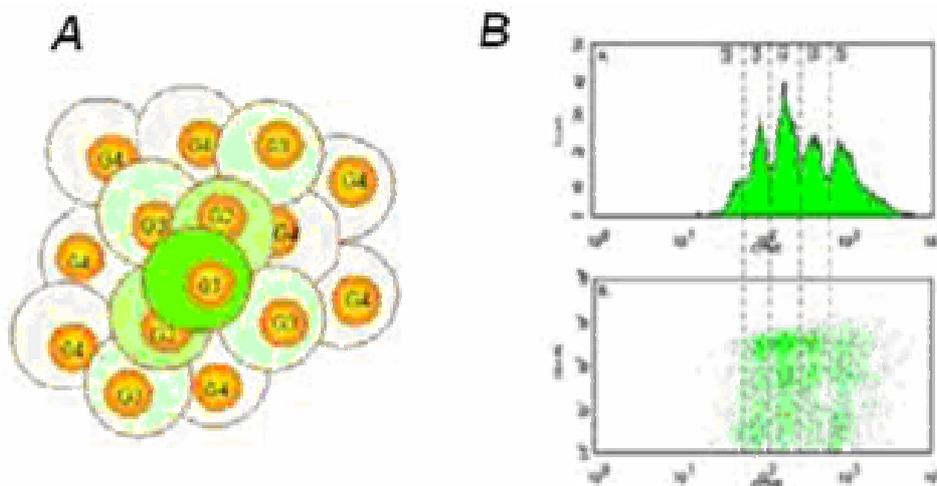


Figura 2. Principio de la tinción con CFSE. A) El CFSE se acumula en el interior de las células y se reduce a la mitad tras cada división celular, B) por lo que esta pérdida en la fluorescencia se puede monitorear en un citómetro de flujo. (Imagen tomada catalogo BD Biosciences Pharmingen, 2002)

Se Ajustaron las células a 1×10^6 células y se resuspendieron en 2 ml de PBS estéril se les añadieron $2 \mu\text{l}$ de CFSE 5 mM por cada ml de PBS (concentración final de $10 \mu\text{M}$), se incubaron durante 10 minutos a 37°C para permitir la incorporación del

CFSE, moviendo los tubos cada 2-3 minutos para hacer uniforme la tinción, posteriormente se añadieron 5 volúmenes de medio RPMI-1640 frío para detener la tinción y se lavaron tres veces con PBS. Se centrifugaron a 2000 rpm 10 min a 4°C y se decantaron conservando la pastilla celular, se agregaron 2 ml de medio RPMI-1640 atemperado y se sembraron en placas de cultivo de 24 pozos que se mantuvieron a 37°C durante 3 días, transcurridos los cuales, se recuperaron las células y se resuspendieron en 1 ml de PBS para lavar, se centrifugaron a 2000 rpm por 10 min, se recuperó la pastilla celular y se fijó con 300 µl de paraformaldehído al 4% y se mantuvieron a 4°C hasta analizar las muestras en un citómetro de flujo FACS Calibur (Becton Dickinson) con el programa Cell Quest Pro.

Se calculó el índice de estimulación de acuerdo a la siguiente fórmula para ambas técnicas.

$$IE = \frac{\text{Media de la muestra} - \text{Media de los controles negativos}}{\text{Media de controles positivos} - \text{Media de los controles negativos}} \times 100 \%$$

3.13. Análisis Estadístico

Dado que la cepa de ratones empleados es singénica los resultados se analizaron mediante una prueba de varianza de *t* para muestras pareadas para determinar las diferencias estadísticamente significativas se empleó el software GraphPad Prisma 3.0 con una significancia estadística menor al 0.05% ($p < 0.05\%$).

4. RESULTADOS

4.1. Obtención de pCry1Ac.

La pCry1Ac se purificó a partir de un litro de medio LB con *E. coli* JM103 del cual obtuvimos un rendimiento de 50mg de la pCry1Ac. El peso molecular de la pCry1Ac purificada (133 KDa) coincidió con el esperado (Adang, *et al.*, 1985) (Fig. 3). La proteína se guardó en alícuotas y se mantuvo en buffer de carbonatos para solubilizarla, la proteína se utilizó en un periodo no mayor a 6 meses para asegurar su integridad.

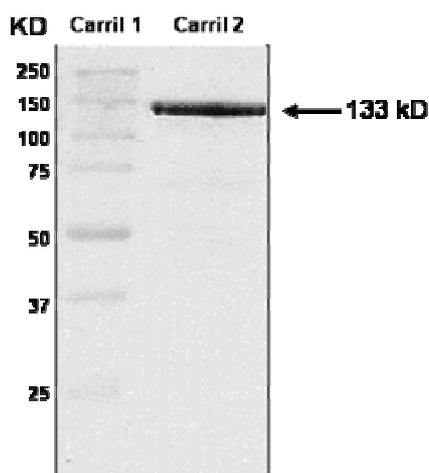


Figura 3. Electroforesis en SDS-PAGE de pCry1Ac purificada. Carril 1, marcadores de peso molecular. Carril 2, pCry1Ac (4 µg).

4.2. Efecto de la administración Intraperitoneal de la pCry1Ac modifica las proporciones celulares en los distintos compartimentos

Para realizar una mejor apreciación de los resultados, una vez asegurada la viabilidad celular se analizaron las poblaciones celulares de cada uno de los sitios: linfocitos intraepiteliales de intestino delgado (IEL ID) e intraepiteliales de intestino grueso (IEL IG), linfocitos de lamina propia de intestino delgado (LPL ID) e intestino grueso (LPL IG), placas de Peyer (PP), bazo y tracto reproductor femenino (V), por citometría de flujo, se observaron diferencias fenotípicas en las poblaciones de linfocitos de distintos compartimentos y se observaron algunos cambios en las proporciones de linfocitos por efecto de la inmunización con la pCry1Ac (Datos no mostrados).

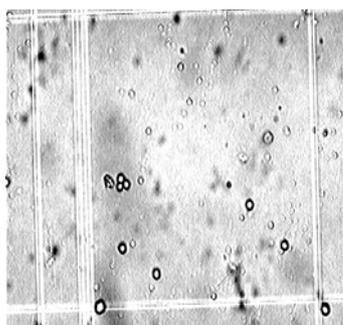


Figura 4. Prueba de viabilidad y conteo celular para linfocitos, las células brillantes corresponden a las células vivas.

4.3. Efecto de la administración Intraperitoneal de la

pCry1Ac en la cantidad de RNA obtenido.

Al determinar la integridad del RNA total obtenido mediante la extracción con el kit AquaPure se realizó una electroforesis en gel de agarosa de acuerdo con la metodología descrita (figura 5), ya que las bandas observables no presentaban deterioro y se visualizó el RNA ribosomal como un indicio de la presencia de mRNA.

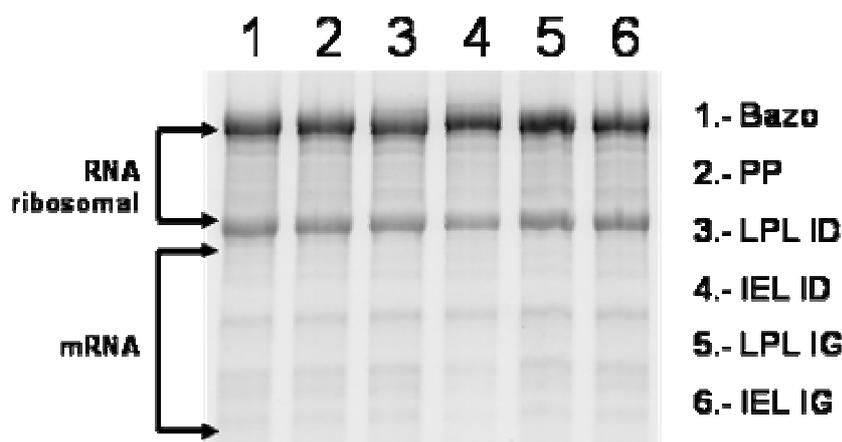
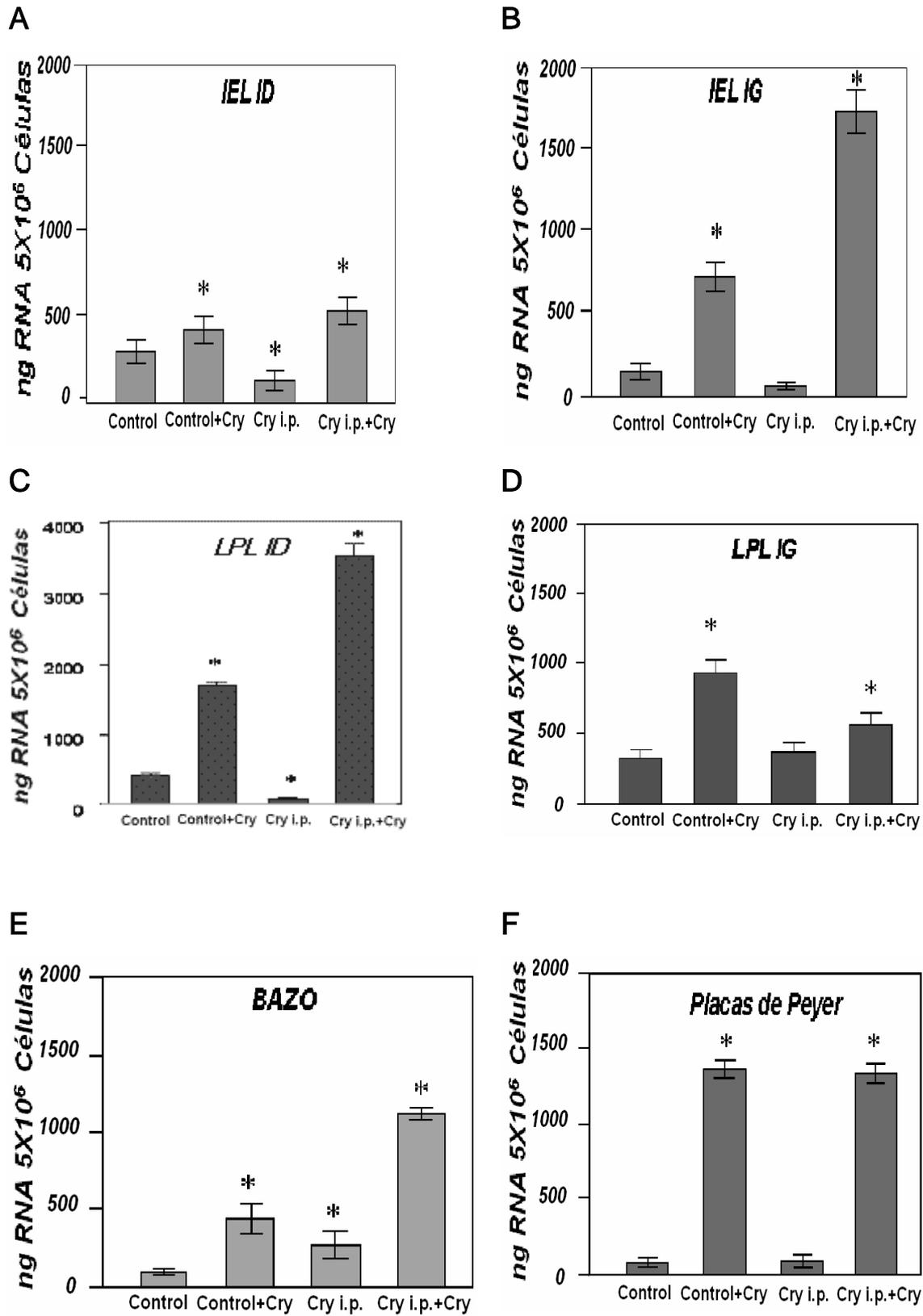


Figura 5. Electroforesis en gel de Agarosa al 1.5% para determinar la integridad del RNA total obtenido en los distintos compartimentos. **bazo**, placas de Peyer (**PP**), linfocitos de lámina propia de intestino delgado (**LPL ID**), linfocitos intraepiteliales de intestino delgado (**IEL ID**), linfocitos de lamina propia de intestino grueso (**LPL IG**), linfocitos intraepiteliales de intestino grueso (**IEL IG**).

Al cuantificar los niveles de RNA total que obteníamos de muestras de cada uno de los sitios analizados encontramos una expresión diferencial en las concentraciones de mRNA total obtenido en muestras con un número idéntico de células, en los que se observó un drástico incremento en las concentraciones cuando las células se mantuvieron en cultivo y se estimulan (células de animales no inmunizados e incubadas en presencia 10 μ g de pCry1Ac) o cuando se re-estimularon *in vitro* (linfocitos de animales inmunizados 3 veces i.p. y mantenidos en cultivo con 10 μ g de pCry1Ac). Se observó que los linfocitos de ratones inmunizados que se re-estimularon con pCry1Ac expresaron altas concentraciones de RNA, los mayores incrementos se observaron en LPL del ID, IEL de IG y bazo, en donde los incrementos variaban de 2 a 4 veces más (Figura 6).



Continúa.....

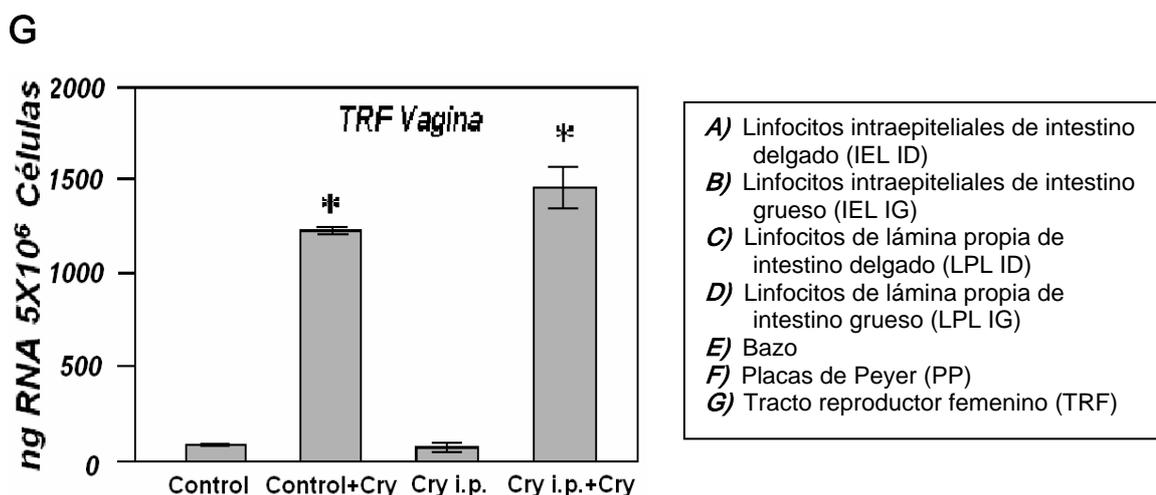


Figura 6. Gráficas de concentraciones de RNA total obtenido de 5×10^6 células de **(A)** linfocitos intraepiteliales de intestino delgado **(B)** linfocitos intraepiteliales de intestino grueso, **(C)** linfocitos de lamina propia de intestino delgado **(D)** linfocitos de lamina propia de intestino grueso, **(E)** bazo, **(F)** placas de Peyer y **(G)** Tracto reproductor femenino, de animales control, inmunizados por tres ocasiones i.p. con $50 \mu\text{g}$ de pCry1Ac (Cry i.p.), de linfocitos control incubados en presencia de $10 \mu\text{g}$ de pCry1Ac (Control+Cry) y de linfocitos obtenidos de animales inmunizados y re-estimulados *in vitro* con $10 \mu\text{g}$ de pCry1Ac (Cry i.p.+Cry), se presentan los resultados de 3 experimentos independientes de 5 animales por grupo. Los asteriscos representan las diferencias significativas al comparar con el control y los grupos experimentales con una $p < 0.05$ (GraphPad Prisma 3.0.)

4.4. El efecto de la administración de la pCry1Ac en los perfiles de citocinas (Th1, Th2, Tr).

Para determinar la respuesta de citocinas constitutiva e inducida por la inmunización o el estímulo con pCry1Ac se realizó PCR reverso, para establecer las diferencias en la expresión de mRNA's de varias citocinas Th1, Th2 y/o Tr.

4.4.1. Perfil de citocinas inducidos por pCry1Ac detectado por PCR Reverso

Se analizó por PCR reverso la expresión del mRNA específico para IL-4, (Th2), IFN- γ (Th1) y TGF- β e IL-10 (Tr) en linfocitos de cada uno de Los distintos sitios analizados (bazo, placas de Peyer, vagina y linfocitos intraepiteliales y de lamina propia de ambos intestinos). El IFN- γ se detectó en todos los sitios analizados excepto en el TRF donde las concentraciones fueron muy bajas cuando se inmunizó con pCry1Ac y cuando los linfocitos se reestimularon *in vitro*. Se observó una

expresión de ambos tipos de citocinas Th1 (IFN- γ) y Th2 (IL-4) y la inducción de la citocinas IL-10 (Figura 7).

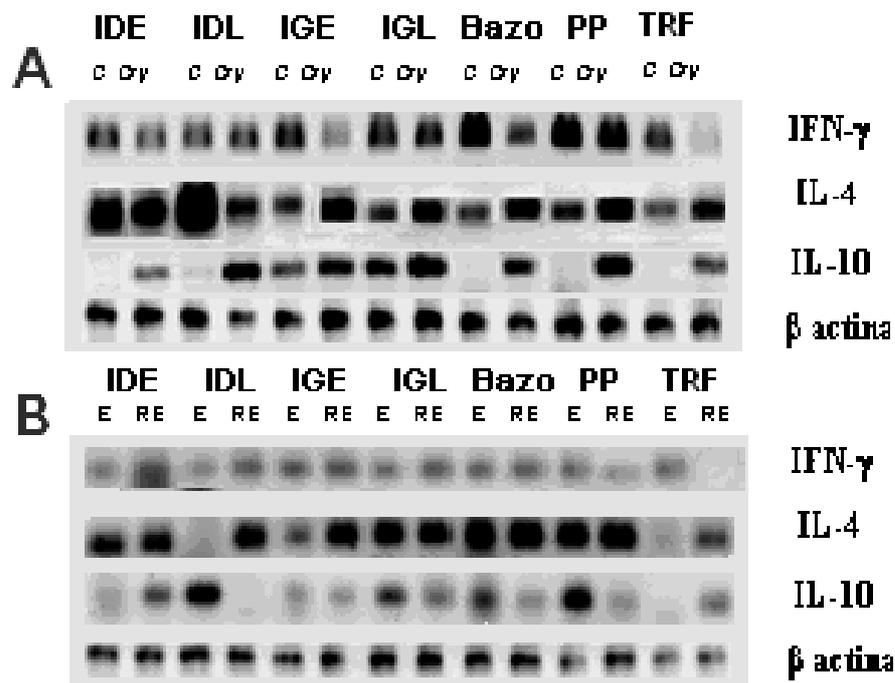


Figura 7. Corrimiento electroforético en geles de agarosa al 1.5% de los amplicones obtenidos por PCR reverso para las diferentes citocinas. **A)** Muestras de linfocitos de ratón control (C) e inmunizado con pCry1Ac (Cry), **B)** muestras de linfocitos estimulación (E) y re-estimulados (RE) *in vitro*. Datos representativos de tres experimentos independientes de 5 animales por grupo.

4.4.2. Citocinas inducidas por pCry1Ac en linfocitos intraepiteliales (IEL) de ambos intestinos

En IEL se ubican sobre la membrana basal del epitelio intestinal y se cree que son capaces de diferenciar entre antígenos inocuos y patógenos.

En IEL ID (intestino delgado) los linfocitos de animales control expresaron mRNA's de IL-4, IFN- γ y no se detectaron niveles basales de IL-10 y TGF- β . Cuando los linfocitos control se sometieron a un estímulo *in vitro* con la pCry1Ac se incrementaron los niveles de expresión de IL-4, IFN- γ y se detectó la presencia de los mensajeros de TGF- β e IL-10 (figura 8A). Mientras que en los linfocitos de animales previamente inmunizados la expresión de IL-4 e IFN- γ fue similar a los controles sin estímulo, mientras que IL-10 y TGF- β presentaron niveles bajos a diferencia de los controles. Cuando los linfocitos se estimularon *in vitro* con pCry1Ac se incrementaron drásticamente los niveles de expresión de IL-4, IL-10 y se observó un incremento

significativo de IFN- γ , mientras que TGF- β no se modificó después del re-estimulo (figura 8 B).

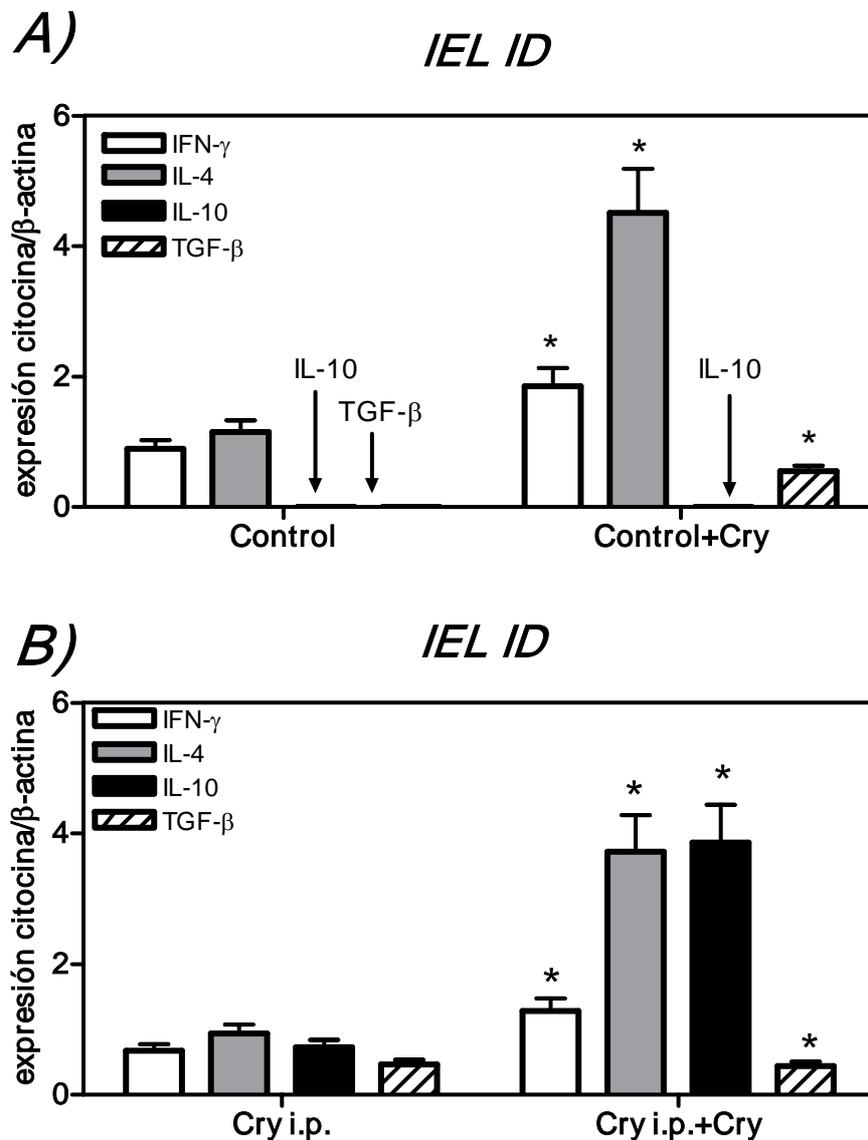


Figura 8. Perfil de citocinas de linfocitos intraepiteliales de intestino delgado (IEL ID) obtenidos a partir del análisis densitométrico de los productos de RT-PCR de las citocinas IL-4, IFN- γ , IL-10 y TGF- β **A)** Muestras de linfocitos de ratón **Control** y linfocitos estimulados *in vitro* por 4 horas con 10 μ g de pCry1Ac (**Control+Cry**), **B)** linfocitos de animales inmunizados (**Cry i.p.**), y re-estimulados con 10 μ g de pCry1Ac por 4 horas (**Cry i.p.+Cry**). Se expresan los datos de tres experimentos independientes con una $n=5$ animales por grupo, los asteriscos representan las diferencias significativas al comparar el control y los grupos experimentales con una $p<0.05$ (GraphPad Prisma 3.0.)

En el caso de linfocitos intraepiteliales de intestino grueso (IEL IG) se encontró que los linfocitos de animales control expresaban mRNA's de IL-4, IFN- γ e IL-10, cuando estos linfocitos control se estimularon *in vitro* con pCry1Ac se incrementaron los niveles de expresión de IL-4, IFN- γ e IL-10 y se detectó la expresión de TGF- β que originalmente no se producía, este efecto es interesante, ya que las citocinas IL-10 y TGF- β participan como reguladoras de la respuesta inmune (figura 9 A). Por otro lado, en linfocitos obtenidos de animales después de tres inmunizaciones se detectó la expresión de las 4 citocinas analizadas (IL-4, IL-10, IFN- γ y TGF- β) en niveles basales; cuando estas células se re-estimularon *in vitro* con pCry1Ac se incrementaron los niveles de expresión de IL-4, IFN- γ e IL-10 mientras que el TGF- β disminuyó ligeramente su expresión (figura 9 B).

En general se observó un incremento similar en la expresión de citocinas por efecto del estímulo *in vitro* con pCry1Ac en todos los sitios analizados al estimular y re-estimular (Fig. 8 y 9).

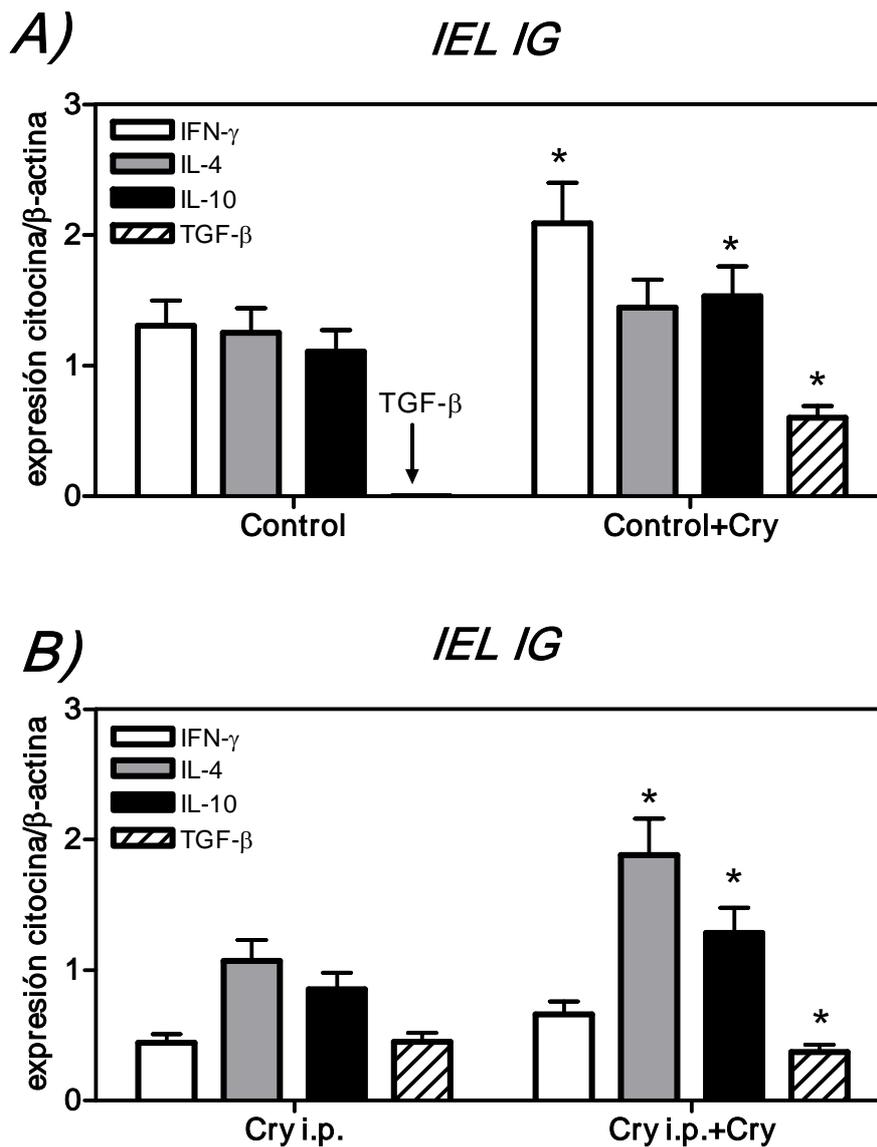


Figura 9. Perfil de citocinas de linfocitos intraepiteliales de intestino grueso (IEL IG) obtenidos a partir del análisis densitométrico de los productos de RT-PCR de las citocinas IL-4, IFN- γ , IL-10 y TGF- β analizadas por PCR reverso. En **A)** muestras de linfocitos de ratón **Control** y linfocitos estimulados *in vitro* por 4 horas con 10 μ g de pCry1Ac (**Control+Cry**), **B)** linfocitos de animales inmunizados (**Cry i.p.**), y re-estimulados con 10 μ g de pCry1Ac por 4 horas (**Cry i.p.+Cry**). Se expresan los datos de tres experimentos independientes con una $n=5$ animales por grupo, los asteriscos representan las diferencias significativas al comparar con el control y los grupos experimentales con una $p<0.05$ (GraphPad Prisma 3.0.).

Para determinar el efecto total de la pCry1Ac en cada tratamiento y en ambos intestinos se compararon las magnitudes de la expresión de los mRNA's de citocinas entre IEL de ambos intestinos y el mayor efecto de pCry1Ac se encontró en IEL de ID

en donde la magnitud de la respuesta fue más elevada al momento de estimular o re-estimar a los linfocitos *in vitro*. Aunque, ambas respuestas son distintas en los grupos control e inmunizados, ya que se observa que la estimulación no induce la expresión de IL-10 en **IEL ID**, mientras que en los linfocitos obtenidos de animales previamente inmunizados pero re-estimulados la expresión de esta citocina (IL-10) se incrementa considerablemente posterior al re-estimulo. En linfocitos de IEL de ID la IL-4 es la citocina que se incrementó más en este sitio por efecto de la estimulación *in vitro* y que el re-estimulo aunque induce que se incremente su expresión no lo hace en la misma magnitud. La pCry1Ac induce la producción de IL-10 y TGF- β *in vivo* (inmunizado) e *in vitro* (figura 10A). En el caso de IG se observaron ligeros incrementos, sin embargo, la inducción de respuesta de citocinas por efecto de la pCry1Ac en todos los casos, inmunizados o estimulados *in vitro*, lleva a la producción de TGF- β que no se detectó en linfocitos de animales control no estimulados (figura 10B).

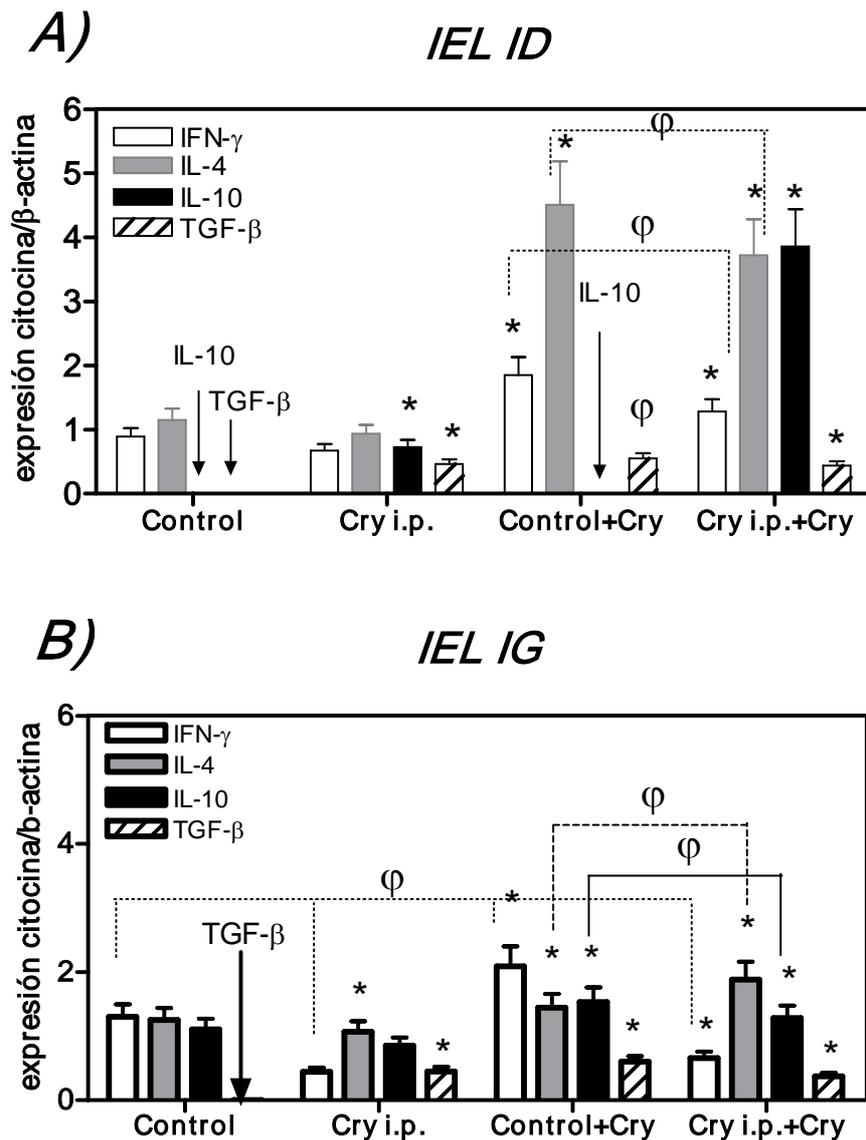


Figura 10. Perfil de citocinas de linfocitos intraepiteliales de intestino delgado y grueso (IEL ID e IEL IG) obtenidos a partir del análisis densitométrico de los productos de RT-PCR de las citocinas IL-4, IFN- γ , IL-10 y TGF- β . **A)** Muestras de linfocitos de ratón **Control** y linfocitos estimulados *in vitro* por 4 horas con 10 μ g de pCry1Ac (**Control+Cry**), **B)** linfocitos de animales inmunizados (**Cry i.p.**), y re-estimulados con 10 μ g de pCry1Ac por 4 horas (**Cry i.p.+Cry**). Se expresan los datos de tres experimentos independientes con una $n=5$ animales por grupo, los asteriscos representan las diferencias significativas al comparar con el control y ϕ las diferencias entre grupos experimentales con una $p<0.05$ (GraphPad Prisma 3.0.).

4.4.3. Citocinas inducidas por pCry1Ac en linfocitos de lámina propia (LPL) de ambos intestinos

En lamina propia de intestino delgado los linfocitos control presentan una producción constitutiva de mRNA's para IL-4, IFN- γ e IL-10; cuando estas células se sometieron a un estímulo *in vitro* con 10 μ g de pCry1Ac incrementaron los niveles de expresión de IFN- γ e IL-10 y se detectó la presencia de TGF- β (figura 11A), mientras que desapareció la expresión de IL-4. Por otra parte, en linfocitos de animales previamente inmunizados se detectaron IL-4, IFN- γ , IL-10 y TGF- β ; cuando se estimularon con pCry1Ac estas células se abatió la producción de IL-10, mientras los niveles de IL-4, IFN- γ y TGF- β no se incrementaron significativamente (figura 11A). En la lamina propia del intestino grueso los linfocitos expresan constitutivamente IL-4, IFN- γ , IL-10 y TGF- β y posteriormente cuando se estimularon *in vitro* con pCry1Ac los niveles de expresión de IL-4, IFN- γ e IL-10 se incrementaron, con excepción del TGF- β que conservó el mismo nivel de expresión del mRNA de esta citocina (figura 11 A). En los linfocitos de animales inmunizados se observó que los mRNA's de las citocinas IL-4, IFN- γ , IL-10 y TGF- β se expresaron de manera muy similar a los controles, cuando se re-estimularon se incrementaron los niveles de expresión de IL-4, IFN- γ e IL-10 y se redujo la expresión de TGF- β (figura 11 A)

Al comparar la intensidad en las respuestas de citocinas entre ambos intestinos se observó que la pCry1Ac tiene un mayor efecto en la LPL de ID en el grupo de animales inmunizados y estimulados, ya que los niveles de expresión de citocinas en este sitio son más altos que los observados en IG. Las respuestas de IL-4 son variables en magnitud entre ambos tejidos; en los controles, inmunizados y estimulados. Se debe de hacer notar que IL-4 no se expresa en el ID del grupo de ratones estimulados y si se expresa cuando se re-estimularon o en linfocitos de ratones previamente inmunizados con pCry1Ac. En el caso de IL-10 se detectaron niveles más altos en ID, sin embargo esta citocina no se expresó en las células de animales inmunizados cuando se re-estimularon *in vitro*, mientras que en el caso de los linfocitos control y estimulados con pCry1Ac se detectó el valor más alto de todos los sitios de estudio. En el caso de TGF- β las respuestas en los cuatro grupos fueron similares en ambos intestinos no se detectó en los controles de ID y su bajo nivel en animales inmunizados. En los linfocitos del intestino grueso de los animales control e inmunizados se detectaron efectos potentes de la pCry1Ac cuando estas células se

estimularon *in vitro* se elevó la expresión de los mRNA's para IL4, IFN- γ , e IL-10. Cabe destacar que aunque se elevaron los niveles de IL-4 e IFN- γ no se detectaron incrementos significativos en linfocitos de LPL ID por efecto del estímulo con pCry1Ac. En contraste, en el IG al estimular a los linfocitos con la pCry1Ac se incrementa de manera significativa la expresión de IL-4, la IL-10 parece ser una de las citocinas más sensibles al estímulo de la pCry1Ac en los linfocitos de LPL de animales control, ya que se incrementa su producción después del estímulo *in vitro*, en el caso del TGF- β se observó posteriormente a la inmunización en ID y de manera constitutiva en IG y se detectó un incremento ligero posterior a los estímulos *in vitro* con la pCry1Ac. (Figura 11B).

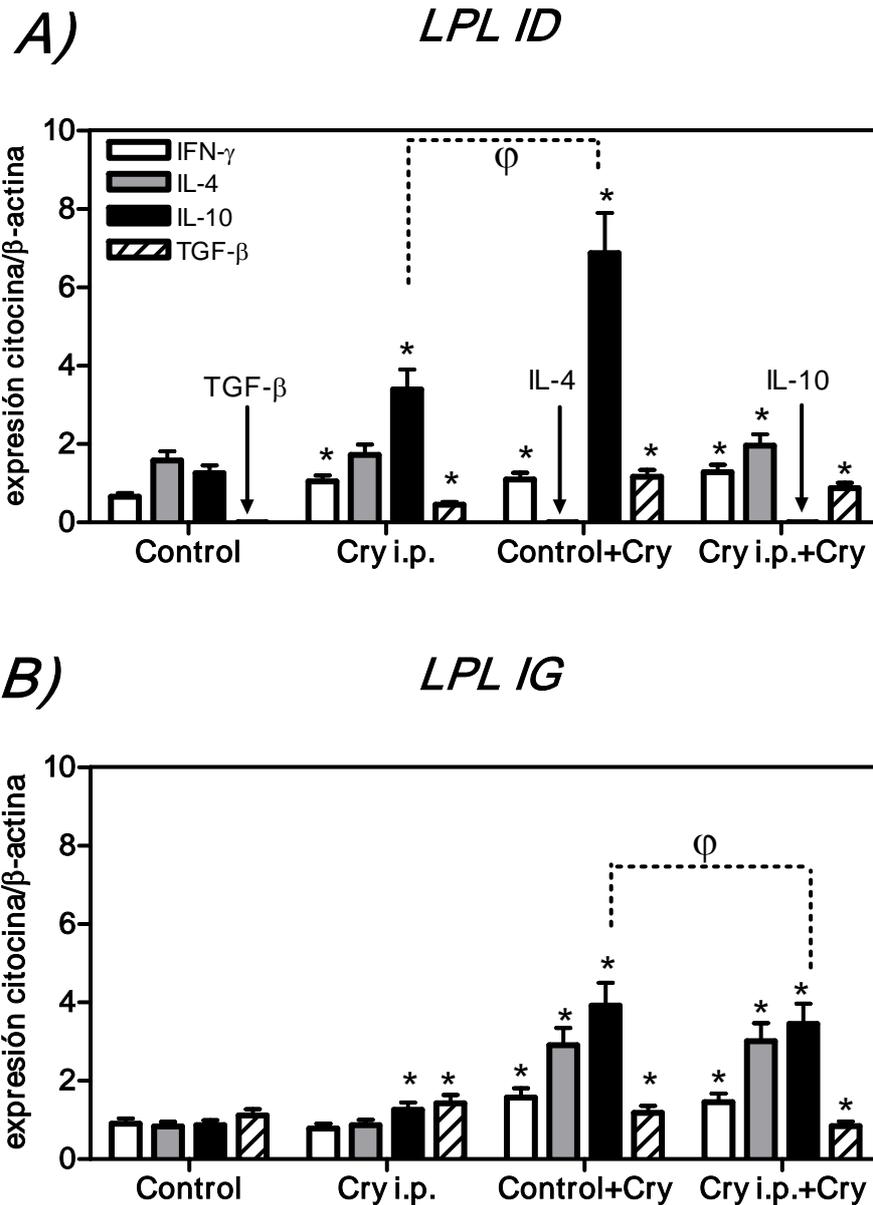


Figura 11. Perfil de citocinas obtenido a partir del análisis densitométrico de los productos de RT-PCR de linfocitos de lamina propia de ambos intestinos **A)** LPL ID y **B)** LPL IG para medir la expresión de citocinas IL-4, IFN- γ , IL-10 y TGF- β analizadas por densitometría en RT-PCR. Muestras de linfocitos de ratón **Control** y linfocitos de animales control y estimulados *in vitro* por 4 horas con 10 μ g de pCry1Ac (**Control+Cry**), linfocitos de animales inmunizados (**Cry i.p.**), y linfocitos de animales previamente inmunizados y re-estimulados con 10 μ g de pCry1Ac por 4 horas (**Cry i.p.+Cry**). Se expresan los datos de tres experimentos independientes con una $n=5$ animales por grupo, los asteriscos representan las diferencias significativas al comparar con el control y ϕ las diferencias entre grupos experimentales con una $p<0.05$ (GraphPad Prisma 3.0.).

4.4.4. Citocinas inducidas por pCry1Ac en placas de Peyer (PP) y tracto reproductor femenino (TRF)

En PP, se detectó que de manera constitutiva, los linfocitos de animales control expresan mRNA's de IL-4, IFN- γ e IL-10 los cuales se incrementaron cuando se estimularon con pCry1Ac y no se detectó la presencia de TGF- β (figura 12). En el caso de linfocitos obtenidos de animales inmunizados i.p. se detectó la presencia de mRNA's para IL-4, IFN- γ y TGF- β ; pero no se encontró la presencia de IL-10; al re-estimar estas células *in vitro* con pCry1Ac se incrementó ligeramente la producción de IL-4 e IFN- γ , se detectó la producción de mRNA de IL-10, pero disminuye la producción de TGF- β (figura 12).

La respuesta más intensa se presentó en los linfocitos de animales control y estimulados con pCry1Ac ya que es en este tratamiento en el cual se detectaron las respuestas más elevadas de citocinas, pero cabe destacar que en este sitio no se expresó la citocina TGF- β . También es importante hacer notar que los linfocitos de animales inmunizados previamente no expresaron IL-10, aunque esta citocina se incremento drásticamente en los linfocitos de animales control que se estimularon con pCry1Ac *in vitro* (figura 12).

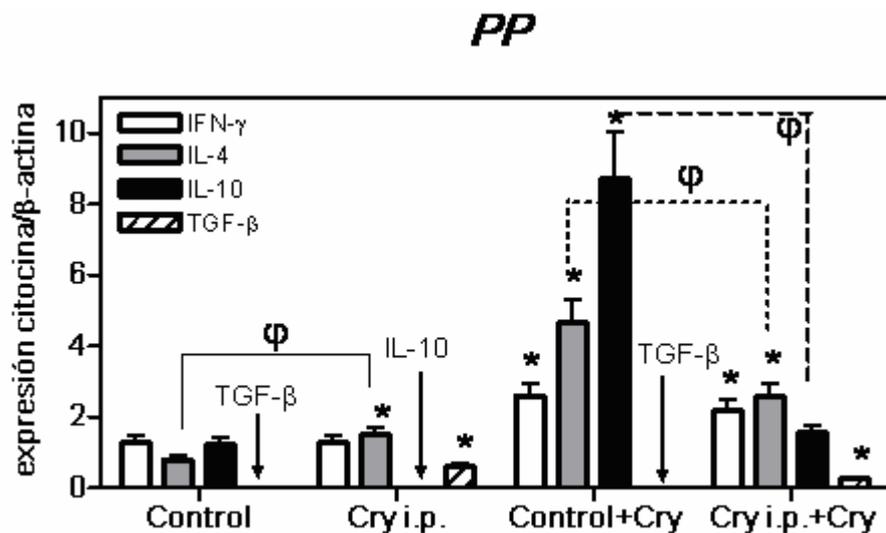


Figura 12. Perfil de citocinas obtenidos por densitometría de los productos de RT-PCR en linfocitos de placas Peyer (PP) para medir la expresión relativa de citocinas IL-4, IFN- γ , IL-10 y TGF- β analizadas por RT-PCR. Muestras de linfocitos de ratón **Control** y linfocitos control y estimulados *in vitro* por 4 horas con 10 μ g de pCry1Ac (**Control+Cry**), linfocitos de animales inmunizados (**Cry i.p.**), y animales inmunizados y re-estimulados con 10 μ g de

pCry1Ac por 4 horas (*Cry i.p.+Cry*). Se expresan los datos de tres experimentos independientes con una $n=5$ animales por grupo, los asteriscos representan las diferencias significativas al comparar con el control y φ las diferencias entre grupos experimentales con una $p<0.05$ (GraphPad Prisma 3.0).

En el tracto reproductor femenino de los animales control se produce IFN- γ e IL-10 y TGF- β de forma constitutiva, cuando se estimularon estas células con pCry1Ac se induce la expresión de IL-4, disminuye la producción de IFN- γ , se pierde la producción basal de IL-10 y se mantiene constante la producción de TGF- β (figura 13). En linfocitos de animales inmunizados i.p. se detectó la presencia de IL-4, IFN- γ , TGF- β y ausencia de IL-10; mientras que la estimulación induce una alta expresión de IL-10 antes de ser estimulados no se detectaba, así como el incremento de IL-4, disminución de IFN- γ y una ligera disminución del nivel de TGF- β (figura 13).

En tracto reproductor femenino (TRF) entre tratamientos se observó un efecto moderado de pCry1Ac en linfocitos control e incluso un efecto regulador en la producción de algunas citocinas, ya que los linfocitos control producen IL-10 constitutivamente, el cual se abatió en los animales inmunizados y en los estimulados, pero se observó una alta producción de esta citocina en células re-estimuladas que provenían de animales inmunizados; en todos los casos se observó un nivel bajo de TGF- β . Es importante hacer notar que los linfocitos de animales inmunizados expresaron altos niveles de IL-4 e IL-10 cuando fueron re-estimulados con la pCry1Ac (Figura 13).

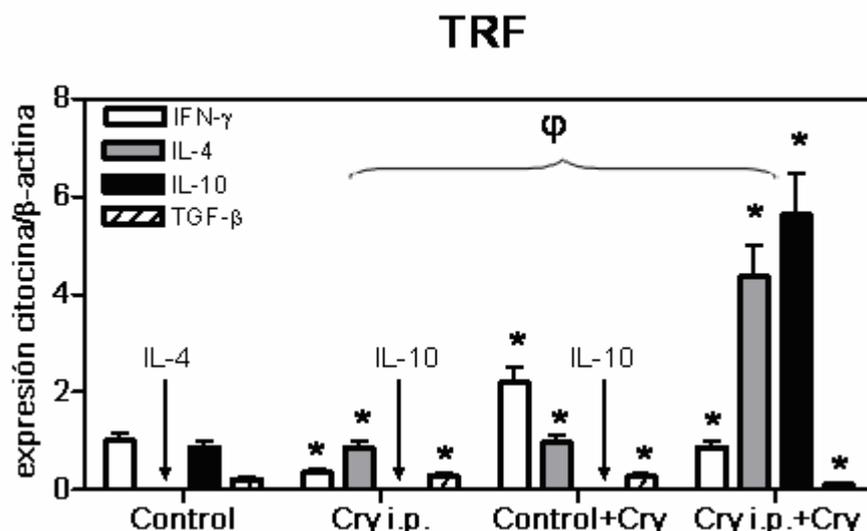


Figura 13. Perfil de citocinas de obtenido por densitometría de los productos de RT-PCR en linfocitos obtenidos del tracto reproductor femenino (TRF), para medir la expresión de citocinas IL-4, IFN- γ , IL-10 y TGF- β . Muestras de linfocitos de ratón *Control* y linfocitos estimulados *in vitro* por 4 horas con 10 μ g de pCry1Ac (*Control+Cry*), linfocitos de animales inmunizados (*Cry i.p.*), y re-estimulados con 10 μ g de pCry1Ac por 4 horas (*Cry i.p.+Cry*). Se expresan los datos de tres experimentos independientes con una $n=5$ animales por grupo, los asteriscos representan las diferencias significativas al comparar con el control y ϕ las diferencias entre grupos experimentales con una $p<0.05$ (GraphPad Prisma 3.0.).

4.4.5. Citocinas inducidas por pCry1Ac en bazo

El bazo es el órgano encargado de filtrar la sangre, es rico en linfocitos B y T, es un órgano que puede proporcionar información del efecto general que se observa por la protoxina, en este sitio se encontró que los linfocitos de animales control constitutivamente expresaron IL-4, IFN- γ e IL-10, pero no expresaron RNA mensajero para TGF- β , el estímulo indujo en cultivo un incremento en la producción de IL-4, IFN- γ e IL-10 y se detectó la presencia de TGF- β 1 (figura 14). En linfocitos de los animales que previamente se inmunizaron i.p. se encontró la presencia de IL-4, IFN- γ , IL-10 y TGF- β , las cuales se incrementaron posteriormente al estímulo (figura 14).

En las células de bazo del grupo control no se detectó la expresión de TFG- β y la inmunización o el estímulo *in vitro* con la pCry1Ac indujo su expresión. Aunque el estímulo y re-estímulo incrementaron la producción de citocinas el efecto más potente se observa en los linfocitos control que se estimulan *in vitro* con pCry1Ac (figura 14).

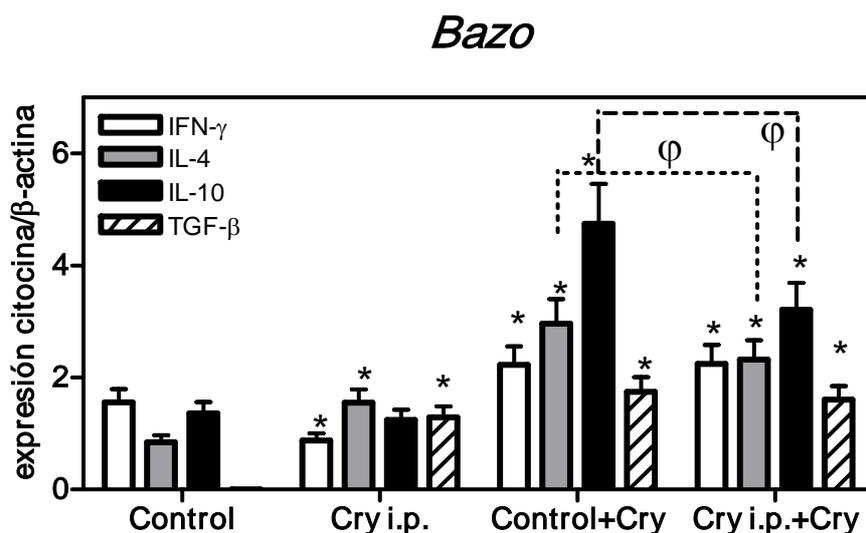


Figura 14. Perfil de citocinas obtenidos por densitometría de los productos de RT-PCR en linfocitos obtenidos de bazo, para medir la expresión de las citocinas IL-4, IFN- γ , IL-10 y TGF- β . Muestras de linfocitos de ratón *Control* y linfocitos estimulados *in vitro* por 4 horas con 10 μ g de pCry1Ac (*Control+Cry*), linfocitos de animales inmunizados (*Cry i.p.*), y re-estimulados con 10 μ g de pCry1Ac por 4 horas (*Cry i.p.+Cry*). Se expresan los datos de tres experimentos independientes con una $n=5$ animales por grupo, los asteriscos representan las diferencias significativas al comparar el control y ϕ las diferencias entre grupos experimentales con una $p<0.05$ (GraphPad Prisma 3.0).

4.5. Proliferación celular inducida por pCry1Ac en cultivos *in vitro*

Debido a que los resultados obtenidos indicaban incrementos en las concentraciones de RNA total por efecto de la pCry1Ac se propuso que era posible que la protoxina incrementara la proliferación celular, lo que generaría un mayor número de células después de la incubación por 4 horas con la protoxina Cry1Ac, ya que en los grupos, tanto control como inmunizados se incrementaron los niveles de RNA posteriormente al estímulo *in vitro* con 10 μ g de pCry1Ac/1x10⁶ células linfoides. La técnica seleccionada para determinar la proliferación celular fue mediante el kit de proliferación AlamarBlue que se basa en la incorporación y transformación mediante la actividad metabólica de un reactivo colorimétrico, se cultivaron linfocitos de animales control e inmunizados con y sin estímulo, se sembraron 10000, 100000 y 500000 linfocitos por pozo y los índices de proliferación obtenidos fueron similares independientemente del número de células empleadas, por lo que se presentan los

resultados de 100,000 células. Las graficas de los índices de Estimulación (*IE*) fueron muy parecidas a los datos obtenidos para las concentraciones de RNA total.

En el caso de los linfocitos obtenidos de **LPL de ID** los Índices de estimulación fueron similares entre los linfocitos control y los linfocitos de animales inmunizados (figura 15) y fueron estadísticamente diferentes a los de los linfocitos estimulados o re-estimulados con 10 µg de pCry1Ac. Estas diferencias se observaron a partir de las 2 horas. A las 11 horas los linfocitos re-estimulados alcanzaron el máximo de proliferación del sistema y los porcentajes de proliferación en ese momento resultaron estadísticamente diferentes a los controles, a los linfocitos estimulados y a los linfocitos de animales inmunizados (figura 15). Los porcentajes de proliferación se incrementaron con el tiempo; a las 4 horas fueron de 26.56% en los linfocitos de los animales control, en los linfocitos estimulados fueron de 51.54%, 23.95% en los linfocitos de los animales inmunizados y 41.710% en los linfocitos re-estimulados. No se encontraron diferencias significativas en la proliferación entre linfocitos estimulados y re-estimulados a lo largo de todo el ensayo. Así mismo, no se observaron diferencias significativas entre linfocitos control e inmunizados que se mantuvieron solo con medio, la proliferación se evaluo hasta las 44 horas, el porcentaje máximo de proliferación alcanzada fue de 82.32% y se obtuvo en los linfocitos re-estimulados, con el tiempo se observó que disminuyeron las diferencias y a las 40 horas las células estimuladas y re-estimuladas dejaron de proliferar.

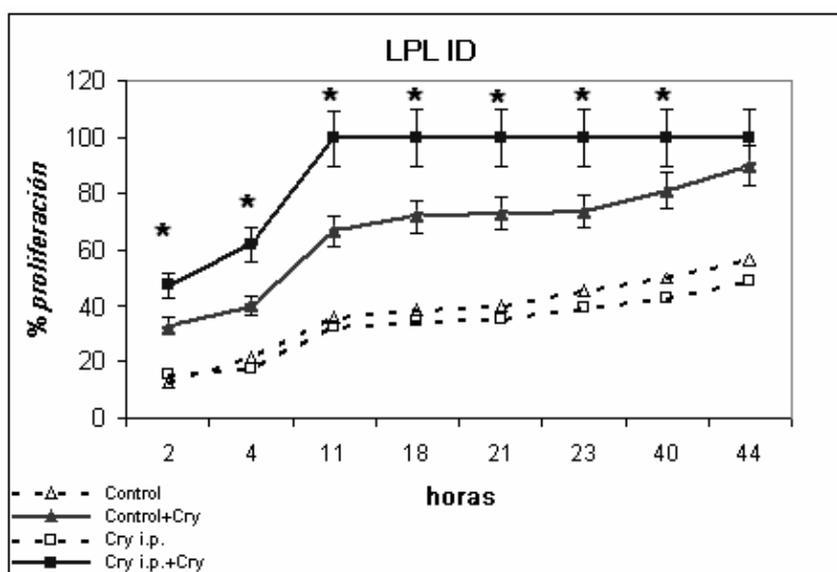


Figura 15. Gráfica de proliferación celular de linfocitos obtenidos de lamina propia de intestino delgado (LPL ID) de ratones control y de ratones después de

tres inmunizaciones i.p. con pCry1Ac y estimulados o re-estimulados *in vitro* con $10 \mu\text{g}$ pCry1Ac / 1×10^6 células. Los asteriscos representan las diferencias significativas entre los grupos estimulados *in vitro*. GraphPad Prisma 3.0 ($p < 0.5$). Datos de dos experimentos independientes con seis pozos por grupo.

En los linfocitos obtenidos de bazo, los niveles de proliferación en linfocitos estimulados y re-estimulados se mantuvieron similares hasta las 4 horas con un 65.51% y un 67.17% respectivamente. No se observaron diferencias significativas entre ambos grupos de linfocitos mantenidos con medio; ni entre linfocitos estimulados o re-estimulados. El cultivo se mantuvo hasta las 44 horas en donde se detectaron los niveles máximos de proliferación de 55.42% para linfocitos de animales control, 73.9% para linfocitos de animales inmunizados, a partir de las 20 horas se alcanzó un 100% de proliferación en linfocitos estimulados y 90.16% para linfocitos re-estimulados y no se encontraron diferencias significativas en la proliferación de células cultivadas solo con medio o los grupos estimulados *in vitro* con pCry1Ac (Figura 16).

Este efecto en la proliferación celular se repitió en el resto de sitios analizados y los datos obtenidos se muestran en el Anexo 1.

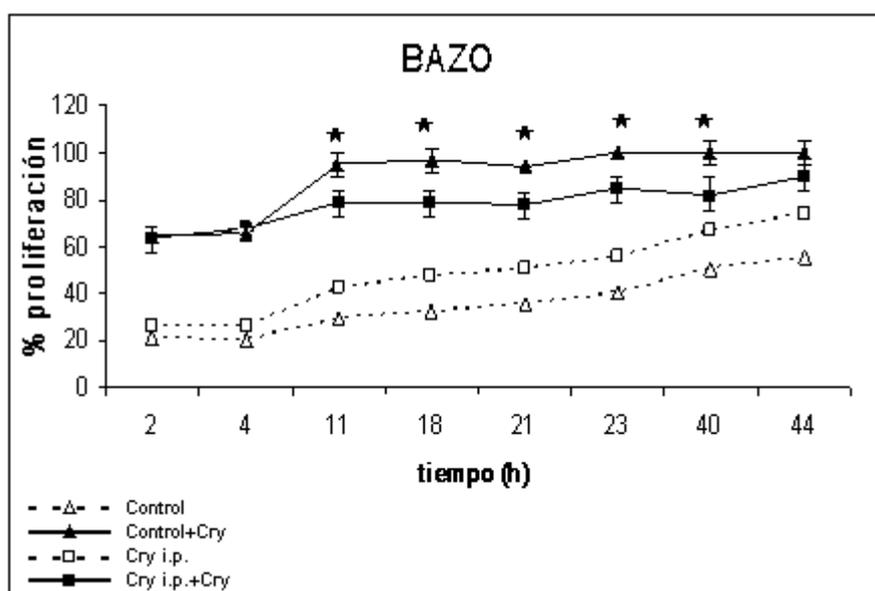


Figura 16. Proliferación de linfocitos obtenidos de bazo de ratones control y de ratones después de tres inmunizaciones i.p. con pCry1Ac y linfocitos estimulados o re-estimulados con $10 \mu\text{g}$ de pCry1Ac/ 1×10^6 células. Los asteriscos representan las diferencias significativas entre los grupos estimulados *in vitro*. GraphPad

Prisma 3.0 ($p < 0.5$). Datos de dos experimentos independientes con seis pozos por grupo.

4.5.1. Ensayo de proliferación mediante tinción con CFSE

Para corroborar la presencia de proliferación se realizó una nueva prueba con el ensayo de proliferación de CFSE a las 4 horas de cultivo, el ensayo se determinó mediante citometría de flujo y se analizaron los resultados a partir de los histogramas obtenidos en los cuales se analizó el desplazamiento de los linfocitos teñidos con CFSE al tiempo cero (líneas de color morado), de los linfocitos que se mantuvieron en cultivo con medio (líneas negras) y de los linfocitos que se estimularon o re-estimularon *in vitro* con 10 μg de pCry1Ac (líneas rojas).

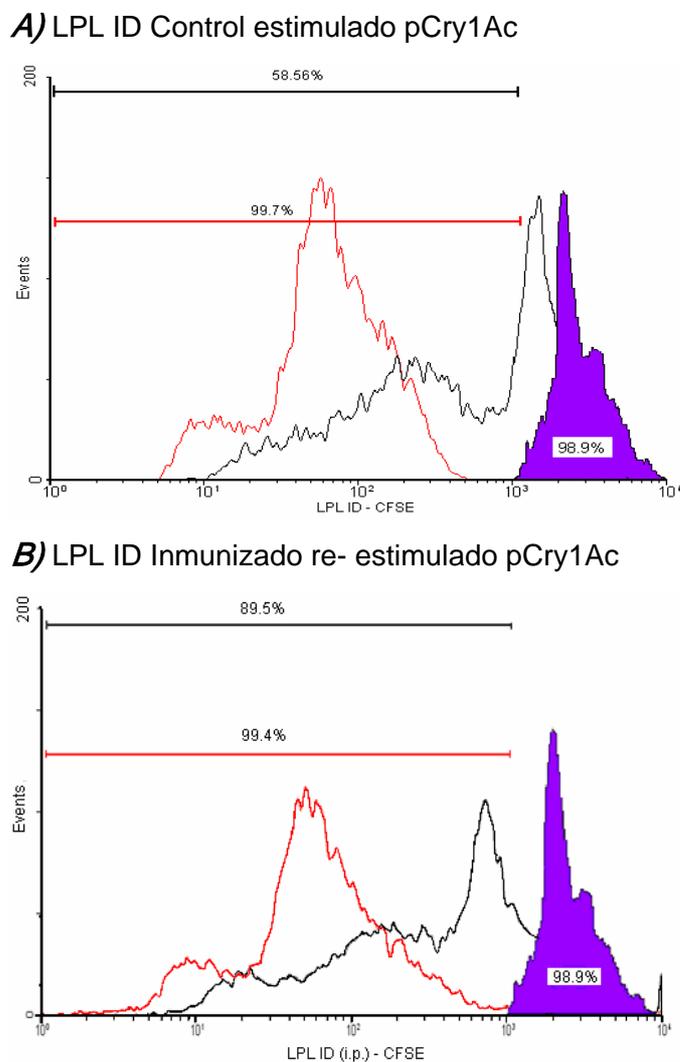


Figura 17 Gráfica de proliferación celular empleando el ensayo de CFSE de cultivos de linfocitos obtenidos de animales control e inmunizados y estimulados *in vitro* por 72 horas A) linfocitos control y estimulados con pCry1Ac por 72 horas

B) linfocitos de animales inmunizados y re-estimulados con pCry1Ac por 72 horas. Se presentan los histogramas representativos de tres mediciones independientes.

En la tabla 3 se muestran los resultados del efecto de la pCry1Ac sobre la proliferación de distintos tejidos a diferentes tiempos analizados por la técnica de Alamar Blue y CFSE. Cuando se utilizó pCry1Ac como un agente estimulante y se calcularon las diferencias en los índices de estimulación (*IE*) para cada grupo a las 4, 44 y 72 horas. Encontramos que a las 4 horas las células de todos los tejidos proliferaron. Los índices de proliferación más elevados fueron el bazo y las células que menos proliferaron fueron los linfocitos de la LPL de ID (68.44%); mientras que los linfocitos de animales inmunizados y re-estimulados con la pCry1Ac el sitio con mayor proliferación fue la LPL de ID (92.54%) y las células que menos proliferaron fueron LPL de IG e IEL de ID (44.07 y 61.55 %) respectivamente.

A las 44 horas las células sin inmunizar (control) presentaron índices de proliferación de 85.11-171.59%; y que fueron las células de bazo las que más proliferaron, mientras que las que menos proliferaron fueron las de IEL IG. En el caso de linfocitos de animales inmunizados los IE oscilaron entre 61.72-155.34% y fueron las células de LPL ID las que más proliferaron y las que menos proliferaron fueron las de LPL de IG.

A las 72 horas la proliferación se midió con la técnica de CFSE, aunque los resultados no son comparables con la técnica de Alamar Blue, los linfocitos control que más proliferaron por acción de la pCry1Ac fueron los de IEL IG, por otro lado los linfocitos provenientes de animales inmunizados que más proliferaron fueron los de IEL de ID.

Los linfocitos de LPL IG proliferaron menos que los de animales control a todos los tiempos, los índices de estimulación en bazo fueron menores en linfocitos re-estimulados que en linfocitos estimulados.

| | 4 horas | | 44 horas | | 72 horas | |
|--------|----------------|---------------|----------------|---------------|----------------|---------------|
| | Contrl +Cry | Inmun +Cry | Contrl +Cry | Inmun +Cry | Contrl +Cry | Inmun +Cry |
| IEL ID | 93.9 | 61.6 | 96.6 | 130.6 | 112.2 | 130.0 |
| IEL IG | 72.4 | 80.4 | 85.1 | 140.0 | 74.2 | 115.5 |
| LPL ID | 68.4 | 92.5 | 101.8 | 155.3 | 84.2 | 87.6 |
| LPL IG | 93.6 | 44.1 | 114.6 | 61.7 | 138.7 | 84.6 |
| Bazo | 100.0 | 84.8 | 171.6 | 141.0 | 100.0 | 100.0 |

Tabla 3 índices de Estimulación (*IE*) para cada sitio analizado y método de evaluación de la linfoproliferación *in vitro*. Valores obtenidos con la técnica de proliferación AlamarBlue a las 4 y 44 horas pos-estimulación y con la técnica de proliferación CFSE a las 72 horas pos-estimulación.

Al comparar las gráficas obtenidas de la cantidad de RNA total y la proliferación se encontró que ambas graficas presentan la misma tendencia (figura 18).

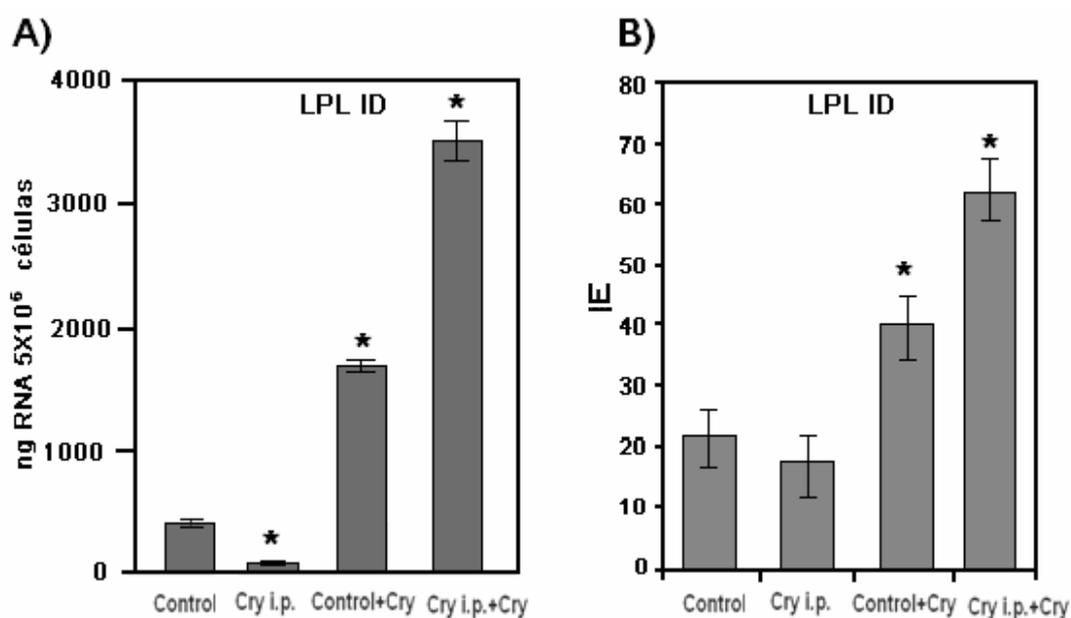


Figura 18. Análisis comparativo entre **A)** cantidades de mRNA de 5×10^6 células y **B)** proliferación celular (*IE*) de 1×10^5 células después de un estímulo por 4 horas con $10 \mu\text{g}$ de pCry1Ac. Los asteriscos representan las diferencias significativas al comparar el control y los grupos experimentales con una $p < 0.05$ (GraphPad Prisma 3.0).

5. DISCUSION

Debido a sus características inmunogénicas y adyuvantes a nivel sistémico y de mucosas, la pCry1Ac representa un excelente candidato adyuvante para activar la respuesta inmune en las mucosas a nivel celular. Las concentraciones obtenidas a partir de *E. coli* (50mg) hacen de ella un excelente modelo experimental de bajos costos de producción y fácil obtención.

5.1. El efecto de la administración de la pCry1Ac en los perfiles de citocinas

El número de linfocitos y los fenotipos encontrados fueron consistentes con lo descrito anteriormente y con los estudios histológicos realizados en el laboratorio (Reséndiz-Albor, *et al.* 2005). Al analizar las características funcionales y fenotípicas de ambos intestinos por citometría de flujo Reséndiz-Albor, *et al.* (2005) detectaron la presencia de células T que espontáneamente producían IL-2, IFN- γ e IL-4 tanto en linfocitos IEL como de LPL en ambos intestinos, sin embargo, se encontraron diferencias marcadas en los perfiles de citocinas entre intestino delgado y grueso, ya que para linfocitos intraepiteliales de intestino delgado (IEL ID) se observó que un 96% de células T producen IL-2, un 10% producían IL-4, mientras que para linfocitos intraepiteliales de intestino grueso (IEL IG), un 46% producían IL-2 y no se encontraron células T productoras de IL-4. Para linfocitos de lamina propia de intestino delgado (LPL ID) se detectó que el 21% producían IFN- γ , 51% IL-4 y aunque los linfocitos intraepiteliales de intestino grueso (LPL IG) 6-8% de células produjeron IFN- γ y un 55% produjeron IL-4, mientras que los niveles de IL-10 se detectaron en muy baja proporción en todos los casos. Las marcadas diferencias fenotípicas y funcionales existentes en los linfocitos de los diferentes compartimentos intestinales y las modificaciones en las proporciones celulares (datos no mostrados) al inmunizar con la pCry1Ac, nos hicieron suponer que la protoxina podría tener efecto en los perfiles de citocinas, ya que estas son indicadores de los rasgos diferenciales y funcionales distintivos en las poblaciones de linfocitos que residen en los compartimentos intestinales. Además, se ha reportado que la pCry1Ac induce altas respuestas de anticuerpos a nivel intestinal y sistémico (Vázquez-Padrón, *et al.* 1999; Moreno-Fierros, *et al.* 2000) y se conoce que la respuesta Th2 es más efectiva en la regulación de la respuesta de células B (Mosmann y Coffman, 1989),

La citometría de flujo solo permite analizar la proporción de células de un fenotipo particular que produce una determinada citocina, mientras que el análisis de

citocinas por RT-PCR permite la cuantificación de citocinas en linfocitos totales de un compartimento, dando una idea del microambiente de citocinas más que el tipo celular que las produce, por lo que en este trabajo se decidió analizar las citocinas IFN- γ (Th1), IL-4, IL-10 (Th2) y TGF- β (Tr) por RT-PCR. Se analizó la expresión de estas citocinas en linfocitos de distintos compartimentos de mucosas y en bazo. Se evaluó la expresión constitutiva en animales control, y la expresión inducida por pCry1Ac en los linfocitos de animales inmunizados, además de la producción de citocinas producidas después de cuatro horas del estímulo *in vitro*. Actualmente, se sabe que las citocinas desempeñan un papel importante en la regulación del sistema inmune de un organismo, median la respuesta protectora contra patógenos y la supresión de respuestas inflamatorias que pueden ocasionar daño no deseado a los tejidos. La capacidad de analizar la respuesta de citocinas en humanos y modelos experimentales como el ratón ha sido vital para el entendimiento de las respuestas efectoras y reguladoras ocurridas durante una infección o en enfermedades autoinmunes (Godornes, *et al.* 2007) y la capacidad de una proteína para modular la producción de citocinas puede tener relevancia terapéutica.

Se empleo este tiempo de estimulación debido a que en un reporte previo Carol y cols. (1998) mostraron que la incubación por cuatro horas con un estímulo policlonal usando cycloheximida (CHX 100 $\mu\text{g/ml}$) es suficiente para la óptima activación de las células *in vitro*, encontrando que el número de las células secretoras de IFN- γ inducidas por el estímulo se incremento por la activación policlonal *in vitro*, tanto en IEL como LPL de intestino delgado. Nosotros observamos que las células de estos compartimentos (IEL y LPL) cuando se estimularon por cuatro horas con 10 $\mu\text{g/mL}$ de pCry1Ac modificaron la expresión de citocinas se modificó en respuesta al estímulo y que en IEL de ID se incrementó fuertemente la producción de IL-4, mientras que en IEL de IG solo se observan diferencias en animales inmunizados y re-estimulados (Cry i.p. +Cry) con respecto al control; así mismo el perfil de IL-10 no es el mismo entre ID e IG (Fig. 10), y en células de animales control y estimulados (Cronrol+Cry) es donde se observa principalmente un incremento en la expresión de IFN- γ . Por otra parte en LPL de ambos intestinos el perfil de citocinas varia dependiendo si los linfocitos provienen de ID o IG, destacando el abatimiento de IL-4 en linfocitos control y estimulados *in vitro* (Control+Cry) y de IL-10 en linfocitos inmunizados y re-estimulados (Cry i.p.+Cry) (Fig. 11A).

Observamos que el patrón de citocinas que se detectó fue complejo ya que existe una intensidad de expresión de citocinas diferente dependiendo del compartimento analizado (Fig. 10, 11, 12, 13 y 14), así como la producción espontánea de las mismas en diversos sitios de mucosas, sin embargo, la producción espontánea ha sido poco descrita y estudiada, debido a su complejidad.

Las células T CD4⁺ son las principales productoras de citocinas, regulan la respuesta inmune y se han clasificado según las citocinas que secretan, así las células Th1 se sabe secretan principalmente IL-2 e IFN- γ y las células Th2 que secretan IL-4, IL-5, IL-6, IL-9 e IL-10 (Caballero, 1998), en las mucosas también existe un tercer tipo de citocinas, las células T reguladoras (Tr). La activación de las células T para producir estas citocinas, genera un microambiente que se considera como el factor más importante para promover la diferenciación de células T vírgenes (O'Garra, A, 1998 y Abbas, A. K., *et al.* 1996) a Th1, Th2 o Tr,

En este trabajo nos propusimos conocer el microambiente de citocinas que se genera por el estímulo o la inmunización con la pCry1Ac y detectamos la expresión del IFN- γ en todos los tejidos analizados, es una citocina que se produce espontáneamente en los diversos sitios de mucosas y su expresión se incrementó después del estímulo *in vitro* con la pCry1Ac (Anexo-2); esta observación se ha descrito en algunos estudios que afirman que el interferón γ (IFN- γ) se expresa constitutivamente por linfocitos intraepiteliales y de lamina propia en humano (Kontakou, 1994 y Quiding, 1991, Carol, 1998) o en células totales de ambos intestinos, (Al-Dawoud, 1992). El IFN- γ es una citocina importante en las mucosas ya que controla funciones fisiológicas básicas del epitelio intestinal, incluso la secreción y consumo de electrolitos (Holmgren, 1989. Sollid, 1987) y el transporte potencialmente protector de IL-6, el IFN- γ posee propiedades proinflamatorias y su síntesis y acción se controlan estrictamente (Trinchieri, 1985).

En células de animales control después del estímulo con la pCry1Ac se incrementa marcadamente la producción de IL-4 en LPL IG, PP IEL ID (Fig. 10-12) e IL-10 en LPL ID e IG (Fig. 11), mientras que la expresión del IFN- γ se incrementó en menor magnitud que estas dos citocinas (IL-4, IL-10) en todos los sitios analizados (Fig10-14), lo que indicaría una respuesta tipo Th2. Pero en nuestros experimentos observamos que existe expresión constitutiva de IL-4 e IFN- γ entremezcladas en

linfocitos de un mismo sitio, indicando la existencia de patrones de citocinas Th1/Th2 mezclados (Fig 10-14) y no polarizados en las mucosas. La expresión de citocinas es diferente dependiendo del sitio de estudio. La expresión espontánea de citocinas se ha descrito previamente en los linfocitos provenientes de mucosas, por ejemplo Carol, en 1998, encontró la presencia espontánea de células secretoras (SC) de IL-4 e IFN- γ en linfocitos de intestino delgado y grueso del humano; en IEL de duodeno se demostró que secreta IFN- γ espontáneamente en un 3.6 % y en LPL el 1.9 %, mientras que para IL-4 en IEL el 1.3 % y en LPL el 0.7 % y los comparó con células mononucleares de sangre periférica. Este autor detectó en sangre números muy bajos de SC que espontáneamente producen IFN- γ y ausencia de SC que espontáneamente producen IL-4. También observó que en muestras de colon, sólo el 0.2 % de IEL y LPL secretaron IFN- γ en estado basal, y el 0.1 % secretó IL-4.

En nuestro análisis se encontró la presencia de IFN- γ en todos los casos a niveles basales, tanto en los linfocitos control como el de animales inmunizados además, observamos que los niveles se incrementan de forma variable cuando se estimulan *in vitro* con pCry1Ac dependiendo del sitio. En general en todos los sitios analizados se detectó de forma constitutiva IFN- γ y al estimular *in vitro* con la pCry1Ac lo que nos indica la presencia de células Th1, mientras que IL-4 se detectó en todos los sitios a excepción del TRF (Fig. 13), y el estímulo *in vitro* incrementó su expresión de forma variable en todos los casos a excepción de LPL de ID, en donde posterior al estímulo no se detectó esta citocina, la producción de esta citocina indicaría una respuesta Th2. Aunque se detectó la presencia espontánea de IFN- γ , en todos los sitios analizados, los niveles de expresión fueron ligeramente menores a los de IL-4. La producción de IL-4 y/o IFN- γ producida en la primera fase de contacto con un antígeno es esencial para la respuesta inmune subsiguiente, y es bien conocida la regulación cruzada entre los linfocitos Th1 y Th2, que recíprocamente se inhiben la una a la otra. El incremento en la producción de IL-4 no solo induce el cambio de fenotipo de los linfocitos B inmaduros a células productoras de anticuerpos, sino que previenen a los linfocitos T de producir IFN- γ inducida por IL-12 al disminuir en ellos la expresión de la unidad $\beta 2$ para IL-12 (Velásquez, 2001). Por otra parte, las células presentadoras de antígeno, en ausencia de IL-12, pero con IL-10 promueven el paso de Th0 a Th2 productoras de IL-4, IL-5, IL-10, responsables de respuestas de tipo humoral. La presencia una respuesta mezclada Th1/Th2 se puede explicar por la

posible presencia de más de una población de células productoras de estas citocinas. Estos resultados y los nuestros confirman que los linfocitos intraepiteliales y de lámina propia intestinales espontáneamente secretan IFN- γ y/o IL-4 y que la secreción basal de estas citocinas probablemente esta implicada en la homeostasis normal de la mucosa intestinal.

Como se estableció en los experimentos realizados por Moreno-Fierros, 2000 la inmunización intraperitoneal con pCry1Ac induce altas respuestas de IgG, IgA e IgM en intestino delgado y grueso, aunque se sabe que la magnitud de la respuesta depende de la ruta de inmunización usada; y se ha descrito que la ruta i.p. es una buena ruta para inducir respuesta inmune humoral. Por lo que debe de existir una población celular que incremente la respuesta humoral mediante la producción de IL-4 y otra población que active la respuesta celular (células productoras de IFN- γ). Carol en 1998, mediante ELISPOT encontró que la proporción de células secretoras de IL-4 fue considerablemente más alta entre linfocitos de duodeno (ID) que entre linfocitos de colón (IG) para IEL. Lo que explicaría la menor expresión de IFN- γ en relación a la IL-4, en los sitios analizados y los incrementos en los niveles de IFN- γ que promueven la diferenciación de las células Th0 hacia Th1 y a su vez, provocan la activación de los macrófagos.

En varios sitios encontramos un notable incremento en la producción de IL-10 al estimular *in vitro* o al inmunizar con la pCry1Ac. En nuestro estudio detectamos la expresión basal de IL-10 en LPL de ambos intestinos, PP TRF y bazo (Fig. 12, 13 y 14), sin embargo después de la estimulación y la inmunización encontramos que los niveles de esta citocina se incrementaban. Es probable que los incrementos en la expresión de IL-10 que detectamos en algunos sitios como LPL IG, PP y bazo (Fig.11, 12 y 14 respectivamente) posterior a la estimulación con pCry1Ac genere una respuesta de tipo Th2 ya que esta citocina es la principal molécula que regula la síntesis de IFN- γ (Powrie, 1993). Se ha descrito que los linfocitos obtenidos de LPL son muy activos y expresan predominantemente un fenotipo Th2 (Abreu-Martin, MT y Targan, SR, 1996). En nuestro estudio detectamos la expresión basal de IL-10 en LPL de ambos intestinos, PP TRF y bazo, sin embargo después de la estimulación y la inmunización los niveles de esta citocina se incrementaban.

Se ha descrito que en animales deficientes de IL-10 con fondo genético BALB/c, el IFN- γ se expresa de forma constitutiva en IEL de ID (Wang, *et al.*, 2004), como parte de la respuesta innata y adquirida; en la enfermedad inflamatoria del intestino que ocurre en estos ratones deficientes de IL-10, lo que indica el papel fisiológico principal de IL-10 es prevenir el desarrollo de la inflamación intestinal. Este papel también lo describió Foussat, (*et al.* 2003) quien asegura que a tiempos cortos la IL-10 es necesaria para controlar la inflamación. Esta regulación de la inflamación por parte de la IL-10 podría explicar la ausencia de inflamación presente en tejidos de animales inmunizados con pCry1Ac, ya que en el laboratorio en diversas ocasiones se han realizado cortes histológicos de cada uno de los sitios que aquí se estudiaron y hasta el momento no se ha observado inflamación al igual que los datos observados por Mayes *et al.*, (1989) en donde se reporta que las proteínas Cry no inducen inflamación intestinal cuando se administraban de forma oral. Así mismo, el incremento de IL-10 en este trabajo después de cuatro horas de estímulo *in vitro* en linfocitos de diferentes tejidos sugiere que esta citocina podría controlar la inflamación o explicar la ausencia de inflamación.

Carol y cols. (1998) afirman que la expresión inducible de citocinas en presencia de un estímulo refleja la respuesta *in vivo*, lo que se observó en los animales después de tres inmunizaciones con pCry1Ac. Observamos que la producción de citocinas fue similar al grupo control, sin embargo, en muchos de los sitios se detectó la producción de TGF- β que antes no se detectaba (Fig. 10-12 y 14). Esta citocina es una proteína reguladora del sistema inmune, de la proliferación y la diferenciación celular. Muy probablemente la discriminación entre respuesta frente a parásitos o frente a antígenos alimentarios o extraños involucre un mecanismo de regulación cruzada similar a los conocidos para las respuestas Th1/Th2, por lo que a nivel de la mucosa se sugiere la existencia de una tercera vía del sistema inmune, los linfocitos T reguladores, productores de TGF- β o linfocitos Th3, que pueden ser las células que promueven la síntesis de anticuerpos en la mucosa. Aunado a la presencia de IL-10 la expresión del TGF- β en los animales inmunizados y estimulados nos indica una posible respuesta reguladora. Se sabe que el TGF- β inhibe la síntesis del IFN- γ , producido por los Th1, más aún, se ha demostrado que el TGF- β , producido por los linfocitos Th3, inhibe la formación de IgE inducida por IL-4 (Lorente, 2001), hasta el momento no se ha detectado IgE en los sitios de mucosas al inmunizar con pCry1Ac (Datos en prensa). Actualmente se sabe que las células T reguladoras (Tr)

secretan altas concentraciones de IL-10 y TGF- β en modelos *in vivo* (Foussat, *et al.*, 2003), con escasa secreción de IL-2, y ausencia de IL-4, es decir, no son Th1 ni Th2, y no afectan la producción de IgG2a (regulada por IFN- γ) (Rojas-Espinosa, 2001). El proceso de producción de células T reguladoras aún es desconocido, pero es particularmente importante en las mucosas, ya que su respuesta en estos tejidos representaría el balance entre dos procesos independientes, la respuesta T reguladora y la respuesta inmunogénica Th1/Th2 (Strober y Kelsall, 1998). Lorente (2001), asegura que las células efectoras más potentes son IELs, ya que producen un microambiente intestinal local, mismo que puede ser de utilidad para dirigir las propiedades efectoras y reguladoras, ya que se ha descrito que en oposición a Th1 y Th2, puede ser responsable de la tolerancia debido a la producción de TGF- β 1 que disminuye las citocinas inflamatorias y promueve la producción de IgA, a la cual se le atribuyen la protección de las mucosas (Abbas, 1998).

Adicionalmente, los incrementos de citocinas en linfocitos estimulados o re-estimulados después de cuatro horas nos indican una rápida respuesta a la pCry1Ac, y ya que la pCry1Ac es resistente a la proteólisis (Hofte y Whiteley, 1989; Knowles, *et al.*, 1991) es muy posible que exista un receptor para dicha proteína. Estas características se han observado en superantígenos que son potentes inductores de una amplia variedad de citocinas incluyendo TNF- α , IFN- γ , IL-2, estos superantígenos se unen a moléculas clase II en células presentadoras de antígeno y no requieren el procesamiento o proteólisis del péptido (Sperber, *et al.* 1995).

El amplio espectro de los efectos inmunobiológicos mediado por estas citocinas indica la heterogeneidad funcional que puede existir dentro de las poblaciones celulares en las mucosas. A fin de mantener la integridad del epitelio intestinal, el sistema inmune asociado al intestino debe desarrollar respuestas eficientes contra microorganismos patógenos y prevenir la sensibilización a antígenos de alimento y flora microbiana común. Las citocinas producidas de manera local por linfocitos T probablemente desempeñan papeles críticos en la compleja regulación de las respuestas inmunes y no inmunes a nivel intestinal. (Carol, *et al.* 1998). El órgano linfóide más grande en el cuerpo es el intestino, pero es también el más complejo. (Abreu-Martin, MT y Targan, SR, 1996). Los linfocitos T intestinales secretan citocinas que posiblemente desempeñan un papel crítico en la regulación de la respuesta

inmune; las diferencias (Fig. 10, 11 y 12) pueden deberse a la presencia de una microflora distinta y diferente función fisiológica en cada uno de ellos.

Las discrepancias en la producción de citocinas encontradas en este trabajo con lo descrito por Resendiz-Albor (2005) y otros trabajos pueden deberse a diferentes métodos, ya que en este estudio se analizó la producción de citocinas del total de linfocitos obtenidos de cada sitio y está bien establecido que existen diferencias en las proporciones de linfocitos de distintos tipos en los diferentes compartimentos intestinales, así también se observó que posterior a las tres inmunizaciones se incrementaron los porcentajes de células tanto CD4+ como CD8+, en varios compartimentos (datos no mostrados), y en la literatura se ha descrito por Bailey, *et al.* (1994) un alto número de células CD4+ en la lámina propia y que células CD8+ se encontraron tanto en IEL y LPL, pero al remover células CD4+ o CD8+ de las suspensiones de linfocitos intestinales IEL como LPL, resulta en la disminución en el número de células secretoras de IFN- γ y/o IL-4, tanto en IEL como LPL, y la depleción de ambos (CD4+ y CD8+) produce la desaparición de células secretoras, indicando que las células secretoras de citocinas en intestino son células T tanto CD4 como CD8 (Carol, 1998), por lo que sugieren que los linfocitos CD8 son la fuente principal de IFN- γ en IEL, mientras que en LPL el IFN- γ se sintetiza principalmente por linfocitos CD4 y que el IFN- γ no se secreta exclusivamente por las células CD4 sino también parcialmente por los linfocitos CD8.

En el bazo, encontramos producción de citocinas tanto de manera constitutiva (IL-4, IL-10, IFN- γ) como inducidas por la pCry1Ac (TGF- β), sin embargo, en la literatura se ha descrito la expresión de citocinas, en Godornes (2007) quienes reportan niveles basales de IFN- γ , IL-2 e IL-10 en esplenocitos cultivados con por RT-PCR en tiempo real. Igualmente, Lage, 2006 encontró en bazo de perros sanos la expresión de TNF- α , IL-12 e IL-10 no así de IL-4 e IFN- γ , sin embargo los autores no discuten la presencia de citocinas encontradas de forma constitutiva.

5.2. Efecto de la administración Intraperitoneal de la pCry1Ac en la cantidad de mRNA total

La mayor parte del RNA de una célula (85-90%) es ribosómico, y su elevada concentración se debe a su función y al grado de síntesis de proteínas. Por tanto el

índice de RNA:DNA se puede considerar como un indicador del grado de actividad metabólica de la célula. Este índice se ha empleado por muchos autores para la estimación de la condición nutricional y el crecimiento de algunos organismos (Buckley, 1984). En investigaciones que se realizan en cultivo se pueden controlar los principales factores que afectan al índice, sin embargo, en el medio existe una gran variedad de factores de crecimiento que pueden influir sobre la relación de RNA, pero se conoce muy poco sobre ellos, sin embargo, la presencia de sustancias contaminantes a antígenos, pueden afectar sus concentraciones.

Encontramos marcadas diferencias en las concentración de mRNA total de células mantenidas en cultivo, en los que se observa un incremento drástico en las concentraciones de RNA total cuando las células eran estimuladas *in vitro* por 4 horas, principalmente en linfocitos de ratones inmunizados y re-estimulados con 10 µg de la pCry1Ac, los mayores incrementos se observan en LPL de ID, IEL de IG y bazo. Este elevado incremento en las concentraciones de RNA solo puede deberse a una modificación en el estado de activación celular y/o a la síntesis de proteínas y almacenaje de mRNA's para llevar acabo la división celular (proliferación) inducida por la pCry1Ac.

Las diferencias en la cantidad de mRNA que produce una célula es modificable, debido a que no todas las proteínas se necesitan siempre, en todos los tejidos o en las mismas cantidades. Por tanto, los seres vivos han desarrollado sistemas para controlar la cantidad de cada proteína que sintetiza la célula, a este sistema se le conoce como "economía domestica". El sistema mas habitual regula la cantidad de mRNA que se produce, esta cantidad de RNA que produce un gen en un momento específico depende de la facilidad con que la RNA polimerasa puede unirse al promotor e iniciar la copia (Cabrejos, *et al.* 2001).

5.3. Proliferación celular al administrar Cry1Ac

La inmunidad de tipo celular, constituye un mecanismo fundamental para la defensa del organismo. Esta respuesta, mediada por linfocitos T, es esencial para la protección contra patógenos intracelulares: virus, algunas bacterias, hongos y protozoarios (Margni, 1996; Tizard, 1984; Werner, 1983). Debido a la importancia que tiene la acción de los linfocitos T en la defensa del organismo, se han desarrollado pruebas inmunológicas que permiten evaluar su funcionalidad, ya que existen

factores provocados por infecciones de microorganismos, que pueden llegar a afectar la respuesta inmune e incluso comprometer la vida de un organismo (Ramayo, *et al.* 2005).

Se analizó la proliferación *in vitro* que induce la pCry1Ac debido a los incrementos en las concentraciones de RNA total y como un elemento para evaluar la efectividad de los mecanismos inmunes de los diversos tipos celulares presentes en las muestras obtenidas (B, T, NK). Las células obtenidas que se analizaron por citometría de flujo (datos no mostrados), contenían distintos tipos celulares, los cuales, se emplearon como fuente de células para la estimulación y re-estimulación *in vitro* con pCry1Ac, para determinar si la pCry1Ac actúa como un mitógeno, medimos la proliferación *in vitro* dado que es la prueba mas utilizada y se basa en que ciertas lectinas, como concanavalina A, se unen a residuos hidrocarbonados de glucoproteínas de superficie de Los linfocitos T, estimulando su proliferación policlonal (Barta, 1981 y 1993; Felsburg, 1994; Margni, 1996; Tizard, 1984, Werner, 1983). pCry1Ac podría tener actividad de mitógeno ya que se ha descrito (Burton, *et al.* 1999) que Cry1Ac presenta una similitud estructural a la lectina que contribuye al reconocimiento de estos residuos hidrocarbonados. La posición de los aminoácidos Asn506, Gln509 y Tyr513 adyacentes a la región beta-16 del dominio III de algunas proteínas Cry favorece la interacción de proteínas solubles a la interacción con proteínas que unen carbohidratos, por lo que se le atribuye una función estructural similar a lectinas (Burton, *et al.* 1999). Estos autores también sugieren que la digestión enzimática ocurrida por las proteasas puede generar varias isoformas de la toxina brindándoles una función similar a lectinas, debido a la estructura conformacional de diversas proteínas Cry.

En este trabajo utilizamos dos tipos de ensayo para analizar la proliferación celular, sin embargo, los resultados con ambas pruebas de proliferación no son comparables entre si, ya que como se ha observado con anterioridad (Ramayo, 2005), Los índices de proliferación dependen del tipo de técnica empleada, sin embargo, Los resultados muestran que en todos los sitios analizados (IEL ID, IEL IG, LPL ID, LPL IG, bazo y PP) se induce proliferación celular, al establecer los índices de proliferación o índice de estimulación (*IE*) se elimina la proliferación debida a los factores de crecimiento del medio de cultivo.

La mayoría de las observaciones indican que la estimulación con un mitógeno ocurre fundamentalmente sobre los linfocitos T (Bohnlein *et al.* 1989; y Wimer, 1997), aunque, se plantea que las poblaciones de linfocitos B también se estimulan a proliferar y diferenciarse, en menor proporción (Utsinger *et al.* 1977), No obstante, se considera que la proliferación y diferenciación de los linfocitos B necesita, en última instancia, de la presencia de subpoblaciones de linfocitos T cooperadores que serían estimulados por el mitógeno (Clement, Dagg, Lehmeier y Kiyotaki, 1983).

Es importante mencionar que en este trabajo detectamos proliferación en células como la LP donde se considera que la mayoría de los linfocitos son efectores y han perdido la capacidad de proliferar, sin embargo se ha descrito que en estos sitios efectores existe proliferación de linfocitos, por ejemplo, después de la activación de células aisladas de la lámina propia se demostró que estas células fueron capaces de proliferar. (Bailey, *et al.* 1994).

Existe otro reporte en el que se describió la proliferación celular en monocitos de humano al estimular estas células con concentraciones variables de pCry1Ac y un lisado de 1×10^4 células de *S. pyogenes* y se observó que la mayor proliferación se presentaba al cultivar estos monocitos con el lisado y 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Cry1Ac. El autor atribuye al efecto de la pCry1Ac en estas células al estallido respiratorio, por lo que esta protoxina potencia la proliferación de células inmunocompetentes de una manera más poderosa que cuando solo se administra el patógeno (Rodríguez-Orozco, 2006). Las concentraciones empleadas coinciden con las que nosotros empleamos, sin embargo consideramos que el efecto de pCry1Ac involucra a un mayor espectro de células inmunes, no solo monocitos ya que al inmunizar se ha observado que se modifican diversas poblaciones celulares como son: células CD4+, CD8+ y células B (datos no mostrados).

Por otra parte en el presente trabajo se empleó una mezcla de células linfocitarias para la prueba de proliferación, lo que nos permitió evaluar los procesos de cooperación celular (como la presentación de antígeno). Los resultados sugieren que estos procesos no se afectaron, ya que de haberse presentado algún tipo de deficiencias de tipo celular no habría proliferación celular (Barta, 1993; Felsburg, 1994; Margni, 1996; Werner, 1983) y esta resultaría en la pérdida de proliferación (anergia), que se conoce son inducida por agentes patógenos y toxinas, que dañan la

respuesta inmune celular (Gregory, 1998, Martinez-Moreno, *et al.* 1995; Mosmann, 1983). Además, de que el empleo de linfocitos purificados por gradiente de centrifugación, no permite reproducir mejor las condiciones y procesos que ocurren *in vivo*.

Los resultados obtenidos para las concentraciones de RNA total concuerdan con los Índices de proliferación a las 4 horas de estímulo, pero no se debe descartar que puede existir un estado de activación diferente al basal cuando las células se estimularon con el antígeno (pCry1Ac).

5.4. Relación entre la producción de citocinas y la proliferación

En los últimos años se ha establecido una relación entre la proliferación celular y la producción de citocinas (Bird, *et al.* 1998 y Gett, *et al.* 1998). Mientras que la producción de IFN- γ puede estimular la división de células, la expresión de IL-4 se detecta solamente posterior a por lo menos tres ciclos de división (Bird, *et al.* 1998).

En el presente trabajo se presupone una regulación que no es Th1/Th2 ya que se encontró la presencia de IL-4 e IFN- γ , y la presencia de IL-4 y TGF- β inducen la proliferación de monocitos y nosotros detectamos proliferación celular en bazo, LPL ambos intestinos y en IEL de ambos intestinos (Fig. 15, 16 y anexo-1).

También, se ha estudiado la presencia de bajos niveles de proliferación de linfocitos T en pacientes con cáncer cervico uterino que se sugiere se debe a la presencia de citocinas inmunosupresoras como TGF- β 1 e IL-10, sin embargo, suponemos que este efecto depende de la concentración de ambas citocinas y la presencia y equilibrio en el microambiente, ya que aunque nosotros detectamos IL-10 y bajos niveles de TGF- β 1, estos niveles no fueron suficientes para inhibir la proliferación o las células que se están dividiendo no son células T, sino monocitos o células B productoras de anticuerpos en expansión clonal.

Bailey, (*et al.* 1994), describió una tendencia a producir IL-4 más que IL-2 en células de lámina propia murina, en algunas líneas de células T específicas de antígeno también se encontró que producen tanto IL-4 como IL-2 (Harriman, *et al.* 1992). Así mismo, los cultivos primarios de células T murinas, aisladas de tejidos

linfoides sólidos que drenan sitios de mucosas, secretaron IL-4 antes que IL-2 después de la activación con el antígeno o mitógeno (James, 1990 y Daynes, 1990)

Aunque las determinaciones de citocinas son complicadas, se ha descrito que la mayor acumulación de mRNA IL-2, IL-4 e IL-5 se ha encontrada a tiempos cortos en células activadas de la lamina propia, comparadas con células de bazo (James, *et al.* 1990).

Además, la inducción *in vivo* de células T a producir citocinas particulares se describió en ratones infectados por *Leishmania spp.*, y se reportó que las respuestas que implican IL-4 tienen que ver con la susceptibilidad a la enfermedad. (Heinzel, *et al.* 1989, Belosovic, 1989 y Sadick, 1990). El transcrito de mRNA de IL-4 se detectó en todos los tejidos estudiados, pero el PCR punto final no permitió mostrar diferencias en las concentraciones. (Bailey, *et al.* 1994).

Los patrones de citocinas producidos por células T activadas al parecer no son azarosos y pueden variar en diferentes ambientes. Tales diferencias pueden atribuirse a un predominio de las subpoblaciones diferentes de células T vírgenes o de memoria o de los efectos inductivos y reguladores de poblaciones diferentes de células accesorias locales y pueden ser relevantes para el éxito de una respuesta inmune (Bailey, *et al.* 1994). Los tipos de células presentes en los sitios en los cuales el antígeno se detecta tienen gran importancia en la determinación del tipo de respuesta producida.

Vázquez-Padrón, *et al.* 2000, asegura que el encontrar anticuerpos específicos contra pCry1Ac después de la inmunización en diferentes sitios linfoides como las PP, (nódulos linfáticos mesentéricos) MLN y LPL de ratones inmunizados por la vía intragástrica e intraperitoneal, es una evidencia de que los linfocitos B activados por la pCry1Ac en las PP migran a los MLN, mediante el ducto torácico y finalmente a la lamina propia intestinal.

Los linfocitos intraepiteliales (IEL) de ratón y humano se han caracterizado y se sabe poseen diferencias fenotípicas y funcionales entre ambos intestinos (Lefrancois, 1991 and Lundqvist *et al.*, 1995). La heterogeneidad funcional y fenotípica se ha caracterizado en linfocitos T de la lamina propia (LPL) murina (Boll and Reimann,

1995) y se caracterizaron las diferencias fenotípicas y funcionales en poblaciones de linfocitos de la lamina propia (LPL) de ambos intestinos fue caracterizada por Reséndiz-Albor (2005). Asimismo, los resultados obtenidos en respuestas humorales sustentan la compartimentalización del sistema inmune en sitios inductores y efectores (Moreno-Fierros, 1999; Brandtzaeg, 1999; Kantele 1998), las diferencias en la expresión de citocinas encontradas en el presente trabajo como respuesta al estímulo *in vivo* e *in vitro* con pCry1Ac apoyan la compartimentalización de las mucosas, ya que los linfocitos obtenidos de distintos compartimentos responden a la estimulación *in vitro* produciendo citocinas con diferente intensidad y diferente perfil.

Por otra parte, los tejidos reproductivos parecen jugar un papel importante en la regulación de la respuesta inmune en las mucosas reproductivas. En ese sentido, el sistema reproductor se parecería a los tejidos “inmuno privilegiados” como el ojo, a esta condición se le denomina inmunosupresión (Real-Navarrete, 2000), pero el sistema inmune debe defender a los tejidos y órganos ante una infección, dilucida los mecanismos reguladores de protección, se ha reportado que el TGF- β es producido de forma local y estratégica en el útero del ratón y eliminan células claves en el reconocimiento antigénico (los linfocitos T) induciendo su muerte (Díaz, *et al.* 1996), por esta ruta se conoce que pCry1Ac induce respuesta humoral que es predominantemente IgM, seguida de IgA e IgG, estos datos son importantes ya que la inducción de respuesta inmune humoral y celular en la mucosa genital es trascendente para prevenir infecciones virales y bacterianas de transmisión sexual (Moreno-Fierros, 1999).

Existen numerosas evidencias de que las células T de las mucosas son diferentes a las células T sistémicas (Bailey, *et al.* 1994), nuestros resultados confirman esta aseveración al proporcionar pruebas adicionales que apoyan la compartimentalización regional del sistema inmunológico intestinal al referir diversos niveles de expresión de citocinas en compartimentos de mucosas y sistémicos (Fig. 10-14). La inducción de inmunomodulación de la respuesta inmune de mucosas es deseable para prevenir una gran variedad de infecciones (Moreno-Fierros, *et al.* 2000), sin embargo, el mecanismo por el cual los antígenos inducen la producción de citocinas aun es confuso, pero puede estar relacionado con diferencias en exigencias de activación (Sperber, *et al.* 1995).

Finalmente, referimos que la producción de citocinas en distintos compartimentos es marcadamente diversa y puede ser el reflejo de diferencias significativas en exigencias de activación, nuestros datos apoyan el concepto que los perfiles de las citocinas inducidos por la interacción de células T y monocitos pueden ser dependientes del modo de la activación de la célula T como afirman Sperber y cols. (1995).

6. CONCLUSIONES

- pCry1Ac induce y/o modifica la producción de citocinas producidas constitutivamente.
- En todos los sitios analizados se observó la expresión constitutiva de los mensajeros de IL-4 (a excepción de TRF) e IFN- γ , sugiriendo la importancia de estas citocinas en las mucosas.
- Se observó que por la estimulación *in vitro* con pCry1Ac se eleva la expresión del mensajero para IL-4, más que la de IFN- γ (en varios compartimentos de mucosas: IEL ID, LPL IG, PP, bazo).
- pCry1Ac promueve y modifica los patrones de citocinas (Th1/Th2) de manera compleja dependiendo del compartimiento que se estudie en las mucosas.
- Se observó que la pCry1Ac induce la expresión de IL-10 en IEL-ID.
- Los resultados por PCR reverso en la LP-ID muestran la presencia del mensajero para IL-10 al inmunizar con pCry1Ac y correlaciona con los datos obtenidos anteriormente por citometría, indicando que la IL-10 proviene de linfocitos T CD4+.
- Detectamos que aunque los efectos inmunomoduladores de pCry1Ac varían en los linfocitos obtenidos de distintos compartimentos mucosos, en general observamos inducción de las citocinas reguladoras IL-10 y TGF- β .
- Se observó que el TGF- β se expresa constitutivamente en LPL-IG y TRF y que la pCry1Ac induce su expresión en LPL-ID, IEL-IG, IEL ID y en PP; manifestando la presencia de una respuesta Th3 en las mucosas.
- La expresión de citocinas más compleja se detectó en los linfocitos del TRF, lo que confirma una compleja respuesta en este compartimento.
- La proteína pCry1Ac es capaz de inducir proliferación en células linfoides, de manera similar a un mitógeno.
- Los resultados obtenidos sugieren la existencia de un posible receptor para pCry1Ac en células del sistema inmune, dado los rápidos efectos observados *in vitro*.

REFERENCIAS

- 1 **Abbas**, A. K., Murphy, K. M. and Sher, A., Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 1996. 383:787-793.
- 2 **Abbas**, A.K. Lichtamn, a.H. and Pober, J.S. 1998. *Inmunologia celular y Molecular*, 2a edición, McGraw hill-Interamericana, p. 540
- 3 **Abreu-Martin** MT, Targan SR. 1996. Regulation of immune responses of the intestinal mucosa. *Clin. Immunol. Immunopathol*16: 277-309.
- 4 **Adang**, M.J., M.J. Staver, T.A. Rocheleau, J. Leighton, R.F. Barker, and D.V. Thompson. 1985. Characterized full-length and truncated plasmid clones of the crystal protein of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-73 and their toxicity to *Manduca sexta*. *Gene* 36, 289-300.
- 5 **Bailey**, M. Hall L., Bland P. W. and Stokes C. R. 1994. Production of cytokines by lymphocytes from spleen, mesenteric lymph node and intestinal lamina propria of pigs. *Immunology* 82 577-583
- 6 **Barta**, O, Oyekan, P. 1981. Lymphocyte transformation test in veterinary clinical. immunology. *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.* 4 (2): 209-221.
- 7 **Barta**, O; Barta, V: Lymphocyte transformation test. En: Barta a (ed)-*Monographs in Animal Immunology*, Veterinary Clinical Immunology Laboratory. Bar-Lab, Inc.1993, Chapter 84, pp 84-1- 84-17.
- 8 **Beagley**, K.W. Beagley, K. Fujihashi, A.S. Lagoo, S. Logoo-Deenadaylan, C.A. Back, A.M. Murray, A.T. Sharmanov, M. Yamamoto, J.R. McGhee, C.O. Elson and J. Kiyono, 1995. Differences in intraepithelial lymphocyte T cell subsets isolated from murine small versus large intestine, *Journal of Immunology* 154 (1995) (11), pp. 5611–5619.
- 9 **Belosovic** M., Finbloom D.S., Van der Meide P.H., Slayter M.V. & Nacy C.A. (1989) Administration of monoclonal anti-IFN- γ antibodies in vivo abrogates natural resistance of C3H HeN mice to infection with *Leishmania major*. *J. Immunol.* 143, 266.
- 10 **Beverly**, B., Kang, S. M., Lenardo, M. ,1 and Schwartz, R. H., Reversal of in vitro T cell clonal anergy by IL-2 stimulation. *Int. Immunol.* 1992.4:661-671.
- 11 **Bird**, J. J., Brown, D. R., Mullen, A. C., P. noskowitz, N. H., Mahowald, M. A., Sider, J. R., Gajewski, T. F., Wang, C. R. and Reiner, S. L., Helper T cell differentiation is controlled by the cell cycle. *Immunity* 1998. 9:229-237.
- 12 **Bohnlein**, E., Ballard, D. W., Bogerd, H., Peffer, N. J., Lowenthal, J.W. & Greene, W. C. (1989). Induction of interleukin-2 receptor- α gene expression is regulated by post-translational activation of kappa 8 specific DNA binding proteins. *J Biol Chem*, 264, 8475-8.
- 13 **Boll** G, Rudolphi A, Spiess S, Reimann J. Regional specialization of intraepithelial T cells in the murine small and large intestine. *Scand J Immunol.* 1995 Feb;41(2):103-13.
- 14 **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.
- 15 **Brandtzaeg**, P. and Farstad, I.N. 1999. The human mucosal B-cell system. In Ogra, P.I., Mestecky, M.E., Iamm, M.E. and Strober, Wbienenstock, J. and McGhee (eds.), *Mucosal Immunology*, second edition, Academic Press, San Diego, CA, p.439-46E
- 16 **Brandtzaeg**, P.; E.S. Baekkevold, I.N. Farstad, F.L. Jahnsen, F.E. Johansen, E.M. Nilsen and T. Yamanaka, Regional specialization in the mucosal immune system: what happens in the microcompartments. *Immunol. Today* 20 (1999), pp. 141–151.
- 17 **Buckley**, L.J. 1984. RNA:DNA ratio and index of larval fish growth in the sea. *Mar. Biol.*, 80: 291-298
- 18 **Burton** SL, Ellar DJ, Li J, Derbyshire DJ. 1999. N-acetylgalactosamine on the putative insect receptor aminopeptidase N is recognised by a site on the domain III lectin-like fold of a *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxin. *J Mol Biol.* 1999 Apr 16;287(5):1011-22.
- 19 **Caballero**, S.M. 1998. Inmunología de la infección por helmintos. *Rev. Esp. Alergol. Inmunol. Clin.* 13(6):297-313.
- 20 **Cabrejos**, M. E., Tamayo C.E., Maldonado M.E. *Revista chilena pediátrica*, v.72 n.5 Santiago set. 2001.
- 21 **Cannon** R.J.C. *Bacillus thuringiensis* use in agriculture a molecular perspective. *Biol. Rev. Camb. Phil. Soc.* 1996. 71:561–636.
- 22 **Carol**, M., A Lambrechts, A Van Gossum, M Libin, M Goldman, F Mascart-Lemonea. 1998. Spontaneous secretion of interferon and interleukin 4 by human intraepithelial and lamina propria gut lymphocytes. *GUT* 1998;42:643-649

- 23 **Carson**, R. T. y D.A. Vignali, 2002. Simultaneous quantitation of 15 cytokines using a multiplexed flow cytometric assay.
- 24 **Clement**, L. T., Dagg, M. K., Lehmeyer, J. E. & Kiyotaki, M. (1983). Two phenotypically distinct suppressor T cell subpopulations inhibit the induction of B cell differentiation by phytohemagglutinin. *J Immunol*, 131, 1214-7.
- 25 **Crickmore** N, Zeigler DR, Feitelson J, Schnepf E, Van Rie J, Lereclus D, Baum J, Dean DH. 1998. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiol Mol Biol Rev*. 1998 Sep;62(3):807-13.
- 26 **Czerkinsky** C, Anjuere F, McGhee JR, George-Chandy A, Holmgren J, Kieny MP, Fujiyashi K, Mestecky JF, Pierrefite-Carle V, Rask C, Sun JB. 1999. Mucosal immunity and tolerance: relevance to vaccine development. *Immunol Rev*. Aug;170:197-222.
- 27 **Daynes**, R.A., Araneo B.A., Dowell, T.A., Huang, G K. & Dudley, D. (1990) Regulation of murine lymphokine production in vivo. III. The lymphoid tissue microenvironment exerts regulatory influences over T helper cell function. *J. exp. Med.* 171, 979.
- 28 **De Maagd**, R.A.; Bosch, D. y Stiekema, W. 1999. *Bacillus thuringiensis* toxin-mediated insect resistance in plants. *Trends Plant Sci.*, 4: 9-13.
- 29 **De Zubiría S.** 2000. *Conceptos Básicos en Asma Bronquial* 2a edición 2000. 400 pag.
- 30 **Díaz Flores**, M; Baiza Gutman, L; Hicks, J. 1996. Los nuevos moduladores endometriales en el embarazo temprano / New endometrial modulators in early pregnancy. *Gac. méd. Méx*;132(5):519-28, sept.-oct. 1996
- 31 **Denolf P**, Hendrickx K, Van Damme J, Jansens S, Peferoen M, Degheele D, Van Rie J. 1997. Cloning and characterization of *Manduca sexta* and *Plutella xylostella* midgut aminopeptidase N enzymes related to *Bacillus thuringiensis* toxin-binding proteins. *Eur J Biochem*. 1997 Sep 15;248(3):748-61.
- 32 **Felsburg**, P.J. 1994 Jul. Overview of the immune system and immunodeficiency diseases. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Practice* 24 (4): 29-653.
- 33 **Foussat**, A.; Cottrez, F.; Brun, V.; Fournier, N. Breittmayer J.P. y Groux H. A 2003. Comparative Study between T Regulatory Type 1 and CD4+CD25+ T Cells in the Control of Inflammation. *J Immunol*. Nov 15;171(10):5018-26..
- 34 **Francis**, B.R., Bulla, L.A. Jr. 1997. Further characterization of BT-R1, the cadherin-like receptor for Cry1Ab toxin in tobacco hornworm (*Manduca sexta*) midguts. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 27:541-550
- 35 **Fujimura** Y.2000. Evidence of M cells as portals of entry for antigens in the nasopharyngeal lymphoid tissue of humans. *Virchows Arch*. 2000 Jun;436(6):560-6.
- 36 **Ge** AZ, Pfister RM, Dean DH. 1990. Hyperexpression of a *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin-encoding gene in *Escherichia coli*: properties of the product. *Gene*. 1990 Sep 1;93(1):49-54
- 37 **Gett**, A. V. and Hodgkin, P. D., Cell division regulates the T cell cytokine repertoire, revealing a mechanism underlying immune class regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998.95:9488-9493.
- 38 **Gill** SS, Cowles EA, Francis V. 1995. Identification, isolation, and cloning of a *Bacillus thuringiensis* CryIAC toxin-binding protein from the midgut of the lepidopteran insect *Heliothis virescens*. *J Biol Chem* 1995, 270(45):27277-27282.
- 39 **Gregory**, C R; silv3, H T; Pratz, J D, ET AL. 1998. Comparative effects of malononitriloamide analogs of leflunomide on whole blood lymphocyte stimulation in humans, rhesus macaques, cats, dogs and rats. *Transplant Proc*. 30: 1047-1048.
- 40 **Guy-Grand**. D., S. M. Malassis, C. Briottet, and P. Vassalli. 1991. Cytotoxic differentiation of mouse gut thymodependent and independent intraepithelial T lymphocytes is induced locally: correlation between functional assays, presence of perforin and granzyme transcripts, and cytoplasmic granules. *J. Exp. Med.* 173:1549.
- 41 **Halstensen** T. 1997. Why are we not all allergic: basic mechanisms for tolerance development. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 1997; 4: 25-31.
- 42 **Hanson** LA, Luindin S, Karlsson M, Dahlman-Hoglund A, Dahlgren. U, Telemo E. 1998. Regulation of the immune response to oral administration of antigens in food allergic experimental animals. *Nutritional Research* 1998; 18: 1343-1350.
- 43 **Harriman** G.R., Hornqvist E. & lycke N.Y. (1992) Antigen-specific and polyclonal CD4+ lamina propria T-cell lines: phenotypic and functional characterization. *Immunology*, 75, 66.
- 44 **Heinzel** F.P., Sadick M.D., Holaday B.J., Coffman R.L. & Locksley R.M. (1989) Reciprocal expression of interferon γ or interleukin 4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis. Evidence for the expansion of distinct helper T cell subsets. *J. exp. Med.* 169, 59.

- 45 **Höfte** H, Whiteley HR. 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol Rev.* 1989 Jun;53(2):242-55.
- 46 **Hollemweger**, J. E. Ernst, D. Guenther, C., 2002. NEW CFSE T Cell Proliferation Kit. Clontech .Discovery Labware .Immunocytometry Systems. Pharmingen
- 47 **James S.P.**, Kwan W.C. & Sneller M.C. (1990) T cells in inductive and effector compartments of the intestinal mucosal immune system of nonhuman primates differ in lymphokine mRNA expression, lymphokine utilization, and regulatory function. *J. Immunol.* 144, 1251.
- 48 **Jenkins** MK, Miller RA. 1992. Memory and anergy: challenges to traditional models of T lymphocyte differentiation. *FASEB J.* 1992 Apr;6(7):2428-33.
- 49 **Kantele**, A.; M. Häkkinen, Z. Moldoveanu, A. Lu, E. Savilahti, R.D. Alvarez, S. Michalek and J. Mestecky, Differences in immune responses induced by oral and rectal immunizations with *Salmonella typhi* Ty21a: evidence for compartmentalization within the common mucosal immune system in humans. *Infect. Immun.* 66 (1998), pp. 5630–5635.
- 50 **Knight**, N. Crickmore, PJ, Ellar DJ.1994. The receptor for *Bacillus thuringiensis* CryIA(c) delta-endotoxin in the brush border membrane of the lepidopteran *Manduca sexta* is aminopeptidase. *Mol Microbiol.* 1994 Feb;11(3):429-36.
- 51 **Knowles** BH, Knight PJ, Ellar DJ. 1991. N-acetyl galactosamine is part of the receptor in insect gut epithelia that recognizes an insecticidal protein from *Bacillus thuringiensis*. *Proc Biol Sci.* 1991 Jul 22;245(1312):31-5.
- 52 **Knowles**, B. H. and Dow, J. A. T. (1993). The crystal d-endotoxins of *Bacillus thuringiensis*: models for their mechanism of action on the insect gut. *BioEssays* 15, 469–476.
- 53 **Kronenberg** M. 1991. Self-tolerance and autoimmunity. *Cell.* 1991 May 17;65(4):537-42.
- 54 **Kruse** N, Shen BJ, Arnold S, Tony HP, Muller T, Sebald W. 1993. Two distinct functional sites of human interleukin 4 are identified by variants impaired in either receptor binding or receptor activation. *EMBO J.* Dec 15;12(13):5121-9
- 55 **Laemmli**, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T 4. *Naturb.* 227:680-685.
- 56 **Lee** MK, You TH, Gould FL, Dean DH. 1999. Identification of residues in domain III of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin that affect binding and toxicity. *Appl Environ Microbiol.* 1999 Oct;65(10):4513-20.
- 57 **Lefrancois**, L 1991. Phenotypic complexity of intraepithelial lymphocytes of the small intestine. *The Journal of Immunology*, Vol 147, Issue 6 1746-1751
- 58 **Lorente** F, Romo A, Laffod E, Dávila E. 1998. Medidas de prevención de las enfermedades alérgicas. *Allergologia et Immunopathologia* 1998; 26: 97-109.
- 59 **Lundqvist**, C., Baranov, V., Hammarström, S., Athlin, L., and Hammarström, M.L. 1995. Intraepithelial lymphocytes. Evidence for regional specialization and extrathymic T cell maturation in the human gut epithelium. *International Immunology*, Vol. 7, No. 9, pp. 1473-1487.
- 60 **Margni** R.A. 1996. Inmunología e inmunohistoquímica: Fundamentos, Editorial Medica Panamericana, Argentina I p. 179-183
- 61 **Martinez-Moreno**, A; Moreno T; Martinez-Moreno, F J; Acosta, I; Hernandez, S. 1995. Humoral and cell-mediated immunity in natural and experimental canine leishmaniasis. *Vet. Immunol. and Immunopathol.* 48: 209-220.
- 62 **Mayer** L. 2000. Epithelial cell antigen presentation. *Curr Opin Gastroenterol.* Nov;16(6):531-5.
- 63 **Mayes** ME, Held GA, Lau C, Seely JC, Roe RM, Dauterman WC & Kawanishi R. 1989. Characterization of the mammalian toxicity of the crystal polypeptides of *Bacillus thuringiensis* subsp israelensis. *Fundamental and Applied Toxicology*, 13: 310-316.
- 64 **McGhee**, J.R., Lamm, M:E. and Strober, W. 1999. Mucosal immune responses: an overview. In Ogra, P.L., Mestecky, M.E., Lamm, M:E. and Strober, Wbienenstock, J. and McGhee (eds.), *Mucosal Immunology*, second edition, Academic Press, San Diego, CA, p.485-506.
- 65 **Moreno-Fierros** L, Vazquez-padron R., Esquivel M.R. 1999. Immunomodulatory effects of intranasal and rectal coadministration of Cry1Ac protoxin with BSA and HbsAg in mice.
- 66 **Moreno-Fierros**, L. Resendiz-Albor, A.A., Lopez Revilla R. 1999. Different antiamebic antibody isotype patterns in the large and small intestine after local and systemic immunization of mice with glutaraldehyde fixed trophozoites. *Life Sci* 64: 1079-1089.
- 67 **Mosmann**, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. of Immunological Methods* 65: 55-63.
- 68 **Murray** KJ, Grom AA, Thompson SD, Lieuwen D, Passo MH, Glass DN. 1998. Contrasting cytokine profiles in the synovium of different forms of juvenile rheumatoid arthritis and

- juvenile spondyloarthritis: prominence of interleukin 4 in restricted disease. *J Rheumatol.* (7):1388-98.
- 69 **O'Garra, A.**, Cytokines induce the development of functionally heterogeneous T helper cell subsets. *Immunity* 1998. 8:275-283.
- 70 **Okamura, M;** Sumida, K; Muto, T; Kashida, Y; Machida, N; Watanabe, T; Mitsumori, K; 2004. Analysis of gene expression profiles of forestomach tumors in rasH2 mice initiated with N-ethyl-N-nitrosourea. *Arch Toxicol* 78: 688–696
- 71 **Parish, C.R.**, 1999. Fluorescent dyes for lymphocyte migration and proliferation studies. *Immunol. Cell Biol.* 77, 499.
- 72 **Prasad SS, Shethna YI.** 1975. Enhancement of immune response by the proteinaceous crystal of *Bacillus thuringiensis* var *thuringiensis*. *Biochem Biophys Res Commun.* 1975 Feb 3;62(3):517-23.
- 73 **Ramayo, L. G.,** Soba, M. G., Mundo, S. L. Evaluación de la inmunidad celular en caninos: prueba de proliferación de linfocitos in vitro. *Investigación veterinaria.*(7) 1514-6634
- 74 **Resendiz-Albor A.A.** 2000. Diferencia regionales en las poblaciones de linfocitos T y B en el epitelio y la lamina propia del intestino de ratón. Efecto de la inmunización intraperitoneal con la protoxina Cry1Ac de *Bacillus thuringiensis*. Tesis de maestría. Biología Celular.
- 75 **Real-Navarrete, L.M.** Soriano, S. N. 2000. Inducción de tolerancia (II). *Ciencia, Tecnología y Medicina. JANO EMC* 59: (1360). 69 - 76
- 76 **Resendiz-Albor A.A.** Esquivel, R, López-Revilla,R., Verdín, L, Moreno-Fierros L. 2005 Striking phenotypic and functional differences in lamina propria lymphocytes from the large and small intestine of mice. *Life Sci.* 2005 Apr 29;76 (24):2783-803
- 77 **Rodríguez-Orozco, A.** 2006. Efecto coadyuvante de la protoxina Cry1Ac en la inmunidad celular al administrarla con un buen agente patógeno de mucosas. *Revista Alergia México.* 53(4):125-129.
- 78 **Rojas-Espinosa, O.**2001. Inmunología (de memoria). Ed. panamericana. pp.374.
- 79 **Sabbaj, S.,** Kiyono, H., and McGhee, J. "Mucosal Immunisation for Enteric Diseases" *BioDrugs,* 2:134-157, Adis International Ltd., 1997.
- 80 **Sadick M.D.,** Heinzl F.P., Holaday B.J., Pu R.T., Dawkins R.S. & Locksley R.M. (1990) Cure of murine leishmaniasis with anti interleukin 4 monoclonal antibody. Evidence for a T cell dependent, interferon γ -independent mechanism. *J. exp. Med.* 171, 115.
- 81 **Sambrook, J.,** Fritsch, E.F., and Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- 82 **Sanchez, G.;** Zulantay, I.; Gajardo, M.; Venegas, J.; Villanueva, R.; Perez, A.; Liendo, F.; Werner A., Solari, A. Immunophenotyping by flow cytometry of peripheral blood lymphocytes from Chilean chronic chagasic patients *Rev. m d. Chile* v.130 n.4 Santiago abr. 2002
- 83 **Sanchez-Vizcaino JM,** Slauson DO, Ruiz-Gonzalvo F, Valero F. 1981. Lymphocyte function and cell-mediated immunity in pigs with experimentally induced African swine fever.
- 84 **Sanz. M. L.** 2001. Inmunidad del tracto intestinal. Procesamiento de antígenos. *Alergol Inmunol Clin* 2001;16 (Extraordinario Núm. 2):58-75
- 85 **Schnepf E,** Crickmore N, Van Rie J, Lereclus D, Baum J, Feitelson J, Zeigler DR, Dean DH. 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol Mol Biol Rev.* 1998 Sep;62(3):775-806.
- 86 **Shitomi Y,** Hayakawa T, Hossain DM, Higuchi M, Miyamoto K, Nakanishi K, Sato R, Hori H. 2006. A novel 96-kDa aminopeptidase localized on epithelial cell membranes of *Bombyx mori* midgut, which binds to Cry1Ac toxin of *Bacillus thuringiensis*. *J Biochem (Tokyo).* 2006 Feb;139(2):223-33.
- 87 **Simecka JW.** 1998. Mucosal immunity of gastrointestinal tract and oral tolerance. *Advanced Drug delivery Reviews* 1998; 34: 235-259.
- 88 **Smith, M.R.** DeGudicibus, S. J. Stacey, D. W. 1986. Requirement for c-ras proteins during viral oncogene transformation. *Nature* 320:540-543.
- 89 **Spangler B.D.** 1992. Structure and function of cholera toxin and the related *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. *Microbiol. Rev.* 56:622-647
- 90 **Sperber K,** Silverstein L, Brusco C, Yoon C, Mullin GE, Mayer L. 1995. Cytokine secretion induced by superantigens in peripheral blood mononuclear cells, lamina propria lymphocytes, and intraepithelial lymphocytes. *Clin Diagn Lab Immunol.* 1995 Jul;2(4):473-7.
- 91 **Strober W** and K Kelsall, 1998. To be responsive or not to be responsive. That is the mucosal question. *Gastroenterology.* 114:214-217

- 92 **Tizard, I.** *Inmunología Veterinaria*. 3° ed. Ed. Interamericana. 1984,
- 93 **Trinchieri, G.** 1994. Interleukin-12: a cytokine produced by antigen-presenting cells with immunoregulatory functions in the generation of T-helper cells type 1 and cytotoxic lymphocytes. *Blood*. 84:4018-27
- 94 **Ulett, G. C., Ketheesan, N. and Hirst R. G.** Cytokine Gene Expression in Innately Susceptible BALB/c Mice and Relatively Resistant C57BL/6 Mice during Infection with Virulent *Burkholderia pseudomallei*. *Infection and Immunity*, 68:(4)2034-2042, (2000)
- 95 **Utsinger, P. D., Yount, W. J., Fallon, J. G., Loge, M. J., Fuller, C. R. & Elliot, D.** (1977). Cytofluorometric analysis of the kinetics of lymphocyte transformation after phytohemagglutinin stimulation: comparison with the kinetics of thymidine incorporation. *Blood*, 49, 33-46.
- 96 **Valaitis, A., M. K. Lee, F. Rajamohan, and D. H. Dean.** 1995. Brush border membrane aminopeptidase-N in the midgut of the gypsy moth serves as the receptor for the CryIA(c) δ-endotoxin of *Bacillus thuringiensis*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 25:1143–1151.
- 97 **Vázquez-Padrón R.I., Gonzalez-Cabrera J., Garcia-Tovar C., Neri-Bazan L, López-Revilla R., Hernandez M., Moreno-Fierros L, De la Riva G.A.** 2000. Cry1Ac protoxin from *Bacillus thuringiensis* sp. kurstaki HD73 binds to surface proteins in the mouse small intestine. *Biochem. Biophys Res Comm.* 271 :54-58.
- 98 **Vázquez-Padrón R.I., Moreno-Fierros L, Neri-Bazan L, De la Riva G.A, López-Revilla R.** 1999. *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac protoxin is a potent systemic and mucosal adjuvant. *Scand. J. Immunol* 46:578-584.
- 99 **Vázquez-Padrón R.I., Moreno-Fierros L, Neri-Bazan L, De la Riva G.A, López-Revilla R.** 1999. Intragastric and intraperitoneal administration of Cry1Ac protoxin from *Bacillus thuringiensis* induce systemic and mucosal antibody responses in mice. *Life Sci* 64:1897-1912.
- 100 **Vázquez-Padrón R.I., De la Riva, G., Selman-Housein G.** 1996. Development of an immunoradiometric assay for quantitative determination of CryIA (b) protein in transgenic sugarcane plants. *J. Immunol. Meth.* 196:33-39.
- 101 **Velásquez G, H; Sanchez, V, J Lopez C.J.** 2001. *Citocinas*. Mexicali, B.C. Universidad Autónoma de Baja California. 194 p
- 102 **Wang XZ, Zhang SJ, Chen YX, Chen ZX, Huang YH, Zhang LJ.** 2004. Effects of platelet-derived growth factor and interleukin-10 on Fas/Fas-ligand and Bcl-2/Bax mRNA expression in rat hepatic stellate cells in vitro. *World J Gastroenterol.* 2004 Sep 15;10(18):2706-10.
- 103 **Werner, L L.** Immunological diseases affecting internal organ systems. En: *Ettinger S.J.* (ed). *Textbook of Veterinary Internal Medicine*, vol. II. 2° ed. WB Saunders Co. Chapter 83, 1983, pag. 2158-2185.
- 104 **Wilson A.D., Crarke C.J., Stokes C.R.** 1990. Whole cholera toxin and B subunit act synergistically as an adjuvant for the mucosal immune response of mice to keyhole limpet hemocyanin. *Scand J. Immunol.* 139:3764-3775.
- 105 **Wimer, B. M.** (1997). Therapeutic immunostimulating effects of plant mitogens exemplified by the L4 isolectin of PHA. *Cancer Biother Radiopharm*, 12, 195-212.
- 106 **Zahner, V., Momen, H., Salles, C.A. Rabinovitch L.** 1989. A comparative study of enzyme variation in *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*. *J. Appl. Bacteriol.* 67:275-282.

ANEXO-1

Proliferación celular encontrada en los distintos compartimentos de mucosas

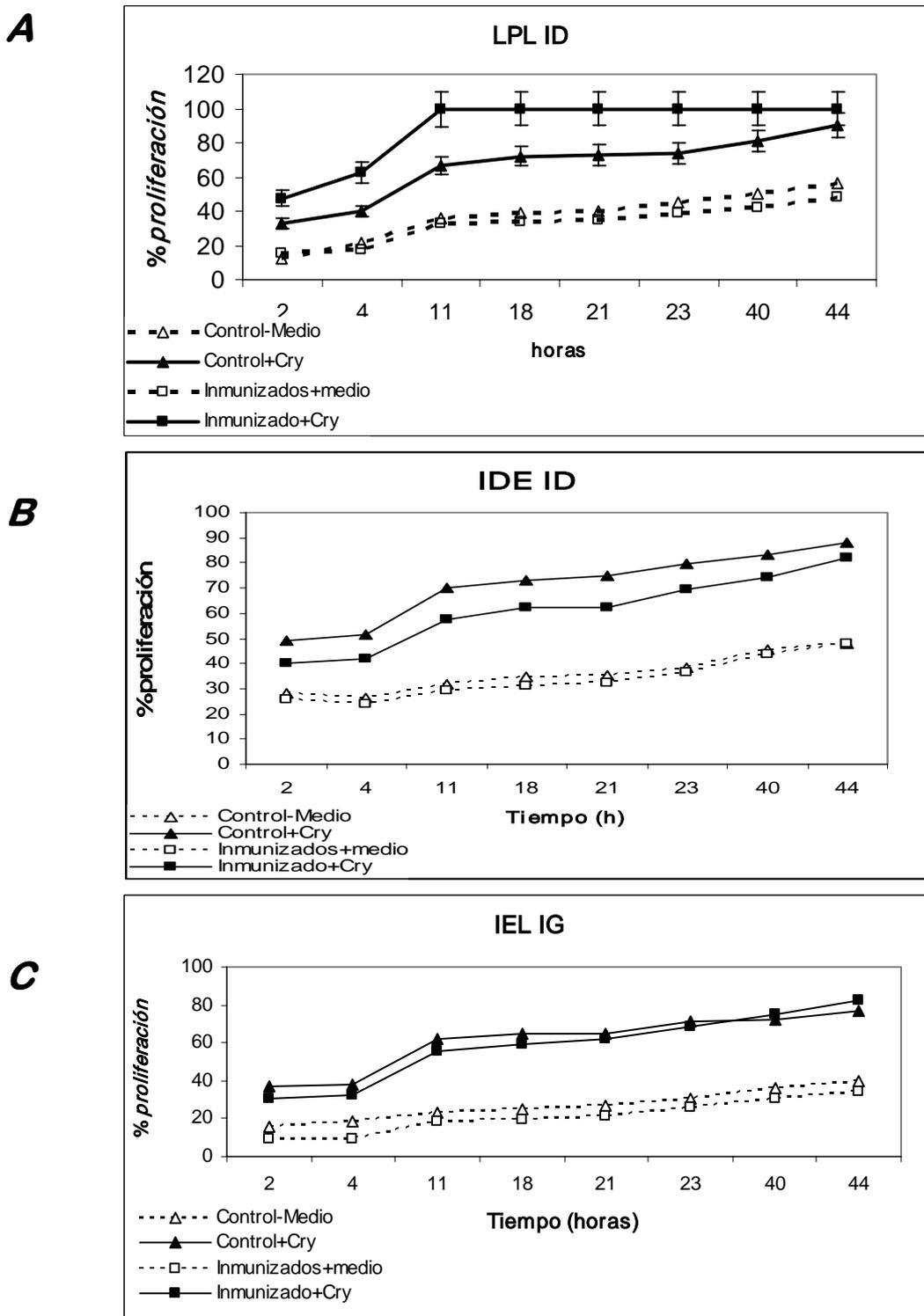
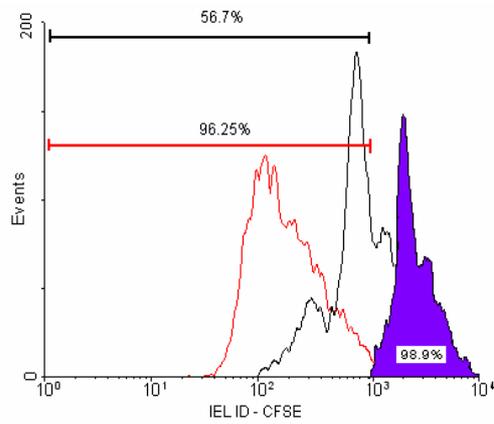


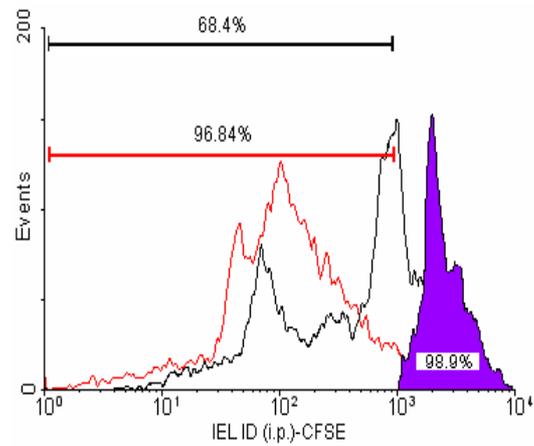
Figura A1. Gráficas de proliferación celular de linfocitos obtenidos de lamina propia de intestinos delgado y de linfocitos intraepiteliales de ambos intestinos de ratones control y de ratones después de tres inmunizaciones i.p. con pCry1Ac y estimulados o re-estimulados *in vitro* con $10 \mu\text{g pCry1Ac} / 1 \times 10^6$ células.

Datos de citometría de flujo obtenidos con la prueba de CFSE para determinar la proliferación celular en los distintos compartimentos de mucosas.

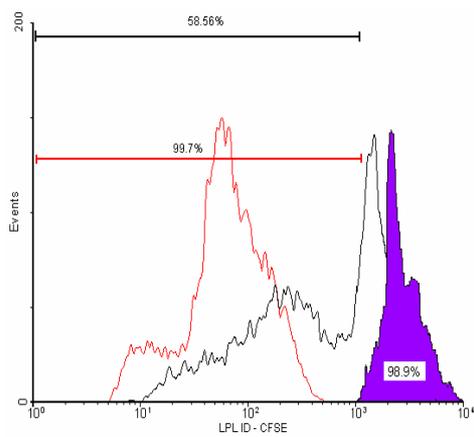
A) IEL ID Control estimulado Cry



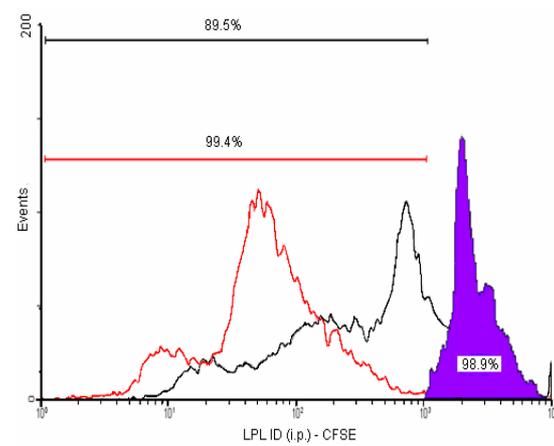
B) IEL ID Inmunizado re-estimulado Cry



C) LPL ID Control estimulado Cry



D) LPL ID Inmunizado re-estimulado Cry



Continúa.....

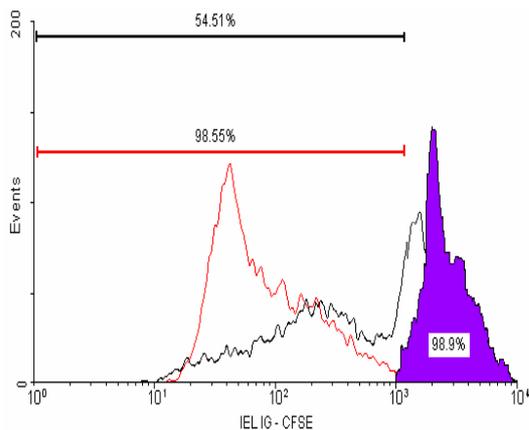
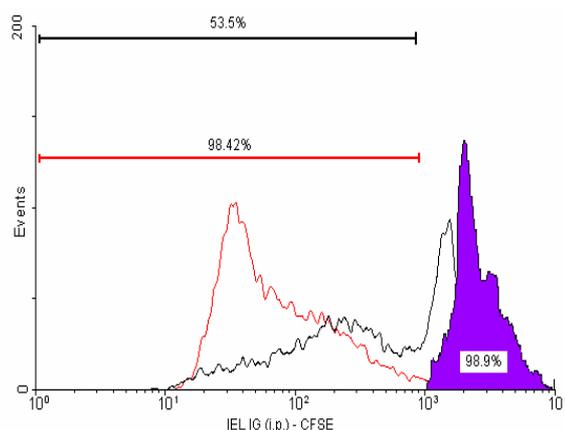
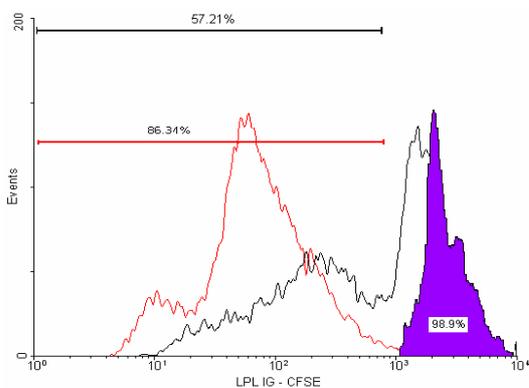
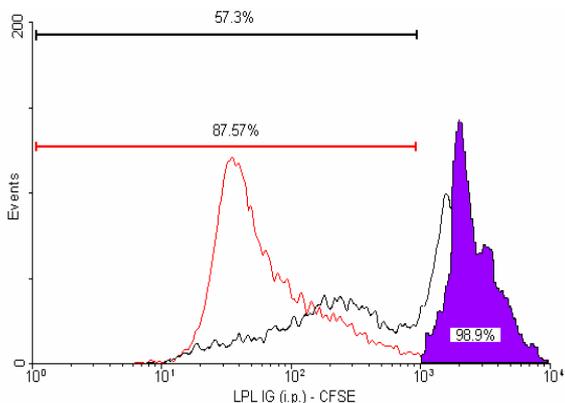
E) IEL IG Control estimulado Cry**F) Inmunizado re- estimulado Cry****G) LPL IG Control estimulado Cry****H) LPL IG Inmunizado re- estimulado Cry**

Figura A2. Gráfica de proliferación mediante CFSE de cultivos celulares de linfocitos obtenidos de animales control e inmunizados y estimulados in vitro por 72 horas **A)** IEL ID Control estimulado con pCry1Ac, **B)** IEL ID Inmunizado re-estimulado pCry1Ac, **C)** LPL ID Control estimulado con pCry1Ac, **D)** LPL ID Inmunizado re-estimulado pCry1Ac **E)** IEL IG Control estimulado pCry1Ac, **F)** Inmunizado re-estimulado pCry1Ac, **G)** LPL IG Control estimulado pCry1Ac; **H)** LPL IG Inmunizado re-estimulado pCry1Ac Se presentan los histogramas representativos de tres mediciones independientes.

ANEXO-2

Graficas que muestran la producción de citocinas por tejido analizado.

