

**UNIVERSIDAD DE ORIENTE
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
CENTRO DE ESTUDIOS DE BIOTECNOLOGIA INDUSTRIAL**

**EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE
MUCOSAL DE LOS CONSTITUYENTES DE LA
VACUNA ANTIMENINGOCÓCICA CUBANA**

**TESIS EN OPCION AL TITULO ACADEMICO DE MASTER EN
BIOTECNOLOGIA
MENCION BIOTECNOLOGIA INDUSTRIAL**

Autor: Lic. Irasema Pérez Portuondo

Tutores: DCsM. Oliver Pérez Martín

Dra. Miriam Lastre González

Asesor: DCsM. Gustavo Sierra González

**INSTITUTO FINLAY
Ciudad de La Habana
2002**

TABLA DE CONTENIDO

Páginas

Excergo

Dedicatoria

Agradecimientos

Resumen

Introducción ----- 1

- Problemas ----- 4
- Hipótesis ----- 4
- Objetivo General ----- 4
- Objetivos específicos ----- 5

Revisión Bibliográfica

- Neisseria meningitidis B ----- 6
- Enfermedad meningocócica ----- 6
- VA-MENGOC-BC[®] ----- 9
- Estructuras anatomofisiológicas de la inmunidad mucosal ----- 10
- Sistema Inmune Mucosal ----- 15
- Anticuerpo IgA ----- 17
- Prueba de Hipersensibilidad Retardada ----- 21
- ELISA ----- 22

Materiales y Métodos

- Reactivos y preparación de soluciones ----- 24
- Equipos e instrumentos ----- 26
- Selección y distribución de animales ----- 26
- Diálisis de las Vesículas de Membrana Externa ----- 27
- Protocolo de inmunización ----- 27
- Toma de muestras ----- 28
- Ensayo de Hipersensibilidad Retardada ----- 29
- ELISA ----- 29
- Reto con N. meningitidis B ----- 31
- Estadística ----- 33

Resultados y Discusión ----- 34

Conclusiones ----- 42

Recomendaciones ----- 43

Bibliografía ----- 44

Anexos

EXCERGO:

“Pero las inteligencias aquí congregadas hoy, no vienen como lo peregrino a descansar de las fatigas de una penosa jornada, ni a ampararse del oasis que le proteja en la tormenta que le amenaza: no, ni cansados ni satisfechos; acuden para darse mutua cuenta de la parte que han realizado en la común tarea del progreso y en la aplicación de las nociones científicas a las necesidades de la vida, objetivo de todos los esfuerzos del espíritu humano y móvil a la vez de toda actividad individual y colectiva”

Nicolás J. Gutiérrez, 1882.

DEDICATORIA

A mis pequeños

A mi mamá

A mi hermana y Lilita

A mi esposo

AGRADECIMIENTOS

- **Al Dr. Gustavo Sierra por permitir que me incorporara al Instituto, por hacer que entendiera lo bonita, interesante e importante que es la Inmunología.**
- **Al Dr. Oliver Pérez por permitirme estar en el laboratorio, acogerme como una más, enseñarme a escoger las ideas precisas, los experimentos correctos, por permitirme realizar un trabajo tan bonito e importante.**
- **A la Dra Miriam Lastre por sus exigencias, por sus peleas, por su afán porque todo salga bien y que todos sepamos organizarnos de manera que se pueda aprovechar mejor el tiempo.**
- **A Miriam Díaz por sus consejos, por la enseñanza de los pequeños trucos con que resolver los problemas de cada día.**
- **A Judith de Campo por su ayuda en todo, sus consejos, por ser mi profesora en ELISA, la hermana con quien contaba siempre.**
- **A Gustavo Bracho por su ayuda en todo momento que la necesité, por su colaboración con todo el trabajo en la computadora.**
- **A Caridad Zayas por su colaboración en todos los experimentos, sus enseñanzas en cuanto a técnicas que desconocía, por ser mi amiga.**
- **A Mildrey Fariñas por su atención a los ratones que eran el alma de mi trabajo, por su compañía en las fiestas, por las canciones compartidas, por ser mi amiga.**
- **A Carlos Taboada por su ayuda inestimable en los primeros ELISA que me dieron la confianza en seguir, así como ser el más pequeño del laboratorio y hacerme sentir un cariño maternal.**
- **A Rosa María Torres por aprender con ella la preparación de los materiales del laboratorio, como se ordenaban y se limpiaban muchos de estos, por la alegría que hacia sentir en el Departamento.**
- **A Néstor, Danay, Tamara, Igor, Carlos, Jorgito, Sheila, Ariadna, Fernando por estar en el laboratorio, hacerlo más agradable.**
- **A todos por lograr ser como una familia, con nuestros defectos y virtudes; pero siempre tratando que los primeros no laceraran nuestras alegrías, por estar siempre juntos y hacerme sentir que dejo atrás algo muy bonito.**
- **A todos mis compañeros del CEBI por dejarme ser lo que soy hasta ahora, en especial a la M.Sc. Clara Martínez.**
- **A mami, por cuidarme y estar al tanto de David y Arturo, y sus consejos por los que he llegado a ser la persona que soy.**
- **A Yanet por ser mi hermana y ayudarme en todo lo que he necesitado.**
- **A Manuel por ser la compañía, el apoyo, la calma, la cordura, el ejemplo, por su amor y su paciencia para conmigo.**
- **A David y Arturo por ser mis hijos, por darme la fuerza para existir, el valor para enfrentarlo todo, por sus travesuras, sus risas, sus maldades, por hacerme sacar ese amor que toda madre lleva dentro.**
- **A todos los que me quieren y desean para mí lo mejor.**

LEYENDA

IgA: Inmunoglobulina A
IgAs: Inmunoglobulina A secretora
IgG: Inmunoglobulina G
IgM: Inmunoglobulina M
IgE: Inmunoglobulina E
VME: Vesículas de Membrana Externa
LPS: Lipopolisacárido
PoliC: Polisacárido del grupo C
VA: Vacuna antimeningocócica
PP: Placas de Peyer
MALT: Tejido Linfoide asociado a mucosa
GALT: Tejido Linfoide asociado a intestino
NALT: Tejido Linfoide asociado a fosas nasales
BALT: Tejido Linfoide asociado a bronquios
TGI: Tracto gastrointestinal
LP: Lámina propia
CD: Cluster de diferenciación
HEV: Vénulas endoteliales altas
FAE: Tejido asociado a folículo
URT: Tracto respiratorio superior
TCR: Receptor de la célula T
Th: Célula T auxiliadora
CTL: Linfocito T citotóxico
CS: Componente secretor
MHC: Complejo mayor de histocompatibilidad
IL-10: Interleucina 10
TNF: Factor de necrosis tumoral
IFN γ : Interferón gamma
ELISA: “Enzyme-linked immunosorbent assay”: Ensayo inmunoenzimático.
Ad libitum: a libre demanda
SSTF: Solución salina tamponada con fosfato
IM: Inoculación por vía intramuscular
IN: Inoculación por vía intranasal
SBF: Suero fetal bovino
HR: Hipersensibilidad retardada
A: Absorbancia
T0: Tiempo 0 ó inicial
Tf: Tiempo final
DL₅₀: Dosis letal 50 o media

RESUMEN

La vacuna VA-MENGOC-BC[®] se aplica mediante inmunizaciones intramusculares ofreciendo una alta protección. En este trabajo se evaluó la respuesta inmune inducida al aplicar las VME y el PoliC, constituyentes de la vacuna antimeningocócica cubana, por vía nasal. Se valoró la influencia de la administración nasal de estos y VA-MENGOC-BC[®] en animales previamente inmunizados con VA-MENGOC-BC[®] parenteral y se analizó la inducción por vía nasal de respuesta sistémica y mucosal regional y a distancia de las VME y PoliC en animales previamente inmunizados parenteralmente con estos mismos componentes. Para ello se desarrollaron diferentes esquemas de inmunización con variadas dosis, que respondieran a los objetivos planteados. El muestreo incluyó sangre, saliva y lavado vaginal para determinar la presencia de IgG e IgA anti VME y PoliC. Se desarrolló la hipersensibilidad retardada y se retaron los animales con *N. meningitidis* B por vía intraperitoneal. Los resultados mostraron que la inmunización nasal indujo considerable IgA anti VME en saliva y vagina, así como ligera IgG anti VME sérica; también hubo respuesta celular dada por la hipersensibilidad retardada. La inmunización nasal no fue afectada por dosis previas de VA-MENGOC-BC[®] y sólo se obtuvo respuesta de IgA anti VME con tres dosis nasales o una estimulación parenteral y dos dosis nasales evidenciando la necesidad de, al menos, dos dosis nasales. Además se observó respuesta de IgG anti PoliC con dosis nasales después de previas parenterales de VA-MENGOC-BC[®], lo cual aboga hacia una adecuada primoestimulación inducida por VA-MENGOC-BC[®] y una reestimulación en el ámbito nasal.

INTRODUCCION

La biotecnología moderna ha encontrado importantes campos de aplicación en la producción, particularmente en la industria farmacéutica y en la agricultura. Pese a que todavía existe una lenta materialización de sus resultados, inclusive en estos dos campos, la biotecnología es ya una realidad en los diferentes sectores productivos y, por su enorme potencial, es considerada una tecnología estratégica en los principales países desarrollados.

Aunque existen varias definiciones de biotecnología, de manera breve, se puede decir que es la utilización de los diferentes sistemas biológicos para producir bienes y servicios. Esta amplia definición (que incluye a la tecnología del ADN recombinante) permite incluir industrias y desarrollos de América Latina que utilizan biotecnologías de segunda generación, pero con conocimientos y dominio de los modernos conceptos y de las modernas técnicas biológicas.

La biotecnología no es solo utilizar las técnicas de ADN recombinante como tecnología de producción, sino que mediante la aplicación de sus herramientas tecnológicas y sus conocimientos básicos, permitirá comprender y prevenir las enfermedades humanas de una nueva manera que no se vislumbraba hace diez años atrás. Tal vez, el principal impacto de la biotecnología sea sobre la investigación básica misma, lo que facilita y amplía sus campos de acción. En este proceso de comprensión de los mecanismos biológicos, más que en la capacidad de fabricar proteínas, es donde reside la potencialidad del exitoso futuro de la biotecnología¹.

Nuestro entorno contiene una variedad de microbios infecciosos (virus, bacterias, hongos, protozoos y parásitos multicelulares). Estos pueden causar enfermedad y si se multiplican desenfrenadamente eventualmente pueden matar su hospedero. La mayoría de las infecciones en los individuos normales son de corta vida y dejan pequeños daños permanentes. Esto es debido al sistema inmune el cual combate los agentes infecciosos. Debido a que los microorganismos aparecen en diferentes formas, se requiere de una amplia variedad de respuestas inmunes para enfrentar cada tipo de infección. El sitio de

esta y el tipo de patógeno determinan mayormente cual respuesta inmune será más efectiva. La definición más importante es entre los que invaden las células del hospedero y los que no. Todos los virus, algunas bacterias y algunos protozoarios se replican dentro de las células del hospedero y para eliminar estas infecciones el sistema inmune debe reconocer y destruir esas células infectadas. Muchas bacterias y parásitos grandes viven en tejidos, fluidos corporales y otros espacios intercelulares y las respuestas a estos patógenos son diferentes².

La mayoría de los agentes infecciosos penetran en el ser humano a través de las mucosas. Sin embargo, la inmunología de las mucosas no se ha estudiado suficientemente debido a la dificultad de investigación de los diferentes sistemas mucosales. Un gran desafío consiste en producir vacunas eficaces que se puedan administrar por vía mucosal. El estudio de las interacciones de los agentes patógenos con las células del sistema inmune y con las que no lo son en la superficie de las mucosas, permitirá elaborar nuevos métodos de producción de vacunas.

En el desarrollo de las vacunas mucosales a partir de organismos muertos, se tiende a abandonar las mezclas de antígenos no identificados, como células enteras para producir vacunas de subunidades compuestas por un solo antígeno o por varios, bien caracterizados. Por ello, se necesitan nuevos adyuvantes y fármacos inmunomoduladores. El desarrollo de estas vacunas a partir de antígenos no vivos, se complica por el hecho de que la mayoría de los antígenos puros son poco inmunogénicos en las mucosas¹.

La vacunación por una ruta de administración parenteral es desagradable debido fundamentalmente al temor a las inyecciones. La inmunización mucosal (oral, nasal, etc) representa una vía más fácil y aceptable de vacunación³. La liberación de vacunas por la vía intranasal ha cobrado mucho interés en los años recientes como una vía para inducir una respuesta mucosal de anticuerpos (IgA) que pueda jugar un papel en la inhibición del ataque o invasión de microorganismos patógenos a través de las superficies mucosales⁴. Basado en el concepto de un Sistema Inmune Mucosal Común, por medio del cual los linfocitos activados de una región mucosal son capaces de diseminar la inmunidad a otros

tejidos mucosales y glandulares, la vacunación en un sitio mucosal debe ser capaz de proveer protección a todas las otras superficies. La mucosa nasal es uno de estos sitios atractivos y potenciales para la vacunación. Además la superficie mucosal es grande y está bien provista de vasos sanguíneos. Por debajo del epitelio existe una densa red de capilares fenestrados, así como un buen desarrollo del sistema linfático conteniendo por ejemplo: macrófagos, células de Langerhans y linfocitos⁵. La inmunización intranasal que estimula el tejido linfoide nasal (NALT) en roedores, es más efectiva en generar respuesta de anticuerpos en el tracto respiratorio y las glándulas salivales según lo visto por Takahashi y col y Wu y Russell en 1990 y 1993, respectivamente^{6,7}. Por último, se sabe que la inducción de respuesta nasal contrario a la oral induce respuesta no solo mucosal sino también sistémica.

Neisseria meningitidis es una bacteria Gram -, patógena obligada del hombre, que coloniza la nasofaringe, allí puede permanecer sin causar enfermedad en dependencia del estado de la inmunidad del huésped. La Meningitis tipo B se convirtió en un problema de salud para Cuba durante la alta incidencia alcanzada en la década de los 80. Debido a la falta de existencia de una profilaxis efectiva se creó la necesidad de desarrollar una vacuna que permitiera controlar la epidemia. La vacuna obtenida, VA-MENGOC-BC[®], consta de vesículas de membrana externa (VME) y polisacárido (Poli) de los serogrupos B y C, respectivamente absorbidos en Al(OH)₃. Esta fue introducida en el Programa Nacional de Inmunizaciones Cubano a partir de 1991^{8,9} y es aplicada por vía parenteral.

VA-MENGOC-BC[®] proporciona una elevada protección contra la enfermedad. En adultos se encuentra IgA, aunque esta parece provenir de contactos naturales. Tampoco hay datos concluyentes de que influya sobre el estado de portador.

La región nasofaríngea humana provee el único hábitat natural para *N. meningitidis*. Se considera que estimular la producción de una respuesta de IgA puede ayudar en la prevención de la enfermedad meningocócica sistémica por interferir con la adhesión meningocócica y con la invasión de la superficie mucosal¹⁰. Poco se sabe del efecto de esta

vacuna contra una infección mucosal a nivel preclínico, ni tampoco del mejor candidato de los componentes de VA-MENGOC-BC[®] en inducir una mejor respuesta.

PROBLEMAS

¿Las VME y el PoliC constituyentes de la vacuna antimeningocócica cubana administrados por la vía intranasal serán capaces de inducir respuesta mucosal y sistémica?

¿La inoculación intranasal de las VME, el PoliC y VA-MENGOC-BC[®] potenciarán una previa inmunización con VA-MENGOC-BC[®]?

¿La aplicación nasal de las VME y el PoliC potenciaran su previa aplicación parenteral?

HIPOTESIS

Como VA-MENGOC-BC[®] protege contra la enfermedad; pero no induce respuesta de IgA, clase involucrada en las defensas mucosales, la inmunización nasal inducirá IgA específica a diferentes niveles y potenciará la inmunización previa.

OBJETIVO GENERAL

Incrementar el conocimiento sobre la inducción de la respuesta inmune de los constituyentes de la vacuna antimeningocócica al emplear la vía mucosal.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Determinar la inducción por vía nasal de respuesta sistémica y mucosal regional y a distancia por los constituyentes de VA-MENGOC-BC[®].
- Evaluar la influencia de la administración nasal de las VME, PoliC y VA-MENGOC-BC[®] en animales previamente inmunizados con VA-MENGOC-BC[®] parenteral.
- Precisar la inducción por vía nasal de respuesta sistémica y mucosal regional y a distancia de las VME y PoliC en animales previamente inmunizados parenteralmente con estos mismos componentes.

REVISION BIBLIOGRAFICA

Neisseria meningitidis

N. meningitidis, un diplococo gramnegativo y oxidasa positivo, es un patógeno humano obligado y su relación usual con el hospedero es de comensalismo, así puede permanecer por períodos diversos de tiempo sin causar la enfermedad, produciendo en el hospedero estadios de portador sano cuya duración está en dependencia de su estado de inmunidad¹¹.

Los portadores son de gran importancia en la génesis de la enfermedad y contribuyen a esclarecer la dinámica de transmisión entre este y el huésped susceptible. No existe una relación predecible entre el índice de portador y la incidencia de la infección, aunque algunos autores opinan que el número de portadores se eleva considerablemente en tiempos de epidemia, llegando a alcanzar más de un 50% de la población¹².

N. meningitidis está recubierta por una cápsula de polisacáridos de alto peso molecular, los que constituyen uno de los factores más importantes de su virulencia. Tomando como base las inmunorreacciones de este polisacárido se han descrito los serogrupos A, B, C, D, H, I, K, L, 29E, W135, X, Y y Z, siendo los serogrupos A, B y C los causantes de más del 90% de las epidemias de meningitis en el mundo. En la actualidad, el serogrupo B se ha convertido en el principal agente causal de la enfermedad meningocócica en los países en desarrollo, con un 60% de los casos y muestra una alta incidencia mundial. La mayor incidencia ocurre en niños pequeños y sobre todo en los menores de 1 año¹³.

Enfermedad meningocócica

Una parte de los individuos expuestos desarrollará alguno de la amplia gama de síndromes clínicos, variando su severidad desde un leve dolor de garganta hasta meningitis y un estado de choque, los cuales matarán a las horas de la aparición de los síntomas. Una proporción de los pacientes que se recobran queda con secuelas neurológicas permanentes¹⁴.

La patogénesis de la mayoría de los casos de meningitis involucra aproximadamente 6 etapas. Estas incluyen: ataque a las células epiteliales de la mucosa nasofaríngea y orofaríngea, trasgresión de la barrera mucosal, supervivencia en el torrente sanguíneo (evitando células fagocíticas y actividad bacteriolítica), entrada en el fluido cerebroespinal, supervivencia en el fluido cerebroespinal y producción de la enfermedad en meninges y cerebro.

El mecanismo por el cual la bacteria es internalizada y transcitosada es enteramente desconocido. Recientemente ha sido sugerida que la proteasa IgA₁ neiserial pueda estar involucrada en la supervivencia intracelular por clivaje de la proteína LAMP1, una glicoproteína integral de la membrana de los endosomas y lisosomas y que previene la fusión fagolisosomal¹⁵.

Una vez en la sangre, los patógenos meníngeos más frecuentes parecen evitar la fagocitosis por leucocitos polimorfonucleares y células del tejido retículoendotelial debido a que poseen una cápsula antifagocítica. Las vacunas antimeningocócicas probablemente intervienen en esta patogénesis por liberar anticuerpos que neutralizan la cápsula antifagocítica y elevar la fagocitosis y la bacteriolisis.

Los patógenos gramnegativos pueden eludir ser destruidos por anticuerpos y complemento por tener lipopolisacáridos especiales en su superficie o por tener proteínas de la membrana externa que limitan la bacteriolisis o se combinan con IgA bloqueadoras¹⁴.

A pesar de extensos estudios, el mecanismo responsable del desarrollo de la inmunidad natural contra el meningococo permanece sin aclarar. La protección ha sido correlacionada con la presencia de anticuerpos bactericidas, constituyendo el centro de la gran mayoría de los estudios en esta forma de defensa del huésped. Mucha menor atención se le ha prestado a la muerte de la *Neisseria* sp. por fagocitosis y por eso es poco lo que se conoce sobre la importancia de este mecanismo comparado con la actividad bactericida sérica. Se ha encontrado una estrecha relación entre la actividad opsonina, duración y severidad de los síntomas y el nivel de IgG anti-membrana externa. Sin embargo, para la mayoría de los

antígenos, una respuesta inmune humoral eficiente resultante en la producción de anticuerpos y en la generación de respuesta de memoria necesita la ayuda de linfocitos T. No obstante, las células T responden a antígenos peptídicos asociados con moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad y no será estimulado por vacunas polisacarídicas, lo cual explicará por qué la eficacia protectora de las vacunas basadas en las cápsulas polisacarídicas evaluadas actualmente tienen corta vida y es inefectiva en niños pequeños¹⁰.

El alto grado de adaptación del meningococo a su hospedero humano, manifestado a través de la continua evolución antigénica de las macromoléculas expresadas en su superficie, es causal para interesarse, pero el hecho de que la mayoría de los adultos no desarrollen la enfermedad meningocócica, no obstante presumir la exposición continua al meningococo patogénico y que el segundo ataque de la enfermedad en los niños o adultos son muy raros, confirman que la protección natural es posible y usualmente altamente efectiva. Estos son fundamentos para ser optimistas en el futuro de las vacunas¹¹.

La cápsula polisacarídica del meningococo serogrupo B consiste de residuos repetidos de α -2,8-oligómeros de ácido siálico enlazados y 2,8- α -ácido-N-acetilneuramínico, los cuales sirven como un importante factor de virulencia y antígeno protector del organismo. Los candidatos vacunales basados en el polisacárido nativo del grupo B inducen una respuesta transitoria de anticuerpos predominantemente de isotipo IgM¹¹.

Es interesante notar que la cápsula polisacarídica del serogrupo C es un homopolímero de 2,9- α -ácido-N-acetilneuramínico y solo difiere de la cápsula polisacarídica B por un enlace. Un número de posibles explicaciones ha sido dado para la pobre inmunogenicidad de la cápsula polisacarídica del grupo B, incluida la sensibilidad a la neuraminidasa y la inmunotolerancia debido a la similitud del ácido siálico con moléculas de los tejidos humanos¹¹.

Varias vacunas antimeningocócicas del serogrupo B basadas en las proteínas de la membrana externa han sido desarrolladas y testadas en ensayos clínicos randomizados, las únicas que han demostrado una eficacia protectora significativa son las desarrolladas por

Cuba y Noruega. Ambas consistentes en vesículas de membrana externa (VME) adsorbidas en hidróxido de aluminio como adyuvante y la cubana posee además Polisacárido C. Sin embargo es importante notar que estas vacunas contienen cantidades significativas de otros antígenos además de las porinas¹¹.

VA-MENGOC-BC[®]

La vacuna antimeningocócica cubana está compuesta por VME de la cepa B:4:P1.19.15;L3,7,9 (385/83) de *N. meningitidis* B y polisacárido capsular purificado del serogrupo C, los que luego de formar un complejo son adsorbidos en gel de Al(OH)₃. Las VME están constituidas fundamentalmente por proteínas mayoritarias de serotipo y subtipo y proteínas de alto peso molecular. Además, lo integran fosfolípidos y LPS en cantidades controladas. Las VME son extraídas de la membrana externa por medio de detergentes y la estructura formada mantiene su conformación nativa. En la formulación el polisacárido C facilita la solubilización lo que permite una mejor presentación al sistema inmune. Cada dosis de vacuna contiene 50 µg de proteína del meningococo B, 50 µg del polisacárido C, 2 mg de Al(OH)₃ y 0,01% de tiomersal como preservante. Las características de su formulación y sus componentes garantizan la ausencia de reacciones adversas graves^{16,17,18}.

El nombre comercial de este preparado es VA-MENGOC-BC^{®8}. Esta permitió controlar la epidemia de meningitis en nuestro país y su aplicación en varios países latinoamericanos que fueron azotados por este tipo de epidemia⁹.

VA-MENGOC-BC[®] presenta una alta eficacia (significativa disminución de casos en los vacunados con respecto a los no vacunados, en estudios prospectivos, aleatorios a doble ciego y placebo controlado) y no se observa siempre correlación entre la inducción de anticuerpos bactericidas y la vacunación (efectividad) en todas las edades, sobre todo en los niños pequeños, por lo que se ha dudado de la efectividad y eficacia de esta vacuna¹³.

Menor atención se ha prestado al papel protector de la inmunidad mediada por células, debido fundamentalmente a la aceptación del efecto dominante de los anticuerpos

bactericidas en la protección contra la enfermedad meningocócica y a que los sujetos que carecen de dichos anticuerpos tienen un alto riesgo de padecer la enfermedad. Sin embargo, en contraste con los serogrupos A y C, se ha observado que las cepas del serogrupo B son relativamente resistentes a la muerte por dichos anticuerpos séricos y el complemento, mostrando elevada susceptibilidad a la destrucción por mecanismos opsonofagocíticos¹³.

El hecho de que la mayoría de las enfermedades infecciosas sean combatidas a través del tejido mucosal ha planteado nuevos desafíos en el desarrollo de las vacunas. Considerando previamente que muchas vacunas indujeron respuestas sistémicas solamente, las nuevas vacunas ayudarán a inducir eficientemente las respuestas mucosal y sistémica¹⁹.

Hoy, con solo pocas excepciones, las vacunas licenciadas para humanos son aplicadas por inyecciones parenterales y por consiguiente inducen mayormente una respuesta inmune sistémica²⁰, pero estas rutas de inmunización sistémica no inducen, generalmente, secreción de IgA específica o inmunidad protectora en los tejidos mucosales²¹. Existe una contribución significativa de las células T locales en la inducción de anticuerpos IgA producidas localmente superior a los anticuerpos derivados del plasma y en la mayoría de los casos su inducción requiere inmunización mucosal directa²¹.

Estructuras anatomofisiológicas de la inmunidad mucosal

En los humanos el área de superficie de los tejidos mucosales es extensa, comprendiendo una extensión de alrededor de 400 m², lo cual es 200 veces superior al área total de la piel. Debido a que la mayoría de los patógenos bacterianos y virales entran al cuerpo a través de las membranas mucosales, el sistema inmune mucosal es una importante línea de defensa²². En comparación con la piel, estas membranas mucosales forman una barrera mecánica débil, pero están provistas con una gran defensa que en los vertebrados comprende elementos específicos y no específicos²³.

La producción de linfocitos en los órganos linfoides primarios va seguida por su migración hacia los tejidos linfoides periféricos secundarios. Estos últimos comprenden los órganos encapsulados bien organizados (bazo, ganglios linfáticos y placas de Peyer) y los cúmulos

no encapsulados que se encuentran dispersos por el organismo. El grueso de este tejido linfoide no encapsulado se encuentra asociado a las mucosas. El tejido linfoide secundario se puede dividir funcionalmente en órganos sistémicos y un sistema mucoso que protege al organismo de los agentes que penetran directamente a través del epitelio de las mucosas. Este tejido linfoide está relacionado con las vías respiratorias, las superficies que tapizan el tubo intestinal y el aparato genitourinario. Las células linfoides se hallan presentes ya sea como cúmulos difusos u organizados en nódulos. Las placas de Peyer (PP) de la parte terminal del íleon contienen folículos y el epitelio intestinal que cubre dichas placas se halla especializado en el transporte de los antígenos hacia el tejido linfoide. Esta función particular es realizada por células epiteliales denominadas células M, las cuales son capaces de absorber y transportar los antígenos a las células linfoides subepiteliales²⁴.

Los tejidos linforeticulares asociados a mucosas (MALT) son los mayores sitios inductores para la respuesta IgA en mamíferos superiores y consiste en tejido linforeticular asociado a intestino, fosas nasales y bronquios, conocidas abreviadamente como GALT, NALT y BALT, respectivamente. Además, existen agregados linfoides en el intestino grueso y estos son llamados asociados al recto (RALT). Las secciones del aparato reproductivo están consideradas ser parte del sistema inmune mucosal, aunque la inmunidad sistémica también contribuye a proteger estos sitios. Colectivamente el MALT comprende aproximadamente 65-75% del tejido linfoide organizado en humanos y animales experimentales (ratón, rata, conejo y primates)²⁴.

El MALT suministra células inmunes B y T a todos los tejidos mucosales. Cuando uno considera que la mayoría de los microorganismos invade a través o cohabitan esta superficie mucosal como flora normal, entonces se advierte que los mamíferos superiores requieren una gran instalación del sistema inmune mucosal para la protección del hospedero. La protección de la superficie mucosal es debida en parte a la producción local de anticuerpos mayormente de isotipo IgA y de tipo secretor (IgAs), las células plasmáticas productoras de IgA en la lámina propia y las regiones escinares glandulares cumplen esta tarea²⁵ (Fig. 1²⁶).

Una razón para considerar al MALT como un sistema especial (separado de los órganos linfoides sistémicos) es que las células linfoides asociadas a mucosa recirculan dentro del sistema linfoide mucosal. Esto es, las células linfoides estimuladas en las PP pasan vía nodos linfáticos regionales a flujo sanguíneo y de ahí regresan a los sitios efectores mucosales. La recirculación específica es producida por las células linfoides siendo capaces de reconocer las moléculas de adhesión expresadas específicamente en las células epiteliales de las vénulas post-capilares mucosales³.

La mayor colección de células inmunocompetentes se encuentra en el tracto gastrointestinal (TGI) donde el GALT provee las células T y B precursoras destinadas a las regiones de la lámina propia (LP), las cuales contienen más de 10^{10} células plasmáticas productoras de IgA por metro de intestino humano. Además, gran número de células T de fenotipo $CD4^+$ y $CD8^+$ pueblan este mismo tejido mucosal. De este modo células T y citocinas regulan la síntesis de IgA en los tejidos mucosales, donde 3-4 g de IgAs son secretados diariamente en el TGI humano^{24,25}.

La mucosa nasal es el primer sitio de contacto con los antígenos inhalados. Sin embargo, la naturaleza de la respuesta inmune local y el papel del NALT en estas respuestas, han sido raramente estudiados debido a la ausencia de un modelo animal adecuado.

En los humanos, el NALT es conocido como Anillo de Waldeyer y consiste en los tonsiles adenoides o nasofaríngeos, las bandas nasofaríngeas bilaterales y los tonsiles linguales bilaterales²³.

Los estudios de fenotipos inmunohistológicos y linfocitarios muestran que este tejido merece ser llamado MALT. Las consecuencias de una tonsilectomía temprana y una adenoidectomía no están bien entendidas y existen evidencias que muestran que no puede ser tan inocuo como frecuentemente se piensa. Sin embargo, el incidente del incremento de las infecciones respiratorias recurrentes puede parcialmente ser debido a cambios en la mucosa nasal y en el NALT, que son inducidos por la contaminación aérea. Tejidos equivalentes al anillo de Waldeyer han sido encontrados en monos, caballos, carneros, pero

no se han hecho estudios funcionales en estas especies. Durante mucho tiempo se pensó que los roedores no poseían tejido tonsilar, aunque décadas antes, acúmulos de células linfoides pareadas fueron descritas en el pasaje nasal de ratas. C.F.Kuper y col. (1992) han estudiado NALT en ratas, ratones y hámsters y han demostrado que las acumulaciones de células linfoides situadas a la entrada del conducto nasofaríngeo son un componente del MALT. Aunque secciones cruzadas de los pasajes nasales muestran acumulaciones linfoides en cualquier otra parte, el tejido pareado, anteriormente mencionado, es probablemente el único MALT bien organizado en la nasofaringe de roedores que tiene una localización fija. Por eso este tejido puede ser considerado como los tonsiles nasofaríngeos y como un equivalente del anillo de Waldeyer. No se han observado en roedores estructuras equivalentes a los tonsiles palatinos y linguales.

El NALT se parece a las PP con relación a la ontogenia aunque estas últimas aparecen poco antes del nacimiento, antes que el NALT. Esto puede reflejar un papel central de las PP en MALT o puede simplemente resultar de la exposición temprana del intestino al material extraño. La apariencia activada y la ontogenia de los componentes de este MALT sugieren que el NALT y las PP son los componentes principales en la inducción de respuesta inmune del tracto respiratorio y el intestino, respectivamente²³.

Aunque el NALT y las PP parecen ser importantes para la defensa de los sitios mucosales, sus funciones pueden diferir. Las PP pueden ser el tejido central en la inducción de la síntesis de inmunoglobulinas secretorias, mientras que el tejido linfoide en el sistema respiratorio parece estar más involucrado en la respuesta celular. En este último los tejidos del MALT también difieren: el NALT y el BALT difieren en su estado de activación y en el número de células B que expresan IgA de membrana. Estas últimas son raras en el NALT; pero no en el BALT y en este aspecto el BALT se parece a las PP más estrechamente que al NALT. La diferencia en los patrones de distribución de la población de macrófagos en el NALT, BALT y las PP proporcionan evidencias adicionales de las funciones divergentes de los diferentes tejidos linfoides mucosales²³.

Kuper y col. (1992) concluyeron que el NALT parece ser, en muchos aspectos, el principal tejido linfoide mucosal en el tracto respiratorio; que las características morfológicas de las PP y el NALT y la migración de linfocitos y patrones de adhesión conectados con ellos indican que las PP y el NALT juegan papeles diferentes pero de igual importancia en la respuesta mucosal. Que el NALT es más un órgano célula T, mientras que las PP son más un órgano B. Esto está acorde con los datos de unión de linfocitos-HEV (vénulas endoteliales altas) para las PP humanas y el tejido tonsilar. No obstante, el significado de las diferencias morfológicas entre NALT y PP deben ser elucidados²³.

La naturaleza del antígeno expuesto a la mucosa nasal, el NALT y la ruta de entrada, determinan el tipo de respuesta inducida. Los antígenos solubles penetran el epitelio nasal intacto y alcanzan el nodo linfático cervical superficial, estos antígenos preferencialmente inducen una respuesta inmune sistémica o establecen tolerancia. En contraste, los antígenos particulados son removidos fácilmente de la mucosa nasal; pero en exposiciones repetidas o cuando el aparato ciliar está afectado, estos son tomados por las células M y alcanzan el NALT²⁵. Sobre todo los nódulos linfáticos cervicales posteriores y se evoca una respuesta IgAs predominante y se establece una inmunidad secretoria. El balance entre activación en los nodos posterior y superficial determina la respuesta eventual. Aunque se ha sugerido un papel pivotal para el NALT en el establecimiento de una respuesta secretoria, se debe tener presente que los patrones de migración de los linfocitos, además indican involucramiento del NALT en la respuesta sistémica. ¿Qué pasa en el NALT bajo la exposición del antígeno?. Esto debe ser dilucidado²⁵.

El Sistema Inmune Mucosal

Entre los factores más importantes de la inmunidad humoral protectora en las superficies mucosales por donde la mayoría de los patógenos entran al hospedero están los anticuerpos IgAs producidos localmente. Este isotipo constituye más del 80% de todos los anticuerpos producidos en los tejidos asociados a mucosas y la IgAs es inducida, transportada y regulada por mecanismos que son marcadamente distinguibles de los involucrados en la respuesta sistémica²⁷. El sistema inmune mucosal puede ser dividido en sitios donde el antígeno es encontrado y las respuestas iniciales son inducidas y en grandes áreas

superficiales donde se encuentran las células plasmáticas IgA⁺ y donde la producción de IgAs resulta en protección inmune local. Está ahora bien establecido que los antígenos ambientales, los cuales son mayormente adquiridos por inhalación o ingestión, pueden ser tomados por tejidos linforeticulares especializados en el BALT y el GALT. Estudios en muchos modelos de animales experimentales incluyendo ratón y humanos han aportado evidencias que la estimulación de las células B precursoras de IgA en GALT con antígenos administrados oralmente guían a la diseminación de células T y B a los tejidos mucosales efectores como son las regiones de la lámina propia de los aparatos intestinal, respiratorio, genitourinario y varias glándulas secretoras para respuestas de anticuerpos IgAs antígeno específica. Además, muchas vacunas orales han mostrado inducir respuesta IgAs apropiadas en secreciones incluyendo saliva, lágrimas y fluidos obtenidos de lavados nasales o gastrointestinal²⁷.

El sistema inmune mucosal puede ser dividido en **sitios inductores**, donde el antígeno es primero encontrado y se induce una respuesta inmune inicial y **sitios efectores**, donde la producción de IgA secretoria resulta en la inmunidad local.

- Sitios inductores de IgA

La mayoría de los estudios de los sitios inductores de IgA han sido efectuados en GALT, los cuales son colectivamente representados por las PP, el apéndice y los pequeños módulos linfáticos solitarios. El BALT comparte muchas similitudes anatómicas con GALT y probablemente tenga las mismas funciones en el URT^{28,29,30}. Las PP tienen la apariencia anatómica de un clásico órgano linfoide secundario con áreas de células T o B dependientes bien definidas. Ellas descansan en la submucosa separadas del lumen intestinal por una capa simple de células epiteliales cuboidales, el tejido asociado a folículo (FAE). Además de los enterocitos convencionales, esta capa epitelial contiene muchas células linfoides de todos los tipos, así como una población única de células epiteliales especializadas (células M). Esta estrecha relación entre elementos epiteliales y linfoides encontrados en las PP es peculiar del sistema inmune mucosal y es también vista en tejidos análogos como tonsiles y apéndice³¹. Las células M tienen cortas microvellosidades, pequeñas vesículas citoplasmáticas y pocos liposomas y están adaptadas a la toma y

transporte de antígenos lumbinales, incluyendo proteínas y partículas como virus, bacterias y algunos pequeños parásitos²⁷.

Los folículos contienen los centros germinales donde se ve una división significativa de las células B (Tab.1). Estos centros germinales están considerados ser los sitios donde frecuentemente las células B cambian a IgA y ocurre la maduración de la afinidad. Además, ellos contienen la mayoría de las células B IgA⁺ en superficie. Sin embargo, a diferencia de los nodos linfáticos y del bazo, las zonas de células B no tienen un número de células plasmáticas significativamente elevado. Adyacentes a los folículos están las áreas de células T dependientes, los cuales contienen todas las subpoblaciones. Además están todas las células inmunocompetentes encargadas de la regulación de la inducción de células efectoras antígeno específico con los cuales últimamente mediar las respuestas inmunes celular y humoral para la protección mucosal²⁷.

- Sitios efectores

Luego de la estimulación antigénica en las PP y su presentación a las células B y T, estas células dejan las PP por los nodos linfáticos eferentes y alcanzan la circulación sistémica a través del conducto torácico. Estos linfocitos entran entonces a los sitios efectores como es la lámina propia de los aparatos respiratorio, gastrointestinal y reproductivo y los tejidos glandulares, donde estas células linfoides son selectivamente retenidas por mecanismos no entendidos todavía. Las células B se expanden clonalmente bajo la influencia de los antígenos, células T y citocinas y se convierten en células plasmáticas IgA maduras²⁷.

La lámina propia del sistema gastrointestinal es el mayor sitio efector mucosal y los tipos de células principales encontradas son linfocitos incluyendo 20-40% de células B y células plasmáticas y 40-60% de células T (Tab.1). Los macrófagos encontrados en número significativo en la lámina propia pueden estar involucrados en el procesamiento de antígenos y presentación en este sitio.

La vía de distribución celular del tejido inductor IgA (ejemplo: GALT y BALT) a sitios efectores IgA (ejemplo: regiones de lámina propia del intestino, bronquio, aparato

genitourinario y glándulas secretorias) ha sido llamada **Sistema Inmune Mucosal Común** (Fig. 2³²).

Anticuerpo IgA

La superficie mucosal está protegida contra infecciones principalmente por el sistema inmune mucosal, del cual la IgAs es la principal clase estimulada. La IgAs es una inmunoglobulina polimérica y es activamente transportada a las secreciones mucosas. La respuesta IgAs es iniciada en el MALT. Este involucra la estimulación de las células B, su migración desde los nodos linfáticos regionales y su circulación sistémica y su retorno a los sitios mucosales donde el antígeno fue primeramente encontrado^{23,30,31,33,34}.

Las rutas de inmunización sistémica generalmente no inducen la secreción de IgAs específica o inmunidad protectora en el tejido mucosal^{35,36,37}. Las respuestas inmunes mucosales son iniciadas por la toma del antígeno de la superficie mucosal en los tejidos linfoides organizados localizados en la mucosa, en la proximidad de los nodos linfáticos donde las células B-antígeno específico son generadas³⁸. Los anticuerpos IgA predominantemente diméricos producidos por las células B plasmáticas en la mucosa son transcitados dentro de las secreciones por vía del receptor Ig polimérico expresado en la superficie basolateral de las células epiteliales y glandulares, al cual se asocia el componente secretor y forma la molécula de IgAs completa^{24,35} (Fig. 3³⁹).

Por otro lado, existen evidencias que la exposición local al antígeno puede resultar en niveles mucho mayores de IgA específica en la región de la exposición que en los sitios distantes. Este ha guiado al ensayo de las estrategias de inmunización rectal y vaginal para vacunas contra enfermedades transmitidas sexualmente^{40,41,42,43}. En particular la inmunización entérica, la cual estimula el GALT, tiene como resultado respuestas de anticuerpos IgA preferencialmente en el intestino y menos en los aparatos respiratorio y genital, así la inmunización intranasal, la cual estimula el NALT de roedores, es más efectiva en generar respuesta de anticuerpos en el aparato respiratorio y glándulas salivales⁷.

Las dependencias de la respuesta IgA de las células T ha sido bien establecida y las células que inducen el cambio de isotipo y las células Th que inducen la diferenciación terminal de las células B encargadas de IgA han sido resumidas previamente en otros estudios¹³.

El patrón de citocinas bajo el cual se encuentre la activación primaria de las células T y su subsiguiente diferenciación son los patrones claves en determinar el último fenotipo de las células T. Luego, en el desarrollo, el IFN γ y la IL-10 refuerzan la expansión de las células Th1 y Th2, respectivamente. El desarrollo bajo alguna de estas vías está además, influenciada por el tipo de célula presentadora de antígenos. Los linfocitos B se relacionan más con un fenotipo Th2 establecido, mientras que los macrófagos y las células de Küppfer del riñón favorecen el desarrollo de células Th1. Para la estimulación de células T vírgenes, las células dendríticas comprenden las células presentadoras de antígenos más efectivas²⁵.

En estudios donde se estimularon células T CD4⁺ de las PP y bajo se apreció un alto número de células productoras de IL-4 y IL-5 (Th2), mientras que las células productoras de IFN γ e IL-2 (Th1) fueron iguales al fondo. Los estudios de Beagley y col (1996) demuestran que la inducción de una respuesta IgA mucosal es coincidente con la activación predominante de células CD4⁺ Th2 en las PP²⁵.

De la descripción anterior, uno puede hipotetizar que las células Th2 deben predominar en los sitios mucosales y que los protocolos de inmunizaciones y adyuvantes que favorecen la inducción de la respuesta IgA deben activar preferencialmente las células Th2 más que las Th1²⁵. No obstante, el predominio de la producción de IgA pudiera ser un fenómeno de selección a nivel efector más que inductor.

Una característica muy particular de la IgA es su marcada heterogeneidad, la que es debida a un conjunto de componentes con constantes de sedimentación que van de 7S a 13S, que se forman por polimerización y son dissociables por mercaptoetanol y urea en medio ácido. Su contenido en hidratos de carbono ocupa un valor intermedio entre IgG e IgM. Los valores son algo superiores el 7% y la relación hexosamina/ hexosa es de 0.8. La IgA, al igual que la IgM no atraviesa la barrera placentaria.

Se conocen dos subclases de IgA (IgA1 e IgA2) que difieren antigénicamente y por su contenido en galactosamina, aminoazúcar que solo está presente en la primera. Los pesos moleculares de las cadenas α_1 y α_2 son 58000 y 52000 dalton, respectivamente. En todos los casos su estructura normal es $\alpha_2\kappa_2$ ó $\alpha_2\lambda_2$.

Las subclases de IgA son de la mayor importancia contra ciertos microorganismos patógenos, especialmente *N. gonorrhoeae* y *N. meningitidis* (no así las cepas de *Neisseria* no patógenas), *Haemophilus influenzae* y *Streptococcus neumoniae* ya que estos producen una enzima extracelular capaz de desdoblar la IgA1 humana. La enzima que se conoce como IgA proteasa es notablemente selectiva y escinde un solo péptido (prolina-treonina) enlazado en la región de bisagra de la cadena pesada de la subclase IgA1. Después de la ruptura los anticuerpos IgA1 pierden algunas de sus propiedades biológicas tal como su capacidad de aglutinar. La IgA2 es resistente a la IgA proteasa como lo son las demás proteínas que han sido probadas, aún aquellas que contienen residuos de prolina-treonina. Es posible especular que en el curso de la evolución ciertas bacterias desarrollaron IgA proteasa como un factor de virulencia eficaz que les permitiera un mayor éxito en la invasión al hospedero. En una especulación similar se ha sugerido que la IgA2 puede haber aparecido como una variante de la IgA1 resistente a la proteasa por la eliminación en la región de la bisagra de 13 residuos de aminoácidos en los que está incluido el enlace escindido por la IgA proteasa^{44,45}.

La IgAs es una molécula compleja compuesta por un dímero de IgA, una molécula de la cadena J, que es un polipéptido de aproximadamente 15000 dalton de peso molecular, el cual es necesario para que la IgA dimérica se combine con una glicoproteína de membrana denominada componente secretor (CS). La función de este último es permitir que los anticuerpos IgA sean transportados a través de los tejidos²⁴.

El CS está compuesto por 5 dominios inmunoglobulínicos estabilizados por enlaces disulfuros, un segmento transmembrana y una larga cola citoplasmática de 100 residuos aminoacídicos. El CS es sintetizado en el retículo endoplasmático de las células epiteliales

de la mucosa y transportado al complejo de Golgi, donde se encuentra en forma libre actuando como un receptor en la superficie basal de la célula epitelial para la IgA dimérica que ya contiene la cadena J. El complejo resultante es absorbido dentro de la célula epitelial por endocitosis, luego pasa a través de la célula y es descargado a la luz intestinal. Esta relación integral entre el componente secretor y el dímero de IgA estabiliza la IgAs haciéndola menos susceptible al ataque de diversas enzimas proteolíticas^{46,47,48}.

Las IgAs antibacterianas tienen una función bacteriostática en sinergismo con la lactoferrina y/o la transferrina, las que reducen la producción bacteriana de sideróforos. La IgAs puede inhibir la adhesión bacteriana a las células epiteliales y puede incrementar su adherencia al mucus. La neutralización de virus por IgA es debido a la inhibición de la primera etapa de infección, unión y penetración intracelular del virus. El mismo mecanismo está involucrado en la neutralización de las toxinas bacterianas. La IgAs además decrece la absorción intestinal de proteínas extrañas en la dieta. Así ha sido reportada que la IgAs antibacteriana puede causar en ciertas bacterias la pérdida de un plásmido, el cual determina su infectividad⁴⁹.

Los anticuerpos IgA en la lámina propia pueden unir antígenos y excretarlos a través del epitelio al lumen, los anticuerpos IgA antivirales en tránsito a través de las células epiteliales pueden inhibir la producción de virus por una acción intracelular y anticuerpos IgA secretados al lumen pueden prevenir la adherencia y penetración al epitelio de antígenos y microbios⁵⁰.

Es además concebible que la IgA pueda interactuar intracelularmente con otras proteínas de virus envueltos o con proteínas de virus no envueltos en una etapa temprana del ciclo celular. En cada caso debe ser posible interrumpir la replicación viral preservando la vida de la célula infectada. Esto está en contraste con la inmunidad mediada por células las cuales protegen matando a la célula infectada⁵¹.

Las subclases de IgA carecen de potentes funciones efectoras como la activación por la vía clásica del complemento. Los anticuerpos de esta clase pueden, no obstante, ejercer efectos

antiinflamatorios por bloqueo de los mecanismos de amplificación biológicos no específicos inducidos por IgG, IgM e IgE⁵².

Prueba de Hipersensibilidad Retardada

A pesar del desarrollo de varios procedimientos complejos para la evaluación de la inmunidad celular, las pruebas cutáneas de hipersensibilidad retardada continúan considerándose técnicas muy útiles dado lo fácil de su realización, en la evaluación global de la inmunocompetencia individual, así como en encuesta epidemiológica para conocer el grado de inmunización de una población^{53,54}.

Las reacciones de hipersensibilidad retardada son respuestas inflamatorias inmunes debidas a un reclutamiento extravascular de células T efectoras específicas contra antígenos foráneos que llegan a los tejidos. El papel de las células T en mediar las reacciones de hipersensibilidad retardada ha sido demostrado por el aislamiento en los tejidos lesionados, de células T antígeno-específicas funcionales. Las citocinas secretadas por su activación inducen alteraciones en los tejidos adyacentes, utilizándose como indicadores de estimulación local.

Estas reacciones de hipersensibilidad retardada están mediadas por subpoblaciones de linfocitos Th1 circulantes, con un fenotipo CD3⁺/CD4⁺, que abandonan los vasos, entran a los tejidos extravasculares reclutando y activando, por las citocinas producidas, varios tipos celulares no específicos, tal como los macrófagos. El infiltrado celular, los mediadores químicos liberados y el edema acompañante, junto a la fibrina formada, tienen como resultado la induración de la piel, constituyendo el diámetro de esta induración un índice de hipersensibilidad cutánea.

Las interacciones de las células T con el antígeno ocurren como resultado de un proceso cinético inmune, que comienza tras la deposición del antígeno en la piel. Su reconocimiento, captura, procesamiento y presentación están mediados por las células presentadoras de antígenos locales, las que presentan el antígeno a las células T en el contexto de las MHC-II, lo cual, junto con la producción de citocinas como la IL-1, TNF- α ,

IL-12 e IFN γ activan a las células T. Los linfocitos, una vez activados, son capaces de liberar citocinas, tales como TNF- β , IL-2 e IFN γ que actúan reclutando y activando leucocitos efectores derivados de médula ósea, que constituyen el infiltrado perivascular característico de estas lesiones.

La mayor actividad en estas reacciones es alcanzada a los 2 ó 3 días de iniciada. Esta característica permite diferenciar estas reacciones de las alérgicas, que se presentan de segundos a minutos después de la exposición al alérgeno y de las mediadas por inmunocomplejos, que ocurren en un tiempo de varias horas a un día^{53,54}.

ELISA

La técnica inmunoenzimática ELISA es un método rápido de gran sensibilidad, especificidad y bajo costo, que supera muchas de las técnicas de diagnóstico empleadas con anterioridad, por lo que su uso se ha extendido rápidamente a diversos campos de la medicina.

Este método es un ensayo heterogéneo que se emplea específicamente para la detección de macromoléculas y se caracteriza porque requiere de separación de fases y se realiza mediante un inmunoabsorbente de fase sólida.

Principales ventajas del ELISA

- Alta sensibilidad que permite la detección de concentraciones muy bajas de antígenos o anticuerpos.
- Rapidez y precisión en la ejecución del método.
- Especificidad de la detección que permite la diferenciación y estudio de serotipos y relaciones antigénicas.
- Factibilidad de automatización, estandarización y empleo para pruebas diagnósticas masivas.
- Fácil conservación de los reactivos por períodos largos.
- Bajo costo por determinación y requerimiento de un equipamiento simple.

Principales tipos de ELISA

La mayoría de las variantes de ELISA utilizadas pueden agruparse en dos categorías: procedimientos directos, en los cuales se utilizan como conjugado los anticuerpos específicos marcados con una enzima y procedimientos indirectos, en los que se emplean como conjugados moléculas anti-inmunoglobulinas marcadas. Ambos tipos de procedimientos pueden ser utilizados para la detección de antígenos. En los directos, la detección se realiza mediante el uso de un antígeno específico marcado y en los indirectos se lleva a cabo utilizando un anticuerpo específico como intermediario que es detectado por el conjugado anti-especie. Los procedimientos indirectos pueden ser empleados también para la detección de anticuerpos.

La presencia de la reacción antígeno-anticuerpo se revela mediante la adición del sustrato específico de la enzima y la consiguiente formación de hidrolizados coloreados generalmente que permiten la evaluación visual cualitativa de los resultados. Además como la retención de la enzima es proporcional a la cantidad de antígeno o anticuerpo inmovilizado, es posible realizar la evaluación cuantitativa por colorimetría, todo lo cual se basa en la asunción de que tanto el antígeno como el anticuerpo pueden ser acoplados a una enzima, manteniéndose en el conjugado la actividad inmunológica y enzimática de ambos componentes^{24,55}.

MATERIALES Y METODOS

Reactivos

- Vacuna antimeningocócica VA-MENGO-BC[®] (Lote 7097)
- Vesículas de membrana externa (VME) (Lote 8002)
- Polisacárido del serogrupo C
- Conjugado anti IgG de ratón peroxidasa (SIGMA)
- Conjugado anti IgA de ratón biotinilada (SIGMA)
- Poli-L-lisina (SIGMA)
- Suero Fetal Bovino (SIGMA)
- Estreptavidina (SIGMA)
- Mucina (MERCK)
- Na₂CO₃ (MERCK)
- NaHCO₃ (BDH)
- Na₂HPO₄ · H₂O (MERCK)
- NaCl (MERCK)
- KH₂PO₄ (MERCK)
- KCl (MERCK)
- Acido cítrico (MERCK)
- Tween 20 (SIGMA)
- Skim Milk (MERCK)
- OPD (o-fenilendiamina) (SIGMA)
- H₂O₂ (MERCK)
- Dextrana férrica (IMEFA)
- H₂SO₄ (MERCK)
- Pilocarpina (IMEFA)
- Pentobarbital sódico (IMEFA)
- Agar Mueller-Hilton (MERCK)

Soluciones

- Buffer de recubrimiento:
 - Na₂CO₃-----0.19875 g en 50 mL de agua destilada
 - NaHCO₃----0.36625 g en 50 mL de agua destilada
 - Unir ambos volúmenes
 - Ajustar pH a 9.6-9.8
 - Llevar a 250 mL con agua destilada
 - Esterilizar
 - Guardar en frío hasta su uso (atemperar antes de usar)
- SSTF 0.015M 10X:
 - Na₂HPO₄ · H₂O-----7.27 g
 - NaCl-----40 g
 - KH₂PO₄-----1 g
 - KCl-----1 g

- Disolver en 500 mL de agua destilada
- Llevar a pH 7.2
- Esterilizar (Dura alrededor de 1 mes a temperatura ambiente. Abrir bajo condiciones estériles para extraer porciones)

- SSTF 0.015M 1X:
 - Tomar 450 mL de agua destilada
 - Añadir 50 mL de SSTF 10X
 - Agitar bien
 En los casos anteriores se ajusta pH con HCl ó H₂SO₄.

- Buffer sustrato:
 - Acido cítrico-----2.1014 g en 100 mL, tomar 48.6 mL
 - Na₂HPO₄ · 2H₂O----3.5597 g en 100 mL, tomar 51.4 mL
 - Unir los volúmenes escogidos
 - Llevar a pH 5.0
 - Llevar a 200 mL con agua destilada
 - Esterilizar
 Si el pH está por debajo de 5 se añade Na₂HPO₄ · 2H₂O, si está por encima se añade ácido cítrico.

- SSTF 1X+Tween 20 (0.05%): (Solución de lavados para IgG e IgA secretores)
 - 100 mL de SSTF 1X + 50 mL de Tween 20 ó
 - 500 mL de SSTF 1X + 250 mL de Tween 20

- H₂O+Tween 20 (0.05%): (Solución de lavados para IgG e IgA séricas)
 - 1000 mL de agua destilada + 100 mL de Tween 20 ó
 - 500 mL de agua destilada + 250 mL de Tween 20

- SSTF 1X-Tween 20+Skim Milk:
 - 50 mL de SSTF 1X-Tween 20
 - 1.5 g de Skim Milk

- SSTF 1X+Tween 20+Skim Milk:
 - 50 mL de SSTF 1X
 - 1.5 g de Skim Milk (queda al 3%)
 - 25µg de Tween 20

- Sustrato: (Se prepara al momento de añadir)
 - 15 mL de buffer sustrato
 - 0.0060 g de OPD (Pesar con guantes, en vial, disolver añadiendo 1 mL del buffer sustrato ya medido, disolver bien, añadir al resto del buffer)
 - 6µL de H₂O₂

- Dextrana férrica:

-24 mL de agua destilada
-1 mL de dextrana
Se prepara a una concentración de 2mg/mL

- H₂SO₄: (Para detener)
-5mL de ácido en 13.4 mL de agua destilada
- Pilocarpina 0.5%:
-7 mL de SSTF 1X
-1 mL de pilocarpina al 4%
-Mezclar bien
- Pentobarbital sódico 12.5mg/mL:
-2 mL de Pentobarbital sódico conteniendo 250 mg
-18 mL de agua destilada estéril
-Mezclar bien

Equipos e Instrumentos

- Centrifuga refrigerada (SANYO, Japan)
- Centrifuga (Hettich Rotanta/RP)
- MicroELISA (Titertek Multiskan)
- Caliper
- Gabinete de seguridad biológica (Antair, BSK, Germany)
- Baño termostataado (Haake GH)
- Frizer -20°C (ASSAB)

Selección y distribución de los animales

Los estudios se realizaron en ratones Balb/c hembras procedentes del CENPALAB, Bejucal, Habana, Cuba, con 18-20 g de peso al inicio del experimento, los cuales fueron distribuidos al azar en cajas de 10 animales cada una utilizando la Tabla de Números Aleatorios. La atención de los animales se realizó de acuerdo a las normas institucionales establecidas por el Instituto Finlay para el cuidado y uso de animales pequeños. Los animales permanecieron bajo condiciones controladas de temperatura (21-24⁰C), humedad (20-25%), ciclo alternativo de luz/oscuridad de 12 horas, así como recibieron alimentación y agua acidulada con HCL a un pH de 2,5-2,8 *ad libitum*.

Los protocolos de investigación así como los métodos de eutanasia fueron analizados y aprobados por una comisión de ética institucional.

Diálisis de las Vesículas de Membrana Externa

Para poder desarrollar los experimentos con VME se procedió a dializarlas pues las mismas estaban disueltas en Desoxicolato, para ello se siguió el siguiente procedimiento. La membrana en la cual se iba a dializar se hirvió en agua destilada filtrada un aproximado de 3 –5 minutos. Luego se amarró un extremo de la membrana, se probó que no tuviera orificios pasando un poco de agua hervida. A continuación se vació del agua y se añadió la muestra. Se cerró la membrana y se colocó en Tris 0.015M, se puso en agitación magnética en cámara fría durante 24 horas al cabo de las cuales se cambió el Tris por uno nuevo. Una vez transcurridas 24 horas se recogió la muestra de VME de forma estéril y se le realizó un Lowry para determinar la concentración de proteínas.

Protocolos de inmunización

Para cumplir los objetivos propuestos se utilizaron tres inmunógenos: la vacuna antimeningocócica VA-MENGOC-BC[®] (Lote 7097), las VME (Lote 8002) y el Polisacárido del serogrupo C, estos dos últimos constituyentes principales de la vacuna.

Para preparar la vacuna se tomaron las dosis necesarias del frasco de VA-MENGOC-BC[®] escogido para ello. Las VME y el Polisacárido C se prepararon a las concentraciones requeridas diluyendo las muestras concentradas en SSTF 1X.

Ciento cuarenta y siete animales se distribuyeron formando tres grupos aleatorios. El primero fue empleado para determinar la inducción por vía nasal de respuesta sistémica y mucosal regional y a distancia por los constituyentes de VA-MENGOC-BC[®]. Este grupo se dividió en 7 subgrupos. En la tabla 2 se muestra como se diseñaron los esquemas y que rutas y dosis se emplearon, así como los tipos y tiempos de recogida de las muestras. Las inmunizaciones intranasales fueron realizadas en los ratones anestesiados con Pentobarbital sódico inoculando 0,05 mL intraperitoneal a cada animal (0,625 mg), instilando luego 1,6, 6 ó 25 µg de VA-MENGOC-BC[®], VME o PoliC respectivamente en las fosas nasales del animal (la mitad del volumen total en cada fosa) y esperando que este lo inhalara. Los animales fueron inmunizados a los 0, 15 y 35 días, siendo esta última dosis opcional según aparece en la tabla 2. Se emplearon 3 controles la vacuna administrada en tres dosis

intramusculares de 25 µg, la vacuna en 2 dosis intranasales y solución salina tamponada con fosfato (SSTF).

El 2^{do} grupo fue empleado para evaluar la influencia de la administración nasal de las VME, PoliC y VA-MENGOC-BC[®] en animales previamente inmunizados con VA-MENGOC-BC[®] parenteral. Para ello se formaron 9 subgrupos. La tabla 3 muestra el diseño de este grupo, así como el muestreo que incluyó en todos los grupos toma de sangre y secreciones mucosales (saliva y lavado vaginal). La vacuna antimeningocócica fue administrada de forma parenteral en las concentraciones de 12,5 ó 25 µg por animal. Las inmunizaciones intranasales se realizaron instilando 1,6 ó 6 µg de los tres antígenos evaluados en las fosas nasales (medio volumen del total en cada fosa) de los ratones preparados como se explicó anteriormente. Como controles se inocularon un subgrupo con alúmina y otro con SSTF.

El 3^{er} grupo se utilizó para precisar la inducción por vía nasal de respuesta sistémica y mucosal regional y a distancia de las VME y PoliC en animales previamente inmunizados parenteralmente con estos mismos componentes. Este grupo, estuvo formado por 5 subgrupos. Todos los procedimientos para las inmunizaciones se desarrollaron igual a los anteriores (Tabla 4).

Toma de muestras

- La sangre fue colectada por punción del plexo retroorbital y se dejó reposar a 37 °C para permitir la retracción del coágulo, el suero se obtuvo centrifugando la misma a 3500 gravedades por 15 minutos. Los sueros fueron conservados a -20 °C hasta su uso.
- El lavado vaginal fue obtenido aplicando y aspirando 50 µL de SSTF 10X en la vagina de cada animal por 10 veces seguidas. El fluido fue conservado a -20 °C y centrifugado a 9000 gravedades por 10 minutos antes de su utilización para eliminar tapones mucosos y otras partículas celulares en suspensión, evaluándose el sobrenadante donde quedaron las inmunoglobulinas¹⁹.
- La saliva fue colectada al 1½ minutos de la inyección intraperitoneal de 50 µL de Pilocarpina 0,5% y colocada sobre hielo. La saliva fue inmediatamente inactivada por

calor a 56 °C durante 15 minutos para eliminar las proteasas que pueden degradar las inmunoglobulinas, luego centrifugada a 9000 gravedades por 10 minutos para eliminar las partículas celulares en suspensión y mucosidades, conservándose el sobrenadante conteniendo las inmunoglobulinas a -20 °C hasta su uso^{19,56}.

Ensayo de Hipersensibilidad Retardada

A los 7 días de concluido el esquema de inmunización, se administraron a todos los animales 50 µL de SSTF 10X vía intradérmica en la región dorsal de la extremidad trasera izquierda como control. A los grupos inoculados con VME y vacuna se les inoculó igual volumen de VME (1 mg/mL) en la extremidad posterior derecha y a los grupos inoculados con Polisacárido C se les administró 50 µL de este (10 mg/mL). A las 48 horas se midió el diámetro de la induración formada con un caliper. Se calculó la diferencia entre ambas extremidades y se expresó como la medida de la HR dada en mm¹³.

ELISA

Para la determinación de anticuerpos específicos anti-VME de VA-MENGOC-BC[®] se empleó la técnica de ELISA indirecto para analizar el comportamiento de la producción de IgG durante el experimento.

Se tomaron 100 µL de VME (20 µg/mL) en tampón Na₂CO₃- NaHCO₃, 0,1mol/L pH 9,6 y se colocaron en placas de poliestireno de 96 pocillos de fondo plano (MaxiSorp, Nunc) e incubaron a 4 °C toda la noche en cámara húmeda. Después de lavar tres veces con SSTF 0.15 mol/L, pH 7.2-Tween 20 (SIGMA) al 0,05% (se usó este en todos los lavados realizados luego de cada paso de incubación). Se procedió a bloquear con leche descremada al 3% (MERCK)- SSTF-Tween 20 al 0.05% añadiendo 100 µL/pozo. Se incubaron las muestras problemas y los controles (100 µL) diluidos en la solución de bloqueo a 37 °C durante 1 hora si la muestra era suero y 2 horas si era saliva. Se añadieron 100 µL/pozo del conjugado anti-IgG de ratón-peroxidasa diluido 1/5000 y se incubaron las placas 1 hora a 37 °C en cámara húmeda. Se añadieron 100 µL/pozo de solución sustrato compuesta por 0.6 µL de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) al 30% en Tampón citrato pH 5 y se usó como

cromógeno 6 mg de o-fenilendiamina. Se incubaron las placas 20 minutos para la IgG de suero y 45 minutos para la saliva en cámara oscura a temperatura ambiente. Se detuvo la reacción con 50 μL /pozo de H_2SO_4 2 N y se efectuó la lectura a 492 nm en un microELISA (Titertek Multiskan).

Las muestras de lavado vaginal fueron ensayadas con igual protocolo utilizando en este caso para la determinación de IgG una dilución de 1/10 de la muestra y una dilución de 1/2000 del conjugado anti-IgG de ratón-peroxidasa.

Para la determinación de anticuerpos específicos antipolisacarídicos se recubrió la placa de 96 pocillos de fondo plano (MaxiSorp, Nunc) con Poli-L-lisina 3mg/mL ajustada a una concentración de 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ diluída en SSTF y se incubó 30 minutos a temperatura ambiente en cámara húmeda. Se realizaron 3 lavados con SSTF y se efectuó un segundo recubrimiento con Polisacárido C ajustado a una concentración de 2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en todos los pocillos, incubándose toda la noche a 4 °C en cámara húmeda. Se realizaron 3 lavados, seguido a cada paso de incubación con SSTF 0.15 N pH 7.2 más Tween 20 al 0.05 %. Las placas fueron bloqueadas con la solución de bloqueo descrita anteriormente. Se incubaron las muestras problemas y los controles (100 μL / pozo) diluídos en la solución de bloqueo a 37 °C por 1 hora para el suero y 2 horas para la saliva y el lavado vaginal. Se añadieron 100 μL /pozo del conjugado anti-IgG de ratón-peroxidasa diluído 1/1000, se incubó 1 hora a 37 °C. La aplicación del sustrato y lectura fueron iguales al ELISA anterior. Las muestras se diluyeron 1/10 para lavado vaginal y 1/200 para suero.

Para la determinación de anticuerpos IgA se utilizó también un sistema indirecto. Para conocer el comportamiento de la producción de IgA anti VME se procedió a añadir 100 μL de VME (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) en igual tampón que para el ELISA de IgG a las placas de poliestireno de 96 pocillos de fondo plano (MaxiSorp, Nunc) e incubaron a 4 °C. Después de lavar 3 veces con SSTF-Tween 20 al 0,05% (se usó esta solución para todos los lavados (3 veces) luego de cada paso de incubación), se procedió a bloquear con SSTF-Suero Fetal Bovino (SFB) al 10% a temperatura ambiente. Las muestras se prepararon 1/100 para el suero, 1/2

la saliva, 1/10 el lavado vaginal en la solución de bloqueo y se añadieron 100 μL a cada pocillo de la placa, incubándose a 37 °C durante 1 hora la placa con las muestras de suero y 2 horas las placas con las muestras de las secreciones mucosales. Se añadieron 100 μL /pozo del conjugado anti-IgA biotinilado diluida 1/100 y se incubaron las placas 1 hora a 37 °C. Se añadieron 100 μL /pozo de Estreptavidina diluida 1/2000 y se incubó a 37 °C, 1 hora.

Luego de lavar tres veces se procedió añadir el sustrato y a detener en iguales condiciones que para el ELISA de IgG. La detención de la reacción se llevó a cabo a la 1/2 hora de incubación. Se leyó la absorbancia a 492 nm en el microELISA.

Para la determinación de los anticuerpos IgA antipolisacáridicos se procedió en sus primeros pasos igual que para determinar IgG. Se bloqueó con SSTF-SFB al 10% a temperatura ambiente. La preparación de las muestras y el resto de los pasos del ELISA se desarrollaron de forma similar al de la determinación de IgA anti VME.

En algunos grupos aleatorios, como un estudio preliminar, se probó hallar IgA en el lavado obtenido de la vagina y los resultados se discuten mas adelante.

Reto

Una vez concluidos los esquemas de inmunización y las HR se procedió a evaluar la protección que estos habían sido capaces de inducir en los animales. Para cumplir con este objetivo se siguieron una serie de pasos el primero de los cuales fue preparar el inóculo a partir de la cepa 285 de *N. meningitidis* B de 24 horas de sembrada y en una dosis de 5×10^8 cel/mL.

Este inóculo fue administrado a los ratones junto con dextrana férrica (2 mg/mL) y mucina (8%) como factores estimulantes de la virulencia y facilitadores de la susceptibilidad de los ratones a esta bacteria, en un volumen total de 0,5 mL por vía intraperitoneal.

Los animales se revisaron a las 6 horas post-inoculación para controlar la técnica operatoria y observar si hubo muerte por inadecuada manipulación⁵⁷. Luego se chequearon las muertes a las 24, 48 y 72 horas contra el número total de animales del cual se partió, calculándose el % de supervida de la siguiente manera:

$$\% \text{ de supervida} = (\text{Número de supervivientes} / \text{Número total de animales}) \times 100$$

Los animales supervivientes fueron sacrificados con una sobredosis de Pentobarbital sódico aplicada por vía intraperitoneal.

La dosis empleada para retar fue dada por la experiencia de trabajo del Dpto por lo que paralelamente se realizó la evaluación de la DL₅₀ para corroborarla.

Para desarrollar la DL₅₀ se prepararon 8 viales y partiendo de la dilución 10⁹ se realizaron las diluciones 10⁸ -10². Se tomaron 8 cajas con 5 animales cada una tomados al azar y en cada caja se inoculó una de las diluciones. Los resultados fueron leídos a las 24, 48, 72 horas y llevados a la siguiente tabla:

Vivos	Muertos	Acumulados	$\% = \left[\frac{M}{V_{acum} + M_{acum}} \right] \times 100$
Vivos/Muertos			
10 ⁷		S	
10 ⁶		e	
10 ⁵		v	
10 ⁴		a	
10 ³		n	
10 ²		s	
		u	
		m	
		a	
		n	
		d	
		o	

Y se calculó el 50% acumulado:

$$50\% \text{ acum} = \frac{50 - \% < 50}{\% > 50 - \% < 50} \times \text{Log del factor de la dilución}$$

De cada dilución se hicieron diluciones sucesivas hasta 10 y se sembraron en Agar Mueller-Hilton (MERCK) las primeras diluciones, se colocaron invertidas en incubadora a 37 °C y 0,5% de CO₂. Se leyeron a las 24 horas. Se halló el promedio del conteo de las diluciones de cada concentración y después el promedio de la concentración.

Para obtener la DL₅₀ calculada se tomó el antilog del 50% acumulado y se multiplicó por el valor de la siembra de la dilución menor del 50%. Para obtener la DL₅₀ real se dividió la DL₅₀ leída por la DL₅₀ calculada. La comparación de este último valor con la dosis empleada permitió saber si esta estaba por encima o por debajo de la DL₅₀ y por lo tanto si el experimento se realizó de forma correcta.

Estadística

En los casos que se consideró necesario se compararon estadísticamente los resultados. Se determinó si existían diferencias significativas o no entre las medias de los datos de las densidades ópticas de IgG e IgA, así como de los valores de hipersensibilidad retardada evaluándolos con una prueba t de Student para la comparación de medias con un nivel de significación de $p < 0,05$. En el caso que hizo falta se realizó un análisis de varianza de clasificación doble para determinación de diferencias entre tratamientos y tiempos. Para ello se empleó el programa computacional Stat.

RESULTADOS Y DISCUSION

El desarrollo de vacunas ha alcanzado un avance tal que se comienza a evidenciar la importancia de que estas sean administradas utilizando las mismas vías que usan los patógenos para invadir los seres vivos. La mayoría de estos patógenos penetran por las mucosas, de ahí que reforzar los mecanismos de defensa de estas regiones sea esencial. Ahora bien, producir vacunas mucosales eficaces se convierte en un desafío debido al poco conocimiento existente de las interacciones de los microorganismos con los tejidos mucosales y los mecanismos utilizados para atravesarlos.

N. meningitidis es uno de estos patógenos, su único hábitat natural es la nasofaringe humana y por aquí penetra al torrente sanguíneo invadiendo posteriormente el líquido cerebroespinal y las meninges. La colonización de *Neisseria* podría ser evitada empleando una vacuna mucosal que indujera IgA. La vacuna antimeningocócica empleada por vía sistémica proporciona una elevada protección; pero no existen datos concluyentes de que ella afecte el estado de portador. En este trabajo se estudió la capacidad de sus constituyentes de inducir respuesta inmune al administrarla por vía mucosal.

Se diseñaron diferentes esquemas con variadas dosis, que respondieran a los objetivos planteados, para analizar el comportamiento de la respuesta inmune inducida por los componentes de la vacuna antimeningocócica cubana administrados por la ruta nasal y valorar el efecto sobre previas inmunizaciones parenterales.

Respuesta sistémica y mucosal regional y a distancia de las VME y el PoliC al ser inoculados por vía nasal.

Para determinar la inducción de respuesta inmune sistémica y mucosal por los constituyentes de VA-MENGOC-BC[®] al ser inoculados por vía nasal se utilizaron 7 subgrupos. Dos de ellos con 2 dosis de 25 µg y otros 2 con 3 dosis de 6 µg, junto a tres controles, uno de los cuales lo constituyó VA-MENGOC-BC[®] parenteral con 3 dosis de 25 µg. Las muestras evaluadas fueron: sangre, saliva y lavado vaginal. En ellas se evaluaron la

presencia de IgG e IgA anti VME y PoliC. Además, se realizó la HR para evaluar la respuesta celular y se enfrentaron los animales con *N. meningitidis* B para poder ver el nivel de protección alcanzado.

Al realizar los ensayos para determinar la presencia de IgG e IgA anti VME se observó que las VME y VA-MENGOC-BC[®] aplicadas en dos dosis intranasales mostraron una ligera inducción de IgG anti VME sérica; pero no a nivel vaginal (Fig. 4A y B). En cambio se observó una significativa presencia de IgA en saliva y lavado vaginal al inmunizar con 3 dosis de VME en una concentración de 6 µg (Fig. 5B y 6).

La ligera respuesta de IgG anti VME de las 2 dosis, pudiera deberse a que la vía nasal no es la ideal para estimular inmunocitos productores de IgG según planteó Linda Perry en 1999⁵⁸. al afirmar que los antígenos administrados parenteralmente inducen secreción de anticuerpos sistémicos pero no mucosales y viceversa, sugiriendo la separación de las vías de tráfico de linfocitos mucosales y sistémicos.

El soporte molecular para la diferencia anterior partió de la identificación de moléculas de adhesión celular vascular (VCAM) en las células endoteliales de la vasculatura sistémica y moléculas de adhesión celular adresina mucosal (MadCAM) en las células endoteliales de la lámina propia del intestino. Los linfocitos infiltrados en cada uno de estos sitios expresan diferentes perfiles de integrinas moleculares complementarios representadas como $\alpha 4\beta 1$ para tejidos VCAM⁺ y $\alpha 4\beta 7$ para las mucosas MadCAM⁺. Este descubrimiento fortalece la noción que la inducción de inmunidad mucosal requiere de una estrategia de inmunización mucosal^{32,58}.

La inducción significativa de IgA anti VME en saliva y vagina esta en correspondencia mas con el numero de dosis que con la concentración lo que esta de acuerdo con lo señalado por Bakke y col. en 2001⁵⁹ que encontraron mejor respuesta con 4 inoculaciones nasales de 25 µg administradas semanalmente. No obstante nuestras respuestas fueron con menores (6 µg) concentraciones.

Brandtzaeg también se refiere a que el sistema IgA tiene memoria y que una producción persistente de IgAs depende de un estímulo antigénico crónico⁶⁰, por esta razón cuando se inoculan dos dosis nasales no se induce respuesta mucosal y si aparece esta cuando se aplican 3 dosis, lo cual además explica el resultado de Bakke⁵⁹.

Al analizar la presencia de anticuerpos anti PoliC en los animales inmunizados con PoliC por vía nasal, se observó que los esquemas y dosis ensayados no fueron capaces de inducir respuesta de IgG ni de IgA específica.

VA-MENGOC-BC[®] en 3 dosis intramusculares de 25 µg indujo buena respuesta de IgG anti VME en suero y lavado vaginal (Fig. 4 A y B). Esta última, es posible sea derivada del suero, pues se acepta que la IgG es transferida a las secreciones externas por medio de difusión intercelular, endocitosis u otros métodos, los cuales colectivamente son referidos como trasudación tal como reportaron Parr MB y col en 1996⁶¹. En 1999⁶², esta misma autora planteó que la inmunización parenteral induce principalmente IgG en las secreciones del tracto genital y que no se encuentran IgAs específica en las secreciones mucosales.

VA-MENGOC-BC[®] en 3 dosis no indujo IgA anti VME en saliva, lo cual confirma lo planteado por autores como Challacombe y col en 1997¹⁹ y Russell y col en 1996²¹ que para inducir secreción de IgA mucosal se debe inmunizar por esta misma vía y también se opina que las inmunizaciones parenterales no inducen la formación de IgA secretora mucosal según ha sido reportado⁵⁸.

Los animales inmunizados con 3 dosis parenterales de VA-MENGOC-BC[®] mostraron una respuesta positiva al realizar el ensayo de HR, indicando inducción de respuesta celular, este resultado coincide con lo obtenido por Pérez O y col. con 2 dosis en 1998¹³. La aplicación de VA-MENGOC-BC[®] nasal no indujo HR. Las VME nasales indujeron HR tanto en 2 como en 3 dosis aunque con esta última existe una tendencia al incremento a pesar de usarse menores concentraciones (Fig. 7).

Los resultados del reto no fueron concluyentes, pues el grupo donde se aplicó VA-MENGOC-BC[®] en tres dosis (control positivo) solo alcanzó el 50% de protección. Además, el reto se realiza por vía intraperitoneal, por lo que la IgA inducida no sería efectiva para proteger las mucosas. Por ello, es aconsejable trabajar en el desarrollo de un método de reto nasofaríngeo.

La previa inmunización parenteral con VA-MENGOC-BC[®] no afecta la inmunización nasal con VME, PoliC ni VA-MENGOC-BC[®].

Para evaluar la influencia de una previa inmunización parenteral con VA-MENGOC-BC[®] sobre la inoculación nasal con VME o PoliC se emplearon 9 subgrupos. Las combinaciones fueron de: dos de ellos recibieron 2 dosis vacunales y una de VME o PoliC, respectivamente y otros dos recibieron 1 dosis vacunal y 2 dosis de VME o PoliC por vía nasal, respectivamente. Además, VA-MENGOC-BC[®] se empleó en concentraciones de 25 ó 12,5 µg por vía parenteral con 1,6 ó 6 µg por vía nasal y otros dos subgrupos fueron controles negativos. En todos los subgrupos se extrajeron sangre, saliva y lavado vaginal para la determinación de IgG e IgA anti VME o anti PoliC antes y después de las dosis. Además, se evaluó la respuesta de HR y la capacidad de protección al retar con *N. meningitidis* del serogrupo B por vía intraperitoneal.

La respuesta sérica de IgG anti VME se observó en todos los grupos después de la inmunización excepto en los controles. Se encontraron diferencias apreciables en los animales inmunizados con una o dos dosis previas, con diferentes concentraciones. (Fig. 8 A).

Estos resultados están en correspondencia con lo reportado por otros autores⁶³, donde a mayor número de dosis por vía parenteral ó reestimulación se obtiene una mayor respuesta de IgG en suero al estimular los linfocitos de memoria y así se mantiene una inmunidad de larga duración.

La respuesta de IgG anti-VME vaginal sólo se encontró con dos dosis previas de VA-MENGOC-BC[®] de 12,5 µg y 6 µg de VA-MENGOC-BC[®] o VME por vía nasal. Dos dosis de 25 µg previas de VA-MENGOC-BC[®] y una nasal de 1,6 µg de VA-MENGOC-BC[®] a pesar de verse un incremento estuvo por debajo de 0,4 de densidad óptica (Fig. 8 B). Esto pudiera deberse a que el esquema empleado inicialmente fue de 0 y 15 días entre dosis. Cabezas S⁶⁴ demostró que cuando se empleaban altas dosis era necesario un espaciamiento mayor entre las dosis para la inducción de una adecuada respuesta. Por ello una menor respuesta de IgG anti VME sérica conllevará a una menor trasudación y menor título vaginal.

La respuesta sérica anti PoliC no se afectó por el número de dosis previas parenterales y se obtuvieron semejantes títulos con una o dos dosis nasales de Polisacárido (Fig. 9). Estos resultados abogan hacia una adecuada primoestimulación inducida por VA-MENGOC-BC[®] y una reestimulación a nivel nasal. A nivel de vagina no se detectó respuesta, lo que puede estar en correspondencia con los moderados títulos observados en suero.

No se obtuvo IgA anti VME ni anti PoliC en saliva en ninguna combinación y solo se obtuvo IgA anti VME en vagina con una dosis de VA-MENGOC-BC[®] parenteral y dos dosis de VME nasal (Fig. 10). Por ello, el número de dosis parenteral no es el esencial sino el nasal. Esto está en correspondencia con Brandtzaeg que señala que una producción persistente de IgAs depende de un estímulo antigénico crónico⁶⁰, pero administrados por vía mucosal. Linda Perry en 1999⁵⁸ señala que los antígenos administrados parenteralmente inducen secreción de anticuerpos sistémicos pero no mucosales y viceversa, sugiriendo la separación de las vías de tráfico de linfocitos mucosales y sistémicos. Por esta razón 1 sola dosis intranasal no fue suficiente para inducir respuesta de IgA mucosal y si dos dosis al menos para respuesta a nivel de vagina. Por otro lado, la no detección de IgA anti VME en saliva pudiera deberse a que esta fue evaluada a los 7 días y no a los 9 días donde se encuentra el pico de IgA (Pérez O, datos no publicados).

La presencia de IgA en el lavado vaginal puede ser debida a producción local, apoyándonos en lo planteado por Parr MB y col en 1996⁶¹ y 1999⁶², quienes afirmaron que el origen

local de la IgA en las secreciones del tracto reproductivo está apoyado por reportes del componente secretor en el epitelio luminal glandular y células plasmáticas de IgA en el estroma del tracto genital femenino en humanos y otros animales^{65,66,67}. La aparición de esta inmunoglobulina en las secreciones de la vagina luego de inmunizaciones del tracto respiratorio apoya la idea de que el tejido linfoide asociado a nasofaringe tiene la capacidad de actuar como sitio inductor para la migración de células B encargadas de la producción de IgA a tejidos mucosales distantes. Por lo tanto parece ser que la respuesta IgA, inducida por el tracto respiratorio se disemina a través del sistema inmune mucosal común⁶⁸ (Fig. 2).

La respuesta de HR se encontró en todos los subgrupos con dos dosis parenterales de VA-MENGOC-BC[®] o una parenteral y dos nasales. Una dosis parenteral y otra nasal no indujo HR (Fig. 11). No se encontró respuesta de HR frente al PoliC en ninguna combinación. Sería aconsejable evaluar la respuesta de HR frente al PoliC en animales inmunizados con 3 dosis parenterales de VA-MENGOC-BC[®].

Al retar los animales con la bacteria la mayor supervida se obtuvo en los grupos inmunizados con 2 dosis intramusculares de vacuna a una concentración de 12,5 µg y seguidas por dosis nasales de vacuna o VME. A continuación se encontró el grupo que recibió las vacunas a la concentración de 25 µg seguido por concentraciones de 1,6 µg nasalmente, todo lo cual estuvo en correspondencia con los grupos a los que se les encontró alto nivel de HR. Los menores valores de protección fueron los animales que recibieron una dosis parenteral y dos nasales de PoliC o una nasal de VA-MENGOC-BC[®] (Fig. 12).

Las dosis previas de VME o Poly C influyen sobre las respuestas nasales de estos componentes de VA-MENGOC-BC[®].

Para valorar el efecto de la inmunización de los constituyentes de VA-MENGOC-BC[®] al inocularlos por vía nasal con sus previas inmunizaciones parenterales se formaron 5 subgrupos. Dos recibieron dos dosis intramusculares de VME o PoliC y luego una dosis intranasal de ellos mismos. Otros dos recibieron una dosis intramuscular y una intranasal de estos mismos componentes. Un último subgrupo fue de control. Se evaluó la presencia de

IgG e IgA anti VME y anti PoliC en muestras de suero, saliva y lavado vaginal antes y después de la inmunización. Además, se evaluó la HR y la capacidad de protección inducida por estos esquemas al retar con bacteria por vía intraperitoneal.

La respuesta de IgG anti VME en suero no se afectó por una o dos dosis previas de VME parenterales; pero en vaginal sólo se observó respuesta en el subgrupo con 2 dosis previas. (Fig. 13A y B). La IgG anti VME vaginal debe provenir de la trasudación^{61,62}.

Cierto incremento en la respuesta de IgA anti VME se observó en el grupo con 2 dosis intramusculares y una nasal de 25 µg de VME aunque también se observó ligero incremento con una dosis previa a nivel de saliva aunque estas no llegan a 0,4 de densidad óptica (Fig. 14), pero nunca llegan a la respuesta de 3 dosis nasales con 6 µg de VME (Fig. 5B).

En el caso del PoliC, con estos esquemas no se observó inducción de IgG ni de IgA anti PoliC, lo que corrobora que el PoliC plano induce preferencialmente tolerancia^{69,70}.

La HR fue positiva en los grupos inmunizados con VME por ambas vías (Fig. 15), no así frente al PoliC. Los resultados del reto con *N. meningitidis* B no fueron concluyentes. Es aconsejable realizar reto con *Neisseria* del serogrupo C para evaluar la respuesta de inmunizaciones con PoliC.

Valoración socio-económica.

No existen datos concluyentes de que VA-MENGOC-BC[®] elimine el estado de portador por lo que el reservorio de la enfermedad se mantiene a la espera de una falla del sistema inmune del receptor para producir la infección y la enfermedad, pero lo más importante es que este portador es el reservorio para su transmisión.

En este trabajo se investigó de forma preliminar la capacidad de los componentes de la vacuna de inducir respuesta de IgG pero también de IgA específicas en mucosas

introduciendo dosis nasales. La importancia de esta IgA mucosal en prevenir la enfermedad meningocócica es desconocida, pero puede ser un factor en prevenir la colonización y la progresión a una enfermedad invasiva⁷¹. De actuar de esta forma se estaría investigando a favor de eliminar el estado de portador y dar un vuelco, en el futuro, a la circulación poblacional de *N. meningitidis* B al eliminar el único reservorio natural que tiene.

La investigación desarrollada redundará por tanto en un fortalecimiento de la respuesta inmune al adicionar a la respuesta sistémica existente, por la alta cobertura vacunal de nuestra población o la exposición natural de los adultos, una respuesta en mucosa que proteja contra el estado de portados, es decir no sólo luchar contra la enfermedad sino contra el germen.

Challacombe y col (1997)¹⁹ plantearon que el hecho que la mayoría de las enfermedades infecciosas sea combatida a través del tejido mucosal ha planteado nuevos desafíos en el desarrollo de vacunas. Considerando esto se puede decir que la presente investigación constituye la primera fase para el establecimiento de candidatos vacunales mucosales.

Es muy difícil establecer un balance económico sobre el costo de una vacuna mucosal pues en estos momentos se está en las investigaciones preliminares de si induce o no respuesta inmune; pero se prevé que para análisis posteriores cuando se pase a ensayo clínico se pueda calcular el costo de la formulación, de los nebulizadores si se decide administrarla de esta forma que es la que más se asemeja a la forma de infección, del número de dosis y el esquema más idóneo para la población.

CONCLUSIONES

1. La inmunización nasal indujo considerable IgA anti VME a nivel de saliva y vagina, ligera IgG anti VME sérica e Hipersensibilidad Retardada.
2. La inmunización nasal no es afectada por dosis previas de VA-MENGOC-BC[®].
3. Solo se obtuvo respuesta de IgA anti VME por tres dosis nasales o una estimulación parenteral y dos dosis nasales.
4. Solo se observó respuesta de IgG anti PoliC con dosis nasales después de previas parenterales de VA-MENGOC-BC[®].

RECOMENDACIONES

- Se hace necesario introducir el reto por vía nasofaríngea para evaluar de manera efectiva la protección concedida por inoculaciones mucosales y la influencia de la respuesta de IgA.
- Es aconsejable evaluar la respuesta de HR frente a PoliC en animales inmunizados con 3 dosis parenterales de VA-MENGOC-BC[®].
- Es recomendable realizar los retos con *N. meningitidis* serogrupo C frente a las inmunizaciones con PoliC.

BIBLIOGRAFIA

¹ **Sasson A.** 1998. Biotecnologías aplicadas a la producción de fármacos y vacunas. Ed. Elfos scientiae. La Habana. Cuba: 115.

² **Roitt I, Brostoff J, Male D.** 1993. Immunology. 3ra edic. Editorial Mosby, London, England: 3.9-3.11.

³ **Aggerbeck H, Gizurarson S, Wantsin J, Heron I.** 1997. Intranasal booster against diphtheria and tetanus in man. *Vaccine*, 15: 307-316.

⁴ **Shoemaker DR, Saunder NB, Brandt BC, Moran E, Zollinger WD.** 1997. Antibody response of rabbits to intranasally administered meningococcal native outer membrane vesicles. In: Pathogenic Neisseria. Abstracts of the Tenth International Pathogenic Neisseria Conference. Ed Wendell D Zollinger, Carl E Frsch, Carolyn D Deal, Baltimore, Maryland, USA:196.

⁵ **Gizurarson S, Jónsdóttir VM, Heron I.** 1995. Intranasal administration of diphtheria toxoid selecting antibody isotypes using formulations having varios lipophilic characteristic. *Vaccine*, 13: 617-621.

⁶ **Takahashi I, Okahashi N, Kanamoto T, Asakawa H, Koga T.** 1990. Intranasal immunization of mice with recombinant protein antigen of serotype C Streptococcus mutans and cholera toxin B subunit. *Arch. Oral Biol*, 35: 475-477.

⁷ **Wu HY, Russell MW.** 1993. Induction of mucosal immunity by intranasal application of a streptococcal surface protein antigen with the cholera toxin B subunit. *Infect. Immun*, 61: 314-322.

⁸ **Registro Sanitario No. 1133 VA-MENGOC-BC®.** 1989. Vacuna Cubana Antimeningocócica contra los meningococos B y C. Centro Nacional de Vacuna Meningocócica. Ministerio de Salud Pública. Cuba.

⁹ **Sierra VG, Campa C, Valcárcel M, Garcia L, Izquierdo L, Sotolongo F, Casanueva V, Rico O, Rodríguez R, Terry H.** 1991. Vaccine against Group B *Neisseria meningitidis*: Protection trial and mass vaccination results in Cuba. *NIPH ANNALS*, 14: 195-210.

¹⁰ **Saunders NB, Shoemaker DR, Larsen T, Brandt BL, Moran EE, Zollinger WD.** 1997. Immune response of mice to intranasally administered meningococcal native outer membrane vesicles. In: *Pathogenic Neisseria. Abstracts of the Tenth International Pathogenic Neisseria Conference.* Ed Wendell D Zollinger, Carl E Frsch, Carolyn D Deal, Baltimore, Maryland, USA: 198.

¹¹ **Ala'Aldeen DA.** 1997. Current Developments in vaccines against meningococcal disease. *Culture*, 18: 1-4.

¹² **Gutierrez MF.** 1994. Estudio sobre el comportamiento del estado de portador de *Neisseria meningitidis* en adolescentes de 15 a 18 años vacunados con la vacuna antimeningocócica VA-MENGOC-BC[®]. Tesis en opción al título de Especialista de 1^{er} Grado en Higiene y Epidemiología.

¹³ **Pérez O.** 1998. Respuesta celular inducida por VA-MENGOC-BC^R. Tesis en opción al grado de Doctor en Ciencias Médicas: 41 y 49.

¹⁴ **Mandell/ Douglas/ Bennett.** 1990. Principles and practice of infectious diseases. Third Edition. Ed Churchill Livingstone: 741.

¹⁵ **Nassif X.** 1999. Interaction mechanisms of encapsulated meningococci with eucaryotic cells: what does this tell us about the crossing of the blood-brain barrier by *Neisseria meningitidis*? *Curr. Opin. Microbiol*, 2: 71-77.

¹⁶ **Sierra VG, Campa C.** 1990. Preclinical and clinical studies with the antimeningococcal vaccine BC: VA-MENGOC-BC^R. *Rev. Interf. & Biotechn. Sp.*

¹⁷ **Frasch CE.** 1989. Vaccine for prevention of meningococcal disease. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2: S134-S138.

¹⁸ **Frasch CE, Pepler M.** 1982. Protection against group B *Neisseria meningitidis* disease: Preparation of soluble protein polysaccharide immunogens. *Infect. Immun.*, 37: 71-79.

¹⁹ **Challacombe SJ, Rahman D, O'Hagan DT.** 1997. Salivary, gut, vaginal and nasal antibody responses after oral immunization with biodegradable microparticles. *Vaccine*, 15: 169-175.

²⁰ **Bergquist C, Lagergård T, Holmgren J.** 1997. AnticARRIER immunity suppresses the antibody response to polysaccharide antigens after intranasal immunization with the polysaccharide-protein conjugate. *Infect. Immun.*, 65: 1579-1583.

²¹ **Russell MW, Dolvoveanu Z, White PL, Sibert GJ, Mestecky J, Michalek SM.** 1996. Salivary, nasal, genital and systemic antibody responses in monkeys immunized intranasally with a bacterial protein antigen and the cholera toxin B subunit. *Infect. Immun.*, 64: 1272-1283.

²² **Black KP, Fultz PN, Girard M, Jackson S.** 1997. IgA immunity in HIV type 1-infected chimpanzees. II Mucosal immunity. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, 13: 1273-1278.

²³ **Kuper CF, Koornstra PJ, Hamleers DM, Biewenga J, Spit BJ, Duijvestijn AM, VanBreda PJC, Sminia T.** 1992. The role of nasopharyngeal lymphoid tissue. *Immunol. Today*, 13: 219-223.

-
- ²⁴ **Campo JM.** 1998. ELISA indirecto cualitativo para determinar IgA anti-lipopolisacárido en saliva de humanos inoculados oralmente con el candidato vacunal El Tor Ogawa. Trabajo de diploma. La Habana.
- ²⁵ **Beagley KW, Black CA, Dunkley ML, McGhe JR.** 1996. Regulation of mucosal immunity. In: Cytokine regulation of humoral immunity basic and clinical aspects. Cap 16: 391-408, edited by Snapper CM, Wiley and Sons Ltd. USA.
- ²⁶ **Brandzaeg P, Baekkevold ES, Farstad IN, Jahnsen FL, Johansen F-E, Nilsen EM, Yamanaka T.** 1999. Regional specialization in the mucosal immune system: what happens in the microcompartments? Immunol. Today, 20: 141-151.
- ²⁷ **McGhee JR, Mestecky J, Dertzbangh MT, Eldridge JM, Hirasawa M, Kiyuni H.** 1992. The mucosal immune system: from fundamental concepts to vaccine development. Vaccine, 10: 75-88.
- ²⁸ **Scicchitano R, Stanisz A, Ernst PE, Bienenstock J.** 1988. A common mucosal immune system revisited. In: Migration and Homing of Lymphoid cells, Vol II (Ed. Husband AJ) CRC Press, Boca Ratón, FL:1.
- ²⁹ **Phillips-Quagliata JM, Lamm ME.** 1988. Migration of lymphocytes in the mucosal immune system. In: Migration and Homing of Lymphoid cells, Vol II (Ed. Husband AJ) CRC Press, Boca Ratón, FL: 53.
- ³⁰ **Mestecky J.** 1987. The common mucosal immune system and current strategies for induction of immune responses in external secretions. J. Clin. Immunol, 7: 265-276.
- ³¹ **Mowat AM, Viney JL.** 1997. The anatomical basis of intestinal immunity. Immunol. Reviews, 156: 145-166.

-
- ³² **Brandzaeg P, Farstad IN, Haraldsen G.** 1999. Regional specialization in the mucosal immune system: primed cells do not always home along the same track. *Immunol. Today*, 20: 267-276.
- ³³ **Kanof ME, Strober W, Fiocchi C.** 1988. CD-4 positive, Leu 8-negative helper induces T cells predominate in the human intestinal lamina propria. *J. Immunol*, 141: 3029.
- ³⁴ **Haan A, Renegar KB, Small Jr PA, Wilschut J.** 1995. Induction of a secretory IgA response in the murine female urogenital tract by immunization of the lungs with liposome-supplemented viral subunit antigen. *Vaccine*, 13: 613-616.
- ³⁵ **Kozlowsky PA, Cu-uviv S, Neutra MR, Flamigan TP.** 1997. Comparison of the oral, rectal, and vaginal immunization routes for induction of antibodies in rectal and genital tract secretions of woman. *Infect. Immun*, 64: 1387-1394.
- ³⁶ **Lue C, Van DenwallBake AWL, Prince SJ, Julian BA, Tseng M-L, Radl J, Elson CO, Mestecky J.** 1994. Intraperitoneal immunization of human subjects with tetanus toxoid induces specific antibody-secreting cells in the peritoneal cavity and in the circulation, but fail to elicit a secretory IgA response. *Clin. Exp. Immunol*, 96: 356-363.
- ³⁷ **Moldoveanu Z, Clements ML, Prince SJ, Murphy BR, Mestecky J.** 1995. Human immune responses to influenza virus vaccines administered by systemic or mucosal routes. *Vaccine*, 13: 1006-1012.
- ³⁸ **Neutra MR, Pringault E, Krachenbuhl JP.** 1996. Antigen sampling across epithelial barriers and induction of mucosal immune responses. *Ann. Revises*, 14: 275-300.
- ³⁹ **Brandzaeg P.** 1997. Mucosal immunity in the female genital tract. *J. Reprod. Immunol*, 36: 23-50.

⁴⁰ **Mestecky J, Lue C, Russell MW.** 1991. Selective Transport of IgA: cellular and molecular aspects. *Gastroenterol. Clin. North Am*, 20: 441-471.

⁴¹ **Mestecky J, Jackson S.** 1994. Reassessment of the impact of mucosal immunity in infection with the human immunodeficiency (HIV) and design of relevant vaccines. *J. Clin. Immunol*, 14: 254-272

⁴² **Haneberg B, Kendall D, Amerongen HM, Apter FM, Kraehenbuhl JP, Neutra MR.** 1994. Induction of specific immunoglobulin A in the small intestine, colon-rectum, and vagina measured by a new method for the collection of secretions from local mucosal surfaces. *Infect. Immunol*, 62: 15-23.

⁴³ **Lehner T, Panagiotidi C, Bermeier LA, Ping T, Brookes R, Adams SE.** 1992. A comparison of the immune responses following oral, vaginal or rectal route of immunization with SIV antigens in nonhuman primates. *Vaccine Resources*, 1: 319-330.

⁴⁴ **Kilian M, Reinhold J, Lomholt H, Poulsen K, Frandsen EVG.** 1996. Biological significance of IgA1 proteases in bacterial colonization and pathogenesis: critical evaluation of experimental evidence. *APMIS*, 104: 321-338.

⁴⁵ **Stites DP, Stobo JD, Fudenberg HH, Wells JV.** 1985. *Inmunología Básica y Clínica*. 5^{ta} Edición. Edición Revolucionaria. La Habana. Cuba: 192.

⁴⁶ **Ogra PL, Mestecky J, Lamm ME.** 1994. *Handbook of mucosal immunology*. Academic press. Inc 1: 151-158.

⁴⁷ **Abbas A, Lichtman A, Pober J.** 1994. *Cellular and molecular immunology*. 2da edic. WB Saunders Company. Philadelphia, Pennsylvania: 232-234.

-
- ⁴⁸ **Finlay B, Sieber A.** 1995. Mechanism of mucosal colonization and penetration by bacterial pathogens virulence mechanisms of bacterial pathogens. 2da ed. Ed. JA Roth: 33-43.
- ⁴⁹ **Vaerman JP.** 1984. Effector mechanisms of IgA. *Ann. Biol. Clin. (Paris)*, 42: 61-70.
- ⁵⁰ **Lamm ME.** 1998. Current concepts in mucosal immunity. IV. How epithelial transport of IgA antibodies relates to host defense? *Am. J. Physiol*, 274: G614-7.
- ⁵¹ **Mazanec MB, Nedrud JG, Kaetzel CS, Lamm ME.** 1993. A three-tiered view of the role of IgA in mucosal defense. *Immunol. Today*, 14: 430-434.
- ⁵² **Brandtzaeg P.** 1992. Humoral immune response patterns of human mucosal: induction and relation to bacterial respiratory tract infection. Session V: Biology and pathogenesis of mucous membrane infectious. *J. Infect. Dis*, 165 (Suppl 1): S167-76.
- ⁵³ **Wlodzimierz P, Wulf-rudiger H, Askenasa P.** 1991. Delayed Type Hipersensitivity initiation by early-acting cells that are antigens mismatched or MHC incompatible with late-acting, delayed type hypersensitivity effectors T cells. *J. Immunol*, 146: 469-475.
- ⁵⁴ **Smith D, De Shazo RD.** 1992. Delayed Hipersensitivity Skin Testing Val of Clinical Laboratory Immunology. 4th Ed. Rose NR. American Society for Microbiology: 202.
- ⁵⁵ **Peralta EL, Frias MT.** 1987. Manual sobre la técnica inmunoenzimática ELISA. ENPES: 3-53.
- ⁵⁶ **Czerkinsky C, Svennerholm AM, Quiding M, Jonsson R, Holmgren J.** 1991. Antibody-producing cells in peripheral blood and salivary glands after oral cholera vaccination of humans. *Infect. Immun*, 59: 996-1001.

⁵⁷ **Infante JF.** 2000. Estudio de inocuidad e inmunogenicidad protectogénica de la vacuna VA-MENGOC BC[®] en modelos murinos. Tesis presentada en opción al grado de Doctor en Ciencias Veterinarias.

⁵⁸ **Perry LL, Hughes S.** 1999. Chlamydial colonization of multiple mucosal following infection by any mucosal route. *Infect. Immun*, 67: 3686-3689.

⁵⁹ **Bakke H, Lie K, Haugen IL, Korsvold GE, Hoiby EA, y col.** 2001. Meningococcal outer membrane vesicle vaccine given intranasally can induce immunological memory and booster responses without evidence of tolerance. *Infect. Immun*, 69: 5010-5.

⁶⁰ **Brandtzaeg P.** 1995. The role of humoral mucosal immunity in the induction and maintenance of chronic airway infections. *Am J Respir Crit Care Med* , 151:2081-7.

⁶¹ **Parr MB, Parr EL.** 1996. Immunoglobulins in the female genital tract. Part II. Cap 10: 275-308.

⁶² **Parr MB, Parr EL.** 1999. Female genital tract immunity in animal models. *Mucosal Immunology*, Cap 88: 1395-1409.

⁶³ **Ahmed R, Gray D.** 1996. Immunological memory and protective immunity: Understanding their relation. In: *Elements of immunity*. Science, 272: 54-60.

⁶⁴ **Cabezas S.** 2001: Determinación del esquema óptimo de inmunización con VA-MENGOC-BC[®] en ratones. Tesis de Diploma.

⁶⁵ **Mostov KE.** 1994. Transepithelial transport of immunoglobulins. *Ann. Rev. Immunol*, 12: 63-84.

⁶⁶ **Kutteh W, Hatch K, Blackwell R.** 1988. Secretory immune system of the female reproductive tract: I. Immunoglobulin and secretory component-containing cells. *Obstetric. Gynecology*, 71: 56-61.

⁶⁷ **Kutteh WH, Blackwell RE, Gore H.** 1990. Secretory immune system of the female reproductive tract. II. Local immune system in normal and infected fallopian tube. *Fertil. Steril*, 54: 51-55.

⁶⁸ **De Haan A, Renegar KB, Small PA, Wilschut Jr and J.** 1995. Induction of secretory IgA response in the murine female urogenital tract by immunization of the lungs with liposome-supplemented viral subunit antigen. *Vaccine*, 13: 613-616.

⁶⁹ **Griffis JM,** 1984. Immune response of infants and childrens to disseminated infection with *Neisseria meningitidis*. *J. Infect. Dis.* 150: 71.

⁷⁰ **Leinonen M,** 1982. Antibody response against pneumococcal polysaccharide antigens in vaccinated persons. *Ann. Clin. Res.* 40: 39.

⁷¹ **Saunders N,** 1999. Immunogenicity of intranasally administered meningococcal native outer membrane vesicles in mice. *Infect. Immun* 67: 113-119.

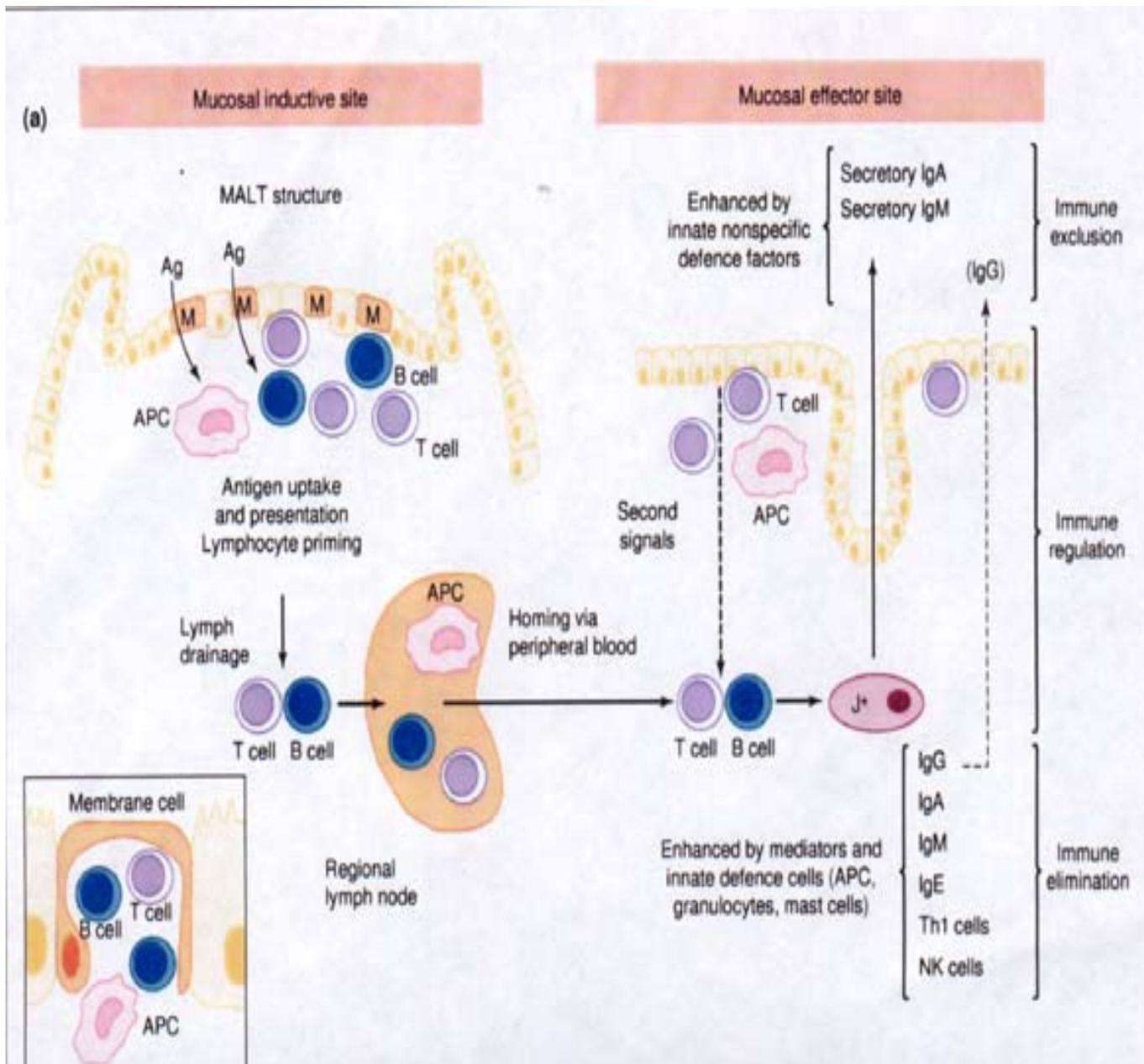


Figura 1: Representación esquemática de los tres componentes principales de la defensa inmune mucosal: exclusión inmune, regulación inmune y eliminación inmune. La estimulación del antígeno en el Tejido Linfoide Asociado a Mucosa (MALT) proporciona la primera señal a las células B, las cuales migran (“home”) a los sitios mucosales secretores por medio de las vías linfática o sanguínea periférica. La segunda señal (en líneas discontinuas) induce la proliferación local y la diferenciación terminal de las células B extravasadas. La mayoría de las células plasmáticas generadas de esta forma producen IgA dimérica conteniendo la cadena J, la cual es translocada al lumen como IgA secretora. Además, alguna IgM pentamérica es activamente transportada a través de las células epiteliales secretoras, mientras que cantidades pequeñas de IgG pasan al lumen por difusión pasiva (línea discontinua clara)²⁶.

ANEXOS

Tabla 1. Características únicas de las células inmunes en los tejidos inductivos y efectores de IgA.

Tejido	Subset celular	Características
Placas de Peyer	Células T CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁻	Apoya preferentemente respuesta IgA. Igual frecuencia de células tipo Th1/Th2. Aproximadamente 65% de células CD3 ⁺
	Células T CD3 ⁺ CD4 ⁻ CD8 ⁺	Precursores celulares para linfocitos T citotóxicos. Inhiben la respuesta del sistema inmune. Aproximadamente 25% células T CD3 ⁺
	Células T CD3 ⁺ CD4 ⁻ CD8 ⁻	Conversión de la tolerancia oral. Células relacionadas con γ/δ TCR. Aproximadamente 5% de células T CD3 ⁺
	Células B sIgA ⁺	Alta frecuencia de células productoras de IgA (5-10% de células B). Presencia de células de memoria y células vírgenes (centro germinal)
	Células accesorias (macrófagos y células dendríticas).	Células presentadoras de antígenos efectivas. La combinación célula dendrítica-célula B apoya la síntesis de IgA. Menos del 5% de las células de las PP
Lámina propia Intestino	Células T CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁻	Apoya respuesta IgA. Alta frecuencia de células tipo Th2. Aproximadamente 50%. Células T CD3 ⁺
	Células T CD3 ⁺ CD4 ⁻ CD8 ⁺	¿Disminuye la regulación de síntesis de IgA? Efecto CTLs. Aproximadamente 30% células T CD3 ⁺
	Células T CD3 ⁺ CD4 ⁻ CD8 ⁻	Desconocido (¿Protección de células Th?). Aproximadamente 10% células T CD3 ⁺
	Células plasmáticas IgA ⁺	Aproximadamente 90% de células plasmáticas son células productoras de IgA.
	Células accesorias	Los macrófagos comprenden la mayor población de células presentadoras de antígenos en este sitio.

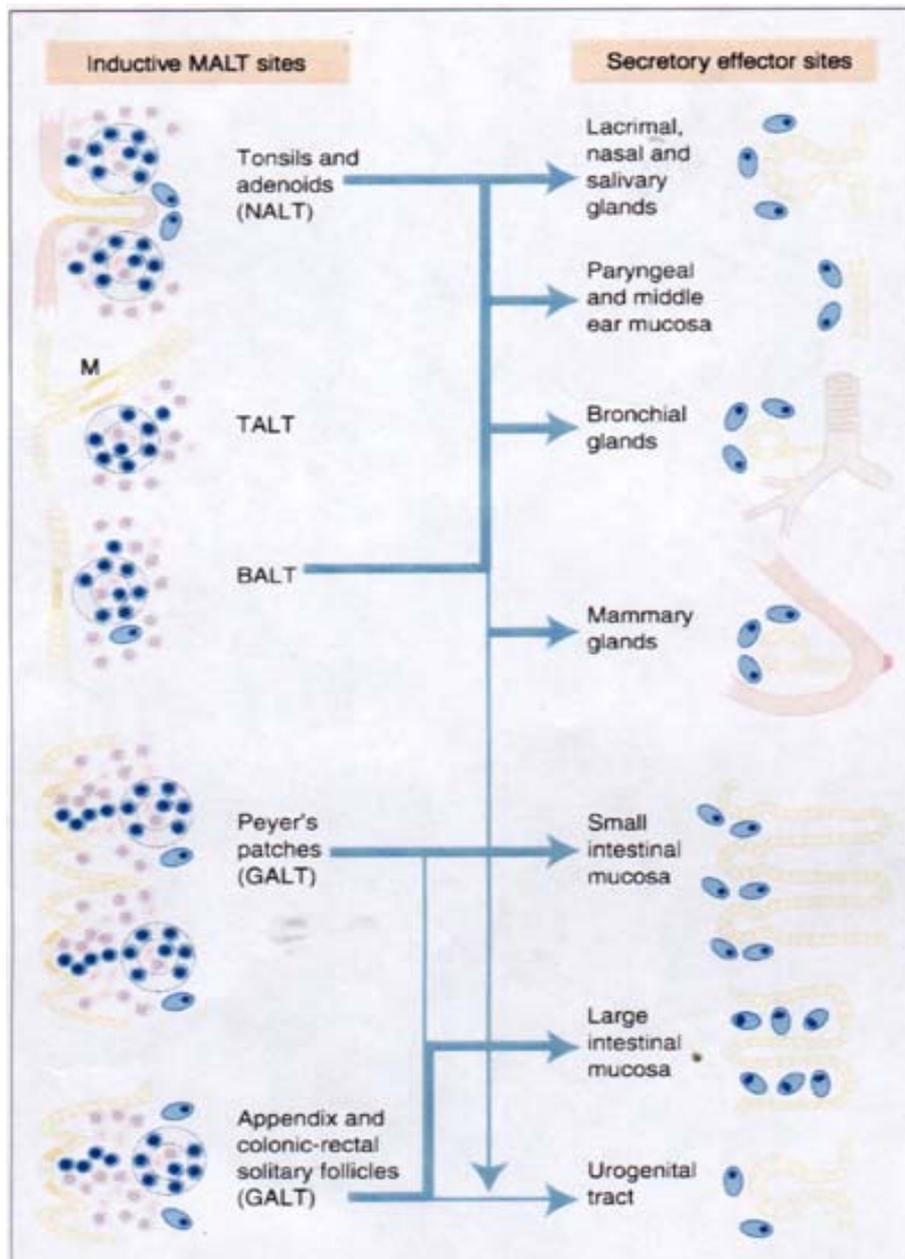


Figura 2: Modelo para la migración de células linfoides (primed) del Tejido Linfoide Asociado a Mucosa (MALT) con sus folículos linfoides activados a sitios efectores en el sistema inmune mucosal humano integrado. El epitelio asociado a folículo especializado contiene células M delgadas que transportan antígenos. En el modelo se indica la regionalización (putativa) en la comunicación entre los sitios inductores y efectores, las flechas más gruesas indican las vías preferenciales de migración de las células B. Código de colores: verde azul- Células B y células plasmáticas productoras de IgA, púrpura- Células T, rosado- Células presentadoras de antígeno. TALT- Tejido linfoide Asociado a la Trompa de Eustaquio³².

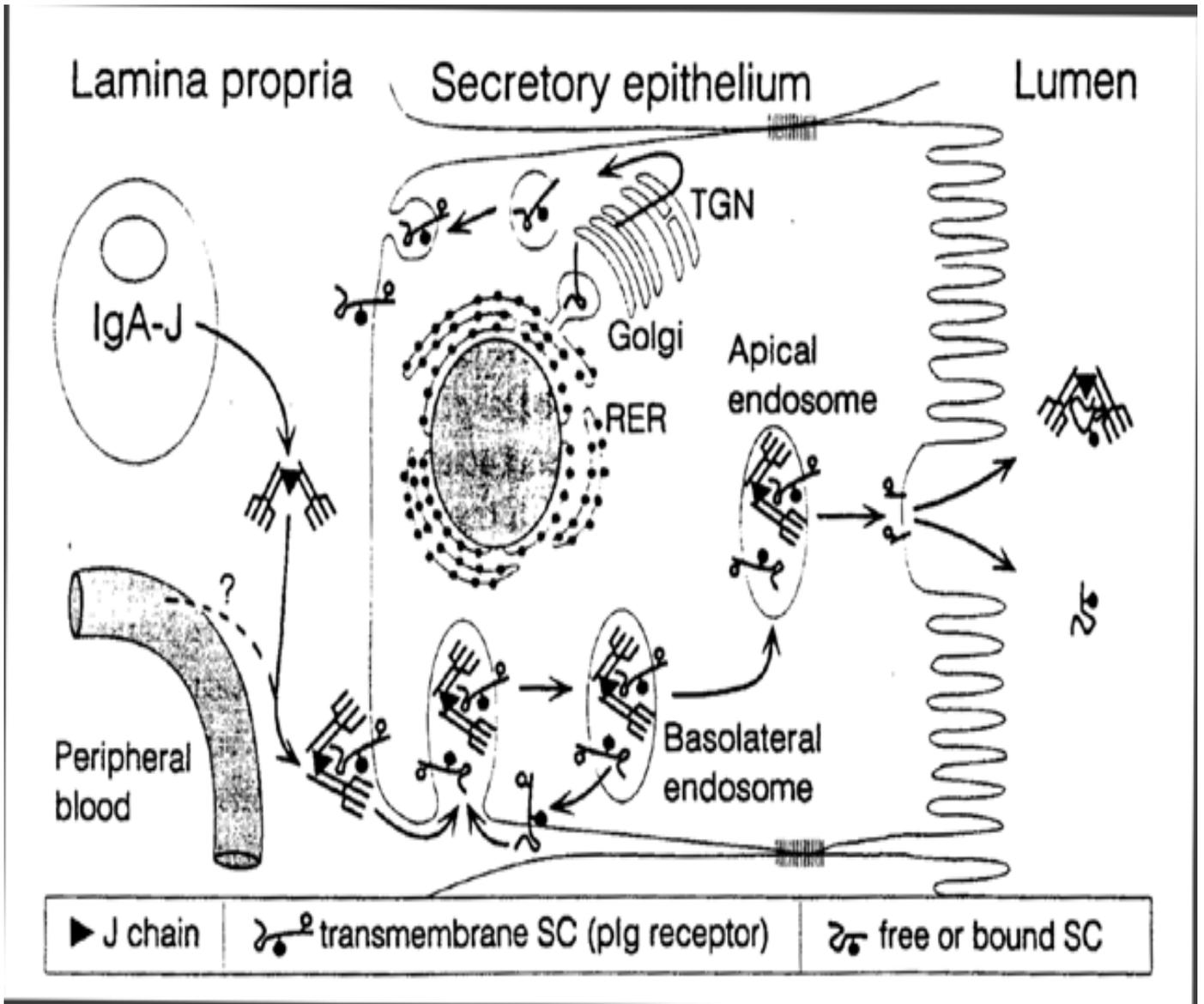


Figura 3: Modelo para el transporte epitelial mediado por receptor pIg de la IgA conteniendo la cadena J (IgA-J) desarrollado en las siguientes etapas: 1. Síntesis y transporte del componente secretor (CS) transmembrana en el retículo endoplasmático rugoso (RER) de las células epiteliales; 2. Glicosilación terminal (•) en el Complejo de Golgi y transporte desde este; 3. Expresión del receptor en la superficie basolateral de la célula; 4. Unión del receptor con la IgA dimérica; 5. Endocitosis del complejo receptor-ligando y el receptor escudado que no ha sido ocupado; 6. Transcitosis del endosoma basolateral al apical y 7. Clivaje del receptor y liberación de la IgA secretora y el CS libre al lumen³⁹.

Tabla 2: Protocolo desarrollado para inocular los constituyentes de VA-MENGOC-BC[®] por vía nasal.

Grupo	Antígeno	N	Ruta	Dosis (µg) (1 ^{ra} /2 ^{da} /3 ^{ra})	Volumen (µL)	Esquema (días)	Muestreo (suero)	Muestreo (sec. Mucosales)
1	Va	7	IN/IN	1,6/1,6	16/16	0,15	0,35	0,35
2	VME	7	IN/IN	25/25	10/10	0,15	0,35	0,35
3	PoliC	7	IN/IN	25/25	10/10	0,15	0,35	0,35
4	VME	7	IN/IN/IN	6/6/6	10/10/10	0,15,35	0,50	0,42
5	PoliC	7	IN/IN/IN	6/6/6	10/10/10	0,15,35	0,50	0,42
6	Va	7	IM/IM/IM	25/25/25	250/250/250	0,15,35	0,56	0,56
7	SSTF	7	IN/IN	-	10/10	0,15	0,35	0,35

Tabla 3: Protocolo desarrollado para evaluar la influencia de las VME, PoliC y VA-MENGOC-BC[®] administradas por vía nasal en animales previamente inmunizados con vacuna.

Grupo	Antígeno	N	Ruta	Dosis (µg) (1 ^{ra} /2 ^{da} /3 ^{ra})	Vol (µL)	Esquema (días)	Muestreo (suero)	Muestreo (sec. Mucosales)
1	Va	7	IM/IM/IN	25/25/1,6	250/250/16	0,15,35	0,56	0,56
2	Va	7	IM/IM/IN	12,5/12,5/6	125/125/60	0,15,35	0,50	0,42
3	Va/Va/VME	7	IM/IM/IN	12,5/12,5/6	125/125/60	0,15,35	0,50	0,42
4	Va/Va/PoliC	7	IM/IM/IN	12,5/12,5/6	125/125/60	0,15,35	0,50	0,42
5	Va/VME/VME	7	IM/IN/IN	12,5/6/6	125/10/10	0,15,35	0,50	0,42
6	Va/PoliC/PoliC	7	IM/IN/IN	12,5/6/6	125/10/10	0,15,35	0,50	0,42
7	Va/Va	7	IM/IN	25/1,6	250/16	0,15	0,35	0,35
8	alúmina	7	IM/IN	1000/64	250/16	0,15	0,35	0,35
9	SSTF	7	IM/IM/IN	-	100/100/10	0,15,35	0,50	0,42

Tabla 4: Protocolo de inmunización de VME y PoliC en animales previamente inmunizados con estos mismos componentes.

Grupo	Antígeno	N	Ruta	Dosis (µg) (1 ^{ra} /2 ^{da} /3 ^{ra})	Vol (µL)	Esquema (días)	Muestreo (suero)	Muestreo (sec. Mucosales)
1	VME/VME/VME	7	IM/IM/IN	25/25/25	100/100/10	0,15,35	0,56	0,56
2	PoliC/PoliC/PoliC	7	IM/IM/IN	25/25/25	100/100/10	0,15,35	0,56	0,56
3	VME/VME	7	IM/IN	25/25	100/10	0,15	0,35	0,35
4	PoliC/PoliC	7	IM/IN	25/25	100/10	0,15	0,35	0,35
5	SSTF	7	IM/IM/IN	-	100/100/10	0,15,35	0,50	0,42

Leyenda: Va, VA-MENGOC-BC[®]; VME, Vesículas de Membrana Externa; Poli C, Polisacárido del serogrupo C; IN, Inoculación por vía intranasal; IM, Inoculación por vía intramuscular; SSTF, Solución salina tamponada con fosfato.

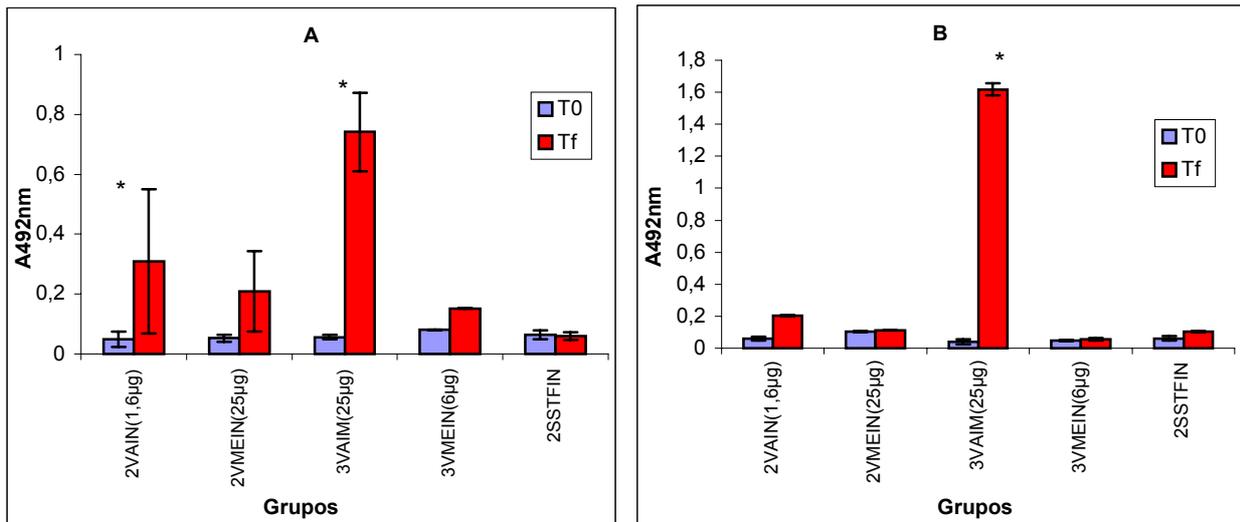


Figura 4: Inducción de IgG antiVME en suero (A) y lavado vaginal (B) de animales inmunizados con los constituyentes de VA-MENGOC-BC[®] por vía nasal. Las barras representan las medias \pm la desviación estándar de las muestras. Los asteriscos representan las diferencias significativas ($p < 0,05$). Leyenda: VA, vacuna; VME, vesículas de membrana externa; SSTF, solución salina tamponada con fosfato; A, absorbancia; T0, tiempo inicial; Tf, tiempo final; IM, inoculación intramuscular; IN, inoculación intranasal.

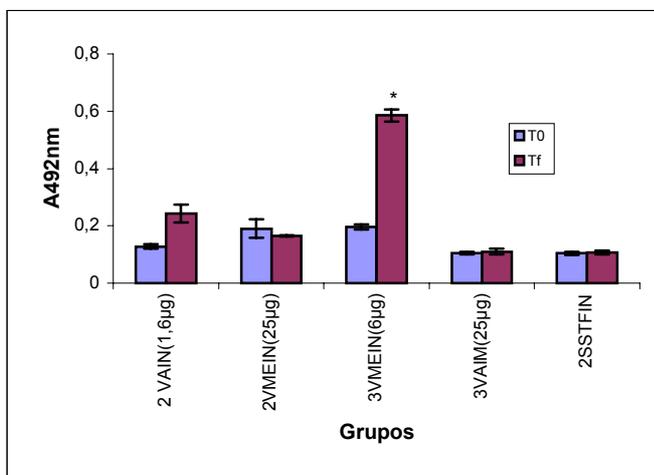


Figura 5: Inducción de IgA antiVME en suero (A) y saliva (B) de animales inmunizados con los constituyentes de VA-MENGOC-BC[®] por vía nasal. Las barras representan las medias \pm la desviación estándar de las muestras. Los asteriscos representan las diferencias significativas ($p < 0,05$). Leyenda: VA, vacuna; VME, vesículas de membrana externa; SSTF, solución salina tamponada con fosfato; A, absorbancia; T0, tiempo inicial; Tf, tiempo final; IM, inoculación intramuscular; IN, inoculación intranasal; PoliC, polisacárido C.

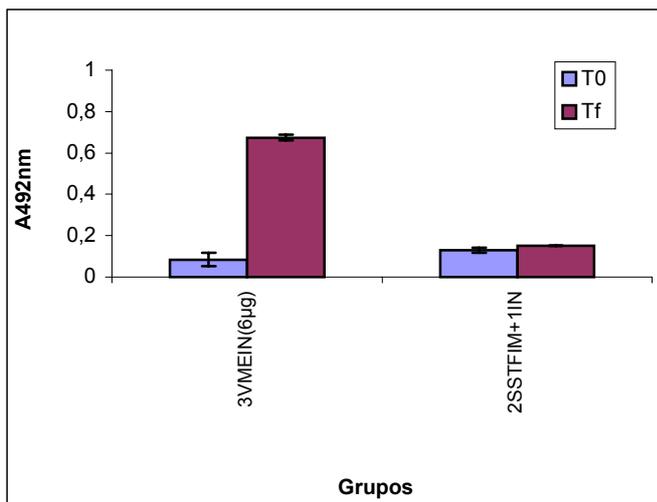


Figura 6: Inducción de IgA antiVME en lavado vaginal de animales inmunizados con los constituyentes de VA-MENGOC-BC® por vía nasal. Las barras representan las medias \pm la desviación estándar de las muestras. Los asteriscos representan las diferencias significativas ($p<0,05$). Leyenda: VA, vacuna; VME, vesículas de membrana externa; SSTF, solución salina tamponada con fosfato; A, absorbancia; T0, tiempo inicial; Tf, tiempo final; IM, inoculación intramuscular; IN, inoculación intranasal.

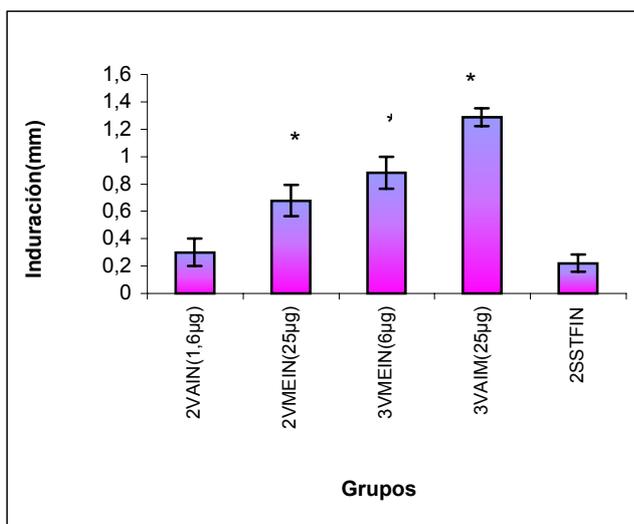


Figura 7: Respuesta de DTH antiVME de animales inmunizados con los constituyentes de VA-MENGOC-BC® por vía nasal. Las barras representan las medias \pm la desviación estándar de las muestras. Los asteriscos representan las diferencias significativas ($p<0,05$). Leyenda: VA, vacuna; VME, vesículas de membrana externa; SSTF, solución salina tamponada con fosfato; A, absorbancia; T0, tiempo inicial; Tf, tiempo final; IM, inoculación intramuscular; IN, inoculación intranasal.

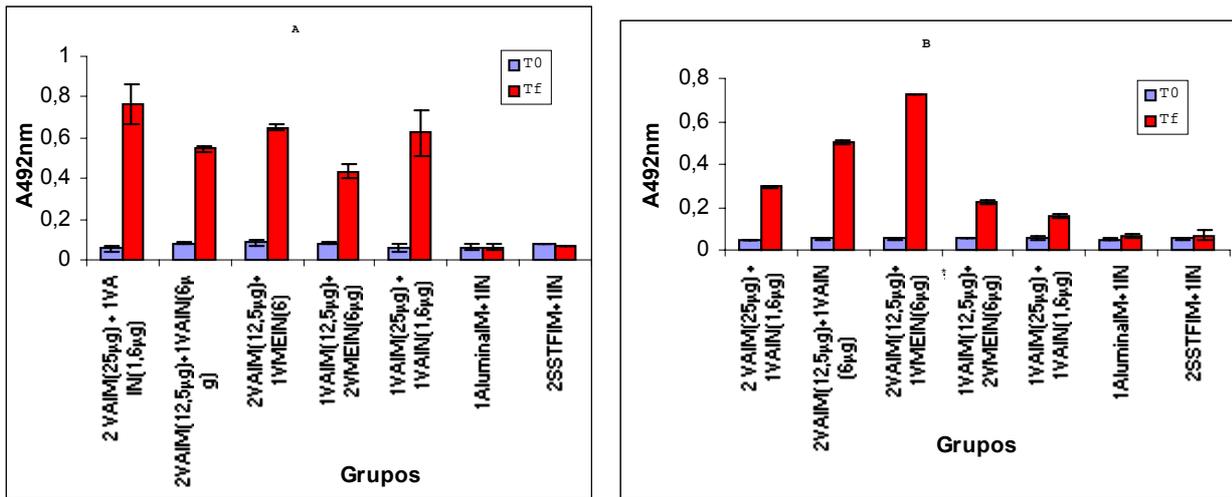


Figura 8: Respuesta de IgG antiVME en suero (A) y vagina (B) al inocular VA-MENGOC-BC[®], VME por la vía nasal en animales previamente inmunizados con VA-MENGOC-BC[®] parenteral. Las barras representan las medias \pm la desviación estándar de las muestras. Los asteriscos representan las diferencias significativas ($p < 0,05$). Leyenda: VA, vacuna; VME, vesículas de membrana externa; SSTF, solución salina tamponada con fosfato; A, absorbancia; T0, tiempo inicial; Tf, tiempo final; IM, inoculación intramuscular; IN, inoculación intranasal.

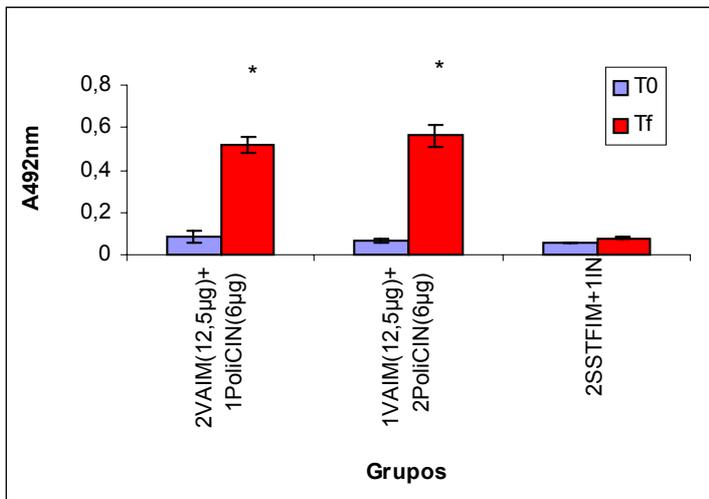


Figura 9: Respuesta de IgG antiPoliC en suero al inocular PoliC por vía nasal en animales previamente inmunizados con VA-MENGOC-BC[®]. Las barras representan las medias \pm la desviación estándar de las muestras. Los asteriscos representan las diferencias significativas ($p < 0,05$). Leyenda: VA, vacuna; VME, vesículas de membrana externa; SSTF, solución salina tamponada con fosfato; A, absorbancia; T0, tiempo inicial; Tf, tiempo final; IM, inoculación intramuscular; IN, inoculación intranasal.

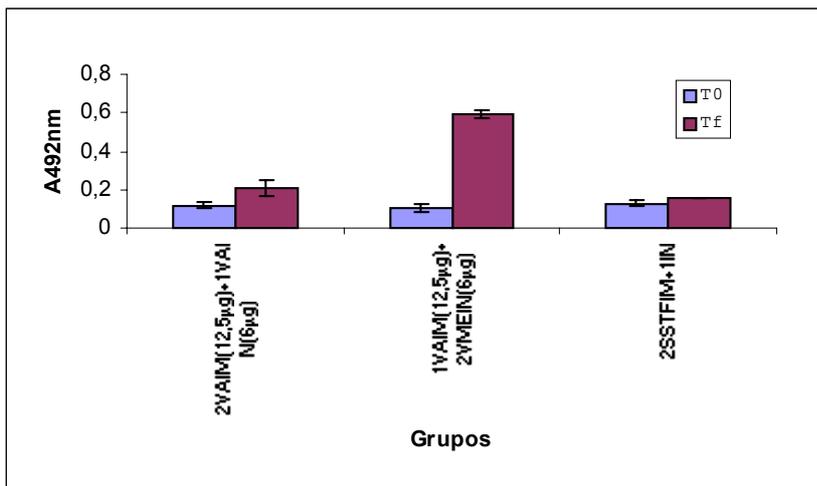


Figura 10: Respuesta de IgA antiVME en lavado vaginal al inocular VA-MENGOC-BC[®], VME Y Poli C por la vía nasal en animales previamente inmunizados con VA-MENGOC-BC[®] parenteral. Las barras representan las medias \pm la desviación estándar de las muestras. Los asteriscos representan las diferencias significativas ($p < 0,05$). Leyenda: VA, vacuna; VME, vesículas de membrana externa; SSTF, solución salina tamponada con fosfato; A, absorbancia; T0, tiempo inicial; Tf, tiempo final; IM, inoculación intramuscular; IN, inoculación intranasal.

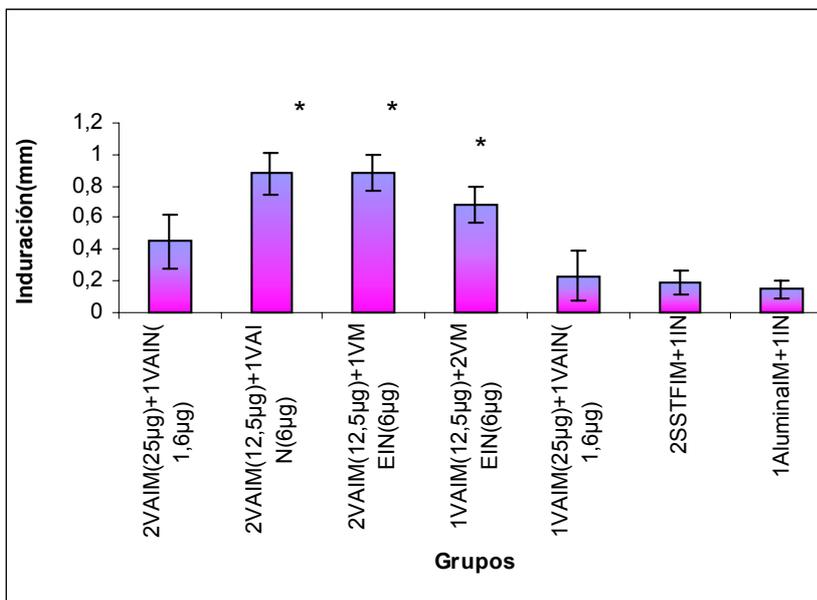


Figura 15: Respuesta de DTH antiVME al inocular VA-MENGOC-BC[®], VME Y Poli C por la vía nasal en animales previamente inmunizados con VA-MENGOC-BC[®] parenteral. Las barras representan las medias \pm la desviación estándar de las muestras. Los asteriscos representan las diferencias significativas ($p < 0,05$). Leyenda: VA, vacuna; VME, vesículas de membrana externa; SSTF, solución salina tamponada con fosfato; A, absorbancia; T0, tiempo inicial; Tf, tiempo final; IM, inoculación intramuscular; IN, inoculación intranasal.

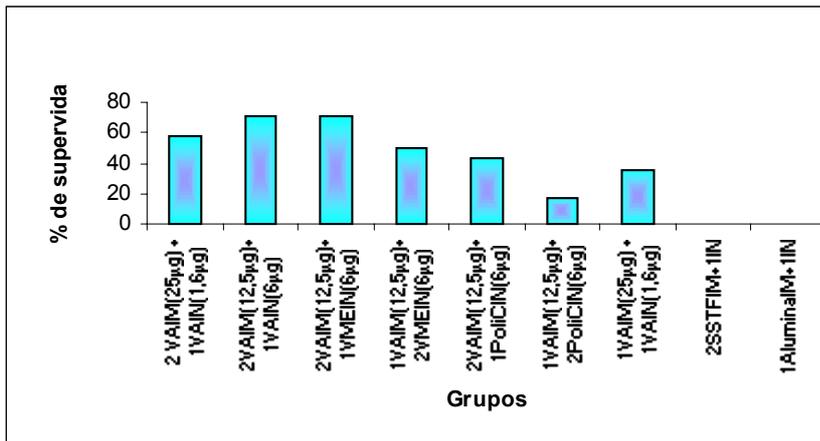


Figura 12: Respuesta ante el reto con *N. meningitidis* B al inocular VA-MENGOC-BC[®], VME Y Poli C por la vía nasal en animales previamente inmunizados con VA-MENGOC-BC[®] parenteral. Leyenda: VA, vacuna; VME, vesículas de membrana externa; SSTF, solución salina tamponada con fosfato; A, absorbancia; T0, tiempo inicial; Tf, tiempo final; IM, inoculación intramuscular; IN, inoculación intranasal.

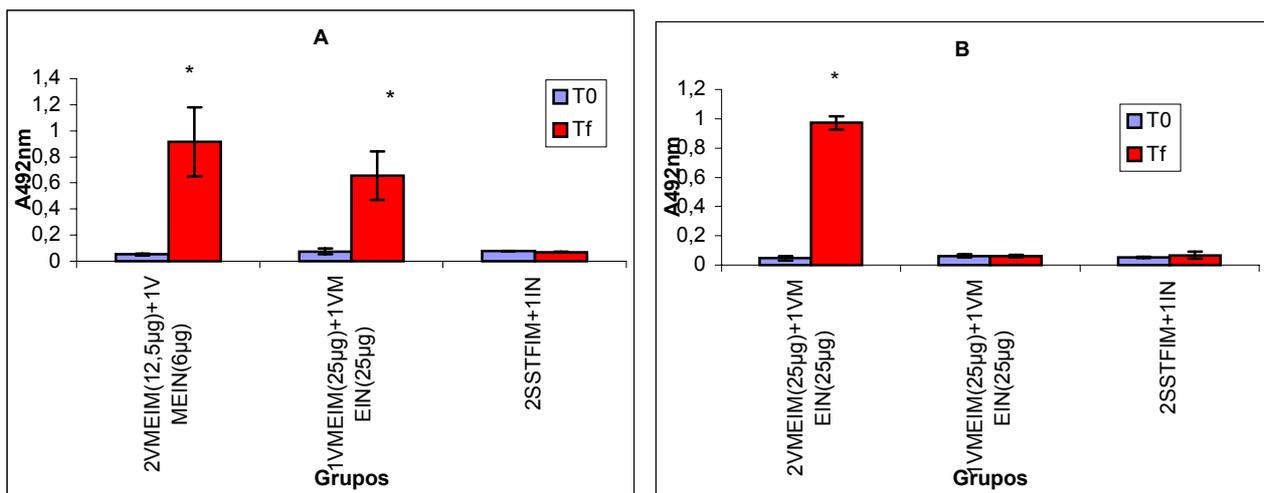


Figura 13: Inducción de IgG en suero (A) y lavado vaginal (B) al inocular VME por vía nasal en animales previamente inmunizados parenteralmente con ella misma. Las barra representan las medias \pm la desviación estándar de las muestras. Los asteriscos representan las diferencias significativas ($p < 0,05$). Leyenda: VA, vacuna; VME, vesículas de membrana externa; SSTF, solución salina tamponada con fosfato; A, absorbancia; T0, tiempo inicial; Tf, tiempo final; IM, inoculación intramuscular; IN, inoculación intranasal.

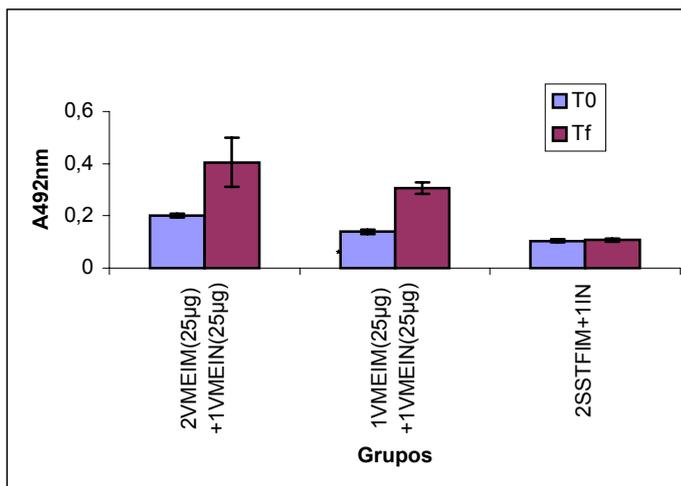


Figura 14: Respuesta de IgA antiVME en saliva al inocular VME por vía nasal en animales previamente inmunizados parenteralmente con ella misma. Las barras representan las medias \pm la desviación estándar de las muestras. Los asteriscos representan las diferencias significativas ($p < 0,05$). Leyenda: VME, vesículas de membrana externa; SSTF, solución salina tamponada con fosfato; A, absorbancia; T0, tiempo inicial; Tf, tiempo final; IM, inoculación intramuscular; IN, inoculación intranasal.

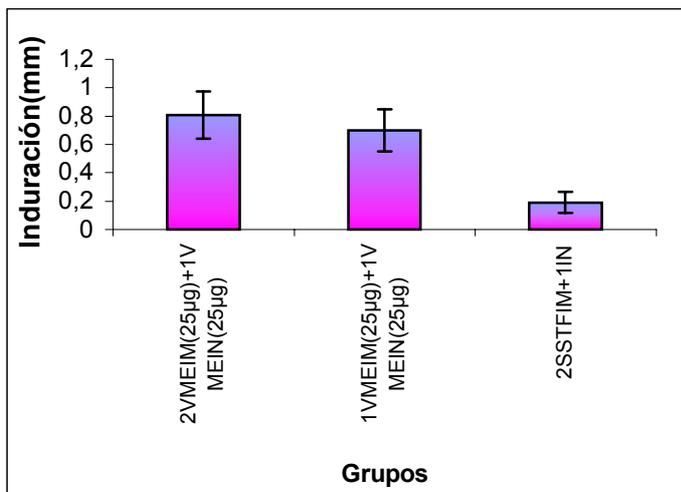


Figura 15: Respuesta de DTH antiVME al inocular VME por vía nasal en animales previamente inmunizados parenteralmente con ella misma. Las barras representan las medias \pm la desviación estándar de las muestras. Los asteriscos representan las diferencias significativas ($p < 0,05$). Leyenda: VME, vesículas de membrana externa; SSTF, solución salina tamponada con fosfato; A, absorbancia; T0, tiempo inicial; Tf, tiempo final; IM, inoculación intramuscular; IN, inoculación intranasal.