

Efecto inmunogénico de la pCry1Ac en la mucosa del tracto genital e intestinal

Tte. Corb. SSN. M.C.N. Miguel Leonardo Méndez- Rodríguez,*

Subtite. Q.B.M. en C. Gabriel Silva-Escobedo,** M. en C. Aldo Resendiz-Albor,***

Cor. M.C. M. en C. Ramón A. Valdés-Espinosa,**** Dra. Leticia Moreno-Fierros*****

Escuela Militar de Graduados de Sanidad. Inmunología de Mucosas FES-Iztacala, UNAM.

RESUMEN

Introducción. Las mucosas constituyen la entrada de la mayoría de los agentes infecciosos, por lo que se requiere diseñar estrategias de vacunación. La inmunización intranasal (IN) proporciona inmunidad en el tracto genitourinario. Se desconoce cómo esta inmunización induce una respuesta inmune en una mucosa distante. La protoxina Cry1Ac (pCry1Ac), de *Bacillus thuringiensis* (Bt) es altamente inmunogénica con efectos adyuvantes a nivel sistémico y en mucosas por la ruta intraperitoneal.

Objetivo. Estudiar los efectos inmunogénicos de la pCry1Ac tanto a nivel sistémico como en las mucosas del tracto genital y del intestino grueso.

Método. Se inmunizaron ratones hembras Balb/c de 6-8 semanas de edad con 50 µg de la pCry1Ac vía IN e IV, por semana, completando tres inmunizaciones, sacrificándolos siete días después de la última dosis y se analizaron los niveles de anticuerpos específicos para la pCry1Ac por ELISA.

Resultados. La pCry1Ac por la ruta IN incrementó la IgA, IgG e IgM a nivel sistémico y de la IgA e IgG en el intestino grueso y tracto genital, mientras que la IgG e IgM se incrementaron en el tracto genital por la ruta IV ($p < 0.05$).

Conclusiones. La pCry1Ac podría ser un adyuvante para inducir respuestas inmunes a nivel sistémico así como al nivel de mucosas.

Palabras clave: pCry1Ac, intranasal, intravaginal, anticuerpos, inmunógeno, adyuvante.

Immunogenic effect of pCry1Ac in the mucosa of the genital and intestinal tracts

SUMMARY

Introduction. The mucosas constitute the income of most of the infectious agents, which requires vaccination strategies design. Intranasal immunization (IN) provides immunity at the genitourinary tract. How this immunization induces a immune response in a distant mucosa? It is unknown. The protoxin CryAc (pCry1Ac), of *Bacillus thuringiensis* (Bt) is highly immunogenic with adjuvant effects at systemic level and in mucosas by the intraperitoneal route.

Objective. To study the immunogen effects from pCry1Ac in systemic, genital tract and intestine large tract of mice mucosa.

Method. Female mice Balb/c of 6-8 weeks old were immunized with 50 mg of the pCry1Ac by IN and IV route, per week, completing three immunizations, sacrificing them seven days after it finishes their doses and anti- Cry1Ac antibodies for ELISA were analyzed.

Results. The pCry1Ac for IN route increases IgA, IgG and IgM at systemic level and IgA and IgG in the large intestine and genital tract, while the IgG and IgM were increased in the genital tract by IV route ($p < 0.05$).

Conclusions. The pCry1Ac could be an adjuvant to induce response at the systemic level as well as at the mucosa level.

Key words: pCry1Ac, intranasal, intravaginal, antibodies, immunogen, adjuvant.

* Alumno de Maestría en Ciencias Biomédicas, Escuela Militar de Graduados de Sanidad. ** Investigador del Laboratorio Multidisciplinario de Investigación de la E.M.G.S. *** Investigador del Laboratorio de Inmunología de Mucosas FES-Iztacala, UNAM. **** Subdirector de Investigación de la Escuela Militar de Graduados de Sanidad. ***** Jefa del Laboratorio de Inmunología de Mucosas FES-Iztacala, UNAM.

Correspondencia:

Tte. Corb. SSN. M.C.N. Miguel Leonardo Méndez-Rodríguez

Laboratorio Multidisciplinario de Investigación. Área Inmunología, Escuela Militar de Graduados de Sanidad. Cerrada de Palomas S/N Col. Lomas de San Isidro C.P. 11620, Del. Miguel Hidalgo, México, D.F. Tel: 01(55)5540-0759 Ext. 4 Fax: 01(55)5540-0759 Ext. 8

Correo electrónico:leonardomiguel@prodigy.net.mx

Recibido: Abril 14, 2004.

Aceptado: Agosto 3, 2004.

Introducción

Las superficies mucosas constituyen la ruta de entrada de la mayoría de los agentes infecciosos de las enfermedades de transmisión sexual, entre otros, las infecciones virales como el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), herpes virus, infecciones por hongos como la candidiasis vulvovaginal, o por parásitos intracelulares, donde uno de los más comunes es la *Chlamydia trachomatis*.^{1,2}

Para generar protección específica contra la gran variedad de patógenos que invaden las superficies mucosas se requieren formas de vacunación capaces de inducir respuestas inmunes específicas en los sitios deseados.³

Los mejores inmunógenos conocidos de mucosas hasta la fecha son los microorganismos vivos; a éstos le siguen los microorganismos muertos y los antígenos particulados.⁴ La toxina de cólera (CT) es el más potente inmunógeno y adyuvante de mucosas, sin embargo, su toxicidad y sus altos costos de producción limitan su aplicación en vacunas.⁵ Recientemente se ha descubierto que la protoxina Cry1Ac (pCry1Ac) de *Bacillus thuringiensis* (Bt) es un inmunógeno y adyuvante a nivel sistémico y de mucosas tan potente como la CT administrado por la ruta intraperitoneal (IP) en ratones Balb/c.⁶

Sin embargo, aunque la inmunización intranasal (IN) puede ser una ruta altamente efectiva para inducir inmunidad en el tracto genitourinario, aún se desconoce cómo la inmunización en el tejido linfóide asociado a nariz (NALT) induce una respuesta inmune en una mucosa distante como la del tracto genital e intestino grueso.⁷

Material y métodos

Purificación de pCry1Ac

E. coli JM103 (pOS9300) fue donada por el Dr. Donald Dean de la Ohio State University (Columbus, EEUU), de donde se obtuvo la pCry1Ac recombinante al inducir su síntesis con isopropil β -D-tiogalactopiranosido (IPTG) 1mM. Las bacterias estimuladas con IPTG se cosecharon a 20,000 x g a 4 °C por 10 minutos y se lavaron dos veces con amortiguador TE (Tris-HCl 0.05M, EDTA 1mM, pH 8.0). Posteriormente se incubó a 37 °C durante 1 hora con 20 mg/mL de lisozima para posteriormente sonicarla durante cinco minutos, tres veces en hielo (Fisher Sonic Dismembrator modelo 300), a una amplitud de 100 entre 17-20 watts. Los cuerpos de inclusión se recuperaron por centrifugación a 20,000 x g a 4 °C por 10 minutos, al término se lavaron dos veces con 50 mL de NaCl 0.5M más Triton X-100 a 1% a 20,000 x g a 4 °C por 10 minutos para resuspenderla en 50 mL de NaCl 0.5 M y se realizó otra centrifugación con las mismas condiciones para resuspenderla en 30 mL de agua bidestilada a 4 °C y se volvió a centrifugar para solubilizar la pastilla en 10 mL de amortiguador de carbonatos (Na_2CO_3 0.1M pH 9.6 más 50 μL de β -mercaptoetanol por 30 minutos a 37 °C con baño de agitación. La pCry1Ac solubilizada se obtuvo por centrifugación a 20,000 x g a 4 °C por 15 minutos, recuperando el sobrenadante. Eliminando los restos de endotoxina

pasándolo por una columna de polimixina (Affi-Prep® Polymyxin Matriz BIO-RAD 156-0010), la cual tiene una capacidad de unión a endotoxina de 5 mg/mL. Posteriormente se verificó su pureza con la prueba de detección semicuantitativa de endotoxina Sigma E-TOXATE® (*Limulus* amoebocyte lysate). Finalmente la concentración de proteínas se determinó por el método de Bradford y la pureza se determinó mediante electroforesis en gel de poli(acrilamida)-dodecil-sulfato de sodio al 10% (SDS-PAGE) y la proteína se almacenó a 4 °C hasta ser usada.^{8,9}

Inmunización

Se inmunizaron ratones hembras Balb/c de seis a ocho semanas de edad con 50 μg de la pCry1Ac disueltos en 20 μL de amortiguador salino de fosfatos (PBS) administrados por vía intranasal (IN), e intravaginal (IV). Cada grupo experimental consistió de cinco ratones que recibieron tres dosis en los días 0, 7 y 14, mientras que el grupo control recibió tres dosis con 20 μL de PBS. Los ratones fueron sacrificados en el día 21, recolectando las muestras de suero y los líquidos del intestino grueso y de vagina de cada uno.

Obtención de las muestras

Líquidos vaginales, intestinales y suero. Siete días después de la última inmunización y antes de sacrificar a los ratones se realizó un lavado vaginal a cada ratón con 150 μL de medio RPMI-1640 (Sigma), utilizando una micropipeta se le adicionaron 15 μL de ácido p-hidroximercuribenzoico 100 mM (PHMB) como inhibidor de proteasas para centrifugar a 20,000 x g por 10 minutos a 4 °C. Se recuperó el sobrenadante y se guardó a -20 °C hasta su uso. Inmediatamente se sacrificó a los ratones con éter obteniendo sangre por punción cardíaca, se recuperó el suero por centrifugación y se almacenó a -20 °C hasta su uso. Una vez sacrificados los ratones y de haber disecado el intestino grueso, éstos se lavaron con 3 μL de medio RPMI-1640 para posteriormente a cada lavado intestinal agregarle 300 μL de PHMB 100 mM, centrifugarlo a 20,000 x g por 10 minutos a 4 °C, para recuperar los sobrenadantes y guardarlos a -20 °C hasta ser utilizados.

Cuantificación de IgA, IgG e IgM específicas para pCry1Ac

Para determinar las inmunoglobulinas específicas para pCry1Ac en suero y en los líquidos del intestino grueso y de la vagina, se usó una prueba de ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA). Las muestras fueron analizadas por triplicado.

En una placa de 96 pozos (Costar Inc.) fue cubierta por pCry1Ac a una concentración de 1 $\mu\text{g}/100$ mL de amortiguador de carbonatos pH 9.6, toda la noche a 4 °C, después de esta incubación, las placas fueron lavadas tres veces con PBS-Tween 20 al 0.05%, para luego bloquear con leche al 6% (Svelty Nestle®) a 4 °C toda la noche, posteriormente se lavaron las placas tres veces con PBS-Tween 20 al 0.05%, y adicionar 100 μL de cada suero (1:1000) y 100 μL de líqui-

do intestinal y vaginal por pozo, para dejar incubando toda la noche a 4 °C. El siguiente paso fue lavar nuevamente tres veces con PBS-Tween 20 al 0.05%. Posteriormente se adicionaron 100 µL/pozo de los anticuerpos conjugados con peroxidasa anti IgA (SIGMA®), anti IgG y anti IgM (PIERCE®) a una dilución de 1:3000, y dejar incubando por dos horas a 37 °C, al término de las dos horas se adicionaron 100 µL/pozo del sustrato (ácido cítrico 0.1M, Na₂HPO₄ 0.2M, H₂O₂ al 30% y ortofenilendiamina) por 15 minutos, y detener la reacción con H₂SO₄ 1.5M, para leer a 492 nm en un lector de placas (Termo Labsystems Multiskan Ascent). Los resultados se reportan en unidades de absorbancia.

Estadística

El análisis estadístico se llevó a cabo mediante los programas SigmaStat 2.03 y SigmaPlot 4.01. Realizando un análisis de varianza de dos vías (ANOVA) para determinar si las diferencias entre las unidades de absorbancia de los anticuerpos después de la inmunización con pCry1Ac eran estadísticamente significativas con respecto al grupo control, considerando valores de $p \leq 0.05$.

Resultados

PCry1Ac

Después de cultivar la cepa de *E. coli* JM103 (pOS9300) de donde se encontraba inserto el gen para la producción de pCry1Ac, se logró obtener una pCry1Ac con una concentración de 2.5 µg/µL libre de endotoxina en un volumen final de 20 mL (Figura 1).

Anticuerpos específicos para pCry1Ac

En general los niveles de IgA, IgG e IgM séricas se incrementaron por la ruta IN, mientras que la ruta IV aumentó la IgG e IgM respecto al grupo control (Figura 2).

La inmunización IN tuvo una respuesta inmunogénica sobre la mucosa del intestino grueso al incrementar únicamente los niveles de IgA e IgG específicos para Cry1Ac, en contraste no se observó una respuesta inmunogénica al inmunizar por la ruta IV. Además tampoco se observó una respuesta de la inmunoglobulina IgM por ninguna ruta de inmunización (Figura 3).

Para los anticuerpos obtenidos de la mucosa vaginal se encontró que la ruta IN incrementó tanto la IgA como la IgG. Por otro lado, se encontró una respuesta humoral importante por la ruta IV sobre la mucosa del tracto genital al incrementar tanto la IgG como la IgM (Figura 4).

Discusión

La administración de la pCry1Ac tanto por la ruta IN como por la ruta IV tuvo un efecto inmunogénico al inducir anticuerpos específicos en suero y en las mucosas del tracto genital y del intestino grueso, sin embargo, la magnitud de cada respuesta depende de la ruta de inmunización, del sitio y del isotipo analizado, como se observó con el incremento de la

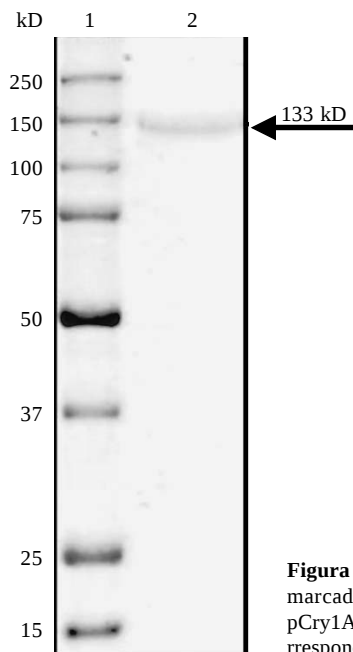


Figura 1. SDS-PAGE al 10%. Carril 1 marcador de peso molecular, carril 2 pCry1Ac. La flecha indica la banda correspondiente a la pCry1Ac de 133kD.

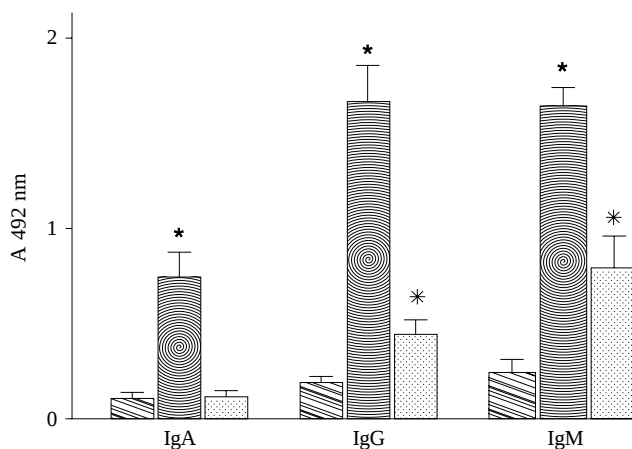


Figura 2. Anticuerpos séricos anti pCry1Ac. Incremento en los niveles de IgA, IgG e IgM anti pCry1Ac por la ruta IN (*) y de IgG e IgM por la ruta IV (*) $p < 0.05$.

IgA e IgG por la ruta IN en la mucosa intestinal y vaginal, mientras que la ruta IV incrementó la IgG e IgM sobre el tracto genital.

Varios estudios han reportado que la inmunización intranasal (IN) es una ruta efectiva para estimular inmunidad en mucosas contra una variedad de patógenos, incluyendo proteínas solubles, la toxina del cólera (CT), o microparticulados derivados de antígenos.⁷ Esta ruta de inmunización induce una fuerte respuesta sistémica de anticuerpos IgA e IgG, y a nivel de mucosas una respuesta antígeno específica, estimulando el incremento de respuestas de linfocitos T citotóxicos (CTL) hacia péptidos virales y de ovoalbúmina.⁷ Por lo que estas respuestas inmunes, tanto humoral como celular, favorecen a esta ruta de inmunización por proporcionar no sólo una res-

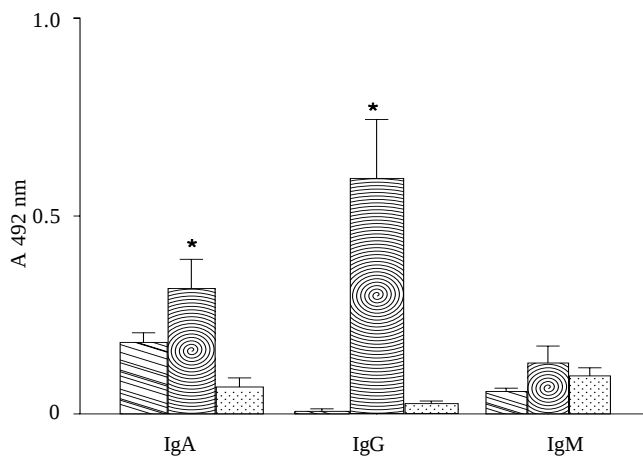


Figura 3. Anticuerpos de la mucosa intestinal anti pCry1Ac control (control), IN (IN) y IV (IV). Incremento de los niveles de IgA e IgG por la ruta IN (*) $p < 0.05$.

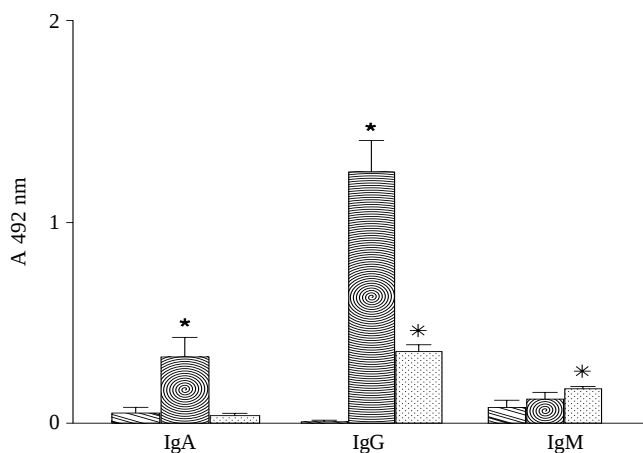


Figura 4. Anticuerpos de la mucosa vaginal anti pCry1Ac control (control), IN (IN) y IV (IV). Incremento de los niveles de IgA e IgG por la ruta IN (*) y de la IgG e IgM por la ruta IV (*) $p < 0.05$.

puesta inmune a nivel local, sino que también hacia sitios de mucosas distales.⁷

En particular la inmunización IN proporciona inmunidad en el tracto genitourinario donde la inmunización directa a menudo se obstaculiza por los cambios epiteliales locales y las influencias hormonales.⁷ Sin embargo, los mecanismos que determinan la inmunogenicidad de las proteínas en superficies mucosas no están bien definidos.¹⁰

La inducción de inmunidad local en la mucosa genital es requerida para prevenir infecciones de transmisión sexual

bacterianas, virales o parasitarias.¹¹ Es importante remarcar que la magnitud de la respuesta de anticuerpos sobre la superficie de la mucosa vaginal que se logró con la pCry1Ac por ambas rutas de inmunización sugiere que la pCry1Ac puede ser usada como un adyuvante para inducir protección inmunológica contra enfermedades de transmisión sexual en el tracto genital femenino.

Por consiguiente, a pesar de los resultados obtenidos, aún se requiere de más investigación para apoyar que la pCry1Ac puede ser un adecuado inmunógeno y adyuvante sistémico y de mucosas donde en este último sitio aún no se comprenden los mecanismo de las repuestas inmunes. Asimismo, también se requiere evaluar cuál ruta de inmunización es la más adecuada para lograr una respuesta inmune satisfactoria contra cada uno de los patógenos a los que está expuesta cada mucosa.

Referencias

1. Stevceva L, Kelsall B, Nacs J, Moniuszko M, Hel Z, Tryniszewka E, Franchini G. Cervicovaginal lamina propria lymphocytes: phenotypic characterization and their importance in cytotoxic T-lymphocyte responses to simian immunodeficiency virus SIVmac 251. *J Viro* 2002; 76(1): 9-18.
2. Perry LL, Karen F, John L, Harlan D. Distinct homing pathways direct T lymphocytes to the genital and intestinal mucosae in *Chlamydia* infected mice. *J Immunol* 1998; 60: 2905-14.
3. Nabel G. HIV vaccine strategies. *Vaccine* 2002; 15: 1945-7.
4. Biewenga J, Van Rees EP, Sminia T. Induction and regulation of IgA responses in the microenvironment of the gut. *Clin Immunol Immunopathol* 1993; 7: 1-7.
5. Williams NA, Hirst TR, Nashar TO. Immune modulation by the cholera-like enterotoxins: from adjuvant to therapeutic. *Immunol Today* 1999; 20: 95-101.
6. Moreno-Fierros L, Pérez-Ordóñez I, Palomar-Morales M. Slight influence of the estrous cycle stage on the mucosal and systemic specific antibody response induced after vaginal and intraperitoneal immunization with protoxin Cry1Ac from bacillus thuringiensis in mice. *Life Sci* 2002 (en prensa).
7. Keri LC, Jutlia MA, Pascual DW. Nasal-Associated lymphoid tissue: phenotypic and functional evidence for the primary role of peripheral node addressin in naïve lymphocyte adhesion to high endothelial venules in a mucosal site. *J Immunol* 1999; 163: 1382-9.
8. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248-54.
9. Towbin H, Staehelin T, Gordon T. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci* 1979; 76: 4350-4.
10. Abreu-Martin MT, Targan SR. Regulation of immune responses of the intestinal mucosa. *Clin Immunol Immunopathol* 1996; 16: 277-309.
11. Johansson EL, Rask C, Fredriksson M, Eriksson K, Czerkinsky C, Holmgren J. Antibody secreting cells in the female genital tract after vaginal or intranasal immunization with cholera toxin B subunit or conjugates. *Infect Immun* 1998; 66: 514-20.