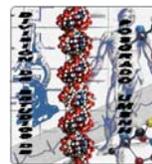




UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO  
FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS Y BIOLÓGICAS  
"DR. IGNACIO CHÁVEZ"



DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**“EFECTO BACTERICIDAD DE *Cry IAc*, SOBRE  
*Escherichia coli*, PROVENIENTE DE PACIENTES CON  
INFECCIONES DEL TRACTO URINARIO”**

**TESIS**

Que Para Obtener el Grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS EN FARMACOLOGÍA BÁSICA**

PRESENTA EL:

**QFB NICOLÁS MEDINA SERRITEÑO**

DIRECTOR O TUTOR DE TESIS

**D EN C. ALAIN R. RODRÍGUEZ OROZCO**

MORELIA, MICHOACAN MÉXICO  
2006

INDICE	Pág.
Índice de Figuras	4
Índice de Tablas	6
Índice de Gráficas	6
Lista de Abreviaturas	7
Resumen	8
Summary	9
<b>Introducción</b>	<b>10</b>
Sistema Inmunitario	10
- <i>Componentes del sistema inmunitario</i>	<i>10</i>
- <i>Sistema linfático</i>	<i>11</i>
- <i>Los glóbulos blancos</i>	<i>12</i>
- <i>Anticuerpos</i>	<i>13</i>
Sistema del complemento	15
Citoquinas	15
Complejo mayor de histocompatibilidad	15
Inmunidad Innata y Adquirida	16
- <i>Reconocimiento</i>	<i>18</i>
- <i>Movilización</i>	<i>18</i>
- <i>El ataque</i>	<i>19</i>
- <i>El reconocimiento de antígenos.</i>	<i>19</i>
Organismos extracelulares encapsulados	20
Organismos extracelulares no encapsulado	21
Organismos intracelulares	21
Mecanismo de Acción Fagocitaria	23
- Cambios metabólicos oxidativas relacionados con la función microbicidas	23
IL-2, INF-gamma y TNF- alfa.	30
Antecedentes Específicos	34
Inmunogenicidad en Mucosas. El uso de coadyuvantes.	34
- Inmunogenicidad en mucosas	35
- Coadyuvantes	36
Modelo de coadyuvante sistémico e inmunogeno en mucosas (Toxina del cólera)	38
<b>Antecedentes</b>	<b>39</b>
Infecciones del Tracto Urinario	39
- Concepto y clasificación	40
- Epidemiología y factores de riesgo	41
- Bacterias causales de infección urinaria	43
- Patogenia de las infecciones urinarias	44

---

Propiedades de <i>E. coli</i> como agente causal más importante de sépsis urinaria	45
- Factores de virulencia	46
- Factores de defensa del humano en el tracto urinario	48
Reacciones del sistema inmune en respuesta a la infección del tracto urinario	50
- Mecanismos de respuesta inflamatoria en las infecciones del tracto urinario	50
Resistencia a los antimicrobianos	52
Control de las infecciones del tracto urinario mediante el uso y diseño de vacunas	56
<b>Antecedente Específico.</b>	58
<i>Bacillus thuringiensis</i> (Bt) y Toxina Cry1Ac.	58
Modo de acción en los insectos diana	61
$\delta$ endotoxinas (proteínas Cry)	62
Dominios de la toxina actividad Cry	65
Secuencia estructural de la toxina Cry1Ac	67
Secuencia nucleotídica de Cry1Ac	69
Respuesta inmune a Cry1Ac; Su papel como adyuvante.	70
<b>Planteamiento del Problema.</b>	73
<b>Justificación</b>	74
<b>Hipótesis del Trabajo</b>	75
<b>Objetivo General y Específicos</b>	75
<b>Material y Reactivos</b>	76
<b>Metodología</b>	77
<b>Resultados</b>	82
<b>Discusión</b>	93
<b>Conclusiones</b>	99
<b>Referencias</b>	100

---

---



---

**Índice de Figuras**

Figura 1. El sistema linfático es una red de ganglios linfáticos	11
Figura 2. Algunos glóbulos blancos que combaten las infecciones	13
Figura 3. Estructura básica en Y de los anticuerpos.	14
Figura 4. Mecanismo fagocítico de los Linfocitos T	20
Figura 5. Mecanismo operante en la acidificación del fagosoma	23
Figura 6. Mecanismo Oxidativa Fagocítico	24
Figura 7. Fagocitosis: mecanismos y consecuencias	26
Figura 8. Mecanismo de la vacuola fagocítica en la destrucción de un microorganismo	27
Figura 9. Fagocitos quiescentes (en reposo); capacidad bactericida por su interacción con mieloperoxidasa y un haluro.	28
Figura 10. Respuesta inmunogénica en sitios distantes.	37
Figura. 11. Incidencia de ITU y prevalencia de la bacteriuria asintomática de acuerdo con edad y sexo.	43
Figura. 12. Imagen electrónica de la morfología de bacterias <i>Escherichia coli</i>	46
Figura. 13. Microscopía electrónica de células de <i>Escherichia coli</i> con tinción negativa mostrando flagelos y pilis.	48
Figura 14. Microfotográfica de un <i>Bacillus thuringiensis con espora y cristal</i> , microscopio Electrónico de transmisión.	60
Figura 15. Se pueden ver cristales y esporas de <i>Bacillus thuringiensis</i>	60
Figura. 16. Estructura tridimensional de proteínas insecticidas producidos por <i>Bacillus thuringiensis</i> .	61
Figura. 17. Inserción de toxinas Cry en la membrana	63
Figura. 18. delta-endotoxina de <i>Bacillus thuringiensis</i>	64
Figura. 19. Identidad filogenético de las toxinas Cry y Cyt (Bt)	65

---



---

---

---

Figura. 20. Transmisión electro microscópica del cuerpo de paraesporal <i>del Bacillus thuringiensis</i> y de la característica del cristal bipyramidal.	65
Figura 21. Unión del los dominios de la Toxina Cry1Ac en la membrana celular.	68
Figura 22. La estructura en horquilla del mRNA, forma típica de Cry1A(c) (A) y gen modificado de Cry1A (c') (B)	69
Figura. 23. Pruebas de susceptibilidad de la <i>Escherichia coli</i> .	86
Figura 24- En los gráficos A y B los resultados de los ensayos cinéticos con el control negativo y con el control positivo (Amikacina)	87
Figura 25 – Cinética de la fagocitosis de <i>Escherichia coli</i> en la dilución 1:2	87
Figura 26 – Cinética de la fagocitosis de <i>Escherichia coli</i> en la dilución 1:4	88
Figura 27 – Cinética de la fagocitosis de <i>Escherichia coli</i> en la dilución 1:8	89
Figura 28 – Cinética de la fagocitosis de <i>Escherichia coli</i> en la dilución 1:16	89
Figura 29 – Cinética de la fagocitosis de <i>Escherichia coli</i> en la dilución 1: P	90
Figura 30. Representa las concentraciones detectables del Factor de Necrosis Tumoral-alpha según el logaritmo de la densidad óptica	
Figura 31. Las barras representan las concentraciones de TNF- $\alpha$ en sobrenadantes	91
Figura 32. Representan las concentraciones detectables del Interferón Gamma, según el logaritmo de la densidad óptica	93
Figura 33 Las barras representan las concentraciones del IFN- $\gamma$ en sobrenadantes	93
Figura 34 Representan las concentraciones detectables de la Interlucina-2, según el logaritmo de la densidad óptica	95
Figura 35 Las barras representan las concentraciones de la IL-2.	95

---

---

---



---

## Índice de Tablas

Tabla 1. Categorías de ITU	41
Tabla 2. Porcentaje de Resistencia de las bacterias aisladas con mayor frecuencia, en pacientes externos y hospitalizados.	55
Tabla 3. Porcentaje de Sensibilidad por concentración inhibitoria mínima ( $\mu\text{g/ml}$ ) de microorganismos aislados de orina	56
Tabla 4. Clasificación de las $\delta$ - endotoxinas de <i>Bacillus thuringiensis</i> .	66
Tabla 5. Diluciones y controles para la activación de células MN <i>in Vitro</i> .	81
Tabla 6. Porcentaje de Inhibición del Crecimiento de <i>Escherichia coli</i> por la toxina Cry1Ac.	85
Tabla 7. Porcentaje de estimulación de la síntesis de TNF- $\alpha$ , por células mononucleadas en cultivo tratadas con Cry1Ac respecto a las células tratadas con Concanavalina.	92
Tabla 8. Porcentaje de estimulación de la síntesis de IFN- $\gamma$ , por células mononucleadas en cultivo tratadas con Cry1Ac respecto a las células tratadas con Concanavalina.	92
Tabla 9. Porcentaje de estimulación de la síntesis de IL-2, por células mononucleadas en cultivo tratadas con Cry1Ac respecto a las células tratadas con Concanavalina.	96

## Índice de Gráficas.

Grafica A

Grafica B

Grafica D.

<b>Lista de Abreviaturas</b>
------------------------------

<b>Amk</b>	Amikacina
<b>Bt</b>	<i>Bacillus thuringiensis</i>
<b>Cell B</b>	Células provenientes de la bolsa de Fabricio
<b>Cell T</b>	Células provenientes del Timo
<b>C-ter</b>	Carbonilo Terminal
<b><i>E. coli</i></b>	<i>Escherichia coli</i>
<b>Gr</b>	Gramo
<b>Pg</b>	Pico gramos
<b>KDa</b>	Kilodanton
<b>M</b>	Molar
<b>mL</b>	Mililitros
<b>MN</b>	Mononucleares
<b>MPO</b>	Mieloperoxidasa
<b>μG</b>	Microgramos
<b>NADP</b>	Adenosin di fosfato de Niacina
<b>NADPH</b>	Adenosin di fosfato de Niacina reducido
<b>N-ter</b>	Amino terminal
<b>NK</b>	Células Natural Killer (células asesinas)
<b>PBS</b>	Buffer de Fosfatos
<b>PHA</b>	Fitohemaglutinina
<b>PMN</b>	Células polimorfo nucleares
<b>RPMI</b>	Medio de cultivo Roswell Park Memorial Instituto
<b>SFBI</b>	Suero Fetal Bovino Inactivado
<b>SDO</b>	Superóxidodismutasa

**“EFECTO BACTERICIDAD DE *Cry IAc*, SOBRE *Escherichia coli*, PROVENIENTE DE PACIENTES CON INFECCIONES DEL TRACTO URINARIO”**

**QFB. Medina-Serriteño N<sup>1</sup> y D. en C. Rodríguez-Orozco AR<sup>2</sup>.**

**Resumen:**

Los problemas infecciosos son siempre un reto para el médico, tanto desde el punto de vista del diagnóstico fisiológico preciso como de la identificación de la etiología del agente infeccioso, que a veces es plural. La infección urinaria, una de las más frecuentes enfermedades infecciosas que sufre el hombre, se define como la colonización microbiana de cualquier punto del tracto urinario, desde el extremo distal de la uretra hasta la corteza renal. Los uropatógenos para crecer y establecerse deben sobrepasar las defensas del tracto urinario (sistema inmunológico). La invasión bacteriana de la mucosa induce el estímulo necesario para que las células epiteliales (uroteliales y del túbulo renal) y el sistema monocito-macrofágico produzcan las citocinas y otros mediadores de la inflamación. La magnitud y la localización de esta respuesta inflamatoria determinan algunos de los cuadros clínicos de la ITU. A lo anterior se suma el abordaje inmunoterapéutico de la toxina Cry1Ac que tiene como objetivo central el efecto inmunomodulador inhibitoria bacteriano, como medida no farmacológica.

**Método:** Comprende, por citar si no todo al menos lo más sobresaliente, 5 urocultivos (*Escherichia coli*) de pacientes con diagnósticos y sintomatología diferente, sobre su comportamiento bioquímica, metabólico, farmacocinética y bacteriológico comprendiendo la concentración inhibitoria mínima de la toxina Cry1Ac, que añade a la identificación las pruebas de sensibilidad y resistencia. Expresión y determinación fagocítica en una curva de muerte bacteriana, como de los índices de estimulación proliferativa de INF-gamma, IL-2 y TNF de los sobrenadantes de cultivo de células mononucleadas “in Vitro” estimuladas con la toxina Cry1Ac.

**Resultados:** La confiabilidad de los resultados exigió una metodología de investigación estricta que incluye datos demostrativos, bacteriológica y estadísticamente significativos. Los sobrenadantes de cultivo celular MN, estimuladas con Cry1Ac, mostraron actividad inhibitoria del crecimiento de *E. coli*, en todas las diluciones evaluadas. En los ensayos cinéticos de los índices de inhibición fagocítico, las mejores actividades fue las diluciones 1:2; con índices fagocítico de 68% y 96.23% a las 8 horas, con un valor de  $R^2 = 0.978$  y con una constante de índice de eliminación de  $k = 39.74 (x10^4)$  UFC/mLh- la dilución 1:4; con índices fagocítico de 73% y 88.53% a las 8 horas, y un valor de  $R^2 = 0.9872$  con una constante de índice de eliminación de  $k = 34.75 (x10^4)$  UFC/mLh-. En los índices de estimulación proliferativa de TNF- $\alpha$ , de 1:2 y 1:4 su valor estimado fue de 92% y 52%. Para IFN-  $\gamma$ , presentaron 135% y 70%, la 1: Pura presento 115%. Y de IL-2, presentaron una estimación del 100%, 158% y 140% en la dilución 1:8.

**Discusiones:** El efecto inhibitorio encontrado es restrictivo para las ITU, esto por la estimulación selectiva de factores presentes en el medio de cultivo, las cuales pueden variar en naturaleza y magnitud.

**Conclusiones.** Cry1Ac tiene un potente efecto de inhibición de crecimiento en *Escherichia coli* y este efecto está relacionado con el incremento en la actividad fagocítica que por ende tiene efecto en la activación de citoquinas proinflamatorias, por ejemplo INF-g, TNF-a y IL-2, importantes para explicar el efecto bactericida e inmunomodulador de Cry1Ac.

---

<sup>(1)</sup>Alumno de la Maestría de Farmacología básica. <sup>(2)</sup> Profesor Investigador (1) (2) Lab. Inmunología. División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez” UMSNH.

**“EFFECT BACTERICIDAD OF Cry 1Ac, *Escherichia coli* HAVE MORE THAN ENOUGH, COMING FROM PATIENT WITH INFECTIONS OF THE TRACT URINAL”**

QFB. Medina-Serriteño N<sup>1</sup> and D. en C. Rodríguez-Orozco AR<sup>2</sup>.

**Summary:**

The infectious problems are always a challenge for the doctor, so much from the point of view of the precise physiologic diagnosis as of the identification of the infectious agent's etiología that is sometimes plural. The infection urinary, one of the most frequent infectious illnesses that the man suffers, is defined as the microbial colonization of any point of the tract urinal, from the end distal of the urethra until the renal bark.

The uropatógenos to grow and to settle down should surpass the defenses of the tract urinal (immunologic system). The bacterial invasion of the mucous one induces the I stimulate necessary so that the cells epithelial (uroteliales and of the renal túbulo) and the system monocito-macrofágico produces the citocinas and other mediators of the inflammation. The magnitude and the localization of this inflammatory answer determine some of the clinical squares of the ITU. To the above-mentioned he/she sinks the boarding inmunoterapéutico of the toxin Cry1Ac that has as central objective the bacterial effect inhibitory inmunomodulador, as not measured pharmacological.

**Method:** He/she understands, to mention if not everything at least the most excellent thing, 5 urocultivos (*Escherichia coli*) of patient with diagnostic and different sintomatología, have more than enough its behavior biochemistry, metabolic, pharmacokinetic and bacteriological understanding the minimum inhibitory concentration of the toxin Cry1Ac that adds to the identification the tests of sensibility and resistance. Expression and determination fagocitos in a curve of bacterial death, as of the quantification of INF-gamma, IL-2 and TNF of the sobrenadantes of cultivation of cells mononucleadas "in Vitro" stimulated with the toxin Cry1Ac.

**Results:** The dependability of the results demanded a methodology of strict investigation that includes demonstrative, bacteriological and statistically significant data. The sobrenadantes of cellular cultivation MN, stimulated with Cry1Ac, showed activity inhibitor of the growth of *E. coli*, in all the evaluated dilutions. In the kinetic rehearsals of the indexes of inhibition fagocitos, the best activities were the dilutions 1:2; with index fagocitos of 68% and 96.23% at the 8 hours, with a value of  $R^2 = 0.978$  and with a constant of index of elimination of  $k = 39.74$  (x104) UFC/mLh - the dilution 1:4; with index fagocitos of 73% and 88.53% at the 8 hours, and a value of  $R^2 = 0.9872$  with a constant of index of elimination of  $k = 34.75$  (x104) UFC/mLh - . In the indexes of stimulation proliferativa of TNF -, of 1:2 and 1:4 their dear value was of 92% and 52%. For IFN -, they presented 135% and 70%, the 1: Pure I present 115%. AND of IL-2, they presented an estimate of 100%, 158% and 140% in the dilution 1:8.

**Discussions:** The opposing inhibitory effect is restrictive for the ITU, this for the selective stimulation of present factors in the means of cultivation, which can vary in nature and magnitude. **Conclusions.** Cry1Ac has a potent effect of inhibition of growth in *Escherichia coli* and this effect is for example related with the increment in the activity fagocítica that has effect in the activation of citoquinas proinflamatorias for ende, INF-g, TNF-to and IL-2, important to explain the effect germicide and inmunomodulador of Cry1Ac.

(1)Alumno de la Maestría de Farmacología básica. (2) Profesor Investigador. (1)(2) Lab. Inmunológica. División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez” UMSNH.

## INTRODUCCIÓN

Así como la mente permite que una persona desarrolle su propia forma de ser, el sistema inmunitario provee un concepto propio de biología. La función del sistema inmunitario es defender al cuerpo de los invasores. Los microbios (gérmenes o microorganismos), las células cancerosas y los tejidos u órganos trasplantados son interpretados por el sistema inmunitario como algo contra lo cual el cuerpo debe defenderse. A pesar de que el sistema inmunitario es complicado, su estrategia básica es simple: reconocer al enemigo, movilizar fuerzas y atacar. Comprender la anatomía y los componentes del sistema inmunitario permite ver cómo funciona esta estrategia.

### **Sistema Inmunitario**

El sistema inmunitario tiene su propio sistema de circulación (vasos linfáticos) que abarca todos los órganos del cuerpo excepto el cerebro. Este sistema linfático contiene un líquido claro y espeso (linfa) formado por grasa y glóbulos blancos. Además de los vasos linfáticos existen áreas especiales (ganglios linfáticos, amígdalas, médula ósea, bazo, hígado, pulmones e intestino) en las que es posible reclutar, movilizar y desplegar linfocitos hacia zonas específicas como parte de la respuesta inmune. Es posible ver funcionar este sistema en una herida o infección que produce la inflamación de un ganglio linfático en la zona dañada. Los ganglios se inflaman porque los vasos linfáticos drenan la infección transportándola hacia la zona más cercana en la que pueda organizarse una respuesta inmune.<sup>1-6</sup>

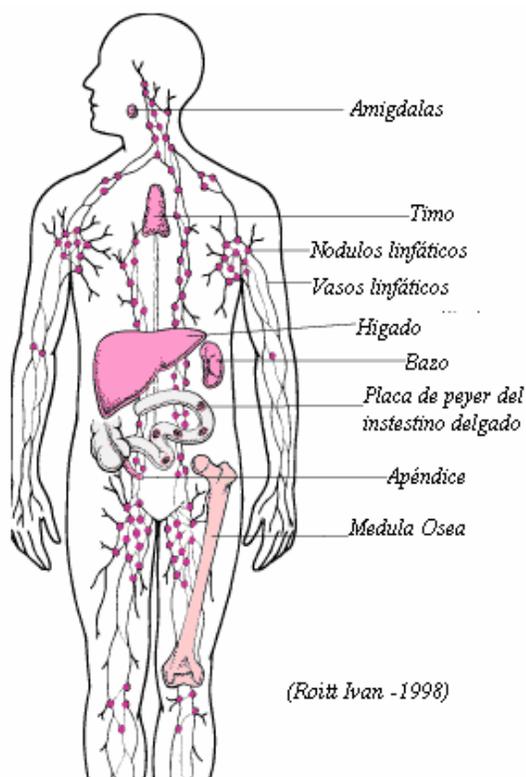
### **Componentes del sistema inmunitario**

El sistema inmunitario está compuesto por células y sustancias solubles. Las células más importantes del sistema inmunitario son los glóbulos blancos. Los macrófagos, neutrófilos y linfocitos son distintos tipos de glóbulos blancos. Entre las moléculas solubles que no forman parte de las células, pero que se disuelven en el plasma, las más importantes son los anticuerpos, las proteínas del sistema del complemento y las citoquinas. Algunas de ellas actúan como mensajeros para atraer y activar otras células. La respuesta del sistema inmune implica una compleja interrelación entre sus componentes.<sup>2, 7, 8</sup>

### Sistema linfático: defensa contra la infección

El sistema linfático es una red de ganglios linfáticos conectados con vasos linfáticos. Los ganglios linfáticos contienen una red de tejido en la cual los linfocitos están estrechamente unidos. Esta red de linfocitos filtra, ataca y destruye organismos perjudiciales que producen infecciones. Los ganglios linfáticos suelen agruparse en zonas en las que los vasos linfáticos se ramifican, como el cuello, las axilas y la ingle fig. 1. La linfa, un líquido rico en glóbulos blancos, fluye por los vasos linfáticos. La linfa contribuye a que el agua, las proteínas y otras sustancias de los tejidos corporales regresen al flujo sanguíneo. Todas las sustancias absorbidas por la linfa pasan por al menos un ganglio linfático y su correspondiente filtro formado por una red de linfocitos. Otros órganos y tejidos corporales (el timo, el hígado, el bazo, el apéndice, la médula ósea y pequeñas acumulaciones de tejido linfático como las amígdalas en la garganta y las placas de Peyer en el intestino delgado) también forman parte del sistema linfático. Estos tejidos también ayudan al cuerpo a combatir las infecciones.<sup>2,9</sup>

**Fig. 1** El sistema linfático es una red de ganglios linfáticos



## Los Glóbulos Blancos

Los macrófagos son grandes glóbulos blancos que ingieren microbios, antígenos y otras sustancias. Un antígeno es cualquier sustancia que puede estimular una respuesta inmune, como; bacterias, virus, proteínas, hidratos de carbono, células cancerosas y toxinas fig. 2 Los macrófagos no se encuentran en la sangre; en realidad se localizan en zonas estratégicas donde los órganos del cuerpo contactan con el flujo sanguíneo o el mundo exterior. Por ejemplo, los macrófagos se hallan donde los pulmones reciben el aire exterior y donde las células del hígado se conectan con los vasos sanguíneos. Las células similares de la sangre reciben el nombre de monocitos.<sup>4-6</sup>

Los neutrófilos, al igual que los macrófagos, los neutrófilos (suelen trabajar juntos) son grandes glóbulos blancos que tragan microbios y otros antígenos. Sin embargo, a diferencia de los macrófagos, los neutrófilos circulan en la sangre; necesitan un estímulo específico para abandonar ésta y entrar en los tejidos. Los macrófagos inician una respuesta inmune y envían señales para movilizar a los neutrófilos, con el fin de que se unan a ellos en el sector con problemas. Cuando llegan los neutrófilos, digieren a los invasores y así los destruyen. La acumulación de neutrófilos y la muerte y digestión de los microbios forma pus.<sup>4-6</sup>

Los linfocitos, principales células del sistema linfático, son relativamente pequeños comparados con los macrófagos y los neutrófilos. A diferencia de los neutrófilos, que no viven más de 7 a 10 días, los linfocitos pueden vivir durante años o décadas. La mayoría de los linfocitos se divide en tres categorías principales:

- Los linfocitos B derivan de una célula (célula madre o precursora) de la médula ósea y maduran hasta convertirse en células plasmáticas, que secretan anticuerpos.
- Los linfocitos T se forman cuando las células madres o precursoras migran de la médula ósea hacia el timo, una glándula donde se dividen y maduran. Los linfocitos T aprenden a diferenciar lo propio y lo extraño en el timo. Los linfocitos T maduros abandonan el timo y entran en el sistema linfático, donde funcionan como parte del sistema inmunitario de vigilancia.<sup>4-6, 10,11</sup>

Las células asesinas naturales, que son ligeramente más grandes que los linfocitos T y B, reciben ese nombre porque matan ciertos microbios y células cancerosas. El adjetivo “natural” indica que, en cuanto se forman, están preparadas para matar diversos tipos de células, en lugar de requerir la maduración y el proceso educativo que sí necesitan los linfocitos B y T. Las células asesinas naturales también producen algunas citoquinas, sustancias mensajeras que regulan funciones de los linfocitos T, los linfocitos B y los macrófagos.<sup>6</sup>

**Fig. 2** Algunos glóbulos blancos que combaten las infecciones



### Anticuerpos

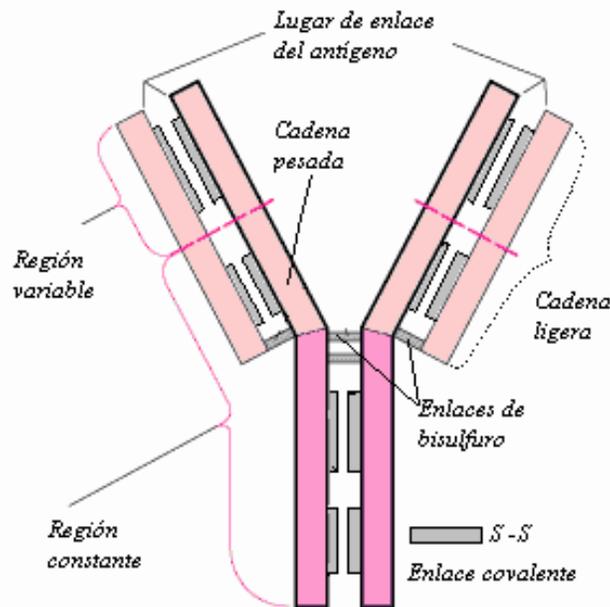
Cuando son estimulados por un antígeno, los linfocitos B maduran hasta convertirse en células que forman anticuerpos. Los anticuerpos son proteínas que interactúan con el antígeno que inicialmente estimula los linfocitos B. Los anticuerpos también reciben el nombre de inmunoglobulinas. Todas las moléculas de los anticuerpos tienen una estructura básica en forma de Y en la que varias piezas se unen mediante enlaces de bisulfuro.

Una molécula de anticuerpo se divide en regiones variables y constantes. La región variable determina a qué antígeno se unirá el anticuerpo. La región constante determina la clase de anticuerpo. Existen cinco clases de anticuerpos: IgM, IgG, IgA, IgE e IgD. Figura 3. La IgM, es el anticuerpo que se produce ante la primera exposición a un antígeno. Esta abunda en la sangre, y normalmente no está presente en los órganos o los tejidos.

La IgG, tipo de anticuerpo más frecuente, se produce tras varias exposiciones a un antígeno. La IgG se encuentra tanto en la sangre como en los tejidos. Es el único anticuerpo que se transmite de la madre al feto a través de la placenta. La IgA es el anticuerpo que desempeña un importante papel en la defensa del cuerpo cuando se produce una invasión de microorganismos a través de una membrana mucosa (superficies revestidas, como la nariz, los ojos, los pulmones y los intestinos).

Esta se localiza en la sangre y en algunas secreciones como las del tracto gastrointestinal y la nariz, los ojos, los pulmones y la leche materna. La IgE es el anticuerpo que produce reacciones alérgicas agudas (inmediatas), puede ser importante a la hora de combatir infecciones parasitarias, muy frecuentes en los países en vías de desarrollo y en el sistema inmune de las mucosas es importante para evitar la colonización por microorganismos patógenos. La IgD es un anticuerpo presente en muy pequeñas concentraciones en la sangre que circula por el cuerpo.<sup>5, 6,11</sup>

fig. 3 Estructura básica en Y de los anticuerpos.



### **Sistema del complemento**

Este sistema abarca más de 18 proteínas, que actúan en cadena, es decir, que una activa la siguiente. El sistema del complemento puede ser activado a través de dos vías, una de ellas, llamada vía alternativa, que es activada por ciertos productos microbianos o antígenos. La otra vía, llamada clásica, es activada por anticuerpos específicos unidos a sus antígenos (complejos inmunes). El sistema del complemento destruye sustancias extrañas, directamente o en conjunción con otros componentes del sistema inmunitario y constituye un elemento importante en la respuesta contra patógenos, muchos de los receptores fagocitos tienen receptores para el complemento que facilitan sus respuestas efectoras como muerte de microorganismos y modulación de la respuesta inflamatoria <sup>11</sup>

### **Citoquinas (Citocinas)**

Las citoquinas, secretadas por células del sistema inmunitario en respuesta a una estimulación, funcionan como los mensajeros del sistema inmunitario. Estas amplifican (o estimulan) algunos aspectos del sistema inmunitario e inhiben (o suprimen) otros.

Algunas citoquinas pueden ser inyectadas como parte del tratamiento para ciertas enfermedades. Por ejemplo, el interferón alfa es efectivo en el tratamiento de ciertos cánceres, como la leucemia de células peludas. El interferón beta, puede ayudar a tratar la esclerosis múltiple. La interleucina-2 (IL-2) puede ser útil en el tratamiento del melanoma maligno y el cáncer de riñón, a pesar de que su uso tiene efectos adversos. Existe otra, llamada factor estimulante de las colonias de granulocitos, que estimula la producción de neutrófilos, y puede ser utilizada en pacientes con cáncer que tienen poca cantidad de neutrófilos a causa de la quimioterapia. <sup>12</sup>

### **Complejo mayor de histocompatibilidad**

Todas las células tienen moléculas en su superficie que son únicas para cada persona determinada. Se las conoce con el nombre de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad. A través de ellas, el cuerpo es capaz de distinguir lo propio y lo extraño. Toda célula que muestre moléculas idénticas del complejo mayor de histocompatibilidad es ignorada; y toda célula que muestre moléculas no idénticas del complejo mayor de histocompatibilidad es rechazada <sup>13</sup>

Existen dos tipos o clase de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad y que de cada persona son únicas (también llamadas antígenos leucocitarios humanos o HLA): las de clase I están presentes en todas las células del cuerpo a excepción de los glóbulos rojos. Las de clase II están presentes sólo en las superficies de los macrófagos y en los linfocitos B y T que hayan sido estimulados por un antígeno.<sup>13,14</sup>

Las células del sistema inmunitario aprenden a diferenciar lo propio de lo extraño en el timo. Cuando el sistema inmunitario comienza a desarrollarse en el feto, las células madres o precursoras migran hacia el timo, donde se dividen hasta convertirse en linfocitos T. Mientras se desarrolla en la glándula del timo, cualquier linfocito T que reacciona ante las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad del timo es eliminado. A todo linfocito T que tolere el complejo mayor de histocompatibilidad del timo y aprenda a cooperar con las células que expresan las moléculas únicas del complejo mayor de histocompatibilidad del cuerpo se le permite madurar y abandonar el timo.

El resultado es que los linfocitos T maduros toleran las células y los órganos del cuerpo y pueden cooperar con las otras células del cuerpo cuando se las llama a defender a éste. Si los linfocitos T no tolerasen las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad del cuerpo, atacarían a constituyentes propios. Sin embargo, en ocasiones los linfocitos T pierden la capacidad de diferenciar lo propio de lo extraño y, en consecuencia, se desarrollan enfermedades autoinmunes como el lupus eritematoso sistémico (lupus) o la esclerosis múltiple.<sup>10, 13</sup>

### **Inmunidad Innata y Adquirida**

El sistema inmunitario ha conformado una compleja red de procedimientos que pueden dividirse en dos categorías: inmunidad innata (natural) y aprendida (adquirida). Todas las personas nacen con inmunidad innata. Los componentes del sistema inmunitario que participan de la inmunidad innata (macrófagos, neutrófilos y sistema del complemento) reaccionan de forma similar ante todas las sustancias extrañas, y el reconocimiento de los antígenos no varía de persona a persona.<sup>3,13</sup>

La inmunidad aprendida es adquirida (el organismo aprende a responder a cada nuevo antígeno con el que se enfrenta) en el momento de nacer, el sistema inmunitario de una persona aún no se ha enfrentado al mundo exterior ni ha comenzado a desarrollar sus archivos de memoria. En consecuencia, la inmunidad aprendida es específica de los antígenos que la persona encuentra a lo largo de su vida. El rasgo característico de la inmunidad específica es la capacidad de aprender, adaptarse y recordar.

El sistema inmunitario lleva un registro o memoria de cada antígeno que la persona encuentre, ya sea a través de los pulmones (al respirar), el intestino (al comer) o la piel. Ello es posible porque los linfocitos tienen una larga vida. Cuando los linfocitos encuentran un antígeno por segunda vez, su respuesta ante él es enérgica, rápida y específica. Esta respuesta inmune específica explica por qué no se contrae varicela o sarampión más de una vez a lo largo de la vida, así como el motivo por el que las vacunas previenen las enfermedades. Por ejemplo, para evitar la poliomielitis, una persona recibe una vacuna hecha de una forma debilitada del polio virus. Si posteriormente esa persona resulta expuesta al polio virus, su sistema inmunitario busca en sus archivos de memoria, encuentra los “datos” de este virus y rápidamente activa las defensas apropiadas. El resultado es que el polio virus es eliminado por anticuerpos específicos que neutralizan el virus antes de que tenga oportunidad de multiplicarse o de invadir el sistema nervioso.<sup>11, 14</sup>

La inmunidad innata y la inmunidad aprendida no son independientes una de otra. Cada sistema actúa en relación con el otro e influye sobre él, directa o indirectamente, a través de la inducción de citoquinas (mensajeros). Rara vez un estímulo desencadena una única respuesta. Lo que hace es iniciar varias, algunas de las cuales pueden actuar juntas u ocasionalmente competir entre sí.<sup>5, 6, 14</sup> De todos modos las respuestas dependen de tres principios básicos del reconocimiento, de la movilización y del ataque.

### ***Reconocimiento***

Antes de que el sistema inmunitario pueda responder ante un antígeno, debe ser capaz de reconocerlo. Los macrófagos son las mayores células procesadoras de antígenos, pero otras células, incluyendo los linfocitos B, también pueden hacerlo. Las células procesadoras de antígenos ingieren un antígeno y lo cortan en pequeños fragmentos. A continuación, estos fragmentos se colocan dentro de las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad y son disparados hacia la superficie de la membrana celular. El área del complejo mayor de histocompatibilidad que contiene los fragmentos de antígeno se adhiere a una molécula especial de la superficie del linfocito T llamada receptor de célula T. Este receptor está diseñado para encajarse (como una llave en una cerradura) en la parte del complejo mayor de histocompatibilidad que transporta el fragmento de antígeno. Los linfocitos T cuentan con dos grandes subgrupos que difieren en su capacidad de unirse (adherirse) a una de las dos clases de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad. El subgrupo de linfocitos T con una molécula CD8 en su superficie puede unirse a moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I. El subgrupo de linfocitos T con una molécula CD4 en su superficie puede unirse a moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II.<sup>10,14</sup>

### ***Movilización***

Una vez que una célula procesadora de antígenos y un linfocito T han reconocido un antígeno, una serie de hechos inicia la movilización del sistema inmunitario. Cuando una célula procesadora de antígenos ingiere un antígeno, libera citoquinas (por ejemplo, IL-1, IL-8 o IL-12) que actúan sobre otras células. La IL-1 moviliza otros linfocitos T; la IL-12 estimula las células asesinas naturales para que sean aún más potentes y secreten interferón; la IL-8 actúa como una especie de “faro” que guía a los neutrófilos hacia el sitio en el que fue encontrado el antígeno. Este proceso de atracción y reclutamiento de células recibe el nombre de quimiotaxis. Cuando los linfocitos T son estimulados a través de sus receptores de células T (cell T<sub>R</sub>), producen varias citoquinas que ayudan a reclutar otros linfocitos, lo cual amplifican la respuesta inmune. Las citoquinas también pueden activar los mecanismos de defensa inespecíficos y en consecuencia, actuar como un puente entre la inmunidad innata y la aprendida.<sup>10, 13 -15</sup>

### ***El Ataque***

Gran parte de la maquinaria del sistema inmunitario tiene la finalidad de matar o de eliminar los microbios invasores una vez que han sido reconocidos. Los macrófagos, los neutrófilos y las células asesinas naturales son capaces de eliminar muchos invasores. Si un invasor no puede ser eliminado por completo, se pueden aislar, uno de los mecanismos más importantes en la formación de granulomas. La tuberculosis es un ejemplo de una infección que no es completamente eliminada; las bacterias que causan tuberculosis quedan aprisionadas dentro de un granuloma <sup>14,15</sup>

La mayoría de las personas sanas expuestas a estas bacterias rechaza la infección causada por la tuberculosis, pero algunas bacterias sobreviven indefinidamente, generalmente en el pulmón, rodeadas de un granuloma. Si el sistema inmunitario se debilita (incluso 50 o 60 años más tarde), las paredes de la prisión se desmoronan y las bacterias que causan la tuberculosis comienzan a multiplicarse.<sup>15</sup>

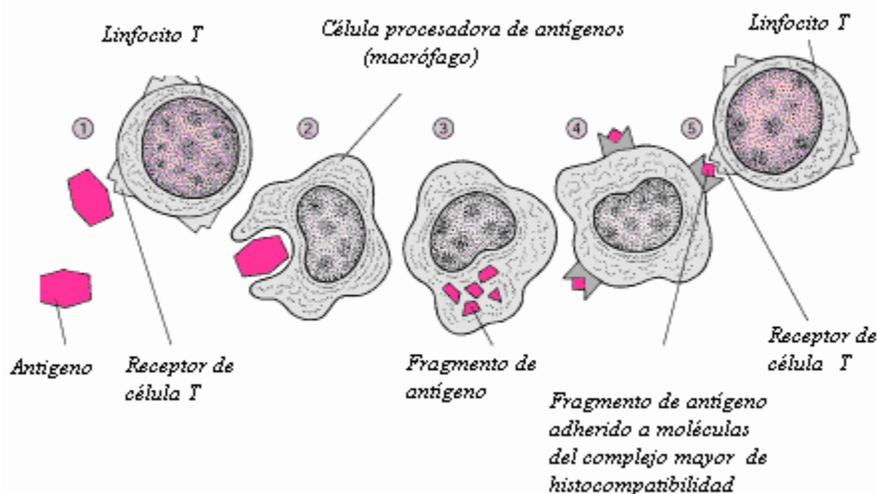
El cuerpo no combate a todos los invasores del mismo modo. Los que permanecen fuera de las células del cuerpo (organismos extracelulares) son relativamente fáciles de combatir; el sistema inmunitario moviliza defensas para facilitar su ingestión por los macrófagos y otras células. Cómo lleva a cabo el sistema inmunitario este procedimiento depende de si los invasores están encapsulados (tienen una gruesa cápsula a su alrededor) o no. Los invasores que llegan al interior de las células (organismos intracelulares), y siguen viables (vivos) y funcionales se combaten de forma completamente diferente.

### ***El Reconocimiento de Antígenos.***

Los linfocitos T forman parte del sistema inmunitario de vigilancia, que contribuyen a identificar antígenos que son sustancias extrañas al cuerpo. Sin embargo, para ser reconocidos por los linfocitos T, este debe ser procesado y “presentado” al linfocito de forma tal que éste pueda identificarlo. Fig. 4. Por ejemplo, un antígeno que circula por el cuerpo tiene una estructura que el linfocito T a primeras no puede reconocer, por lo que una célula procesadora (macrófago) rodea e ingiere al antígeno para sus péptidos antigénicos ser presentados al linfocito T.

Las enzimas de la célula procesadora, reducen dicho antígeno, rompiéndolo. A estos fragmentos se le unen moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad, ya fichados, son lanzados a la superficie de la membrana celular. Los cuales inmediatamente son reconocidos por los receptores de los linfocitos T, para que finalmente ser fagocitados por estos.<sup>8, 10,15</sup>

Fig. 4 Mecanismo fagocítico de los Linfocitos T



### Organismos extracelulares encapsulados

Algunas bacterias además de su pared cuentan con una cápsula que resguarda su identidad e interior que impide que los macrófagos las reconozcan. Un ejemplo de bacterias encapsuladas son los estreptococos, que causan faringitis estreptocócica. La respuesta inmune consiste en hacer que los linfocitos B produzcan anticuerpos contra la cápsula como también de neutralizar las toxinas que producen ciertas bacterias. Una vez creados, se adhieren a las cápsulas. La unidad bacteria-anticuerpo recibe el nombre de complejo inmune. El complejo inmune se adhiere a un receptor sobre un macrófago.

Esta unión permite que el macrófago ingiera todo el complejo y que luego se digiera la bacteria. Los complejos inmunes también activan la cascada del complemento. La unión de productos de la cascada del complemento y el complejo inmune hace que a los macrófagos les resulte muy fácil identificar los complejos inmunes que debe ingerir.<sup>11-15</sup>

### **Organismos extracelulares no encapsulados**

Algunas bacterias tienen sólo una pared celular; no tienen cápsula y, en consecuencia, se las considera no encapsuladas. *Escherichia coli*, una causa muy frecuente de intoxicación alimentaria y de infecciones del tracto urinario, es un ejemplo de bacteria no encapsulada.

Cuando las bacterias no encapsuladas invaden el cuerpo, los macrófagos, las células asesinas naturales, las citoquinas y la cascada del complemento se ponen en acción. Los macrófagos tienen sensores que reconocen las moléculas de la superficie de las bacterias no encapsuladas. Cuando las moléculas y los sensores se unen, la bacteria es rodeada y absorbida por el macrófago en un proceso llamado fagocitosis. La fagocitosis estimula al macrófago a liberar citoquinas que atraen a los neutrófilos. Luego los neutrófilos absorben y matan muchas bacterias más. Algunas de las citoquinas liberadas por los macrófagos activan células asesinas naturales, que luego pueden matar algunas bacterias directamente, o bien ayudan tanto a los neutrófilos como a los macrófagos a matar de forma más eficiente.<sup>11,16</sup>

### **Organismos intracelulares**

Algunos microorganismos, como las bacterias de la tuberculosis, sobreviven mejor dentro de una célula. Una vez ingeridos, estos organismos son secuestrados (encerrados) dentro de la célula en una estructura protectora llamada vesícula o vacuola. Las vesículas pueden fundirse con otras dentro del citoplasma, como las vesículas que reúnen y envuelven las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II. A medida que estas vesículas se unen, el complejo mayor de histocompatibilidad reconoce algunos fragmentos de las bacterias y es transportado hacia la superficie celular. Las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad reconocidas por los linfocitos T, responden al fragmento de antígeno liberando citoquinas.

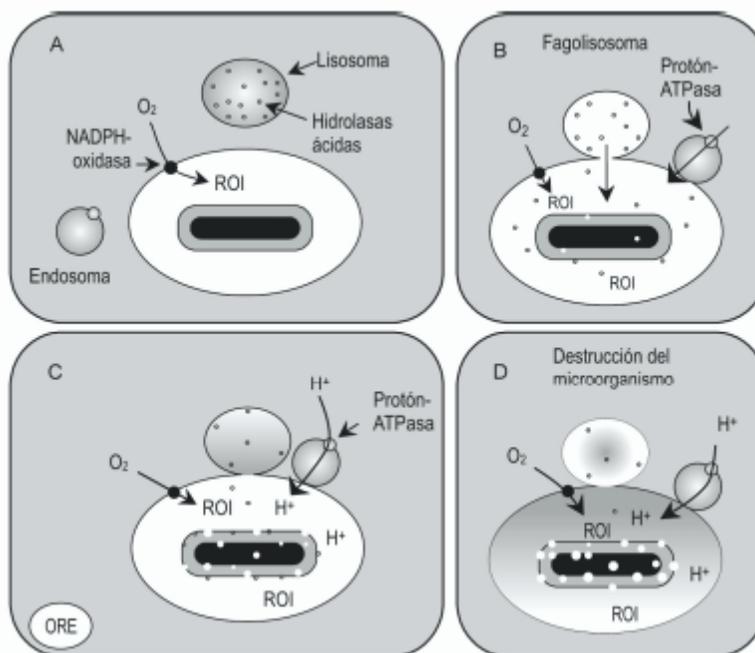
Las citoquinas activan macrófagos. Esta activación deriva en la producción de nuevos elementos químicos dentro de la célula. Estos elementos químicos ahora permiten que el macrófago mate los organismos que se encuentran dentro de la célula. Algunas citoquinas favorecen la producción de anticuerpos<sup>17</sup>

Los anticuerpos participan activamente en la defensa contra organismos localizados fuera de la célula; pero son ineficaces contra las infecciones que se producen dentro de ésta. Los virus son un ejemplo de otro organismo que debe entrar en una célula para poder sobrevivir. Los proteosomas son estructuras especiales que procesan y rompen el virus en fragmentos que son transportados hacia otra estructura, dentro de la célula, llamada retículo endoplasmático. Las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I también se reúnen dentro del retículo endoplasmático rugoso. Estas recogen fragmentos de virus que llevan consigo cuando son lanzadas hacia la superficie celular <sup>11-18,19-21</sup>

### **Mecanismo de Acción Fagocitaria**

La fagocitosis comprende la ingestión y destrucción posterior de bacterias, células infectadas y partículas inertes por células fagocíticas. Ésta se inicia con la llegada de las células fagocíticas (macrófagos y neutrófilos polimorfo nucleares) al lugar de la agresión, atravesando las paredes de los capilares en respuesta a la acción de sustancias quimiotáticas presentes en la zona. La adhesión del microorganismo a la superficie del neutrófilo o del macrófago provoca la activación de la célula, con lo cual la membrana del fagocito comienza a invaginarse hasta rodear por completo al microorganismo en una vacuola denominada fagosoma. En el citoplasma del fagocito, el fagosoma se fusiona rápidamente con lisosomas para formar un fagolisosoma, donde el microorganismo es expuesto a una serie de sustancias microbicidas provenientes de los lisosomas que terminan, en general, con la lisis del microorganismo ingerido. <sup>20,22</sup>

Aunque este mecanismo puede ser operante, se sabe que en la acidificación del fagosoma participa principalmente un sistema enzimático de localización endosomal que funciona como una bomba de protones (el sistema de la protón-ATPasa). La protón-ATPasa se incorpora a la membrana de la vacuola digestiva al ocurrir la fusión fago-endosomal (*Figura 5*). Además de la protón-ATPasa, la membrana de la vacuola digestiva exhibe el marcador lisosomal LAMP-1, cuyo papel biológico aún no es bien comprendido. <sup>20-22</sup>

**Figura 5:** Mecanismo operante en la acidificación del fagosoma

**Figura 5.** Las células fagocíticas destruyen microorganismos a través de mecanismos dependientes e independientes del oxígeno. Los primeros incluyen la participación de los radicales libres del oxígeno (ROI) generados por el sistema de la NADPH-oxidasa al transformar al oxígeno molecular en anión superóxido. Los mecanismos independientes del oxígeno incluyen a hidrolasas lisosomales y a péptidos y proteínas microbicidas. Las hidrolasas lisosomales se activan al acidificarse el medio fagosomal a través de la actividad de una bomba de protones (protón-ATPasa) presente en un tipo de endosomas. La actividad conjunta de los ROI y los componentes lisosomales es la causa de la muerte de los microorganismos ingeridos.<sup>23-25</sup>

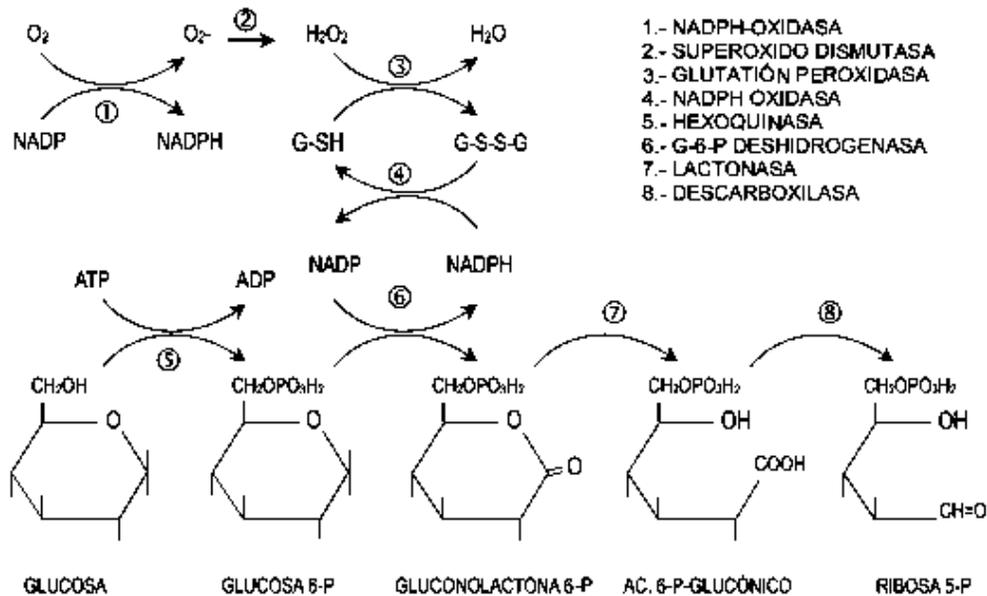
### Cambios metabólicos oxidativos relacionados con la función microbicida

Pocos segundos después del contacto de las células fagocíticas con agentes quimiotácticos y con microorganismos, se detectan en las células alteraciones bioquímicas que indican perturbación de su metabolismo y que incluyen cambios en el potencial eléctrico de la membrana, producción y liberación de AMP cíclico. (cAMP), liberación de anión superóxido y más tarde escape de algunas enzimas lisosomales. Algunos de estos cambios bioquímicos están relacionados con el metabolismo del oxígeno y del nitrógeno mientras que otros son de carácter no oxidativa<sup>20-27</sup>

Dentro de los cambios oxidativos que acompañan al proceso de la endocitosis se encuentran los incrementos en: (a) el consumo de oxígeno, (b) el consumo de glucosa, (c) la actividad del ciclo de las pentosas o hexosas monofosfato y (d) la producción de peróxido de hidrógeno y de otros peróxidos. Al conjunto de estos cambios se le llama “estallido respiratorio” (Figura 6).<sup>21-23,28, 29</sup>. Los mecanismos independientes del oxígeno incluyen la acción de proteínas catiónicas de alto peso molecular, que son capaces de lesionar la membrana microbiana.<sup>28-30</sup>

**Fig. 6** Mecanismo Oxidativa Fagocítico

(Oscar Rojas Espinosa y col-2004)



En la **Figura 6**. Asociado al proceso de la fagocitosis ocurre en las células el llamado “estallido respiratorio”. Este consiste en el consumo incrementado de oxígeno y glucosa y en la producción de cantidades elevadas de anión superóxido y peróxido de hidrógeno, además de otros cambios relacionados como la activación del sistema de la NADPH-oxidasa y del ciclo de las pentosas. El estallido respiratorio es tan importante para la actividad microbicida de las células que la literatura señala situaciones clínicas asociadas a la ausencia de NADPH-oxidasa (paso 1), a la deficiencia en la glutatión peroxidasa (paso 3) y a la carencia de glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (paso 6).<sup>23, 29,30-35</sup>

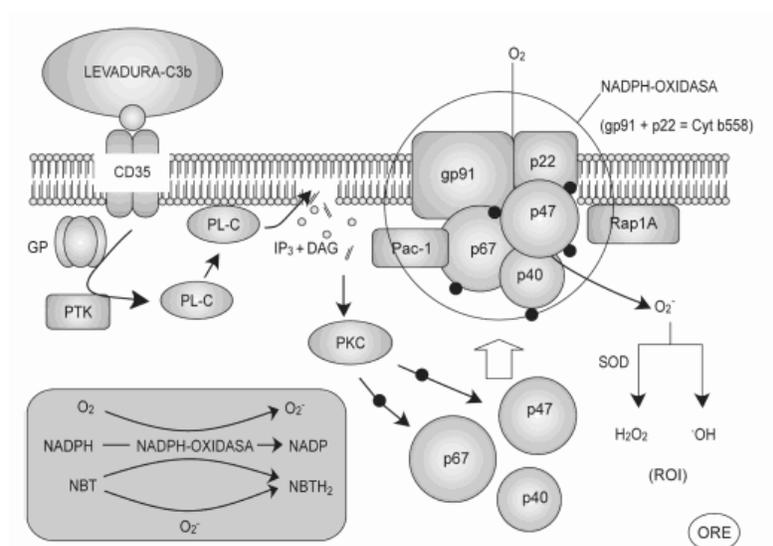
Los polimorfo nucleares (PMN) adquieren la capacidad de producir especies activas de oxígeno (ROS) cuando experimentan la activación. Este fenómeno se caracteriza por el aumento súbito del consumo de oxígeno ( $O_2$ ), antes citado, no asociado al transporte electrónico mitocondrial, catalizado por el sistema NADPH-oxidasa y denominado "*estallido respiratorio*". La producción "explosiva" de radical superóxido en respuesta a estímulos externos es una propiedad característica de los fagocitos. Esta producción es utilizada por las células para destruir bacterias y es también componente importante de la respuesta inflamatoria.<sup>23,29-35</sup>

Los polimorfo nucleares (PMN) juegan un papel esencial en la defensa innata del organismo frente a agentes patógenos y actúan como mediadores primarios de la respuesta inflamatoria. Para defender al organismo, los neutrófilos utilizan una amplia variedad de productos microbicidas, tales como oxidantes, péptidos, enzimas líticos, etc. La generación de oxidantes microbicidas por los neutrófilos se debe al complejo multiproteico NADPH oxidasa, antes mencionado, responsable de la transferencia de electrones desde el NADPH al  $O_2$ , con la simultánea producción de radical superóxido.<sup>30-35</sup>

Durante la activación de la oxidasa, diversas proteínas citosólicas se traslocan a la membrana plasmática que rodea al fagosoma, donde se ensamblan a otro complejo unido a membrana el flavocitocromo b558. Este proceso se encuentra estrictamente regulado e implica fosforilaciones, traslocación y múltiples cambios conformacionales. El producto de la reacción enzima catalizada por la NADPH oxidasa, se identificó al principio como  $H_2O_2$  por su capacidad para oxidar el formato. Posteriormente se demostró por Babior, Kipnes y Curnutte en 1973, que el  $H_2O_2$  procedía de la dismutación del radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ). Cuando los neutrófilos fagocitan partículas, el anión superóxido se produce en aquella región de la membrana plasmática en contacto directo con la partícula. Después ha de transcurrir un período (fase "lag"), que promueve al fagocito el tiempo requerido para la formación y cierre de una vacuola que limita la salida al exterior de las especies de oxígeno formadas.<sup>21, 23,29-35</sup>

El sistema enzimático que cataliza los cambios oxidativos se conoce como *sistema de la NADPH oxidasa* (Figura 7), y consiste de cuando menos 4 subunidades: las glicoproteínas gp91phox y p22phox (las dos subunidades del citocromo b558 membranar el cual es el acarreador electrónico terminal de la oxidasa), y las glicoproteínas p47phox y p67phox, los dos componentes citoplásmicos del sistema.<sup>34,35</sup>

**Figura 7:** Fagocitosis: mecanismos y consecuencias



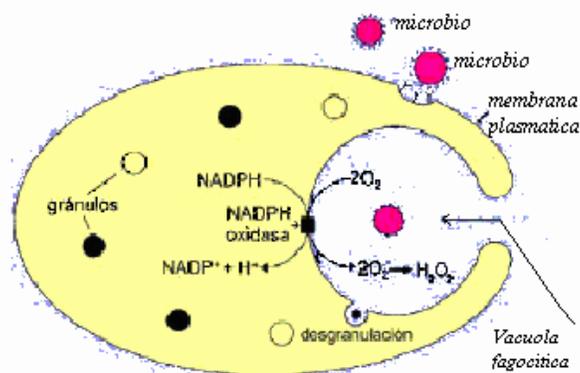
En la **Fig. 7** activación del sistema de la NADPH oxidasa. Siguiendo el contacto entre el receptor CD35 y su ligando (C3b), se inicia en la célula una serie de señales en las que participan proteínas G (GTPasas), tirosincinasas y fosfolipasa C, entre otros componentes. Uno de los intermediarios activados, la proteincinasa C (PKT), activa a su vez a varias proteínas citosólicas (p67 phox, p47 phox y p40), que fosforiladas (\*) se mueven a la cara interna de la membrana, proceso promovido por Rac-1, donde se interaccionan con el citocromo b558 (gp91phox + p22phox) y también lo activan. El citocromo b558 activado captura oxígeno molecular y lo transforma en anión superóxido ( $O_2^-$ ). El anión superóxido es transformado en peróxido de hidrógeno y luego en radicales hidróxilo, que junto con los "singletes" de oxígeno constituyen la familia de radicales libres del oxígeno (ROI). En la clínica, la prueba del NBT es una medida de la capacidad microbicida de las células fagocíticas y refleja el funcionamiento de esta vía metabólica. El NBT se reduce tanto por el sistema de la NADPH-oxidasa como por el anión superóxido producido. (24-27,30-35)

Al descubrirse que los radicales libres de oxígeno se producían en grandes cantidades en la vacuola fagocítica se responsabilizó a estos radicales de la destrucción del microorganismo (Fig.8).

Sin embargo, tanto el radical superóxido como el peróxido de hidrógeno son relativamente poco reactivos, de manera que hubo que buscar otras explicaciones. El contenido de los gránulos citoplasmáticos es también importante. Los citoplastos, cuerpos enucleados sin gránulos, fagocitan las bacterias normalmente y producen un estallido respiratorio normal, pero destruyen las bacterias con poca eficiencia. La mieloperoxidasa, uno de los principales constituyentes de los gránulos, puede utilizar el  $H_2O_2$  para oxidar los haluros y convertirlos en compuestos reactivos tóxicos, como el  $OHCl$  y las cloraminas. Sin embargo, en casos de deficiencia en mieloperoxidasa, la destrucción de los microbios no resultaba abiertamente defectuosa, por tanto, tenían que estar necesariamente implicados otros factores en el efecto del estallido respiratorio y en la destrucción de las proteínas de los gránulos.<sup>23, 29,30-34</sup>

La explicación parece notablemente simple: el bombeo hacia el interior de la vacuola de concentraciones milimolares de electrones, no acompañada de protones, origina el consumo de iones de hidrógeno en el lumen de dicha vacuola, con la consiguiente elevación del pH. El contenido de los gránulos se mantiene en estado inactivo a pH 5.0 y las proteasas neutras se activan cuando se exponen al medio relativamente alcalino de la vacuola.<sup>29-35</sup>

**Figura 8:** Mecanismo de la vacuola fagocítica en la destrucción de un microorganismo

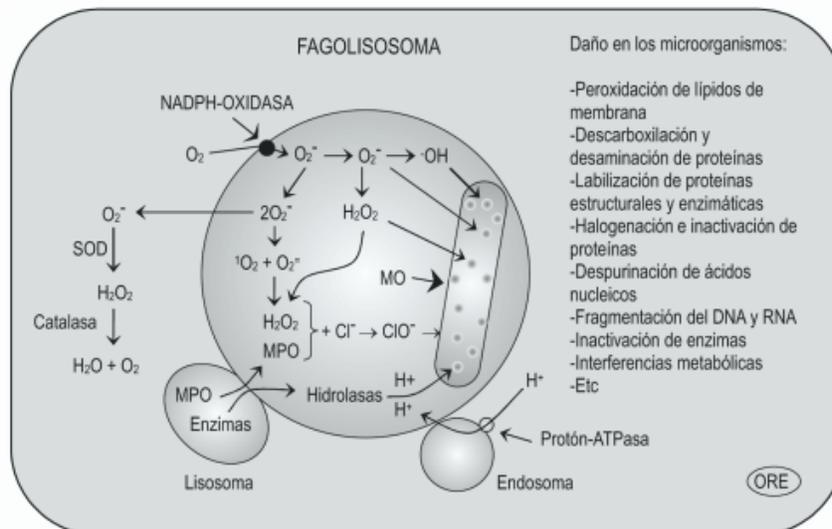


La **Figura 8**. Representación esquemática de un fagocito atrapando un microorganismo en la vacuola fagocítica. La NADPH oxidasa se activa selectivamente en la membrana de la vacuola y genera  $O_2$  y  $H_2O_2$  en el lumen de la vacuola. Otros enzimas se liberan en la vacuola por desgranulación de los gránulos citoplasmáticos (Segal AW y Abo A 1993)

En fagocitos quiescentes (en reposo), la NADPH oxidasa no es activa, pero adquiere actividad catalítica cuando las células se estimulan con agentes apropiados. La actividad microbicida de los mecanismos anteriores postula que se produce  $H_2O_2$  y que éste es responsable de la actividad microbicida de las células, ya sea por su capacidad bactericida intrínseca o por su interacción con mieloperoxidasa y un haluro (*Figura 9*). El último mecanismo conduce a la iodación de la pared celular microbiana, la producción de aldehídos bactericidas por descarboxilación de aminoácidos o el rompimiento oxidativo de enlaces peptídico en las proteínas bacterianas. La síntesis de  $H_2O_2$  en PMN y fagocitos MN durante la ingestión de partículas no es inhibida por CN $^-$ . Esto indica que la oxidasa involucrada no es una hemoproteína. El producto primario de la reducción del oxígeno por la NADPH oxidasa es el anión superóxido ( $O_2^-$ ) el cual puede reducirse de manera espontánea, o por efecto de la superóxido dismutasa (SOD), hasta  $H_2O_2$ , o puede reaccionar con el  $H_2O_2$  ya formado, para producir radicales hidroxilo (OH $\cdot$ ) los cuales son todavía más reactivos.<sup>33-35</sup>

**Figura 9:** Fagocitos quiescentes (en reposo); capacidad bactericida por su interacción con mieloperoxidasa y un haluro.

Oscar Rojas Espinosa y col.



Se observa, en la **Figura 9**, que la muerte de los microorganismos por las células fagocíticas ocurre por la acción conjunta de los radicales libres del oxígeno (ROI: anión superóxido, radicales hidroxilo, peróxido de hidrógeno), de los radicales libres del nitrógeno (óxido nítrico) (no ilustrado), y de los péptidos y proteínas microbicidas contenidos en los gránulos lisosomales. Las enzimas hidrolíticas juegan un papel decisivo en la digestión de los microorganismos gravemente dañados, aunque algunas enzimas, como la lisozima, muestran un efecto microbicida directo sobre algunos microorganismos, en tanto que otras, como la mieloperoxidasa (MPO), utiliza al peróxido de hidrógeno como sustrato para producir, junto con haluros, compuestos altamente tóxicos (esquema basado en las referencias; <sup>(30-33)</sup>)

Son estimulados para la activación de la NADPH oxidasa en fagocitos, la fagocitosis de bacterias u otras partículas opsonizadas, complejos inmunes, citoquinas, tales como el factor de necrosis tumoral (TNF), la linfoxina, el interferón  $\gamma$ , péptidos quimiotácticos como el producto C5a de la rotura del complemento y los péptidos N-formilados derivados de bacterias. <sup>35</sup>

Aunque la fagocitosis pudiera parecer ineludible para un microorganismo que penetre en el cuerpo. Sin embargo, muchos de ellos han adquirido características especiales que les permiten escapar al reconocimiento directo por las células fagocíticas. No obstante, la fagocitosis puede llevarse a cabo gracias a la existencia de factores solubles que se unen a la superficie de estos microorganismos evasores y advierten a los fagocitos de la presencia de un elemento extraño. Estos factores son los anticuerpos (Ac) IgG e IgM y la fracción C3b del componente C3 del sistema de complemento. Un microorganismo recubierto por estas moléculas puede ser fácilmente reconocido y captado por macrófagos y polimorfo nucleares a través de receptores específicos para el fragmento Fc de las IgG y para C3b presentes en la membrana celular de los fagocitos. Las moléculas capaces de favorecer la fagocitosis en esta forma, como IgG y C3b, se denominan opsoninas y el fenómeno en sí se denomina opsonización. Se ha comprobado que la IgG por sí sola es capaz de mediar la adhesión e ingestión de la célula opsonizada a través de sus receptores específicos en fagocitos, mientras que la opsonización únicamente por C3b sólo promueve la adhesión. <sup>36,37</sup>

**IL-2, INF-  $\gamma$  y TNF-  $\alpha$ .**

En 1976 Morgan, Ruscetti y Gallo observaron el crecimiento y proliferación de linfocitos T humanos en sobrenadantes de cultivos de leucocitos humanos activados por mitógeno. Poco después se constata este efecto en poblaciones de linfocitos T con acción citolítica y se demuestra que la manutención de estos cultivos dependía de alguna entidad molecular presente en los sobrenadantes de células T activadas.

En 1978 se demostró que al retirar los sobrenadantes de estos cultivos se propiciaba la pérdida de la capacidad proliferativa de las células en forma de dosis dependiente hasta llegar a la muerte de las estirpes en cultivo; y la adición de estos aumentaba el número de células y la incorporación de Timidina tritiada. Se propone entonces nombrarle factor de crecimiento de células T. Como resultado de varios estudios, en años siguientes se atribuyeron varias funciones a esta molécula y con ellas varios nombres que caracterizaban sus actividades en bioensayos específicos. Más tarde se adopta el consenso de nombrarle Interleucina-2 (IL-2), una vez reconocido su papel como señal entre leucocitos.<sup>38, 39</sup>

.Estudios de funcionamiento bioquímico y de purificación de la molécula por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), llevaron a establecer la estructura de esta. Fue caracterizada como una glucoproteína de 15–18 kd con puntos de glicosilación variables. La IL-2 humana es sintetizada como un polipéptido de 153 residuos de aminoácidos, los primeros 20 representan la secuencia señal que es escindida para producir el factor maduro. La proteína madura contiene 3 residuos de cisteína, dos de los cuales forman un puente disulfuro requerido para su activación biológica.<sup>40</sup>

La IL-2 humana es producto de un gen localizado en el cromosoma 4 y es una linfocina sintetizada y segregada primariamente por células NK, timocitos medulares activados y células Thelper 1 (Th1) estimuladas por mitógenos o por interacción del Complejo Receptor de Células T (TCR) con Complejos del Sistema Mayor de Histocompatibilidad – antígeno (MHC-Ag) en la superficie de células presentadoras.

La activación de las células Th induce la expresión del receptor de IL-2 y subsecuentemente la expansión de células T antígeno específicas; desde este punto de vista IL-2 es un factor autócrino pero también actúa como estimulante parácrino influenciando la actividad de otras células del sistema inmune<sup>40</sup> incluso de estirpes celulares de otros sistemas. En el sistema inmune estimula el crecimiento de células NK y aumenta su función citolítica transformándolas en células LAK. Sobre linfocitos B humanos actúa como factor estimulante del crecimiento y de la síntesis de anticuerpos.<sup>41</sup>

Puede actuar como factor de crecimiento tímico para linfocitos T inmaduros e incrementar las respuestas a otras citocinas en células inmaduras de la médula ósea. IL-2 aumenta también la generación de células T citotóxicas y potencia la función de neutrófilos y macrófagos. Se han señalado como inhibidores de la síntesis de IL-2, los glucocorticoides, la prostaglandina E-2, las interleucinas 4, 10, y la ciclosporina, además como los inductores de su síntesis antígenos T dependientes, activadores policlonales, unión al CD-2, interacción CD-28 B7, lecitinas y otros mitógenos.<sup>38, 39, 41-43</sup>

Las actividades biológicas de la IL-2 son mediadas por la unión de esta a un receptor celular alfa, beta, gamma en las que las tres cadenas establecen contacto con el ligando. La cadena alfa se une a IL-2 con baja afinidad pero es incapaz de transducir señales. La combinación alfa-beta se liga a IL-2 con intermedia actividad pero no transduce señales. Un complejo beta-gamma tiene intermedia afinidad y es capaz de transducir si la concentración de IL-2 es relativamente alta. Parece existir asociación física de la cadena beta con la tirosín-quinasa p-56 lck, la activación lleva a la inducción de c-fos y c-jun. Otra porción de la cadena beta del receptor está ligada al sistema JAK quinasa, probablemente JAK-1 y quizás JAK-3. La cadena gamma está también implicada en la activación del sistema JAK. La exacta contribución de cada cadena en los eventos de activación celular no está enteramente aclarada.<sup>39, 43, 44</sup>

El interferón gamma (IFN- $\gamma$ ), IFN 2 o IFN inmune es una proteína multifuncional primariamente reportada por su actividad antiviral en cultivo de leucocitos humanos infectados por virus y estimulados por fitohemaglutinina (PHA).<sup>39, 45</sup>

El FN- $\gamma$  es una glicoproteína de 143 aa con PM=20 ó 25 kd en dependencia de si la molécula está o no glicosilada y tiene pequeña homología secuencial con los interferones alfa y beta. Se ha identificado un receptor para interferón gamma y su gen esta localizado en el cromosoma 6 mientras que esta citocina es producida por un gen del cromosoma 12.

El DNAc del receptor codifica un polipéptido con 17 residuos de aminoácidos en el péptido señal, unos 228 residuos en dominios extracelulares, 21 residuos en dominios transmembranosos y 223 residuos de aminoácidos en dominios intracelulares.

Una forma soluble del receptor ha sido reportada en la orina humana bajo condiciones fisiológicas.<sup>38, 41</sup> Datos recientes indican que la cadena beta del receptor de interferón gamma es requerida para la transducción que sigue al acoplamiento del interferón gamma. La unión del interferón gamma a su receptor induce dimerización de éste, activación de proteínas quinasas, factores de trascrición y activadores de promotores de genes para citoquinas y otras proteínas. Se conoce la expresión inducida de genes por interferón gamma como HLA-B, HLA-DR, IP-10, P1quinasa y 2-5A sintetasa. Se ha corroborado su papel como inhibidor de la síntesis de proteínas virales y como agente para la destrucción del ácido ribonucleico (RNA). El interferón gamma es producido por células T CD8+, NK- $\gamma$ , delta y Th1 estimuladas por antígenos y mitógenos.<sup>39, 41, 43,45</sup>

Los efectos inmunomodulatorios del IFN- $\gamma$  son diversos: en macrófagos y monocitos aumenta la expresión de MHC-1 aumenta la producción de IL-1, factor activador de plaquetas, peróxido de hidrógeno, protege a monocitos de la lisis mediadas por células LAK, regula negativamente la expresión de IL-8, con lipopolisacaridos induce la producción de NO, lo que activa monolitos citotóxicos para regular negativamente la expresión del receptor del Factor Transformador del Crecimiento Beta (TGF- $\beta$ ), y estimula la subunidad gamma del receptor de IL-2 (IL-2R). Es quimiotáctico para monocitos, aumenta la secreción de Inmunoglobulina G2a (IgG2a) por células B estimuladas por lipopolisacáridos (LPS) y de la Inmunoglobulina G3 (IgG3) en células B no dependientes de T helper 2 (Th2). Su actividad antiviral y antiproliferativa ha sido explorada en numerosos ensayos clínico. Induce su propia expresión y su producción local se acompaña de inflamación que puede acaecer en sitios distantes de aquellos en los que se sintetizó lo que pudiera ser debido a su circulación o a la producción de éste por células que migran.

Aumentan la expresión de ICAM –1 en células endoteliales, inhibe la proliferación celular, el crecimiento tumoral y la diferenciación de fibroblastos. Aumenta la diferenciación de células leucémicas, monoblásticas y promielocíticas, aumenta la producción de endotoxinas inducidas por IL-1 en macrófagos, aumenta la generación de células T citotóxicas y la actividad de NK. Estimula la diferenciación de células eritroleucémicas, la producción de anticuerpos y la inmunidad celular. Potencia la acción del TNF en células endoteliales donde promueve la adhesión y extravasación celular a lo largo del endotelio vascular.<sup>45</sup>

TNF- $\alpha$  es el mediador principal de las respuestas frente a las bacterias gram-negativas y también puede desempeñar un papel en las respuestas inmunitarias innatas frente a otros organismos infecciosos. Inicialmente se descubrió como una actividad identificada en el suero de animales tratados con LPS (lipoproteínas) que eran capaces de inducir necrosis hemorrágica de ciertos tumores.<sup>45,46</sup>

La principal fuente celular de TNF- $\alpha$  son los fagocitos mononucleares activados por el LPS, aunque también pueden ser secretados por células T estimuladas por antígeno, células NK y mastocitos activados. El IFN- $\gamma$  producido por las células T, aumenta la síntesis de TNF- $\alpha$  por los fagocitos mononucleares estimulados por el LPS. De esta manera, el TNF- $\alpha$  actúa como mediador tanto de la inmunidad innata como de la específica, y es un importante nexo de unión entre las respuestas inmunitarias específicas y la inflamación aguda.<sup>45,46</sup>

El TNF- $\alpha$  es el producto del único gen localizado dentro del MHC en el cromosoma 6. El TNF- $\alpha$  forma parte de una gran superfamilia que comprende al menos 15 proteínas con funciones diversas y se une al menos con 24 receptores diferentes. Cada miembro de la familia TNF- $\alpha$  ejerce cierto efecto sobre el sistema inmune. En el fagocito mononuclear, el TNF- $\alpha$  es sintetizado inicialmente como una glucoproteína transmembrana no glucosilada. El TNF- $\alpha$  nativo adopta una forma triangular de formas que cada lado de la pirámide está formado por una subunidad monomérica diferente.<sup>45,46</sup>

Se identificaron ya dos receptores diferentes para TNF- $\alpha$ ; el receptor tipo II (TNFRII) que se une al TNF- $\alpha$  con una afinidad 10 veces mayor ( $K_d=5 \times 10^{-11}$ ) que el receptor tipo I (TNFRI). Cada receptor posee un dominio citoplasmático grande y puede transmitir señales a través de la vía NF $\kappa$ B que origina la mayor parte de los efectos inmunológicos de TNF. En la mayoría de los aspectos, TNFRI es el mediador principal de la actividad de TNF- $\alpha$ , en tanto que TNFRII desempeña una función auxiliar. El TNF- $\alpha$  hace que las células endoteliales vasculares expresen nuevos receptores de superficie (moléculas de adhesión) que hacen que los leucocitos se adhieran a la superficie de la célula endotelial, inicialmente los neutrófilos y, posteriormente, los monocitos y linfocitos. EL TNF- $\alpha$  activa igualmente sobre los neutrófilos aumentando su adhesividad a las células endoteliales. Estas acciones contribuyen a la acumulación de leucocitos en los focos inflamatorios y son probablemente los efectos locales fisiológicamente más importantes del TNF- $\alpha$ . El TNF- $\alpha$  estimula a los fagocitos mononucleares y otros tipos celulares a la secreción de quimioquinas que contribuyen al reclutamiento de leucocitos. EL TNF- $\alpha$  activa los leucocitos inflamatorios para que destruyan microorganismos. El TNF- $\alpha$  es especialmente potente para activar los neutrófilos, pero también afecta a eosinófilos y fagocitos mononucleares.<sup>45-47</sup>

## **Antecedentes Específicos**

### **Inmunogenicidad en Mucosas. El Uso de Coadyuvantes.**

La capacidad que tienen los antígenos de interactuar con efectores del sistema inmunológico y desencadenar una respuesta inmunitaria se llama Inmunogenicidad. Y para que un antígeno sea un buen inmunogeno debe cumplir con varias condiciones, como son: la naturaleza extraña del antígeno, la no inducción de tolerancia, la especie animal, la variación antigénica, la edad del animal, la inmunocompetencia, la restricción por antígenos de histocompatibilidad, la solubilidad del antígeno, la vía de administración, el destino metabólico del antígeno, y el uso de coadyuvantes.<sup>47-49</sup>

En los últimos años y a lo largo de la historia de la medicina se logrado mucho en el desarrollo de nuevas vacunas, por la contribución que ha tenido de las enfermedades infecciosas que antiguamente no se podían erradicar.

El avance de esta poderosa herramienta ha ayudado en el conocimiento de los fenómenos que regulan la inmunogenicidad y la tolerancia en las distintas especies, junto con el desarrollo impetuoso de la biotecnología y la genética. Esto con el fin de la posibilidad de desarrollar vacunas más eficaces. Desde entonces, se han llevado a cabo estudios dirigidos para identificar nuevos blancos de respuesta inmunológica, generar y estudiar nuevos antígenos con técnicas de manipulación genética. Así como de profundizar más en el estudio de los inmunomoduladores, como son citocinas, toxinas modificadas y coadyuvantes.<sup>50,51</sup>

En febrero de 1998, Plotkin (Inst. Pasteur) en una detallada revisión sobre el desarrollo de vacunas en la era moderna, expuso las estrategias usadas por el mismo, entre las que destaca el uso de organismos completos o subunidades inactivados químicamente, toxinas inactivadas, antígenos excretados, polisacáridos capsulares o conjugados con proteínas, péptido sintéticos, anticuerpos antiidiotipo y ácido desoxirribonucleico desnudo. Caso particular de vacunas con patógenos vivos, destacan estrategias como: la atenuación de virulencia, rearrreglos génicos (híbridos), delección de ADN recombinante, vectores como acarreadores de genes heterólogos y creación de mutantes con efectores de replicación. Plotkin, señaló que el objetivo más importante de la inmunización en mucosas es induciendo respuestas locales y sistémicas, esto en base a los éxitos de algunos de sus ensayos que ha llevado a cabo por vías de administración oral, intranasal, intrarrectal e intra vaginal con el uso de distintos sistemas de expresión de genes heterólogo, como Salmonella, Shigella, BCG, Adenovirus y poxivirus.<sup>52</sup>

### **Inmunogenicidad en Mucosas**

A pesar de contar con antígenos que confieren inmunidad sistémica, la mayor parte desencadenan poca o ninguna inmunoestimulación de las mucosas; en cambio, cuando el antígeno se aplica a través de las mucosas tiene más oportunidades de interactuar con los efectores locales y conferir inmunidad tanto en compartimientos sistémicos como de mucosa de tal manera que se ha señalado que las respuestas de IgA en las mucosas se relacionan directamente con la estimulación directa del tejido linfóide y las mucosas<sup>53</sup>

Otras condiciones importantes de un buen inmunógeno, es de ser capaces de potenciar las respuestas inmunológicas en las mucosas y que, además, burlen el ambiente radical que imponen los mecanismos inespecíficos de defensa de los aparatos digestivo, respiratorio y reproductor, diseñándose antígenos encapsulados<sup>54</sup> expresión de antígenos heterólogos en vectores<sup>55</sup> y en proteínas transportadoras<sup>56</sup> estas estrategias son muy costosas y pueden resultar tóxicas para los vertebrados, de modo que resulta atractiva la idea de desarrollar antígenos conjugados con sustancias capaces de coadyuvar a la respuesta inmunológica.<sup>51</sup>

### **Coadyuvantes**

Los coadyuvantes son sustancias que al coadministrarse con el antígeno, aumentan la magnitud de la respuesta inmunológica con respecto a la que se obtendría cuando el antígeno se administra solo. La mayor parte de los antígenos ocasionan respuestas muy pobres al administrarse solos; la producción de nuevos coadyuvantes, como proteínas recombinantes y péptidos provenientes de patógenos, es un área de gran interés<sup>57,58</sup>

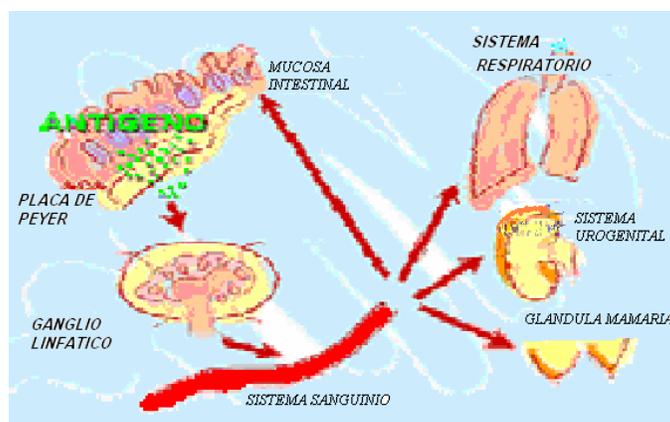
Los coadyuvantes pueden afectar todos los aspectos medibles de la respuesta de anticuerpos, lo que incluye cinética, duración, cantidad, isotipo, avidéz y generación de neutralización y protección; muchos coadyuvantes afectan la especificidad de la respuesta de anticuerpos, pues logran alterar la selección de epítopes de antígenos completos hacia donde se dirige la respuesta de los anticuerpos. Si bien muchos coadyuvantes han sido eficaces para potenciar respuestas humorales, sólo unos pocos han demostrado ser buenos inductores de inmunidad celular.<sup>58</sup>

Los mecanismos generales de acción de los coadyuvantes son los que explican el modo en que se ejercen su acción inmunoestimulante, y son: la liberación del antígeno durante periodos largos, inflamación y activación de células presentadoras, como macrófagos, localización selectiva del antígeno en áreas timo-dependientes, incremento de la captura del antígeno y de su presentación por células accesorias, alteración de las vías de procesamiento de antígenos, estimulación de células T cooperadoras, Regulación de la producción de citocinas y regulación del cambio de clase de inmunoglobulinas.

Como también en la proliferación y diferenciación de células B, estimulación de la maduración de precursores de células B, T y eliminación de células supresoras. Un aspecto importante de un coadyuvante, radica en el hecho de que la inmunización de un sitio de mucosa puede desencadenar respuesta inmunogénica en sitios distantes<sup>53, 56</sup> de la misma mucosa Fig.10, y las subsecuentes reinmunizaciones por vías sistémicas que promueven respuestas protectogénicas más duraderas. Tal es el caso de las vacunas orales, el antígeno al ser liberado en el aparato digestivo, debe vencer mecanismos hostiles, como enzimas luminales, peristaltismo intestinal, secreciones, jugos gástricos y sales biliares, entre otros, al final son captados por células M en el epitelio intestinal y el antígeno se libera al tejido linfoide y a las mucosas.<sup>57</sup> La inyección de antígenos en las placas de Peyer puede generar respuestas de IgA, este mismo liberado en el tejido linfoide asociado a mucosas digestivas puede ser suficiente para generar respuestas contra algunos antígenos.<sup>56-58</sup>

Otro caso, del lumen intestinal, los lipopolisacáridos en grandes cantidades, sirven como coadyuvantes locales. Una vez en el tejido linfoide asociado a mucosas digestivas, interactúan con células accesorias, activan linfocitos T y promueven la activación de las células B específicas con respuesta de la síntesis de anticuerpos. Cada uno de estos pasos pueden potenciarse con el uso específico de nuevos coadyuvantes como del microambiente de mucosas.<sup>59,60</sup>

**Figura 10** Respuesta inmunogénica en sitios distantes.



Sánchez-Vizcaino 2004 ([jmvizcaino@vet.ucm.es](mailto:jmvizcaino@vet.ucm.es))

## **Modelo de Coadyuvante Sistémico e Inmunógeno en Mucosas**

### **(Toxina del cólera)**

Es una molécula actualmente conocida, mejor caracterizada y altamente inmunogénica que aplicada en superficies mucosas, estimula respuestas locales y sistémicas, coadministrada en pocos microgramos con inmunógenos pobres potencia respuestas junto con éstos. Los parámetros siguientes caracterizan a esta toxina del cólera, de actuar como buen inmunogeno y coadyuvante en las mucosas.<sup>61,62</sup>

-Capacidad de unirse a células epiteliales y persistir por tiempo prolongado en la superficie de las mucosas, lo que potencia la respuesta propia de la toxina y contra otros antígenos que se administren con ella. –Estimulación de la producción de la IL-1 in Vitro. – Incita las respuestas de Th2 in vivo, estimulando la síntesis de IgA secretoria y aumentando la síntesis de IgG anti-toxina del cólera en plasma.<sup>63-65</sup> Lo que promueve junto con las citocinas, el cambio isotipo en células B lo que expresa IgM en superficie del tejido linfoide asociado en mucosas digestivas. –Inhibición de células supresoras, causando alteraciones del microambiente, de las células T. – Aumenta la permeabilidad a antígenos lumbinales. – Acción coadyuvante junto con la coadministración con otros antígenos por la misma ruta para despertar inmunidad eficaz contra estos antígenos lo que puede generar memoria inmunológica.<sup>66-68</sup>

Cuando se coadministra con toxinas por vía independiente de IL-2, induce proliferación de células T.<sup>69</sup> Otros factores que contribuyen a que la toxina del cólera sea un buen inmunogeno y adyuvante, es su capacidad de unirse con células eucarióticas y tener resistencia a la acción de las proteasas que hace que aumente su tiempo de contacto con el tejido linfoide asociado a mucosas digestivas como su estabilidad a los líquidos del mismo.<sup>70,71</sup> La toxina del cólera proporciona un patrón ideal para ser comparado con cada nuevo coadyuvante sistémico y de mucosas que se investigue.

## INFECCIONES DEL TRACTO URINARIO

Las infecciones del tracto urinario (ITU) representan una entidad clínica de gran importancia médica y alta frecuencia, tanto a nivel adulto, como en la edad pediátrica, constituyendo la primera causa de consulta en urología y nefrología y la tercera por enfermedades infecciosas en los servicios ambulatorios. Estas representan una gama de padecimientos clínicos y anatomopatológicos, que afectan diferentes partes del riñón. Los síndromes varían desde bacteriuria asintomática hasta absceso perirrenal con sepsis. Cada uno tiene su propia epidemiología, evolución natural y peculiaridades diagnósticas. La diferenciación de los síndromes relacionados con UTI, tiene importantes repercusiones sobre el tratamiento y pronóstico.<sup>72</sup>

La infección en el tracto resulta de una compleja interacción entre agentes bacterianos y factores específicos del huésped, de lo cual puede resultar una bacteriuria asintomática, una infección urinaria baja o una pielonefritis, entidades que representan impactos clínicos diferentes. La mayoría de las infecciones del tracto son de curso benigno y tienen una evolución favorable, sin embargo la edad tiene una connotación especial ya que pueden ser la expresión de una anomalía anatómica o funcional del tracto urinario que puede requerir un enfoque terapéutico médico o médico-quirúrgico específico.<sup>73-75</sup>

Las ITU, son una de las entidades más comunes, que afectan a mujeres de todas las edades, que constituyen una de las entidades clínicas más prevalentes, estimándose que de un 20 a un 35% de las mujeres presentan al menos un episodio de ITU a lo largo de su vida. Pero de preferencia a aquellas en edad reproductiva o sexualmente activas.<sup>76-78</sup> A un cuando no representan, por lo general, una amenaza para la vida, tienden a recidivar con relativa frecuencia y son causa de alta morbilidad asociada y de ausentismo laboral, lo que representa grandes pérdidas económicas, que se suman a aquellas generadas por la atención de la enfermedad en sí.<sup>79</sup>

Puede afectar a individuos de cualquier edad y condición, con una especial incidencia en mujeres de cualquier edad, hombres en edades extremas de la vida, receptores de trasplante renal y en pacientes con cualquier anomalía estructural o funcional del tracto urinario. De forma adicional, la ITU constituye la principal causa de sepsis en pacientes hospitalizados y hasta un 50% de las infecciones nosocomiales tienen su origen en el tracto urinario, en relación en su mayoría con catéteres urinarios. Un 10-15% de los enfermos incluidos en programa de hemodiálisis llegan a esta situación como consecuencia de infecciones urinarias de repetición. Por lo expuesto es fácil entender que las ITU llevan implícita una morbilidad importante, una mortalidad no despreciable y un coste económico elevado. En la última década la búsqueda de regímenes terapéuticos que permitan un mejor cumplimiento, un menor coste y una menor incidencia de efectos adversos ha supuesto una importante innovación en el manejo del paciente con ITU.<sup>72, 80,81</sup>

### **Conceptos y Clasificación**

El término infección urinaria engloba diversas entidades clínicas caracterizadas por la colonización e invasión del tracto urinario por microorganismos patógenos.

La clasificación de las ITU se basa en la localización y frecuencia de la infección, así como en factores que pueden complicarla. En la tabla 1 se mencionan diferentes categorías de ITU en el adulto. La pielonefritis o infección del tracto urinario alto afecta al riñón y pelvis renal, en tanto que la cistitis, uretritis, prostatitis y epididimitis quedan catalogadas como infecciones del tracto urinario bajo.<sup>82</sup>

A su vez una ITU puede clasificarse como no complicada o complicada; la ITU no complicada afecta a individuos que tienen un tracto urinario estructural y funcionalmente normal. Por contra, una ITU complicada implica la existencia de factores del huésped que pueden promover la persistencia o recurrencia de la infección, tales como embarazo, anomalías estructurales o funcionales del sistema excretor, una infección adquirida en el hospital, manipulación reciente de la vía urinaria, diabetes mellitus, estados de inmunosupresión (incluyendo infección por VIH), enfermedad renal poliquística y uso reciente de antimicrobianos.<sup>83,84</sup>

La recurrencia de una ITU puede obedecer a recidiva o reinfección; una recidiva es una infección recurrente producida por el mismo microorganismo, que acontece por regla general en las dos semanas que siguen a la conclusión del tratamiento antimicrobiano; una reinfección es producida por especies diferentes de cepas microbianas y de forma habitual ocurre más allá de dos semanas de la finalización del tratamiento. La bacteriuria significativa denota la presencia de más de  $10^5$  E5 bacterias patogénicas por mililitro de orina, con o sin síntomas. La bacteriuria asintomática es una bacteriuria significativa sin manifestación clínica. La piuria representa un marcador de bacteriuria significativa y se define como un recuento en orina de más de 10 leucocitos/mL en una cámara cuenta glóbulos o, de forma menos precisa, un recuento superior a 6 leucocitos por campo mediante objetivo de alto aumento.<sup>85-87</sup>

<b>Tabla 1. Categorías de ITU</b>
Cistitis aguda no complicada ITU no resuelta ITU recurrente Pielonefritis aguda no complicada en la mujer ITU complicada en hombres o mujeres <ul style="list-style-type: none"> <li>• Cistitis y pielonefritis aguda complicada</li> <li>• Bacteriuria y pielonefritis en el embarazo</li> <li>• Prostatitis aguda</li> <li>• Infección fúngica del tracto urinario</li> </ul> Prostatitis crónica Infección en portador de catéter urinario Bacteriuria asintomática

## Epidemiología y Factores de Riesgo

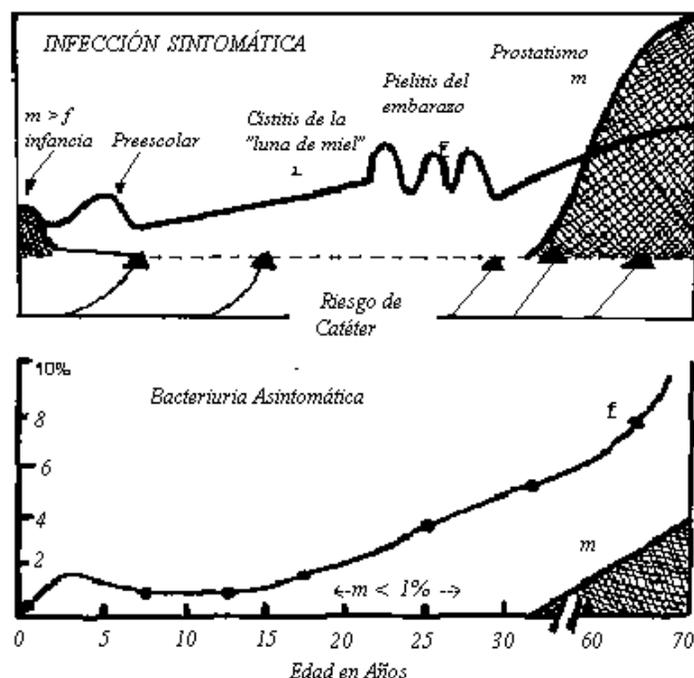
Durante el primer año de vida, las ITU son más frecuentes en el varón, probablemente en relación con la existencia de anomalías congénitas de la uretra; la prevalencia de anomalías congénitas con obstrucción del flujo urinario es del 10-20% en niños con ITU en los primeros 2 meses de vida, estimándose que un tercio de los niños en los que se establece el diagnóstico de pielonefritis tienen reflujo vesico uretral.<sup>88,89</sup> En la fig.11 se detalla la incidencia de ITU y la prevalencia de bacteriuria asintomática de acuerdo con la edad y el sexo. La prostatitis crónica es una causa frecuente de infección urinaria recidivante en el varón adulto. A partir de los 50 años la prevalencia de ITU aumenta de forma progresiva en el varón, quizás en relación con patología prostática o manipulaciones del tracto urinario. En la mujer la prevalencia de ITU pasa del 1% en la edad escolar al 5% a la edad de 20 años, epidemiológicamente asociada con el inicio de relaciones sexuales. A partir de los 20 años la prevalencia de ITU en la mujer sigue en aumento, a razón de un 1-2% por cada década de vida, de modo que a los 70 años más del 10% de las mujeres tienen bacteriuria asintomática.

En la mujer postmenopáusica existe una mayor predisposición a la infección urinaria, como resultado del incremento del pH vaginal y la subsiguiente alteración de la flora endógena. El embarazo es un factor de riesgo independiente para el desarrollo de ITU, con una prevalencia de bacteriuria del 4-10% de las mujeres gestantes. Un 20-40% de tales pacientes podrán desarrollar pielonefritis en el embarazo y está bien documentada la relación entre bacteriuria asintomática en la gestación y riesgo de prematuridad, parto pretérmino y posiblemente efectos adversos fetales. Por tanto se recomienda el screening de bacteriuria durante la gestación. En ancianos de ambos sexos afectados de una enfermedad debilitante crónica u hospitalizada, la prevalencia de bacteriuria supera el 25% de la población.<sup>84,90</sup>

Los enfermos portadores de catéteres urinarios tienen un riesgo aumentado de desarrollar ITU, representando una de las infecciones nosocomiales más frecuentes. El paciente con un sistema cerrado por un período superior a 4 días tiene un 10-20% de incidencia de infección, comparado con un 95% cuando el catéter persiste más allá de 30 días.

Un 1% de los enfermos ambulatorios desarrollan ITU tras cateterización única.<sup>91</sup> Finalmente determinadas enfermedades predisponen a una mayor incidencia o severidad de una ITU, tales como diabetes mellitus, trasplante de órgano sólido, granulocitopenia, enfermedad granulomatosa crónica, SIDA y enfermedades neurológicas, en especial lesionados medulares.<sup>85, 92-96</sup>

**Fig. 11.** Incidencia de ITU y prevalencia de la bacteriuria asintomática de acuerdo con edad y sexo (Guzmán D y col.-1997)



### Bacterias causales de Infección Urinaria.

La mayoría de las infecciones del tracto urinario son de tipo bacteriano, aunque también las hay de tipo micótico y viral. El trastorno puede localizarse en vías urinarias bajas o altas, pero el agente causal más frecuente es *E. coli*, seguida por otras enterobacterias, con predominio de microorganismo gramnegativos. La flora normal de la uretra distal está formada por estafilococos coagulasa negativo (con excepción de *Staphylococcus saprophyticus*), difteroides (*Corynebacterium sp*), estreptococos no hemolíticos, *Lactobacillus*, *Mycobacterium smegmatis*, y microorganismos anaerobios. En ocasiones, de forma transitoria, puede encontrarse *E. coli* u otros bacilos gramnegativos.<sup>97-99</sup>

La orina es un excelente medio de crecimiento para muchos microorganismos. Sin embargo la mayoría de las ITU están producidas por un grupo limitado de patógenos y el 95% de las infecciones están producidas por una única especie bacteriana. *E. coli* es el microorganismo responsable de más del 80% de las ITU no complicadas. Las restantes con respecto a la frecuencia más causales están producidas por otras enterobacterias (*Proteus mirabilis*, *Klebsiella sp*) y *S. saprophyticus*. *Proteus mirabilis* es particularmente frecuente en niños varones, al parecer debido a que coloniza el saco prepucial.<sup>84,98,99</sup>

Los cálculos de estruvita o por infección constituyen una amenaza para la integridad del aparato urinario, *Proteus mirabilis* produce una ureasa que descompone la urea en amonio, el cual fija iones H y la orina se alcaliniza, favoreciendo la generación de cálculos de estruvita. *Klebsiella sp* y *S. aureus* pueden también producir ureasa. *S. saprophyticus* es el segundo agente en orden de frecuencia, produciendo un 5-15% de las cistitis agudas no complicadas en la mujer joven, con una incidencia estacional elevada a finales del verano y otoño. Los estreptococos del grupo B causan ITU en recién nacidos y en embarazadas. En el paciente hospitalizado y portador de catéter urinario crónico existe una gran proporción de infecciones por *Proteus*, *Klebsiella* y *Enterobacter spp*, *Pseudomona aeruginosa*, estafilococos y enterococos.<sup>99,100</sup>

### **Patogenia de las Infecciones Urinarias**

En los aspectos patogénicos de las infecciones urinarias se han logrado importantes avances en la definición de los factores de virulencia que incrementa la capacidad infecciosa de las bacterias causales de infecciones urinarias. Y por otro lado se han dedicado al estudio de los factores que originan la susceptibilidad del huésped. Pero lo que determina la patogenicidad de las ITU la compleja interacción de dos aspectos: factores de virulencia dependientes del microorganismo y factores de respuesta dependientes del huésped.<sup>101</sup>

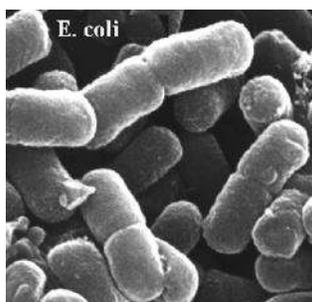
***Vías de Accesibilidad a los Microorganismos.***

El mecanismo habitual de producción de una ITU es el ascenso de gérmenes desde la uretra y tejidos periuretrales a la vejiga (cistitis) y riñón (pielonefritis). Menos de un 3% de los casos de ITU y pielonefritis obedecen a infección hematógena. En condiciones normales la orina y las vías urinarias son estériles. El primer paso en la patogénesis de una ITU es la colonización de la uretra distal y vestíbulo vaginal por microorganismos patógenos. El reservorio de estos gérmenes es el tracto gastrointestinal, debido a la proximidad, en la mujer, del ano a la uretra. En la mujer la uretra es corta y permite el paso de gérmenes hacia la vejiga, en especial durante el coito; en el varón la uretra tiene mayor longitud y junto a las propiedades bactericidas de la secreción prostática se evita el ascenso de microorganismos.<sup>92, 99, 102</sup>

**Propiedades de *E. coli* como Agente Causal más Importante de Sepsis Urinarias**

*Escherichia coli* es un bacilo gram negativo, anaerobio facultativo de la familia Enterobacteriaceae, tribu *Escherichia*. Ver Figura-12 Se le considera un microorganismo de la flora normal, pero hay cepas que pueden ser patógenas y causar daño produciendo diferentes cuadros clínicos. Para determinar el grupo patógeno al que pertenecen se desarrolló un esquema de serotipificación que continuamente varía y que actualmente tiene 176 antígenos somáticos (O), 112 flagelares (H) y 60 capsulares (K).

El antígeno “O” es el responsable del serogrupo; la determinación del antígeno somático y flagelar (O:H) indica el serotipo, el cual en ocasiones se asocia con un cuadro clínico en particular. En base a su mecanismo de patogenicidad y cuadro clínico, las cepas de *E. coli* causantes de diarrea se clasifican en seis grupos. Enterotoxigénica (ETEC), enterohemorrágica también conocidas como productoras de toxina Vero o toxina semejante a Shiga (EHEC o VTEC o STEC), enteroenvasiva (EIEC), enteropatógena (EPEC), nteroagregativa (EAEC) y adherencia difusa (DAEC).<sup>103-105</sup>

**Fig. 12** Imagen electrónica de la morfología de bacterias *Escherichia coli*

(Imágenes obtenidas del Protonic NanoMachine-2005)

**Factores de Virulencia**

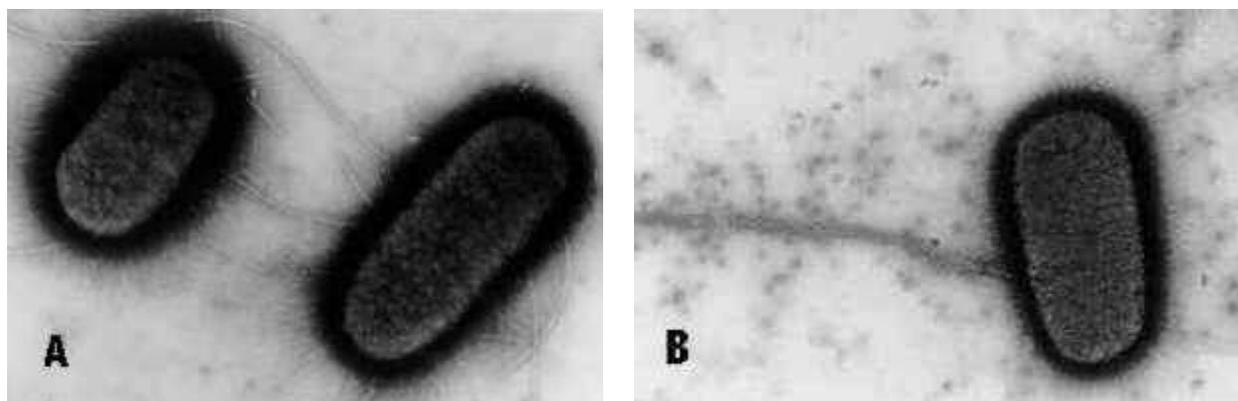
La virulencia se refiere a la capacidad de los microorganismos para causar enfermedad, evaluados por la gravedad de la infección, localización anatómica y complicaciones de la infección. El concepto de la virulencia bacteriana o patogenicidad en el aparato urinario infiere que no todas las especies bacterianas provocan inflamación dentro de estas vías. Las bacterias uropatógenas han desarrollado diversos factores de virulencia para promover la colonización e infección de las vías urinarias. La gama de estos factores abarca el desarrollo de fimbrias con adhesinas en la punta, protectivas, cápsulas bacteriana con lipopolisacáridos y secreción de toxinas, factores de necrosis citotóxicos y como hemolisinas.<sup>101,106</sup>

Existen cepas específicas de *E. Coli* con capacidad potencial para invadir el uroepitelio y causar ITU. Sólo ocho de los más de 170 serotipos de antígeno lipopolisacárido O (O1, O2, O4, O6, O7, O16, O18 y O75) son responsables del 80% de los episodios de pielonefritis aguda comunitaria.<sup>107-111</sup> Estos antígenos somáticos se asocian con los serotipos capsulares K1, K2, K5, K12, K13. Las cepas patógenas también poseen otros factores de virulencia tales como producción de aerobactina (secuestro de hierro) y hemolisina.<sup>85, 94,112</sup> El mecanismo de colonización de *E. coli* más importante está basado en la presencia en el uroepitelio de receptores específicos para la fijación de serotipos del germen provistos de filamentos de naturaleza proteica (*pili* o fimbrias). Ver figura 13. En ciertas bacterias se pueden reconocer dos tipos de apéndices superficiales: los **flagelos** que son órganos de locomoción, y los ***pili*** (Latín: cabellos), conocidos también como ***fimbriae*** (Latín: flecos).

Los flagelos se observan tanto en bacterias Gram positivas como Gram negativas, generalmente en bacilos y raramente en cocos. En contraste los **pili** se observan prácticamente solo en bacterias Gram negativas y solo escasos organismos Gram-positivos los poseen.<sup>113,114</sup> Algunas bacterias poseen tanto flagelos como pili. Las fimbrias, proyecciones filiformes del citoplasma, tienen organelos adhesivos conformados por subunidades proteicas.

Estas se fijan a regiones de glucolípidos y glucoproteínas de las células uroteliales, con lo que la bacteria se adhiere al epitelio y puede persistir dentro del tracto urinario. Se ha estudiado que en células cebadas hay receptores específicos a los que se fija el extremo de la fimbria, mediante la subunidad de adhesina Fimh, para iniciar una reacción inflamatoria por liberación de mediadores inflamatorios.<sup>115</sup>

**Figura. 13.** (A) Microscopía electrónica de células de *Escherichia coli* con tinción negativa mostrando flagelos ondulados y numerosas estructuras, cortas más finas y más rígidas, similares a "cabellos", los *pili*. (B) El largo *pili* sexual de *Escherichia coli* claramente distinguible de los *pili* comunes y más cortos.



(<http://www.biologia.edu.ar/bacterias/micro5.htm-2005>).

Las bacterias gramnegativas, se distinguen, generalmente por su longitud y diámetro. Las fimbrias tipo P son el segundo factor de virulencia más frecuente de las bacterias uropatógenas. Contienen la adhesina papG, que reconocen los glucoesfingolípidos renales<sup>116</sup> De manera importante estas participan en la patogenia de las infecciones ascendentes y en pielonefritis.

Las fimbrias tipo Dr son factores de virulencia que se observan con frecuencia en causas de cistitis en niñas (30-50%) y en embarazos, pielonefritis (30%). Las cepas de *E. coli* que las expresan pueden fijarse e invadir las células epiteliales al interactuar con el factor acelerador de descomposición, que es una proteína reguladora de complemento.<sup>117,118</sup>

En cuanto a las toxinas, con la frecuencia se detectan dos tipos de hemolisina, primero la de tipo alfa. La alfa es producida por muchas cepas de uropatógenos aisladas de pacientes con infección urinaria u otras infecciones gastrointestinales. Es una citolisina formadora de poros que lisa a los eritrocitos mediante la eliminación de los gradientes de iónicos transmembrana. Otra toxina importante es el factor de necrosis citotóxico. In Vitro se ha demostrado que ocasiona lisis celular y así contribuye a la virulencia bacteriana, sin embargo, aún no se ha descubierto una prueba definitiva de la función que cumple esta toxina en el proceso patológico. En la cápsula de *E. coli* uropatógena, se hallan las protectinas (polisacáridos y poli polisacáridos) cuya función de virulencia importante es la de activar vías de señalización que inducen a una reacción inmunitaria en el huésped.<sup>116-118</sup>

Se sabe que la adherencia de las fimbrias a las células del epitelio urinario puede bloquearse en algunos casos con la adición de manosa. Las fimbrias P, a diferencia de otras, son resistentes a la manosa y existe una fuerte asociación entre este tipo de fimbrias y cepas de *E. coli* productoras de pielonefritis, en especial en las formas bacteriémicas.<sup>94,119</sup> Los antígenos del grupo sanguíneo ABO pueden estar relacionados con la adherencia de las fimbrias al epitelio urinario, ya que se ha demostrado que los individuos que tienen anticuerpos contra el antígeno B (grupo A o O) tienen una mayor resistencia a la infección urinaria que los que no tienen los mencionados anticuerpos (grupo B o AB)<sup>120,121</sup>

### ***Factores Defensivos del Humano en el tracto Urinario***

Los factores defensivos del huésped son de crucial importancia en el balance entre esterilidad e infección en el tracto urinario. La interacción entre el vaciamiento de gérmenes durante la micción e integridad de los mecanismos antirreflujo, la presencia de sustancias bacteriostáticas en la orina y los mecanismos de defensa intrínsecos de la mucosa vesical son determinantes en impedir el desarrollo de una ITU. Llegados a este punto es fácil comprender como situaciones en las que el vaciamiento vesical es incompleto (orina residual), el reflujo vesicoureteral, la presencia de cuerpos extraños o litiasis y lesiones inflamatorias preexistentes van a favorecer el establecimiento de una ITU. El descenso del pH urinario, las variaciones amplias de la osmolaridad y, en menor grado, el aumento en la concentración de urea o de ácidos orgánicos, la presencia de proteínas con efecto antibacteriano (lisozima, inmunoglobulina G y A) y los niveles bajos de glucosa afectan negativamente la velocidad de crecimiento de los gérmenes.<sup>99</sup> Otras respuestas innatas son la proteína de de Tamm-Horsfall (HPT), también llamada mucoide, es una proteína que solo sintetiza células del epitelio del asa de henle ascendente y segmento distal. Actúa como factor antiadherente al unirse a las fimbrias de tipo 1 y formar un complejo uromucoide-coliforme que es eliminado por la orina.<sup>116</sup> Las defensinas son un grupo de péptido antimicrobianos con actividad cationico, que tienen la capacidad de matar bacterias, hongos y algunos virus encapsulados. Estas se unen a los fosfolípidos aniónicos de la pared celular de los microorganismos para interrumpir las funciones de su membrana y aumentar la permeabilidad celular hasta causarles la muerte. El urotelio tienen glucolípidos receptores a los que se fijan las fimbrias P; estos receptores sanguíneos P, que incluyen diversos antígenos, como P<sub>1</sub>, P y P<sub>k</sub>. Las fimbrias P, se han demostrado que hemaglutinan a los eritrocitos de individuos con antígenos de tipo sanguíneo P<sub>1</sub> y que la secreción de este aminora la adherencia bacteriana y por lo tanto disminuye la frecuencia de infecciones urinarias.<sup>122</sup> La respuesta inmunitaria se inicia cuando la bacteria hace contacto con las células uroepiteliales. Esta se produce con la interacción entre factores bacterianos, como fimbrias y lipopolisacáridos, y los receptores epiteliales, con lo que se activan diversas vías de señalización. Lipopolisacáridos que son componentes de la pared celular de bacterias gramnegativas, activan varios tipos de células y estimulan al la inmunidad innata.<sup>122</sup>

### **Acción del Sistema Inmune en Respuesta a la Infección del Tracto Urinario.**

Los uropatógenos para crecer y establecer la bacteriuria deben sobrepasar las defensas del tracto urinario. La invasión bacteriana de la mucosa induce el estímulo necesario para que las células epiteliales (uroteliales y del túbulo renal) y el sistema monocito-macrofágico produzcan las citoquinas y otros mediadores de la inflamación.

En un principio se trata de una respuesta inespecífica como es la quimiotaxis de PMN pero posteriormente se producirá la respuesta específica a la infección. La magnitud y la localización de esta respuesta inflamatoria determinan algunos de los cuadros clínicos de la ITU. La severidad de la infección dependerá en cualquier caso de la virulencia del germen. Los pacientes con pielonefritis aguda tienen inflamación de la pelvis y el parénquima renal y se acompañan de una respuesta sistémica generalizada (fiebre, elevación de la proteína C reactiva (CRP) y leucocitos). Se ha especulado aunque no demostrado que la IL-6 podría ser la responsable de la fiebre y la elevación de los reactantes de la fase aguda en pacientes con pielonefritis. <sup>92, 119, 123,124</sup>

Hasta en un 30% de los casos las bacterias responsables de las ITU invaden a través de la mucosa el sistema vascular renal y causar bacteriemias. Se ha observado que el efecto de las citocinas quimiotácticas como la IL-8 que atraen a los PMN a la superficie de la mucosa e inducen su proliferación condicional un descenso de la bacteriuria. La respuesta inflamatoria está directamente implicada en la eliminación de las bacterias desde los riñones. <sup>125</sup>

### **Mecanismos de Respuesta Inflamatoria en la Infección del Tracto Urinario.**

En los últimos años, se empiezan a esclarecer los mecanismos íntimos que median la inflamación en el tracto urinario. La información de la que se dispone respecto a las propiedades bacterianas implicadas en este proceso, la naturaleza de los mediadores de la inflamación y las consecuencias funcionales de la respuesta inflamatoria, en cualquier caso, aún es incompleta. Se conoce, por ejemplo que las bacterias pueden activar directamente a las células epiteliales del tracto urinario, a inducir a los mediadores de la inflamación y que estos a su vez activan la cascada inflamatoria.

Las citocinas son los mediadores detectados en primer lugar en la respuesta celular. La constatación de que la ITU se acompaña de activación en la producción de citocinas por las células epiteliales del TU se evidenció en un modelo experimental de ITU en el ratón y posteriormente en pacientes que habían sido diagnosticados de ITU por *E. coli*. Estudios in Vitro utilizando líneas celulares demuestran la síntesis de novo de IL-8 e IL6 pero no de IL-1a-b, TNFa o mRNA. Los niveles de citocinas detectados en el plasma son mínimos en comparación con la orina lo cual indica la existencia de la producción local de citocinas por el tracto urinario.<sup>126, 127</sup>

La respuesta en la producción de citocinas se ha demostrado que ocurre tanto en niños como en adultos, aunque con diferencias apreciables dependiendo del tipo y localización de la infección en el tracto urinario. La más importante ha sido la elevación de la IL6. Se han observado niveles altos de IL6 en la orina de niños con ITU febril, pero no en los niños con bacteriuria asintomática o con fiebre de otro origen.

Altos niveles de IL6 se detectaron en niños que presentaban reflujo y cicatrices renales. En adultos, también se han determinado niveles elevados de IL6 en orina de pacientes con pielonefritis aguda y bacteriuria asintomática.<sup>100, 119,128</sup> Además de la IL-6 en la ITU, también se activa la síntesis y la excreción de la IL8. En ensayos con voluntarios con ITU, por *E. coli* se observó la presencia de IL-8 en la orina en las primeras las horas de la infección pero no en el suero.<sup>129</sup>

En estudios realizados en pacientes con pielonefritis aguda o con bacteriuria asintomática la IL-8 estuvo elevada en la orina de aquellos que presentaban piuria. También se observó en este estudio que los niveles urinarios de IL8 no dependen de la de la especie bacteriana causante de la infección.<sup>107, 130</sup>

## **Resistencia a los Antimicrobianos**

Además de la diversidad de microorganismos que causan infecciones urinarias y los distintos mecanismos de persistencia bacteriana, la atención y tratamiento de estas afecciones se complica por el desarrollo de resistencia bacteriana a los antimicrobianos.

En gran parte, el problema de la resistencia bacteriana se ha debido al empleo inadecuado de antimicrobianos o de antimicrobianos inadecuados. A este respecto se debe tomar en cuenta que los informes de resistencia difieren entre naciones pobres y ricas, europeas y americanas y aun entre regiones de un mismo país.

Pese a que los antimicrobianos se han usado en la práctica clínica desde el año 1935, al avance en la comprensión de sus mecanismos de acción y formas de utilización y al desarrollo de numerosas familias de antibacterianos, la incidencia de sepsis continúa en aumento. Por otra parte, la tasa de mortalidad por sepsis no ha disminuido significativamente aún cuando las técnicas de soporte vital implementadas en las Unidades de Cuidados Intensivos (UCI) han experimentado notables progresos. La escasez de terapias efectivas para detener los mecanismos de la respuesta inflamatoria sistémica gatillados por las infecciones severas lleva, en un alto porcentaje de los casos, al fracaso de la terapia antimicrobiana y de soporte vital.

De allí que el uso adecuado y oportuno de antimicrobianos continúa siendo el pilar fundamental del manejo de las infecciones graves en UCI.<sup>117,131, 132,133</sup> La selección del antibiótico correcto exige conocer la bacteria responsable de la enfermedad del paciente. El diagnóstico bacteriológico requiere el aislamiento de la bacteria y el estudio de su sensibilidad o resistencia frente a los antibióticos tabla 2.<sup>134</sup>

La resistencia bacteriana es un tema muy importante en el estudio de los antibióticos, porque su comprobación implica el fracaso de la terapéutica. El aumento del uso de antibióticos desde la década de 1940 se ha acompañado del alza creciente en la resistencia, cuya principal causa es la destrucción del antibiótico por la bacteria responsable de la infección.<sup>135,136</sup>

Aunque constantemente salen al mercado nuevos antimicrobianos para combatir la resistencia, las bacterias han sido capaces de desarrollar defensas más efectivas contra los antibióticos más nuevos y poderosos. La producción de  $\beta$ -lactamasas es el medio más importante de resistencia a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos y, en la actualidad, hay varias clases de esta enzima de origen bacteriano.<sup>135, 136</sup> La terapia antibiótica ha conducido a una prolongación dramática en la expectativa y calidad de vida.

Los avances en la medicina moderna han reducido la morbimortalidad de numerosos padecimientos, en especial de las enfermedades infecciosas. En contraste, ha ocurrido una selección de cepas bacterianas que fortalecen sus genes de resistencia a la mayoría de antibióticos. El valor terapéutico de los antibióticos ha estado en evolución a través de los años, de país en país, o incluso de unidad en unidad dentro de una institución.<sup>100, 136</sup>

Las características mismas de los microorganismos hacen que la lucha contra ellos se haya convertido en una carrera donde se ha tenido la necesidad de emplear todo tipo de estrategias, desde las convencionales como la búsqueda de compuestos nuevos con mayor actividad biológica, hasta el diseño de moléculas nuevas mediante procedimientos de biotecnología, pasando por combinaciones de antimicrobianos.<sup>136-138</sup>

Quienes trabajan en unidades de cuidados intensivos (UCI), saben bien que el uso de antibióticos en muchas ocasiones, no sigue los esquemas tradicionales sino que acuden a su propia experiencia, basada en distintas variables a saber: enfermo, ambiente y gérmenes infecciosos que se mueven en la unidad.<sup>138,139</sup> Las infecciones intrahospitalarias (IIH) que originan los organismos resistentes tienen un gran impacto sobre los enfermos, pues resultan en mayor mortalidad o en tratamientos y hospitalizaciones más prolongados y, por tanto, en alza de los costos.<sup>136,140</sup> Tarde o temprano las bacterias se hacen resistentes en la práctica a todos los compuestos antimicrobianos.<sup>141,142</sup>

**Tabla 2.** Porcentaje de Resistencia de las bacterias aisladas con mayor frecuencia, en pacientes externos y hospitalizados.

Agente anti-microbiano	<i>Escherichia coli</i>		<i>Proteus spp.</i>		<i>Klebsiella spp.</i>	
	Ext	Int	Ext	Int	Ext	Int
Amoxicilina	42.6	43.6	39.2	42.1	70.7	81.4
Ampicilina	40.2	42.4	27.6	29.9	43.9	55.7
Cefalexina	1.5	1.5	1.9	2.9	14.6	27.9
Gentamicina	6.7	12.8	31.4	42.3	41.5	67.4
Amikacina	4.1	5.7	15.7	19.6	29.2	48.8
Ciprofloxacina	0.8	1.1	0	0	4.9	11.6
SXT	29.5	32.1	25.7	31.1	43.9	69.8
Ácido pipemídico	0.6	4.2	0	0	2.4	
Piperacilina	11.2	21.7	17.6	22.4	39.1	44.2
Nitrofurantoina	0	1.1	0	0	0	2.3

SXT: sulfametoxazol-trimetoprim

(Refen-Raka L 2004)

Esto tiene muchas consecuencias. Los individuos infectados con gérmenes resistentes, tienen más probabilidad de necesitar hospitalización, hacer estancias hospitalarias mayores y presentan más probabilidades de muerte que los infectados por organismos sensibles.<sup>137</sup> La resistencia también lleva el uso de drogas más tóxicas o más caras.<sup>140,141</sup>

El problema se complica cuando una bacteria resistente a uno o varios antibióticos son expuestos a otra droga, pues se crea la oportunidad de seleccionar un mutante que resiste al nuevo antibiótico. Así, los organismos resistentes a los más nuevos antibióticos, a menudo también lo son a los antiguos compuestos, y se llega a la tan temida multirresistencia. En las infecciones bacterianas agudas se debe iniciar a menudo la terapéutica con antibióticos antes de conocer los resultados de los cultivos y los de las pruebas de susceptibilidad.<sup>141</sup>

En general, es posible hacer una elección estadísticamente efectiva de drogas, que se base en frotis, en los probables gérmenes vinculados con el proceso infeccioso y en el modelo posible de susceptibilidad de los patógenos. Se debe recordar que los modelos de susceptibilidad pueden variar mucho de un hospital a otro y aun de una sala a otra dentro del mismo hospital, en particular para los bacilos Gram negativos.

Por tanto, incumbe al médico familiarizarse con los modelos de susceptibilidad de los microorganismos comunes en el medio hospitalario o comunitario en que actúa.<sup>143</sup> En la tabla 3 se presentan los porcentajes de sensibilidad de los microorganismos gram negativos y gram positivos a los antimicrobianos más utilizados en el tratamiento de las infecciones urinarias.<sup>98,144</sup>

**Tabla 3.** Porcentaje de Sensibilidad por concentración inhibitoria mínima ( $\mu\text{g/mL}$ ) de microorganismos aislados de Orina. (98)

	n cepas	Amp <16	Amp/Sul <16/8	Cefaz <16	Cefur <16	Genta <4	Cotri <2/38	Cipro <4	Nitro <64	Pipem <32	
Bacilos Gram Negativos	<i>E. coli</i>	5486	45	61	97	97	95	61	92	98	91
	<i>P. mirabilis</i>	535	68	85	87	93	85	77	92	79	89
	<i>K. pneumoniae</i>	462	6	51	86	83	93	81	91	64	86
	<i>K. oxytoca</i>	93	17	60	79	81	95	79	96	84	96
	<i>E. cloacae</i>	76	24	34	11	73	96	89	96	73	95
	<i>P. vulgaris</i>	75	13	63	31	36	93	75	93	85	89
	<i>P. aeruginosa</i>	65	2	6	6	8	62	11	75	3	60
Cocáceas Gram Positivas	<i>C. freundii</i>	64	29	53	23	66	84	64	83	88	77
	Enterococcus	328	98	9	75	17	50	94	87	100	12
	<i>S. coagulans</i> (-)	290	84	88	93	88	79	80	81	100	71
	<i>S. aureus</i>	68	51	60	59	56	56	76	54	99	43

Ampicilina (Amp) Ampicilina/Sulbactam (Amp/Sul), Cefazolina (cefaz), Cefuroxima (Cefur), Gentamicina (Genta), Clotrimoxazol (Cotri), Ciprofloxacino (Cipro), Nitrofurantoina (Nitro) A. pipemídico (Pipem).

La flora intrahospitalaria difiere de la comunitaria, en que consiste sobre todo de gérmenes multirresistentes que se han seleccionado por diversos factores ecológicos, entre los que se destaca el uso correcto o no de múltiples antibióticos con fines terapéuticos o profilácticos.

El paciente hospitalizado, y sobre todo el recluso en la UCI, tiende a modificar su flora endógena debido a la colonización por microorganismos propios de la flora nosocomial, de gran potencialidad patogénica. La trasgresión iatrogénica de las barreras naturales de defensa, que va desde ejemplos como el uso de sondas vesicales, y otros instrumentos urológicos, catéteres intravasculares, dispositivos de asistencia respiratoria.<sup>145,146</sup> hasta los menos conocidos como las modificaciones del pH gástrico con el fin de evitar el sangrado digestivo por estrés y, sin duda, la hospitalización prolongada, son algunos de los factores que se destacan en la patogenia de este tipo de infecciones.<sup>136, 141,146</sup>

Por lo tanto los antimicrobianos tradicionalmente empleados para tratar estas infecciones urinarias han sido trimetoprim-sulfametoxazol, amoxicilina y ampicilina, pero el notable desarrollo de estos patógenos que se vuelven resistentes a estos fármacos hace necesario dejar de usarlos como fármacos de primera línea.

En estudios en Estados Unidos (O' Donnell, et al. y Wrigth, et al.), Suecia (André, et al. y Strandberg, et al.), Canadá (Zahanel, et al.), Kosovo (Raka, et al.) y la India (Mathai, et al.) Encontraron que la utilidad de estos antimicrobianos ha disminuido por el desarrollo de resistencia de las bacterias y que cada vez son menos sensibles a tales medicamentos.<sup>81,142, 144,147-150</sup> En resumen, la mejor arma en contra de las infecciones intrahospitalarias es la prevención, hace un siglo<sup>151,152</sup>, se demostró la importancia del lavado de las manos para prevenir la transmisión de infecciones de una paciente a otra, en un centro obstétrico en Viena, son muchos los estudios que prueban que las manos son transmisores potenciales de bacterias con resistencia bacteriana múltiple y que, en consecuencia, el peligro de las IIH con cepas resistentes a diversos antibióticos puede disminuir con el lavado rutinario de las manos. Igualmente efectiva es la prevención cuando se mejoran las normas de higiene y se aplican técnicas correctas de esterilización y de aislamiento de los pacientes que lo requieran y asepsia y antisepsia en las técnicas y procedimientos medicoquirúrgicos al igual que con la selección adecuada de antibióticos profilácticos o terapéuticos.<sup>153,154</sup>

Es importante caracterizar la infección del tracto urinario, ya que si su manejo no es adecuado puede afectar la calidad de vida a futuro. Por ello es importante enfatizar que el diagnóstico de ITU debe tener un fundamento microbiológico y que para la selección de los antimicrobianos se deben considerar además de la susceptibilidad *in Vitro*, factores de riesgo como: edad, sexo, origen nosocomial, eficacia clínica demostrada, facilidad de administración, baja toxicidad y costo razonable, para citar los de mayor importancia.<sup>155</sup>

## Control de las infecciones del tracto urinario mediante el uso y diseño de vacunas

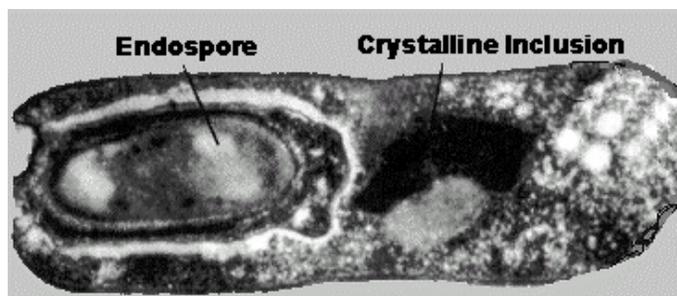
Desde el inicio de la era antibiótica, las infecciones del tracto urinario han sido tratadas con relativo éxito. No obstante, la aparición de cepas resistentes ha motivado la búsqueda, desde hace algo más de una década, de nuevos métodos que permitan, primero prevenir la aparición de la infección, o en su defecto tratar de una manera más eficaz y económica a estas pacientes.<sup>156-158</sup>

Las bacterias que colonizan el tracto urinario, incluida *E. coli*, el más frecuente de los patógenos a este nivel, poseen pili que les confieren la patogenicidad, al permitirles adherirse al epitelio. Basados en este hecho los científicos habían centrado sus esfuerzos en el desarrollo de vacunas que permitiesen bloquear la unión de la bacteria al epitelio, mediante la generación de anticuerpos específicos.<sup>159,160</sup> Desde mediados de la década de los 80, investigadores europeos crearon, a partir de un conjugado de microorganismos patógenos del tracto urinario, una vacuna que sólo confirió protección temporal, pero que, además, producía gran inflamación y dolor en el sitio de la inyección. Para evitar el efecto imitativo, de la forma inyectable, en pacientes femeninos diseñaron óvulos vaginales. Los resultados preliminares fueron alentadores en cuanto a la respuesta del sistema inmune y la prevención del efecto irritativo, pero no así en lo referente a la duración del efecto protector. (Science, abril, 1997). En un reciente informe publicado en la prestigiosa revista Science, investigadores de la Universidad de Washington, en la ciudad de San Luís, Estados Unidos, en cooperación con la compañía MED Immune, anuncian la producción de una nueva vacuna, que estimula la respuesta inmunitaria, con base, no en la antigenicidad global al pili bacteriano, sino contra uno de sus componentes proteínicos, denominado filamento H.<sup>161</sup> Este enfoque evita, por otra parte, exponer al sistema inmune a todo la carga antigénica representada por los microorganismos o el pili completo, que además de no producir una respuesta inmune satisfactoria, es causa de efectos indeseables, tanto locales como sistémicos. Esta significativa conquista, dada por el diseño de vacunas basadas en moléculas de adhesión, abre enormes posibilidades para la creación de otros preparados similares, que permitan combatir infecciones por otros agentes patógenos que expresan adhesinas a nivel de los pili, como es el caso de *H. influenzae*, *K. pneumoniae*, *N. meningitidis* y *N. gonorrhoeae*.<sup>161,162</sup>

### ***Bacillus thuringiensis* (Bt) y Toxina CryIAc**

*Bt* es una especie bacteriana gram positiva aerobia estricta. Comparte las mismas características bioquímicas y fenotípicas con *Bacillus cereus* y *Bacillus anthraxis*, aunque por definición *B. thuringiensis* se caracteriza por la presencia de inclusiones cristalinas formadas durante su esporulación (Fig. 14).<sup>163-165</sup> Estas tres especies bacterianas, durante su ciclo de vida, presentan dos fases principales, la fase de crecimiento vegetativo, en donde las bacterias se duplican por bipartición cada 30.90 min. Dependiendo del medio de cultivo, y la fase de esporulación, en la cual se establece un programa de diferenciación de bacteria a espora.<sup>166-169</sup> *B. thuringiensis* pertenece a la familia *Bacillaceae*, y presenta células vegetativas en forma de bastoncillos más o menos largos, agrupados en cadenas de 2 a 3 células. Son Gram +, aerobias y esporógenas, durante su cultivo y asociadas a la formación de esporas, se forman cuerpos parasporales en forma de cristales que tienen efecto insecticida y se conocen como delta endotoxinas.<sup>169-172</sup>

**Fig. 14. Microfotografía de un *Bacillus thuringiensis* con espora y cristal, microscopio Electrónico de transmisión.**



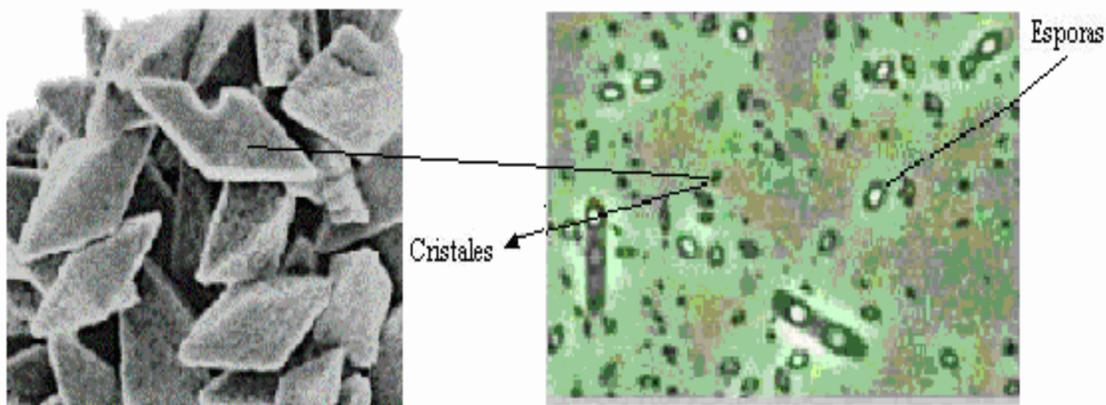
(Waheed I. Bajwa & Marcos Kogan-2001)

Cepas de *B. thuringiensis* han sido aisladas de diferentes hábitat del mundo, incluyendo suelo, superficies de plantas, cadáveres de insectos y polvo de productos almacenados.

El segundo hábitat, después del suelo, donde más comúnmente se han aislado cepas de *B. thuringiensis*, es de hojas de plantas y almacenes de granos. Se han aislado, principalmente, cepas con actividad para cierto orden de insectos en hábitat poblados en su mayoría por dicho orden.<sup>171-173</sup>

A *Bacillus thuringiensis*. se le diferencia de *B. cereus* y *B. anthracis* por su capacidad para producir en el citoplasma, durante la esporulación, protoxinas, en forma de cristales. Figura 15. Dicho cuerpo paraesporal también es conocido como proteínas Cry y Cyt, tienen propiedades insecticidas, usadas en agricultura. <sup>174-178</sup>

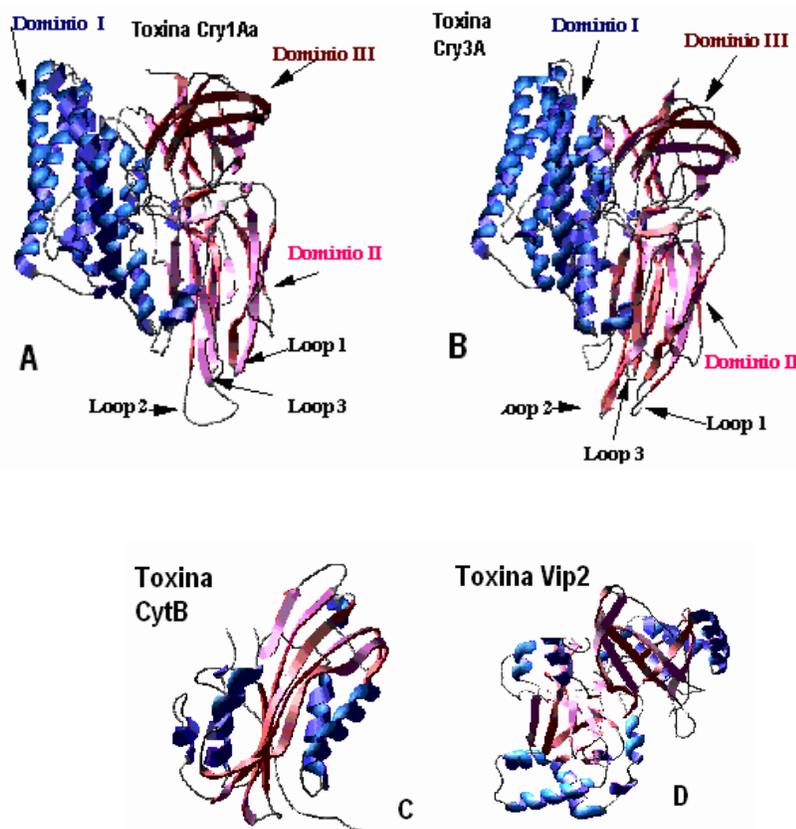
**Figura 15.** Se pueden ver cristales y esporas de *Bacillus thuringiensis*



(A. Aedes, Culex -1977 and B. Electron Micrograph of Purified Crystalline-Bajwa & Kogan -2001)

Un gran número de estas protoxinas se han clonado y los productos de sus genes han mostrado un amplio espectro insecticida. La clasificación subespecífica de Bt se ha realizado mediante enfoques comparativos entre la estructura primaria de las diferentes proteínas Cry y a partir de ensayos serológicos, bioquímicos y toxicológicos Fig. 16. Una de las clasificaciones mejor conocidas de las toxinas Cry está basada en su toxicidad selectiva sobre insectos y especificidad del insecto que intoxican. Tabla 4. <sup>171, 175, 179,180</sup>

**Fig. 16.** Estructura tridimensional de proteínas insecticidas producidas por *Bacillus thuringiensis*.  
A. Toxina Cry1Aa. B. Toxina Cry3A. C. Toxina CytB. D. Toxina Vip2



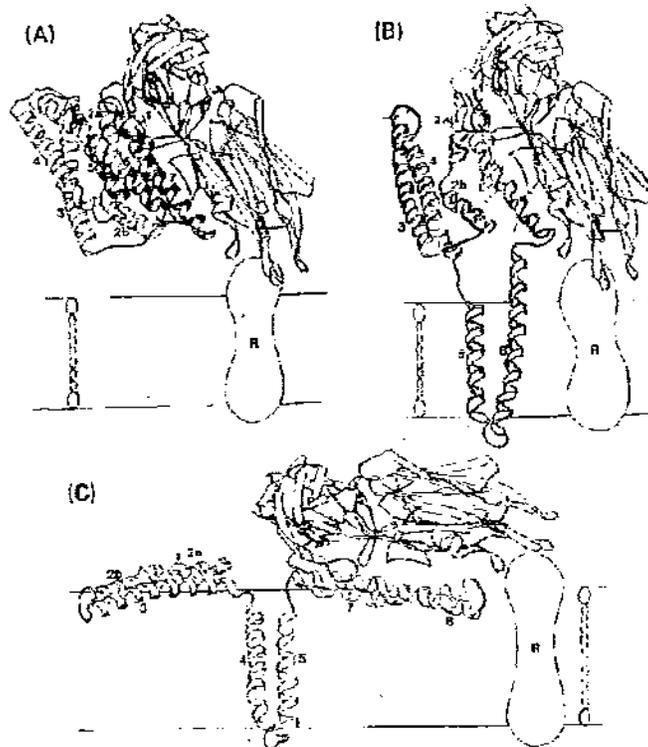
([http://www.susx.ac.uk/ and users/bafnG/bt/index/imagen.html-2005](http://www.susx.ac.uk/and_users/bafnG/bt/index/imagen.html-2005)).

*B. thuringiensis* es capaz de producir diferentes toxinas. Además de las Delta-endotoxinas, (Bt) ha desarrollado una serie de factores de virulencia que le permiten infectar a sus blancos con mayor eficiencia. Entre estos factores de virulencia se encuentra: fosfolipasas, proteasas, quitinasas, alfa-exotoxinas o exotoxinas termolabiles, las beta-exotoxinas, las cuales son toxinas que funcionan como análogos de ATP las cuales actúan sobre la membrana peritrófica de células de insectos; proteínas insecticidas vegetativas (VIPs), con actividad insecticida;  $\beta$ -exotoxinas (thuringiensina), las cuales tienen toxicidad contra insectos y hacia mamíferos; hemolisinas, lisan eritrocitos de vertebrados; enterotoxinas que pueden causar diarrea; y  $\delta$ -endotoxinas (proteínas Cry y proteínas Cyt), que exhiben actividad insecticida. Ver tabla 4 <sup>169, 173, 181</sup>

### Modo de acción en los insectos diana

Es preciso que las larvas de los insectos susceptibles ingieran Bt esporulado o con complejos spora-cristal. La eficacia de la protoxina depende de su solubilización en el intestino medio, de la conversión de la protoxina en la toxina biológicamente activa por la acción de enzimas proteolíticas, de la unión específica del dominio C-terminal de la toxina activa al receptor de membrana y de la formación de poros por parte del dominio N-terminal Figura 17. La especificidad de la delta endotoxina a un tipo de insecto en particular implica la presencia de receptores específicos, la toxina se inserta de forma irreversible a la membrana plasmática de las células intestinales y el próximo paso es la formación de un poro o lesión en esta membrana que conduce a una variación en su permeabilidad, alterando el transporte de los iones de potasio, lo cual trae como consecuencia la tisis celular, disrupción de la integridad del intestino y la muerte del insecto. Por otra parte, las esporas bacterianas se multiplican en la hemolinfa y provocan una septicemia que incrementa el efecto de las toxinas insecticidas.<sup>174,182, 183</sup>

Fig. 17. Inserción de toxinas Cry en la membrana



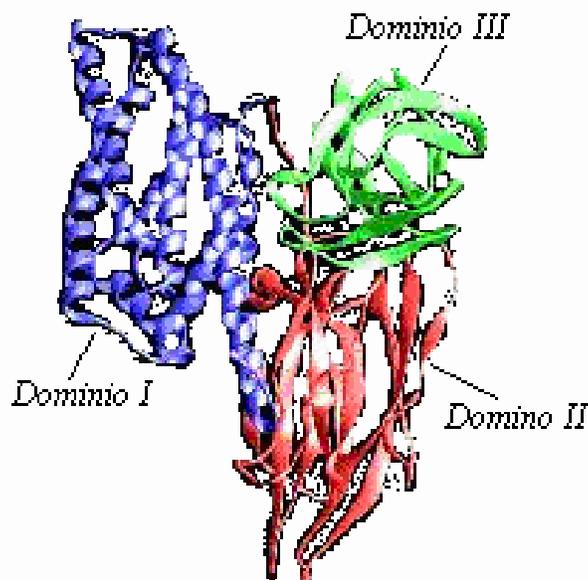
(Modelos de Knowles 1994)

### $\delta$ -Endotoxinas (proteínas Cry)

En la esporulación, la mayoría de las cepas de *B. thuringiensis* producen cuerpos de inclusión que contienen las  $\delta$ -endotoxinas insecticidas (proteínas Cry). Figura 18. La inclusión de una nueva  $\delta$ -endotoxina Cry en este grupo, dependerá del cumplimiento de algunas características, como es su acumulación en la célula como un cuerpo de inclusión parasporal y con actividad tóxica frente a algún organismo, o bien que muestre homología a nivel de secuencia con alguna de las proteínas Cry existentes. Las inclusiones cristalinas están compuestas de protoxinas monoméricas. La degradación de la inclusión por enzimas proteolíticas libera las pequeñas proteínas tóxicas ( $\delta$ -endotoxinas). Estas varían entre cepas, pero en la mayoría de los casos las cepas producen inclusiones alojadas en el compartimiento de la célula madre conteniendo una mezcla de  $\delta$ -endotoxinas.<sup>178, 181, 184, 185</sup>

El espectro de actividad insecticida dentro de las cepas de *B. thuringiensis* está caracterizado principalmente por tres patotipos: contra los órdenes Lepidoptera, Díptera y Coleóptero.<sup>186, 187</sup> En la figura 18 se observa una imagen digital de la estructura de la  $\delta$ -endotoxina.

Fig. 18 delta-endotoxina de *Bacillus thuringiensis*



[http://www.nal.usda.gov/bic/BTTOX/cry3a\\_side.gif](http://www.nal.usda.gov/bic/BTTOX/cry3a_side.gif)

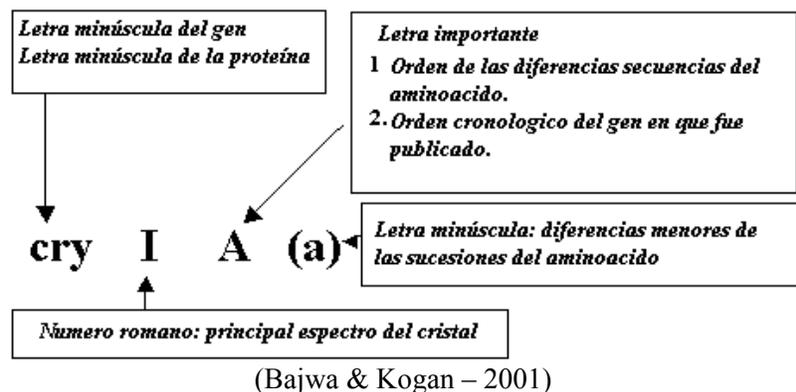
A la fecha las proteínas Cry están agrupadas en 28 grupos y varios subgrupos y la proteína Cyt en dos grandes grupos y varios subgrupos. En la dirección de Internet (<http://www.biols.susx.ac.uk/home/neil-Crickmore/Bt/>) se encuentran los números de acceso al GenBank y las referencias de cada proteína Cry y Cyt.

El número arábigo se designa con la primera fila que corresponde hasta 45% de identidad. La segunda hilera cataloga a las proteínas con una letra mayúscula y corresponde a identidades de 45 a 78%. La tercera fila asigna una letra minúscula y corresponde a una identidad de 78 a 95%. La última fila incluye un número arábigo al final de la nomenclatura indicando más de 95% de identidad fig.19 Es importante señalar que el análisis filogenético de algunos grupos de secuencias tienen distancias infinitas, lo que indica que estas secuencias eran muy diferentes y por lo tanto fueron tratadas como grupos independientes. Tal es el caso de las toxinas Cyt, Cry6, Cry15 y Cry22. <sup>169, 174, 185,187</sup>

Fig. 19 Identidad filogenético de las toxinas Cry y Cyt (Bt)

### Gen ICP y Nomenclatura de la Proteína

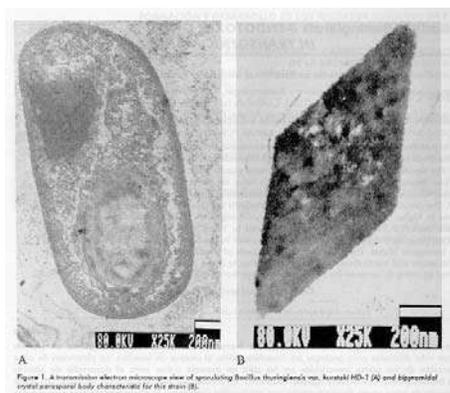
*Cry1A (c) - An ICP gen - Crystal Proteína.*



Dependiendo de su composición de protoxinas, los cristales tienen diferentes morfologías; Las bacterias del patotipo I, con actividad tóxica frente al orden Lepidóptero, se caracterizan en su mayoría por la presencia de un cristal bipiramidal, el cual está constituido por proteínas de peso molecular de 125 a 140 kDa.

Este cristal puede estar formado por diferentes tipos de proteínas, como es el caso de la cepa HD-1 (*B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*), cuyo cristal lo conforman las proteínas Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Ac de 133,2; 131,0 y 133,3 kDa, respectivamente, o bien por un solo tipo, como en la cepa HD-73 (*B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*) cuya proteína es la Cry1Ac figura 20.<sup>165,175, 188</sup>

**Fig. 20.** Transmisión electro microscópica del cuerpo de paraesporal *del Bacillus thuringiensis* y de la característica del cristal bipyramidal.



(Ribeiro BM. 1998/ <http://www.biochemsoctans.org.Lbst/lf03.htm>)

Es común encontrar la presencia de un cristal cúbico asociado o incluido en el cristal bipyramidal. Las proteínas que constituyen este cristal son denominadas Cry2 y están en el rango de 65-71 kDa, presentando una actividad dual contra lepidópteros y dípteros.

El patotipo II con actividad tóxica contra mosquitos y jejenes está representado por una inclusión amorfa o semiesférica, constituida por 4 proteínas con pesos moleculares de 27, 72, 128 y 135 kDa.<sup>175</sup>

Finalmente, las bacterias del patotipo III presentan actividad tóxica contra el orden Coleóptero y muestran un cristal en forma de cojinete o cuadrado aplanado, el cual está formado por proteínas de aproximadamente 70 kDa.

Se han reportado otros tipos de proteínas que poseen un tamaño de 129 kDa y un cristal de forma bipyramidal, las cuales también son tóxicas a coleópteros.<sup>190,191</sup> Por otra parte, también se ha reportado la existencia de una proteína insecticida de 80 kDa la cual es tóxica tanto a coleópteros como a lepidópteros.<sup>192</sup>

**Tabla 4.** Clasificación de las  $\delta$ - endotoxinas de *Bacillus thuringiensis*.

Gen	Especificidad	Forma del Cristal	Medida de la Proteína
Cry I	Lepidópteros (mariposas)	Bipiramidal	130 -138 kD
Cry II	Lepidópteros y Dípteros (mosquitos)	Cuboidal	69 -71 kD
Cry III	Coleópteros (escarabajos)	Irregular	73 -74 kD
Cry IV	Dípteros	Bipiramidal	73 – 134 kD
Cry V - IX	Variedad-nemátodos	Variedad	35 – 129 kD

### Dominios de la toxina activada (Cry1Ac)

La mayor parte de las proteínas Cry se producen como protoxinas, que para ser activas deben ser procesadas por las proteasas del intestino medio de los insectos liberando el fragmento tóxico. Puede generalizarse que el procesamiento típico de las toxinas Cry1 se da por el corte de los primeros veintiocho residuos del extremo N- Terminal en un sitio conservado y de los últimos 500 residuos del extremo C-Terminal, que dando de esta forma un fragmento resistente a proteasas de entre 55 y 65 kDa que se le denomina “toxina”.

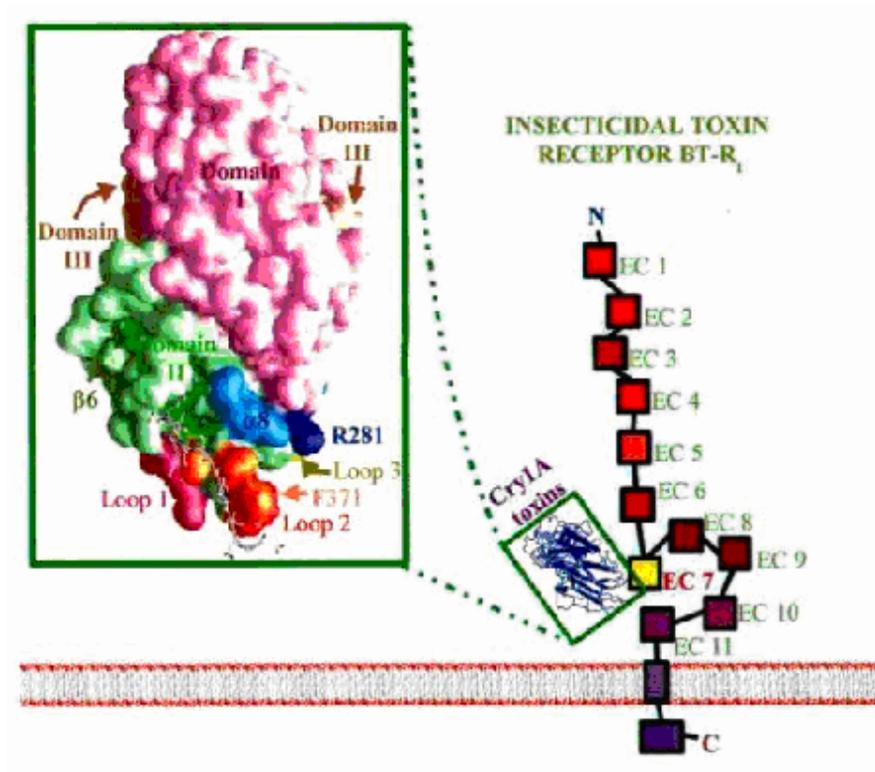
La estructura tridimensional determinada por difracción de rayos X de la porción tóxica de las proteínas Cry, han revelado que estas moléculas están organizadas en tres dominios. (Fig. 21).<sup>169</sup> Dominios I (N - ter. 220 residuos): Dominio formador Del canal. Es un complejo de 7  $\alpha$ -hélices, donde la hélice 5 (hidrófoba) está rodeada por las otras 6  $\alpha$ -hélices que son antipáticas y suficientemente largas para atravesar la bicapa lipídica de la membrana de la célula de l intestino medio del insecto.

Dominio II (central, 200 residuos): Está formado por tres láminas  $\beta$ - antiparalelas alrededor de un centro hidrófobo que terminan en asa (“loops 1, 2 y 2”) en el vértice de la molécula formando un prisma. Este dominio determina la especificidad del receptor, mediante la unión con el receptor de membrana y posee alta similitud en la topología con algunas proteínas de unión a carbohidratos.

Dominio III (C-ter. 150 residuo): Está menos definida funcionalmente, Es un complejo  $\beta$ -sándwich, de dos laminas  $\beta$ -plegadas antiparalelas arregladas en forma de emparedado una sobre otra, se piensa que transduce información desde el dominio II (de unión al receptor) hasta el dominio I (dominio de formación del canal).

Además, parece que regula la actividad del canal, estabiliza la toxina y funciona junto al dominio II en la formación del canal. En resumen, los dominios II y III parecen ser responsables de la primera unión toxina-receptor, así como en la determinación de la especificidad de unión (Fig. 21) <sup>169, 181, 184,185</sup>

**Figura 21.** Unión de los dominios de la Toxina Cry1Ac en la membrana celular.



## Secuencia Estructural de la Toxina Cry1Ac.

Para la clasificación del Bt se han usado varios métodos. Los primeros se basaron en la caracterización morfológica y bioquímica, utilizando técnicas convencionales. Más tarde se desarrollaron esquemas de clasificación basados en el análisis serológico de antígenos flagelares (antígeno H) de células vegetativas.

Se introdujo además el criterio de patrones electroforéticos de esterases y de patrones plasmídicos dada la presencia de plásmidos como portadores de los genes que codifican para las toxinas cristalíferas.<sup>181,184</sup>

El análisis de ácidos grasos se ha utilizado para la separación de cepas. Al final, la genética molecular permitió la clasificación de *B. thuringiensis*, ya que se demostró que los genes que codifican para la toxina cristal, los cuales están localizados en plásmidos, tienen una correlación estrecha con la toxicidad fenotípica.

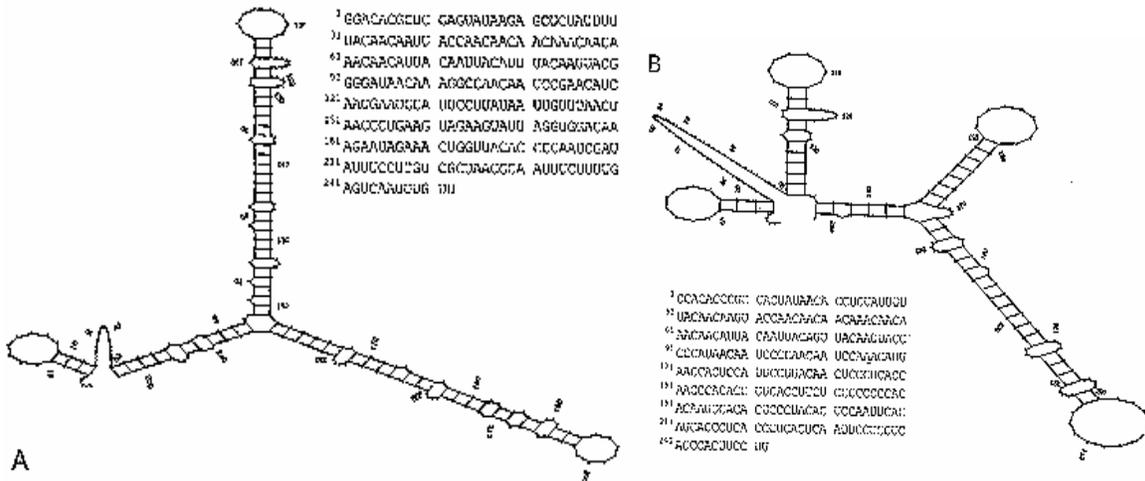
La clasificación por antígenos flagelares aún es útil, y hasta el momento se han logrado identificar 55 serotipos. Esta clasificación no permite correlacionar la cepa con la actividad patogénica, la cual está determinada por el tipo de delta endotoxina. La clasificación basada en los genes que codifican estas toxinas, a los cuales se denominan genes CRY, están basados en cinco grupos fundamentales, de los cuales se han caracterizado varias decenas de subgrupos que permiten establecer una correlación con la actividad insecticida.<sup>185, 188,191</sup>

La clonación y expresión de los genes que codifican las delta- endotoxinas de *Bacillus thuringiensis* en plantas transgénicas han sido utilizadas para proteger las cosechas contra el ataque de insectos. Estos estudios han estimulado el desarrollo de técnicas moleculares para caracterizar de manera fácil y rápida los genes cry presentes en los aislamientos de *B. thuringiensis*. Las técnicas basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) han sido las más utilizadas en los últimos años, permitiendo la determinación precisa de los genes cry. La identificación de genes cry conocidos en las cepas de *B. thuringiensis* es muy importante porque pueden contribuir a la selección de nuevos aislamientos y a la determinación de la especificidad.

La delta endotoxina se produce durante la fase de crecimiento exponencial por algunas variedades de *B. thuringiensis*. Esta fue descubierta por Cantwell y colaboradores al inyectar el sobrenadante esterilizado de un cultivo de *B. thuringiensis* en el hemocele del último instar larvario de *Gallería mellonella*. Su aislamiento y caracterización fue realizado por De Barjac y Dedonder entre 1965 y 1968 y en estudios posteriores utilizando resonancia magnética nuclear se corroboró su peso molecular aproximado de 700 kDa y su estructura química, la cual fue definida como un derivado nucleotídico de adenina unido por una molécula de glucosa a un ácido fosfoalárico figura 22 y grafica B.

Una característica de este compuesto sobre la base de su estructura química es su espectro de absorción ultravioleta, el cual presenta una absorción máxima a 260 nm y una absorbancia mínima a 230 nm.<sup>188,193-196</sup>

**Figure 22.** La estructura en horquilla del mRNA, forma típica de *CryIA(c)* (A) y Gen modificado de *CryIA(c)* (B)



*Estructura típica secundaria del mRNA (A) es un caso favorable para las etapas iniciales de traducción, incluso de la asociación de las subunidades del ribosoma 40S y 60S que forma los 80S ribosomas. La translocación del ribosoma a través del mRNA se inicia en AUG en la posición 100 de la transcripción. La estructura en horquilla típica de la transcripción contiene la unión de 98 hidrógenos, que representan -11,706 cat/Mol. La transcripción modificada (B) con 34 uniones de hidrogeno representan -8,822 cat/Mol. Las estructuras secundarias de mRNA fueron diseñadas, utilizando el programa SQUIGGLES 6,2 (Genética Computer Group, University of Wisconsin, USA)*

## Secuencia Nucleotídica de Cry1Ac

1 ATGGATAACA ATCCGAACAT CAATGAATGC ATTCCTTATA ATTGTTAAG TAACCCTGAA  
 61 GTAGAAGTATTAGGTGGAGAAAGAATAGAAACTGGTTACACCCCAATCGATATTTCTTG  
 121 TCGCTAACGC AATTTCTTTT GAGTGAATTT GTTCCCGGTG CTGGATTGTG GTTAGGACTA  
 181 GTTGATATAA TATGGGGAAT TTTTGGTCCC TCTCAATGGG ACGCATTCT TGTACAAATT  
 241 GAACAGTTAA TTAACCAAAG AATAGAAGAA TTCGCTAGGA ACCAAGCCAT TTCTAGATTA  
 301 GAAGGACTAA GCAATCTTTA TCAAATTTAC GCAGAATCTT TTAGAGAGTG GGAAGCAGAT  
 361 CCTACTAATC CAGCATTAAG AGAAGAGATG CGTATTCAAT TCAATGACAT GAACAGTGCC  
 421 CTTACAACCG CTATTCCTCT TTTGGCAGTT CAAAATTATC AAGTTCCTCT TTTATCAGTA  
 481 TATGTTCAAG CTGCAAATTT ACATTTATCA GTTTTGAGAG ATGTTTCAAGT GTTTGGACAA  
 541 AGGTGGGGAT TTGATGCCGC GACTATCAAT AGTCGTTATA ATGATTTAAC TAGGCTTATT  
 601 GGCAACTATA CAGATTATGC TGTACGCTGG TACAATACGG GATTAGAACG TGTATGGGGA  
 661 CCGGATTCTA GAGATTGGGT AAGGTATAAT CAATTTAGAA GAGAATTAAC ACTAACTGTA  
 721 TTAGATATCG TTGCTCTGTT CCCGAATTAT GATAGTAGAA GATATCCAAT TCGAACAGTT  
 781 TCCCAATTA CAAGAGAAAT TTATACAAAC CCAGTATTAG AAAATTTTGA TGGTAGTTTT  
 841 CGAGGCTCGG CTCAGGGCAT AGAAAGAAGT ATTAGGAGTC CACATTTGAT GGATATACTT  
 901 AACAGTATAA CCATCTATAC GGATGCTCAT AGGGGTTATT ATTATTGGTC AGGGCATCAA  
 961 ATAATGGCTT CTCTGTCGG TTTTCGGGG CCAGAATTCA CGTTTCCGCT ATATTGAAAC  
 1021 ATGGGAAATG CAGCTCCACA ACAACGTATT GTTGTCAAC TAGGTCAGGG CGTGTATAGA  
 1081 ACATTATCCT TACTTTTTA TAGAAGACCT TTTAATATAG GGATAAATAA TCAACAATA  
 1141 TCTGTTCTTG ACGGGACAGA ATTTGCTTAT GGAACCTCCT CAAATTTGCC ATCCGCTGTA  
 1201 TACAGAAAAA GCGGAACGGT AGATTCGCTG GATGAAATAC CACCACAGAA TAACAACGTG  
 1261 CCACCTAGGC AAGGATTAG TCATCGATTA AGCCATGTTT CAATGTTTCG TTCAGGCTCT  
 1321 AGTAGTAGTG TAAGTATAAT AAGAGCTCCT ATGTTCTCTT GGATACATCG TAGTGCTGAA  
 1381 TTTAATAATA TAATTGCATC GGATAGTATT ACTCAAATCC CTGCAGTGAA GGGAAACTTT  
 1441 CTTTTAATG GTTCTGTAAT TTCAGGACCA GGATTTACTG GTGGGGACTT AGTTAGATTA  
 1501 AATAGTAGTG GAAATAACAT TCAGAATAGA GGGTATATTG AAGTTCCAAT TCACTCCCA  
  
 1561 TCGACATCTA CCAGATATCG AGTTCGTGTA CGGTATGCTT CTGTAACCCC GATTACCTC  
 1621 AACGTTAATT GGGGTAATTC ATCCATTTT TCCAATACAG TACCAGCTAC AGCTACGTC  
 1681 TTAGATAAAT TGGATAAAG TGATTTGGT TATTTTGAAA GTGCCAATGC TTTTACATCT  
 1741 TCATTAGGTA ATATAGTAGG TGTTAGAAAT TTTAGTGGGA CTGCAGGAGT GATAATAGAC  
 1801 AGATTTGAAT TTATTCCAGT TACTGCAACA CTCGAGGCTG AATATAATCT GGAAAGAGCG  
 1861 CAGAAGGCGG TGAATGCGCT GTTACGTCT ACAAAACCAAC TAGGGCTAAA AACAAATGTA  
 1921 ACGGATTATC ATATTGATCA AGTGTCCAAT TTAGTTACGT ATTTATCGGA TGAATTTTGT  
 1981 CTGGATGAAA AGCGAGAATT GTCCGAGAAA GTCAAACATG CGAAGCGACT CAGTGATGAA  
 2041 CGCAATTTAC TCCAAGATTC AAATTTCAA GACATTAATA GGCAACCAGA ACGTGGGTGG  
 2101 GGCGGAAGTA CAGGGATTAC CATCCAAGGA GGGGATGACG TATTTAAAGA AAATTACGTC  
 2161 ACATATCAG GTACCTTTGA TGAGTGCTAT CCAACATATT TGTATCAAAA AATCGATGAA  
 2221 TCAAAATTA AAGCCTTTAC CCGTTATCAA TTAAGAGGGT ATATCGAAGA TAGTCAAGAC  
 2281 TTAGAAATCT ATTTAATTCG CTACAATGCA AAACATGAAA CAGTAAATGT GCCAGGTACG  
 2341 GGTTCCCTAT GGCCGCTTTC AGCCCAAAGT CCAATCGGAA AGTGTGGAGA GCCGAATCGA  
 2401 TGCGCGCCAC ACCTTGAATG GAATCCTGAC TTAGATTGTT CGTGTAGGGA TGGAGAAAAG  
 2461 TGTGCCCATC ATTCGCATCA TTTCTCCTTA GACATTGATG TAGGATGTAC AGACTTAAAT  
 2521 GAGGACCTAG GTGTATGGGT GATCTTTAAG ATTAAGACGC AAGATGGGCA CGCAAGACTA  
 2581 GGGAATCTAG AGTTTCTCG AGAGAAACCA TTAGTAGGAG AAGCGCTAGC TCGTGTGAAA  
 2641 AGAGCGGAGA AAAAATGGAG AGACAAACGT GAAAAATTGG AATGGGAAAC AAATATCGTT  
 2701 TATAAAGAGG CAAAAGAATC TGTAGATGCT TTATTTGTAA ACTCTCAATA TGATCAATTA  
 2761 CAAGCGGATA CGAATATTGC CATGATTAC GCGGCAGATA AACGTGTTCA TAGCATTGGA  
 2821 GAAGCTTATC TGCTGAGCT GTCTGTGATT CCGGGTGTCA ATGCGGCTAT TTTGAAGAA  
 2881 TTAGAAGGGC GTATTTTAC TGCAATCTCC CTATATGATG CGAGAAATGT CATTAAAAAT  
 2941 GGTGATTTA ATAATGGCTT ATCTGTGTT AACGTGAAAG GGCATGTAGA TGTAGAAGAA  
 3001 CAAAACAACC AACGTTCCGT CTTGTGTTT CCGGAATGGG AAGCAGAAGT GTCACAAGAA  
 3061 GTTCGTGTCT GTCCGGGTCG TGGCTATATC CTTCGTGTCA CAGCGTACAA GGAGGGATAT  
 3121 GGAGAAGGTT ACGTAACCAT TCATGAGATC GAGAACAATA CAGACGAATC GAAGTTTAGC  
 3181 AACTGCGTAG AAGAGGAAAT CTATCCAAAT AACACGGTAA CGTGTAATGA TTATACTGTA  
 3241 AATCAAGAAG AATACGGAGG TGCGTACACT TCTCGTAGT GAGGATATAA CGAAGCTCCT  
 3301 TCCGTACCAG CTGATTATGC GTCAGTCTAT GAAGAAAAAT CGTATACAGA TGGACGAAGA  
 3361 GAGAATCCTT GTGAATTTAA CAGAGGGTAT AGGGATCACA CGCCACTACC AGTTGGTTAT  
 3421 GTGACAAAAG AATTAGAATA CTTCCAGAA ACCGATAAGG TATGGATTGA GATTGGAGAA  
 3481 ACGGAAGGAA CATTATCGT GGACAGCGTG GAATTACTCC TTATGGAGGA ATAG 3534

(Graphic C. Genetic Computer Group, University of Wisconsin, USA-Gustavo A. 1996).

### **Respuesta Inmune a Cry1Ac. Su papel como adyuvante.**

Para proveer protección específica contra la gran variedad de patógenos que penetran al organismo a través de las superficies mucosas, se requiere estudiar adyuvantes mucosos y proteínas u otras moléculas que pudieran utilizarse como acarreadoras de epitope vacúnales capaces de estimular la respuesta inmune en mucosas, que sean inocuas para humanos, estables y de bajos costos que puedan aplicarse por vías mucosas.<sup>197-199</sup>

Esta ambiciosa meta nos lleva a pensar en sustancias capaces de potenciar las respuestas de las mucosas contra antígenos que las usen como puerta de entrada y además burlen el drástico ambiente que imponen los mecanismos de respuesta inespecíficos en los tractos digestivos y reproductor. Con estos fines se han diseñado vacunas con antígenos encapsulados.<sup>200</sup> otras se basan en la expresión de antígenos heterólogos en vectores y en proteínas transportadoras<sup>201-203</sup>

La idea de desarrollar conjugados vacúnales de antígenos con proteínas capaces de adyugar la respuesta inmune. Nos hace pensar en las propiedades biológicas de Cry1Ac tales como su alta resistencia a la proteólisis, la subilidad y estabilidad a pH alcalino y su aparente inocuidad para vertebrados hace a esta proteína un candidato de interés como vector proteico de epítopes vacúnales y de inducción de respuestas inmunes.<sup>175, 202</sup>

El estudio en la utilización de plasmidos para inmunización es una estrategia para desarrollar una nueva generación de vacunas contra patógenos, así como inducir inmunidad celular contra tumores. En estas estrategias de inmunización genética se requiere el desarrollo de adyuvantes efectivos que potencien el efecto de plasmidos. Y una de estas es fusionando genes derivados de sub-unidades de toxinas bacterianas con reconocida actividad adyuvante y genes de los antígenos deseados. Román-Calderón E, y col., desarrollaron un método para construir adyuvantes genéticos basados en fusión entre el gen E7 de HPV16, la subunidad A2B de la toxina de cólera y el gen de los diferentes dominios de la toxina Cry1Ac de *Bacillus thuringiensis*. Ambas toxinas demostraron ser potentes adyuvantes en mucosas al estimular la secreción de IgA específica.<sup>202-204</sup>

Sea demostrado un aumento de la respuesta inmune contra hematíes de carnero provocado por cristales insecticidas de *Bacillus thuringiensis*<sup>205</sup> y una actividad antitumoral contra sarcoma ascético de Yoshida debido a una potenciación de inmunidad general en ratas tratadas con estos cristales<sup>206</sup>. No se ha reportado actividad citotóxica de las proteínas Cry en células de mamíferos. En la actualidad, las proteínas Cry continúan usándose como pesticidas en la agricultura.<sup>180,207</sup>

Recientemente se encontró que Cry1Ac es altamente inmunogénica y posee efectos adyuvantes tanto a nivel sistémico como de mucosas al menos tan potentes como los de la toxina del cólera.<sup>184, 203, 207,208</sup>

Vázquez et al 1999<sup>a</sup> y b, demostraron que la administración oral e intraperitoneal de la protoxina Cry 1Ac de *Bacillus thuringiensis* (Cry) induce altas respuestas de anticuerpos a nivel intestinal y sistémico y que al administrarse por vía nasogástrica e intraperitoneal a ratones Balb/c desencadenó una alta producción de anticuerpos de IgG y de IgA en contenido de lavado intestinal, en heces y en sangre periférica.<sup>207-210</sup>

De este estudio llama la atención la fuerte estimulación de la producción de IgG en las mucosas, anticuerpo que suele relacionarse más con efectos citotóxicos que protectogénicos en la mucosa a diferencia de la IgA, aunque estudios de toxicidad provenientes de la Agencia de Protección al Medio Ambiente de Estados Unidos revelan que las proteínas Cry libres de  $\beta$ -exotoxina no producen efectos adversos significativos en ratas y ratones de laboratorio.<sup>180,210</sup>

Una vez comprobada la acción inmunogénica de Cry1Ac debido a la alta producción de anticuerpos IgG, IgA e IgM inducidos por Cry1Ac, los investigadores comprobaron que la protoxina Cry1Ac de *Bt* es un potente coadyuvante sistémico y de mucosas, esta adyuvancia depende de la vía de administración.<sup>212, 213</sup>

Rodríguez Orozco y colaboradores demostraron también que las células blanco más importantes que dirige los mecanismos celulares en que se fundamenta la acción adyuvante de Cry1Ac son los monocitos y neutrofilos. Es conocido que estas células y otras estén presentes en el aislado de células mononucleares como linfocitos y células NK y que producen factores solubles que estimulan la actividad fagocítica y bactericida y que muchos de estos factores tienen efectos inmunomoduladores como las citocinas, entre las que cabe mencionar interferones, hemopoyetinas, linfocinas y monocinas, que participan no solo en la proliferación y diferenciación celular sino también pueden ejercer actividad citotóxica contra bacterias y otros microorganismos.<sup>214</sup>

Rodríguez Orozco y colaboradores, demostraron que productos de la activación de monocitos y neutrófilos por la toxina Cry1Ac se liberaban grandes cantidades de especies reactivas del oxígeno como producto de la activación del estallido respiratorio en estas células. Respuesta que esta estrechamente asociado, con el mecanismo de las células fagocíticas. El estudio fue emprendido para examinar el efecto de Cry1Ac, en un ensayo cinético de quimioluminiscencia en monocitos y neutrófilos de sangre periférica humana. Cry1Ac potenció el estallido respiratorio de estas células y el estallido alcanzó un máximo de 70 veces sobre células no tratadas en monocitos estimulados con 3.1 mg/ml de Cry1Ac.  
182,215, 216

La relevancia de este proyecto en el área biomédica se basa en que la mayoría de los agentes infecciosos invaden al organismo a través de las superficies mucosas por lo que es necesario optimizar estrategias de inmunización con ayuda de coadyuvantes más específicos, como la toxina Cry1Ac del *Bt*.

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las infecciones del aparato genitourinario son un grupo de enfermedades causadas principalmente por bacterias gramnegativas aerobias en especial (*Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*), cocos grampositivos (estafilococos, enterococos) y, con menor frecuencia, bacterias anaerobias obligadas (*Bacteroides fragilis*, peptoestreptococos). Pero especialmente por *Escherichia coli*, que se encuentra entre el 80-90% de las ITU. <sup>84,98, 142</sup>

La respuesta inmunitaria se produce con la interacción entre factores bacterianos, como fimbrias y lipopolisacáridos, y los receptores epiteliales, con lo que se activan diversas vías de señalización. Hasta en un 40% de los casos las bacterias responsables de las ITU invaden a través de la mucosa el sistema vascular renal y causar bacteriemias. La severidad de la infección dependerá en cualquier caso de la virulencia del germen. <sup>92,119, 123,124</sup>

Además de la diversidad de microorganismos que causan infecciones urinarias y los distintos mecanismos de persistencia bacteriana, la atención y tratamiento de estas afecciones se complica por el desarrollo de resistencia bacteriana a los antimicrobianos. En gran parte, el problema de la resistencia bacteriana es debido al empleo o tratamiento inadecuado de antimicrobianos <sup>117,131</sup> y a la ausencia de buenos inmunomoduladores potentes en las mucosas del aparato genitourinario.

Cry1Ac, por sus características es un inmunomodulador activo en mucosas y resulta interesante probar su efecto sobre el crecimiento del agente etiológico más importante de sepsis urinaria y evaluar la respuesta de citocinas importantes en la respuesta celular ante el reto de células mononucleadas con Cry1Ac.

## JUSTIFICACIÓN

La respuesta de que la ITU, se acompaña de activación y producción de citocinas por las células epiteliales del TU. Esta se evidenció en un modelo experimental de ITU en ratón y posteriormente en pacientes que habían sido diagnosticados de ITU por *E. coli*. Estudios in Vitro utilizando líneas celulares demostraron síntesis de novo de IL-8 e IL6 pero no de IL-2a-b, TNF- $\alpha$  o INF.

Se ha establecido, que los PMN desempeñan un papel muy importante en la prevención de la adherencia y en la iniciación de la ITU por las enterobacterias. Cuando estas invaden la mucosa del TU, la respuesta de los PMN es probablemente el principal mecanismo para eliminar a las bacteria y controlar la infección presumiblemente a través de la elaboración de radicales libres y otros productos bacterianos.

Sin embargo, aun existen evidencias que durante la ITU también las células T infiltran la mucosa urotelial y que además existe activación local y sistémica. La importancia de las células T así como de las células mononucleadas en la defensa contra la infección por enterobacterias como mediadores de la invasión tisular tiene aun que ser demostrada. La búsqueda de nuevos inmunomoduladores aplicables al humano constituye un reto para la medicina contemporánea que no solo resultaría importante para tratar la infección establecida si no para ser utilizados como adyuvantes y acarreadores de péptidos vacúnales. Por lo que nuestro planteamiento de este trabajo es:

**¿La toxina Cry1Ac, tendrá un efecto inhibitorio de crecimiento sobre *Escherichia coli*, proveniente de pacientes del tracto urinario?**

## HIPÓTESIS DE TRABAJO

**“Cry1Ac ejerce un efecto inhibitorio *In Vitro* sobre el crecimiento de *Escherichia coli* proveniente de sepsis urinaria, a través de la potenciación de fagocitosis y liberación de citocinas inflamatorias por células mononucleares”.**

### **Objetivo General.**

Caracterizar el efecto de Cry1Ac sobre la fagocitosis de *Escherichia coli*, provenientes de pacientes con ITU

### **Objetivos Específicos.**

- 1.- Evaluar el efecto de Cry1Ac sobre la inhibición del crecimiento de *E. coli* proveniente de infecciones del tracto urinario.
- 2.- Evaluar el efecto fagocítico de Cry1Ac sobre *E. coli* proveniente de pacientes con sepsis urinario en una curva de muerte bacteriana.
- 2.- Cuantificar los niveles de IFN-gamma, IL-2 y TNF-alfa en sobrenadantes de cultivo de células mononucleadas humanas estimuladas con toxina Cry1Ac “*In Vitro*”

## **MATERIAL Y REACTIVOS.**

RPMI 1640, Bicarbonato de Sodio ( $\text{NaHCO}_3$ ), Suero fetal bovino inactivado, Cloruro de Sodio ( $\text{NaCl}$ ), Gentamicina, Estreptomycin, Fitohematoglutinina (PHA) de Gibco BRL. Life Technologies Grand Island, Inc. N. Cork., Concavalina, Etanol absoluto de la firma Merck, (Darmstadt, Alemania). Azul de Tripan al 4%, Albúmina bobina sérica (BSA), azul brillante Coomassie de Sigma (Sigma Quemical Company, St. Louis, MO USA). Un juego de ELISA Biotrak System (Amersham Biosciences) Amersham Biosciences UK Limited Little Chalfont Buckinghamshire England. Incubadora Sheldon; Walter jacketed CO2 Incubators, with microprocessor control. Models; 2306&2406. Manufacturing Inc. P.O. Box 627 Cornelius, Oregon, Centrifuge 5804 R; eppendorf rotor FA-45-30-11 Incl aerosol-tight rotor, Eppendorf AG 22331 Hamburg Germany. Micropipettes eppendorf in touch whit life, Brinkman Instruments. Inc. Catiague Road, P.O. Box 1019 Westbury, New York 11590-0207 USA. Hanna Instruments Italia Beech Meters. Microprocessor, Ronchi di Villafronc- Italia Hannapro.

### **Toxina *CryIAc* (Bt).**

Donada del Instituto de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Biológicas –UANL. (IB/FCB-UANL). Por el Dr. Benito Pereyra Alférez; esta se obtuvo por recombinación genética de *E. coli* de la cepa HD-73 de *Bacillus thuriengiensis*: Con las siguientes características:

- a). Toxina *CryIAc* de 65 kD.
- b). 6.0 miligramos de Cristal con pureza del 99.6%
- c). Resuspendida en 10 ml de  $\text{NaHCO}_3$  0.1 M, con un pH 9.6

Se esterilizo por filtración a través de una membrana de nitrocelulosa (poros de 0.2  $\mu\text{m}$ ), se repartió en tubos Eppendorf en volúmenes de 1 ml y se guardo a 4°C. El contenido de las proteínas se evaluó con el método Bradford (1957) y la pureza de *CryIAc* mediante electroforesis en géles de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE).

### **Obtención de Muestras Biológicas: *Escherichia coli***

5 cepa de *Escherichia coli*, aislada de urocultivos, obtenida de pacientes con ITU.

Hospital Civil General “Dr. Miguel Silva” y Hospital Infantil “Eva Sámano de López Mateos”.

## **METODOLOGIAS**

### **Separación de Células Mononucleares de Sangre Periférica.**

Las células mononucleares se obtuvieron a partir de sangre heparizada de donantes sanos mediante el método de gradiente de densidad Ficoll-Paque Plus de 1.077 de densidad por centrifugación. 20 mL de sangre se diluyeron mezclando suavemente con 20 mL de RPMI 1640 en tubos de centrifuga cónicos de plástico de 50 mL. De la mezcla, 20 mL se dejan caer lentamente por las paredes en otro tubo que contiene 10 mL de Ficoll-Paque Plus. Los tubos se centrifugan (*Centrifuge 5804 R; eppendorf*) a 2500 rpm a 4°C durante 30 minutos. El anillo de las células mononucleares formado entre las dos fases claras se recolectó por succión con una pipeta Pasteur. Las Células se lavaron tres veces con buffer de PBS por centrifugación a 1500 rpm a 4°C por 10 minutos. Las células se resuspendieron finalmente en 5 mL de buffer de PBS. La viabilidad celular se estimó en un hemocitómetro por la diferencia de interferencia de contraste microscópica, determinándose las células que excluyeron una solución de Azul de Tripán al 0.4%. La suspensión celular se ajustó a una concentración final de  $2 \times 10^5$  células por mililitro.

### **Determinación de la actividad inhibitoria de los sobrenadantes del cultivo *in Vitro* de la toxina Cry1Ac sobre el crecimiento de E. coli proveniente de pacientes con ITU.**

En una placa de cultivo celular de 96 pocillos (*Corning Incorporated, Costar*) Se sembró una concentración de  $2 \times 10^5$  células mononucleares por pozo. Y a partir de una concentración de partida de 300 µg/mL de Cry1Ac, se hicieron diluciones dobles seriadas de 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 y 1:32 e inocularlos en placa de 96 pocillos. Se utilizó como control de proliferación de células mononucleares, fitohemaglutinina PHA o concavalina y como control negativo solo células (MN) y medio de cultivo. Como sustrato o medio de cultivo se utilizó RPMI 1640 + Suero fetal bovino Inactivado al 10%. Las muestras como controles se montaron 12 veces. Volúmenes referidos en la tabla 5.

**Tabla 5.** Diluciones y controles para la activación de células MN *in Vitro*.

	Células	Medio de Cultivo (RPMI+SFBI al 10%)	Concavalina	Dilución/Cry1Ac	Pura Cry1Ac
Control –	100 µg	100 µl			
Control +	100 µg	60 µl	40 µl		
Muestras	100 µg	60 µl		40 µl	
Control P	100 µg	60 µl			40 µl

Las placas se incubaron durante 72 horas a 37°C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de humedad relativa. Al término de la incubación, en tubos eppendorf de 2 mL, se recolectaron en forma individual los sobrenadantes de cada muestra como de los controles y puestos a temperatura de 4°C para el ensayo siguiente. Las actividades inhibitorias fueron determinadas en antibiogramas como inhibición porcentuales de las concentraciones derivadas de diluciones seriadas y señaladas a la base de uno (1:2, 1:4, 1:8, 1:16 y 1:32) en el ensayo. Se prepararon placas con agar Mueller-Hinton sin suplementos. Una asada de cultivo de *Escherichia coli*, aislado de urocultivos, se transfirió a un tubo de ensaye que contiene de 4-5 mL de medio de caldo de tripticasa Soya, este es incubado a 35°C. En escala patrón de 0.5 McFarland es diluida 1:10 en solución salina estéril para obtener una concentración final del inóculo de 2x10<sup>5</sup> UFC/mL. Una alícuota de este inóculo es transferida y sembrada en las placas de agar Mueller-Hinton.

### Ensayos de Inmunodifusión

Se empleó la técnica de Kirby Bauer como método cuantitativo que requirió proporcionar cálculos reproducibles de la susceptibilidad de las bacterias a compuestos antimicrobianos. La técnica de difusión, este procedimiento utiliza discos de papel impregnados con la muestra problema para probar la susceptibilidad de los microorganismos<sup>217</sup> En uní discos de papel filtro se inoculara 20 µl de cada uno de los sobrenadantes como de controles y estos son transferidos e inoculados en las placas sembradas con la *Escherichia coli*, hasta que los puntos de los uní discos estén secos. Las placas se invierten y se incuban a 35°C por 18 a 21 horas.

Los resultados de los valores de inhibición en los antibiogramas se calculan en porcentajes de acuerdo a la siguiente formula:

$$\% \text{ inhibición} = \frac{\text{Media del halo control (+)}}{\text{Media del halo de muestra}} \times 100$$

### **Determinación del efecto fagocítico de Cry1Ac sobre E. coli proveniente de pacientes con ITU.**

Para determinar el efecto fagocítico inducido por se estudio la cinética de muerte de *E. coli* proveniente de pacientes con infecciones del tracto urinario.<sup>218, 219,220</sup> Primero se activó las células (MN) con la toxina Cry1Ac como en el anterior ensayo. Se incubó una placa de cultivo celular de 96 pocillos (*Corning Incorporated, Costar*) con los diferentes sobrenadantes (1:2, 1:4, 1:8 y 1:16) de Cry1Ac con células mononucleares durante 72 horas a 37°C en atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de Humedad relativa. El medio de cultivo celular siempre fue RPMI 1640 + Suero Fetal Bovino Inactivado al 10% Las células mononucleares fueron contadas en un hemocitómetro ajustándose a una concentración final de 2X10<sup>5</sup> células por pozo Después de las 72 horas a estos cultivos se les inoculó una concentración de 2.5 x10<sup>5</sup> UFC/mL de *Escherichia coli* (Urocultivo).

Por el método de microdilución en placa de 96 pocillos, el inóculo de *E. coli* fue estandarizado y preparado cultivando los organismos hasta alcanzar la concentración patrón de 0.5 McFarland. Idealmente ajustado con solución salina 0.98% estéril de tal manera que después de la inoculación con 40 µl, se llegara a una concentración final de 2.5X10<sup>5</sup> CFU/mL por pozo, en el sistema celular in Vitro, la cual fue estimada en ensayos previos.

Previo al final del tiempo de la incubación de las 72 horas, se inicio el estudio de los índices inhibitorios del crecimiento *in Vitro*, utilizando la técnica general semi-indirecta en cultivo y por el método de microdilución<sup>221</sup> determinada por la técnica de cuenta individual de colonias por inoculación de vaciado en placa en agar (MH). La duración del ensayo cinético se postuló para desarrollarse durante 12 horas en intervalos de 60 segundos de muestreo.

Al término de la primera hora se tomó una alícuota de 100 µl por pozo e inmediatamente, esta se inocula en una placa de agar Muller-Hilton incubándola a 37°C /20 hrs.

Se debe notar que el número de células viables empieza a disminuir, la tasa de mortalidad aumenta progresivamente y paralelamente con el tiempo decrece la concentración celular en las diferentes diluciones de la toxina Cry1Ac. Durante esta fase, la velocidad de crecimiento – (dx/dt) disminuye y esto es proporcional a la concentración celular o sea al cambio logarítmico (no exponencial) del fenómeno.

Los índices inhibitorios determinados porcentualmente fueron calculados por las ecuaciones.

$$\% \text{ eliminación} = \frac{\text{Media concentración control (+)}}{\text{Media concentración muestras}} \times 100$$

Para una constante de índice de eliminación o fagocitosis.

$$K = \frac{B}{T^{1/2}}$$

### **Determinación de IL-2, IFN- γ y TNF- α en sobrenadantes de cultivo de células mononucleadas.**

Para la determinación de las concentraciones de IL-2, INF-γ y TNF- α expresadas por las células mononucleares incubadas en presencia de las diferentes diluciones de la toxina Cry1Ac se usaron inmunoensayos ligados a enzimas. Amersham Biosciences (*ELISA Biotraksystem, Amersham Biosciences uk Limite Little charlfont, England*).

Los sobrenadantes y controles obtenidos del sistema del cultivo celular antes descrito se montaron por duplicado, corriéndose las muestras de la prueba usando la lectura de 450 nm en un microprocesador de lectura de tiras de micro Elisa (*ELISA PLUS, Kontrolab. USA*) con un rango de medición lineal de 0.000 a 3.000 UA (unidades de absorbancia) y con una precisión fotométrica de ± 2% a ± 0.007% lo que sea mayor de 0 a 0.5 absorbancia ± 3% de 1.5% a 3.0% absorbancia.

Los niveles de estimación (estimulación) de la síntesis de IL-2, INF- $\gamma$  y TNF-  $\alpha$ , es expresado en el algoritmo ELISA integrado que proceso y analizo la información obtenida de las muestras y nos indico los resultados interpretados. La estimulación de la síntesis de IL-2, INF- $\gamma$  y TNF-  $\alpha$  se estimó calculando el índice de estimulación.

$$\% \text{ estimulación} = \frac{\text{Media concentración de muestras}}{\text{Media concentración de controles (-)}} \times 100$$

### **Análisis Estadístico**

El paquete estadístico software SPSS (versión 9.1) se uso para el análisis. Prueba de t de Student, ecuación cinética logarítmica, inicial de Monod y el cofactor de correlación de Sperman.

## RESULTADOS

### Actividad Inhibitoria de *CryIAc*.

El análisis de las muestras, sujetas a los ensayos de antibiogramas en placa, después de la incubación, en los uní discos se notaron halos de inhibición significativos (figura. 23). No siendo mayor este que del control positivo que fue impregnado con el antibiótico (Amikacina). El resultado final pudo ser significativamente influenciado por la metodología la cual fue cuidadosamente controlada. Los datos obtenidos de los antibiogramas de las muestras problema exhibieron proporciones de inhibición calculadas de modo porcentual. Para determinar los resultados de los experimentos en forma individual las inhibiciones resultantes de los antibiogramas fueron medidos de acuerdo con la técnica de Kirby Bauer, el área del diámetro de los halos expresados en cada uno de los sensidiscos, inoculados con los sobrenadantes problema del cultivo celular in Vitro.

La inhibición control en este caso como el porcentaje total para cada ensayo se tomó como referencia, sensidisco inoculado con el antibiótico comercial (Amikacina). Los resultados de las inhibiciones (ver tabla. 6) de las muestras y controles se expresaron y calcularon como porcentajes con respecto al antibiótico al que la cepa resultó sensible.

**Tabla 6.** Porcentaje de Inhibición del Crecimiento de *Escherichia coli* por la toxina *CryIAc*

Toxina <i>CryIAc</i> Dilución	Inhibición %
Amikacina	100.0
Control Negativo	0.0
Control Positivo	0.0
1:Pura	33.0
1:2	83.0
1:4	83.0
1:8	78.0
1:16	60.0
1:32	60.0

Los sobrenadantes de cultivo de células mononucleadas estimuladas con Cry1Ac mostraron actividad inhibitoria de crecimiento bacteriano en todas las diluciones de Cry1Ac evaluadas, este fue máximo a las diluciones 1:2, 1:4 en las que se encontró un 83% de la inhibición encontrada con el antibiótico al que la cepa de *Escherichia coli* resulto sensible.

**Fig. 23.** Pruebas de susceptibilidad de la *Escherichia coli*.

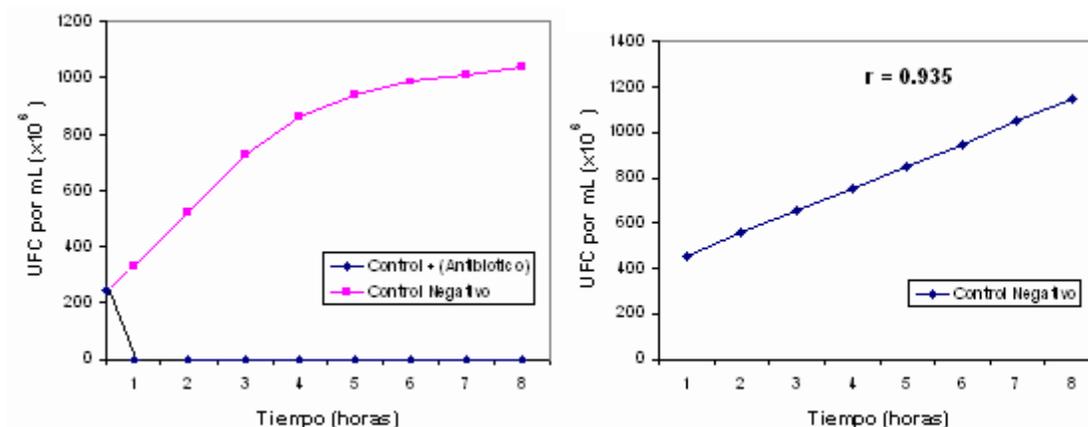


### **Cinética de Muerte Bacteriana**

Consistió en evaluar la viabilidad de *E. coli* en cultivo con macrófagos para estimar la capacidad fagocítica de estos por estímulo de Cry1Ac.

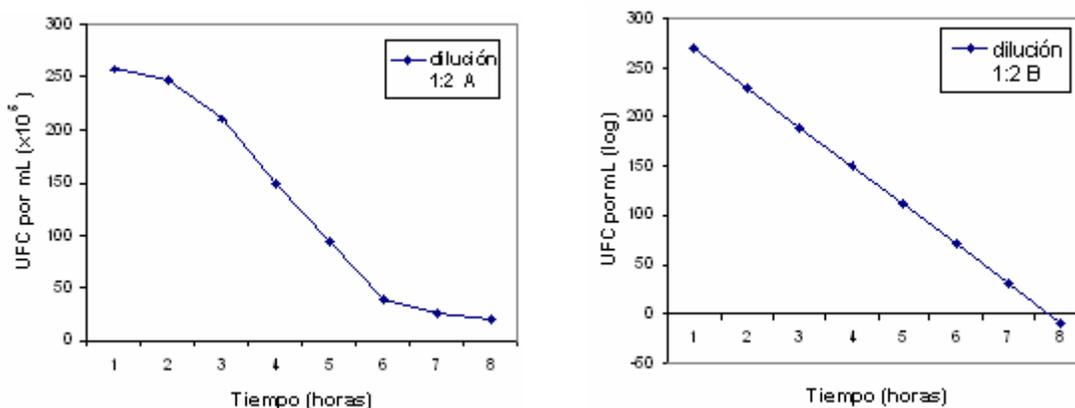
La lectura cuantitativa de colonias indicó la cinética de curva de muerte bacteriana. Estos datos fueron visualizados y graficados en una curva logarítmica que nos deja ver el grado de las tendencias (de las concentraciones en cada hora) de las curvas de muerte bacteriana (figura 24A). Estas fueron más atenuadas en las diluciones 1:2, 1:4 y 1:8, en contraparte de los resultados (figura 24B) de las curvas control del Antibiótico y control negativo.

**Figura 24** En los gráficos A y B se muestran los resultados de los ensayos cinéticos realizados con el control negativo y con el control positivo (Amikacina).



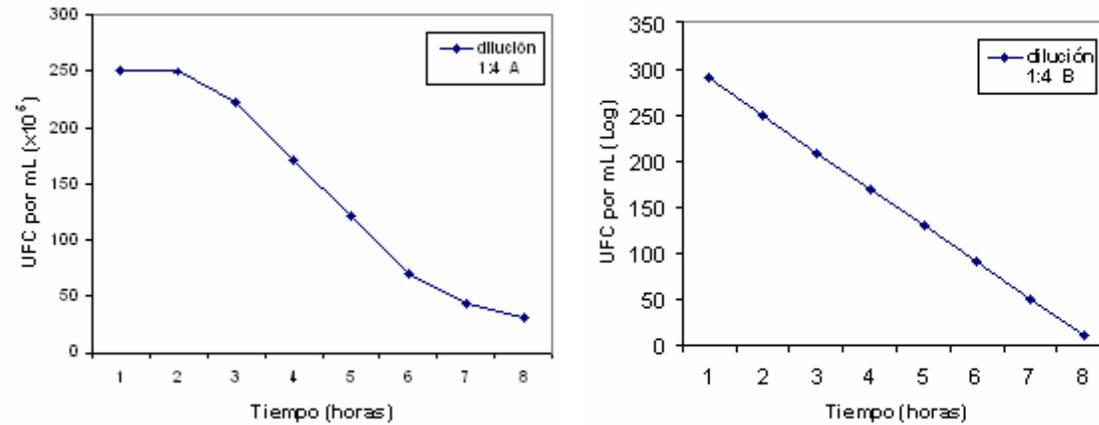
La figura 25 muestra los resultados de los ensayos realizados con la dilución **1:2**. Los índices de muerte bacteriana (referidas al recuento inicial de CFU realizado a la hora de inoculación) fueron del 73% a las 6 horas y del 88.53% a las 8 horas, la constante del índice de eliminación fue de  $k=39.74$  UFC/mlh- (figura 25A) Al representar los valores de UFC en escala logarítmica (figura 25B), se obtuvo una buena rectificación de la grafica, con un valor de  $R^2 = 0.978$  y la siguiente ecuación:  $Y = -39.74(X) + 309.07$

**Figura 25** – Cinética de la fagocitosis de *Escherichia coli* en la dilución **1:2**



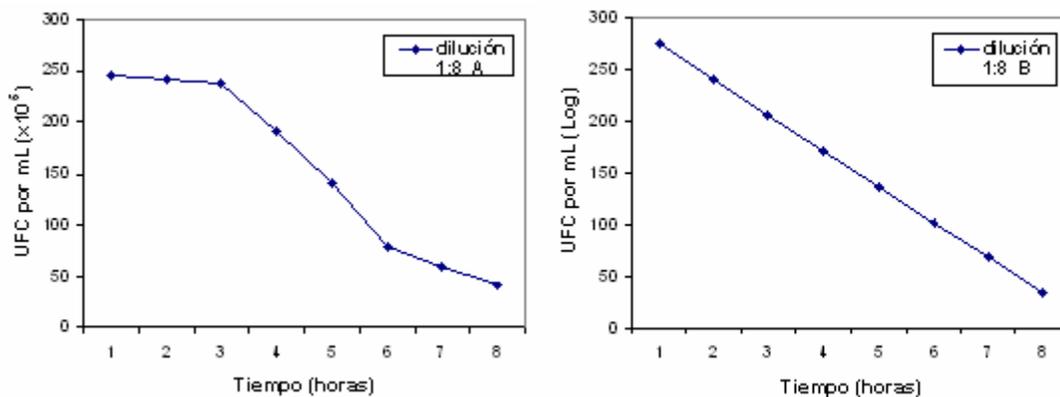
Los resultados de la dilución **1:4** se presentaron en la figura 26. Los índices de muerte bacteriana fueron del 68.90% a las 6 horas y del 96.23% a las 8 horas con una constante de índice de eliminación de  $k= 34.75$  UFC/mLh- (figura 26A). En escala logarítmica, se obtuvo un coeficiente de regresión de  $R^2 = 0.9872$  y la siguiente ecuación:  $Y = -39.643(X) + 288.5$  (figura 26B).

**Figura 26** – Cinética de la fagocitosis de *Escherichia coli* en la dilución **1:4**



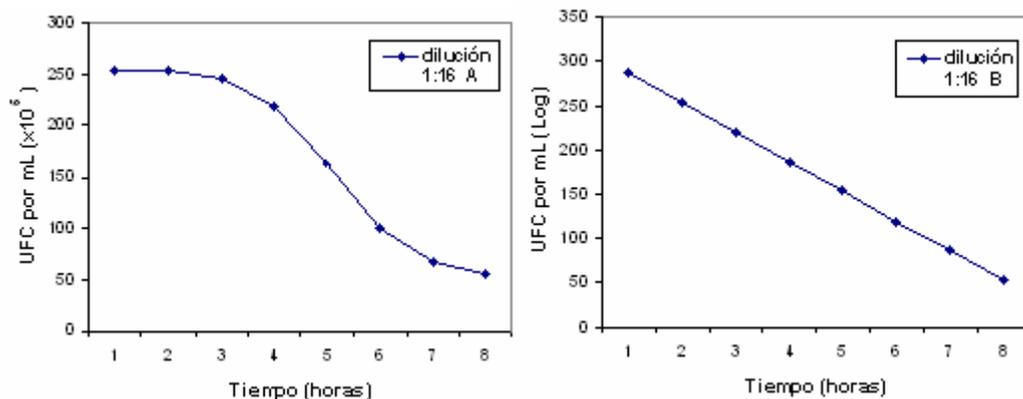
La figura 27 muestra los resultados obtenidos con la dilución **1:8**. Se encontraron índices de inhibición de 62.44% a las 6 horas y del 87.42% a las 8 horas con una constante de eliminación de  $k= 34.60$  UFC/mLh- (figura 27A). Al pasar a la escala logarítmica (figura 27B) se obtuvo un coeficiente de regresión de  $R^2 = 0.970$ . La ecuación fue:  $Y = -34.25(X) + 308.5$

**Figura 27** – Cinética de la fagocitosis de *Escherichia coli* en la dilución **1:8**



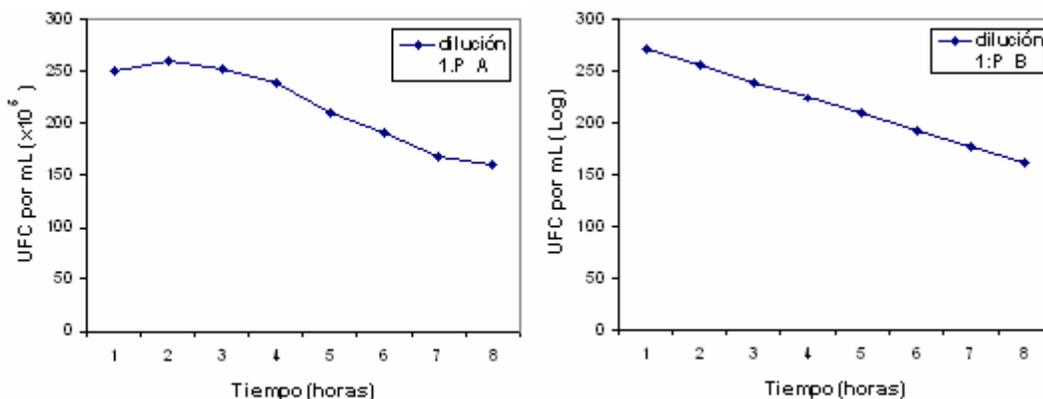
La figura 28 corresponde a la dilución 1:16. Los índices muerte bacteriana fueron de 58.21% a las 6 horas y del 81.50% a las 8 horas, con una constante de eliminación de  $k=33.68$  UFC/mLh- (figura 28A). En escala logarítmica (figura 28B), se obtuvo un coeficiente de regresión de  $R^2 = 0.961$ . La ecuación fue:  $Y = -33.404(X) + 320.32$ .

**Figura 28** – Cinética de la fagocitosis de *Escherichia coli* en la dilución **1:16**



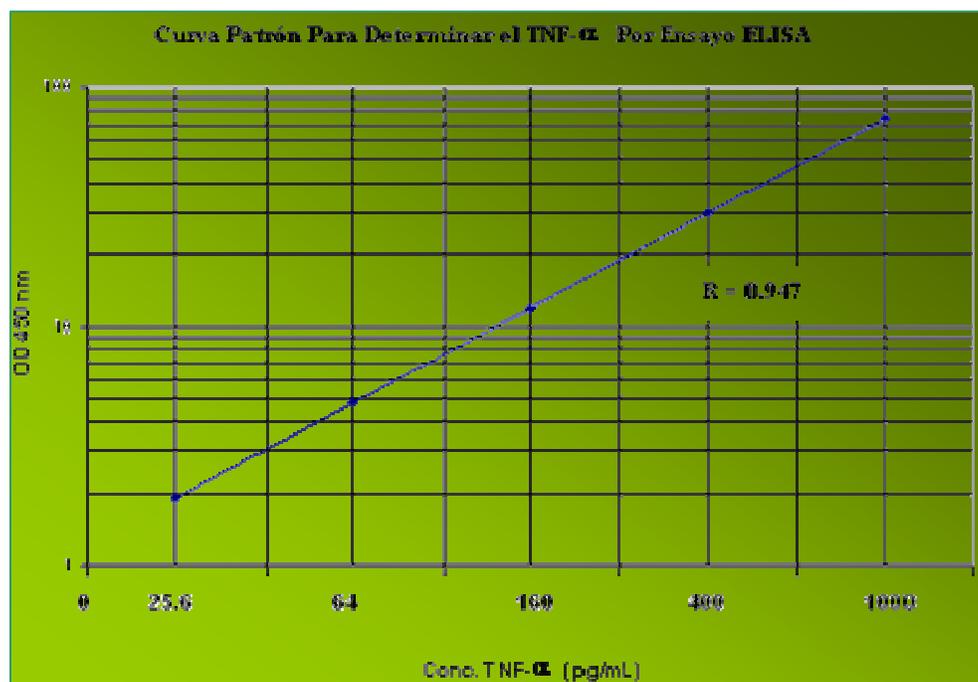
En la figura 29 se representan los datos obtenidos con la dilución 1: Pura. Se registraron los índices de inhibición fagocítico de 28.72% a las 6 horas y del 40.20% a las 8 horas con una constante de eliminación de  $k=15.640$  UFC/mLh- (figura 29A). La escala logarítmica (figura 29B) genero una recta de regresión  $R^2 = 0.955$ , con la siguiente ecuación:  $Y = -15.55(X) + 286.214$ .

**Figura 29** – Cinética de lá fagocitosis de *Escherichia coli* en la dilución **1: P**

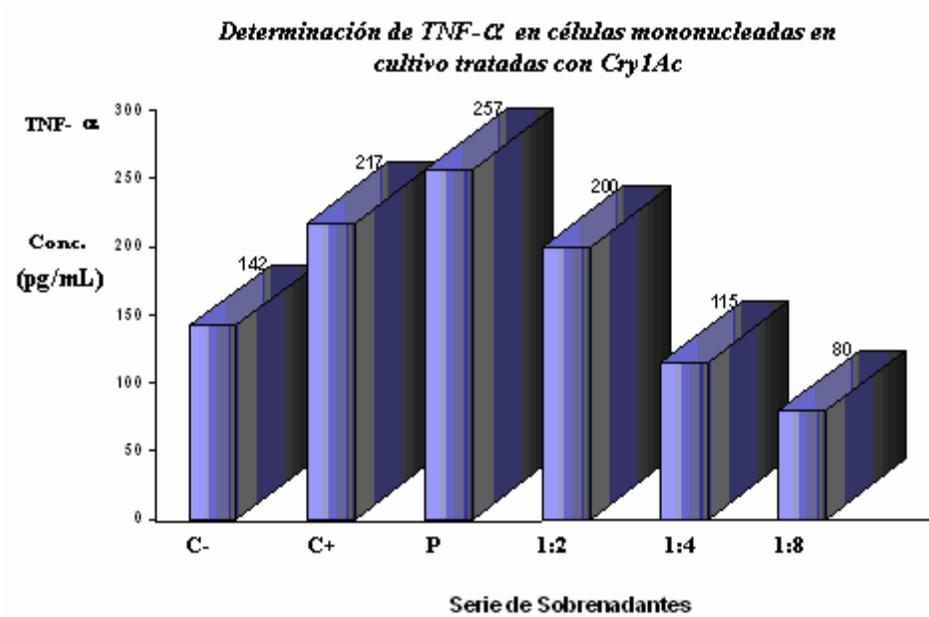


### Inmunoensayo de IL-2, INF- $\gamma$ y TNF- $\alpha$ .

Los coeficientes de regresión lineal en cada uno de las curvas patrón fueron aceptables para hacer las determinaciones. La curva patrón para la determinación de TNF-  $\alpha$ , mostró los siguientes parámetros:  $R^2= 0.947$ , pendiente  $p= 0.883$  e intercepto en el eje de las  $y= 0.00$ . Lo que se considero adecuado para las mediciones de los ensayos problema. La figura 30, es una representación grafica de la curva patrón para el TNF-  $\alpha$ , y de las concentraciones de los sobrenadantes por células mononucleadas en cultivo tratadas con Cry1Ac respecto a las células tratadas con Concanavalina figura 31. Al tratar células mononucleadas con la toxina pura se obtuvo un incremento de la síntesis de TNF-  $\alpha$ . 118% (tabla 7) del obtenido con células tratadas con Concanavalina.



**Figura 30.** Los puntos representan las concentraciones detectables del Factor de Necrosis Tumoral-alpha expresada en pico gramos por mililitro según el logaritmo de la densidad óptica

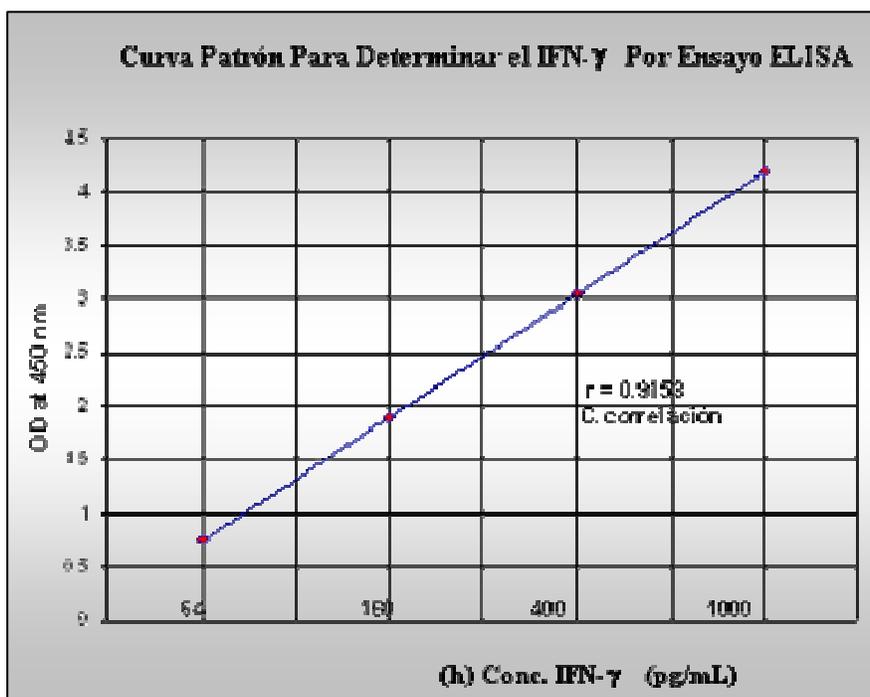


**Fig. 31.** Las barras representan las concentraciones de TNF- $\alpha$  en cada uno de los sobrenadantes expresadas en pico gramos por mililitro; **C-**: células MN en RPMI+SFBI 10% (control negativo), **C+**: Concavalina + células MN + RPMI+SFBI 10% (control positivo), **P**: 300  $\mu$ g/ml de Cry1Ac + células MN + RPMI+SFBI 10%

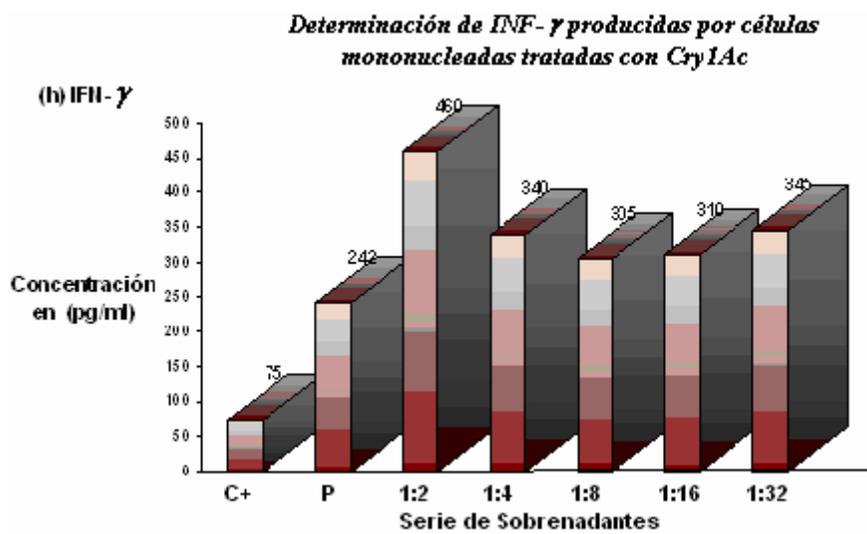
**Tabla. 7** Porcentaje de estimulación de la síntesis de TNF- $\alpha$ , por células mononucleadas en cultivo tratadas con Cry1Ac respecto a las células tratadas con Concavalina

Dilución de la Toxina	% de Estimación de síntesis de TNF- $\alpha$
Pura	118%
1: 2	92%
1: 4	52%
1: 8	37%

El análisis de la curva patrón para la determinación de  $\text{INF-}\alpha$ , arrojó los siguientes valores; un coeficiente de regresión de  $R^2 = 0.9953$ , una pendiente  $p = 1.13$  e intercepto en el eje de las  $y = 0.00$ . Las cuales fueron admitidas para las determinaciones de los sobrenadantes propuestos. Figura 32 de la curva patrón del  $\text{INF-}\gamma$ . Los datos obtenidos expresaron las concentraciones estimadas como dosis dependiente por células mononucleadas en cultivo tratadas con Cry1Ac respecto a las células tratadas con Concanavalina (figura 33), en la mayoría se obtuvo un incremento favorable comparado con el control positivo de concavalina. Los sobrenadantes 1:2, 1:4 y pura en cultivo presentaron 135%, 70% y 115% porcentuales de estimulación de la síntesis de  $\text{INF-}\gamma$  respecto al control positivo con concavalina. tabla.8



**Figura 32** Los puntos representan las concentraciones detectables del Interferón Gamma expresada en pico gramos por mililitro según el logaritmo de la densidad óptica

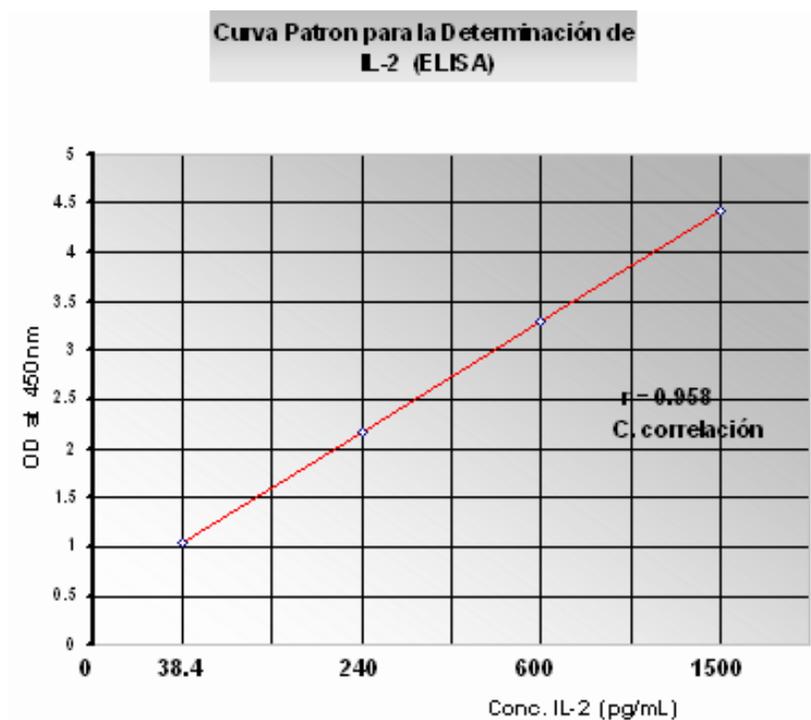


**Figura 33** Las barras representan las concentraciones del IFN- $\gamma$  en cada uno de los sobrenadantes expresadas en pico gramos por mililitro. C-: células MN en RPMI+SFBI 10% (control negativo), C+: Concavalina + células MN + RPMI+SFBI 10% (control positivo), P: 300  $\mu$ g/ml de Cry1Ac + células MN + RPMI+SFBI 10%

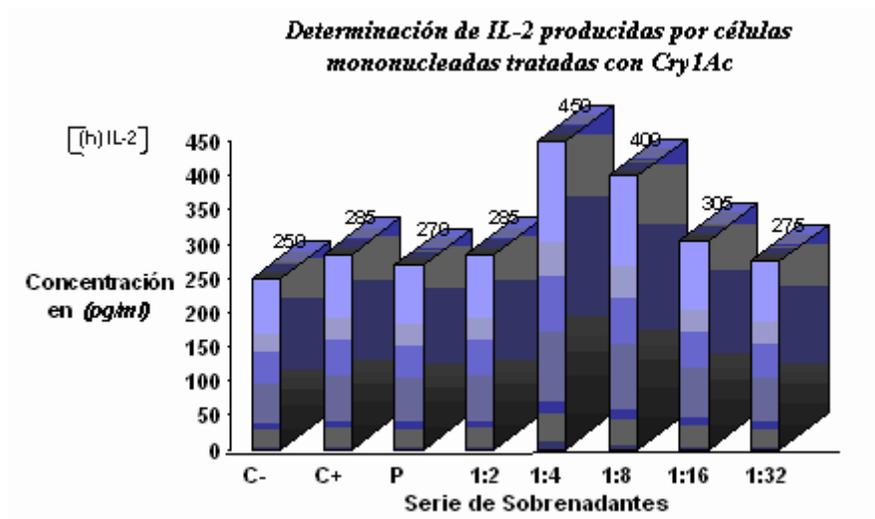
**Tabla. 8** Porciento de estimulación de la síntesis de IFN- $\gamma$ , por células mononucleadas en cultivo tratadas con Cry1Ac respecto a las células tratadas con Concavalina

Dilución de la Toxina	% de Estimación de síntesis de IFN- $\gamma$
Pura	115%
1: 2	135%
1: 4	70%
1: 8	55%
1:16	55%

Para el análisis de IL-2, la curva patrón (figura 34) para su determinación arrojó un coeficiente de regresión de  $R^2 = 0.9538$  una pendiente  $p = 1.04$  e intercepto en el eje de las  $y = 0.00$ . Llevando a determinar los resultados de los sobrenadantes por células mononucleadas en cultivo tratadas con Cry1Ac respecto a las células tratadas con Concanavalina en cultivo celular in Vitro. (Figura 35). Los cultivos de células mononucleadas tratadas con 1:2 y concentración pura de Cry1Ac estimularon 135% y 115% la producción de IL-2 (ver tabla 9) respecto a la estimulación alcanzada con la Concanavalina.



**Figura 34** Los puntos representan las concentraciones detectables de la Interlucina-2 expresada en pico gramos por mililitro según el logaritmo de la densidad óptica



**Figura 35** Las barras representan las concentraciones de la IL-2 en cada uno de los sobrenadantes expresadas en pico gramos por mililitro. **C-**: células MN en RPMI+SFBI 10% (control negativo), **C+**: Concavalina + células MN + RPMI+SFBI 10% (control positivo), **P**: 300 µg/ml de Cry1Ac + células MN + RPMI+SFBI 10%

**Tabla. 9** Porcentaje de estimulación de la síntesis de IL-2, por células mononucleadas en cultivo tratadas con Cry1Ac respecto a las células tratadas con Concavalina

Dilución de la Toxina	% de Estimación de síntesis de IL-2
Pura	90%
1: 2	100%
1: 4	158%
1: 8	140%
1:16	107%
1:32	96%

## DISCUSIÓN.

En la actualidad continúa llamando la atención en la investigación, nuevas formas de combatir patologías que se vuelven difíciles de tratar. Una de estas formas es con inmunomoduladores, como coadyuvantes que tienen la capacidad de potenciar la respuesta inmunológica y facilitan la eliminación o inhibición del agente causal en el huésped. Los coadyuvantes pueden afectar algunos aspectos medibles de respuesta de anticuerpos, que incluye cinética, duración, cantidad, isotipo, avidéz, generación de neutralización, protección y la especificidad de la respuesta de anticuerpos<sup>50</sup>. Desde entonces, se han llevado a cabo estudios dirigidos para identificar nuevos blancos de respuesta inmunológica, generar y estudiar nuevos antígenos con técnicas de manipulación genética, así como de profundizar más en el estudio de los inmunomoduladores, como son citocinas, toxinas modificadas y coadyuvantes<sup>166</sup>.

Respecto a la patogenia de infecciones urinarias se han logrado importantes avances en la medicina para inhibir los factores de virulencia que incrementa la capacidad infecciosa de las bacterias causales de infecciones urinarias y se continúa investigando en la compleja interacción que existe entre factores de virulencia dependientes del microorganismo, factores de respuesta dependientes del huésped, con el objetivo de encontrar tratamientos más eficaces.<sup>104</sup>

La invasión bacteriana de la mucosa activa a la inmunidad innata y a la adquirida y tanto a las células epiteliales (uroteliales y del túbulo renal) como las del sistema monocito-macrófago, que liberan citocinas, como factor de necrosis tumoral (TNF), interferón gamma (INF- $\gamma$ ), interleucina 1 e interleucina 8.<sup>116</sup> y otros mediadores de la inflamación.

En este trabajo, se estudió la toxina Cry1Ac (Bt), como inmunomodulador en sepsis urinaria, aplicable al manejo de ITU ocasionadas por *E. coli*. En el estudio se utilizó como control positivo en el ensayo de inhibición de proliferación bacteriano, Amikacina, un antimicrobiano de gran espectro, en sepsis urinarias y en el caso del ensayo in Vitro sobre la expresión de citoquinas, con un mitógeno policlonal, concavalina A.

En el ensayo se encontró una inhibición de la proliferación bacteriana asociada al aumento en la concentración de Cry1Ac en cultivos bacterianos in Vitro. Esta inhibición fue similar a la alcanzada con el antimicrobiano que se usó como control positivo. Estos resultados son comparables a los objetivos por otros trabajos anteriores<sup>229</sup>. Varios mecanismos pudieran explicarnos en el plano teórico de inhibición de la proliferación bacteriana por factores presentes en los sobrenadantes. Uno de ellos sería la inducción de sustancias bacteriostáticas por células mononucleadas tratadas con Cry1Ac. Rodríguez Orozco y colaboradores, 2005 demostraron que producto de la activación de monocitos y neutrófilos por Cry 1Ac se liberan grandes cantidades de especies reactivas del oxígeno como oxígeno singlete, cloraminas y aniones superóxido e hidroxilo, producto de la potente activación del estallido respiratorio en estas células. Estas especies reactivas potencian la acción bactericida y aumentan la actividad citotóxica de los sobrenadantes de cultivos de células mononucleadas activadas con la toxina de Bt.<sup>233</sup>

Para determinar el efecto de Cry1Ac sobre las respuestas fagocíticas de estos macrófagos, se estudió la cinética de curva de muerte de *E. coli*, cuando esta se enfrentó a monocitos humanos tratados con Cry1Ac. A las 8 horas de tratamiento de los inóculos, la inhibición de *Escherichia coli* se encontró que a la dilución 1:4 (96.2%) de los sobrenadantes se obtuvo el mayor porcentaje de muerte bacteriana seguido de la concentración 1:2 (88.53%) con respecto al control positivo que inhibió por completo el crecimiento de *E. coli* que con respecto al control negativo que proliferó el crecimiento bacteriano. Estos resultados confirman que la toxina Cry1Ac, aumenta la actividad contra *E. coli* que es el microorganismo más importante causante de infecciones urinaria en el humano.<sup>230</sup>

Rodríguez Orozco y colaboradores, demostraron que la célula blanco más importante en que se fundamenta la acción adyuvante de Cry1Ac son los monocitos. Es un hecho conocido que estas células y otras que estén presentes en el aislado como linfocitos y células NK producen factores solubles que estimulan la actividad fagocítica y bactericida y que muchos de estos factores tienen efectos inmunomoduladores como las citocinas, entre las que cabe mencionar interferones, hemopoyetinas, linfocinas y monocinas, que participan no solo en la proliferación y diferenciación celular sino también pueden ejercer actividad citotóxica contra bacterias y otros microorganismos.<sup>234</sup>

Podemos decir que tanto la inhibición del crecimiento de *E. coli* como la potenciación de muerte bacteriana inducida por monolitos tratados con Cry1Ac significo que la toxina ha aumentado el efecto bactericida de monocitos al incrementar la actividad fagocítica de estos e inducir la producción de monocinas con efecto sobre el crecimiento bacteriano esto esta de acuerdo con datos reportados en otros estudios donde se ha constatado el aumento de la fagocitosis y el efecto bactericida de Cry1Ac.

Los resultados obtenidos en los experimentos in Vitro muestran que Cry1Ac induce la expresión y/o secreción de citocinas. Es interesante encontrar que cuando células mononucleares de sangre periférica, son cultivadas con cristales Cry1Ac se inducen síntesis de citocinas importantes en la defensa contra patógenos como IL-2, INF- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ . En el caso de INF- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ , forman parte del complejo de eventos de la respuesta inicial frente agentes infecciosos al poseer un espectro de actividad amplio que les permite actuar sobre diferentes tipos celulares.

Los resultados obtenidos en los experimentos in Vitro muestran que los monocitos tratados con la toxina Cry1Ac en cultivo celular inducen la expresión de citoquinas pro-inflamatorias TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$  y inmunorreguladoras como IL-2. El TNF- $\alpha$  es una citoquina que estimula a neutrófilos y fagocitos mononucleares para lisar microbios. El TNF- $\alpha$  es el mediador principal de la respuesta frente a las bacterias gram-negativas y también puede desempeñar un papel en las respuestas inmunitarias innatas frente a otros organismos infecciosos<sup>236,237</sup>

El resultado que más llamo la atención en este estudio fue la fuerte estimulación de la síntesis de TNF- $\alpha$ , por células tratadas con toxina pura con un 118% del obtenido del estímulo linfo proliferativo que se obtuvo con el control positivo de concavalina A y con la dilución 1:2, no así con las demás diluciones que estuvieron por abajo del 50% de estimulación, similar al resultado del control negativo que fueron células mononucleares no tratadas con la toxina y mitógeno policlonal. El INF-gamma es producido por células T CD8+, NK gamma, delta y Th1 estimuladas por antígenos y mitógenos<sup>237- 238</sup>

Con respecto a nuestro estudio de la síntesis de INF- $\gamma$ , se encontró en la mayoría de las diluciones, se vio un incremento favorable, comparado con el resultado encontrado con el control positivo de concavalina A. Los datos de estimulación obtenidos de los sobrenadantes 1:2, 1:4 y pura en el cultivo presentaron 135%, 70% y 115% de la síntesis de INF- $\gamma$ , respecto al alcanzado por células tratadas con el mitogéno policlonal de Con A y del control negativo. El interferón gamma (INF- $\gamma$ ) es una proteína multifuncional primariamente reportada por su actividad antiviral en cultivo de leucocitos humanos infectados por virus<sup>238, 239</sup>.

Resultados similares, encontraron Aggarwal BB. Rodríguez PC., pero en una proteína aislada y purificada de CryA4, derivada del *Bacillus thuringiensis* subespecie *thuringiensis*, con un peso molecular de aproximadamente 20 kDa en SDS-PÁGE, con actividad citotóxica antitumoral in Vitro. Este efecto citotóxico estuvo relacionado con la proliferación de la síntesis de TNF- $\alpha$  y IFN- $\gamma$  por la activación de macrófagos. Esta toxina potenció la fagocitosis y en particular la respuesta oxidativa de macrófagos acompañado esto de una fuerte inducción de TNF- $\alpha$ . Esta respuesta de la actividad linfocitaria de esta oncotoxina se verifico sobre la línea de células histiocíticas de linfoma humano U-937<sup>240</sup>.

En el reporté de la IL-2 en este estudio, encontramos que en las diluciones, 1:2, 1:4, 1:8 y 1:16 tuvieron un incremento de estimulación de la síntesis de IL-2 en monocitos en cultivo tratadas con Cry1Ac en comparación en el control negativo. Encontrándose que en los cultivos estimularon 100%, 158%, 140% y 107% la producción de IL-2 respecto al resultado alcanzada con el control positivo Con A.

Evaluando la respuesta más favorable de estimulación linfocitaria que tuvieron estos resultados de la síntesis de IL-2 en la mayoría de las concentraciones seriadas en dilución de Cry1Ac de las que se encontraron con los obtenidos de INF-gamma y TNF-alfa en el ensayo in Vitro. Los microorganismos intracelulares o sus productos inducen la producción de IL-2 por monocitos, incrementando la función citolítica de células NK y linfocitos T CD8+ activadas, estimulan la secreción de IFN-gamma por células T y NK y el desarrollo de respuesta Th1.

Puede clasificarse como un regulador de inmunidad innata, debido a que los macrófagos activados desarrollan funciones efectoras de células NK. La IL-2 aumenta también la generación de células T citotóxicas y potencia la función de neutrófilos y macrófagos. Uno ejemplo de la síntesis de esta citoquina es del Bacilo de Calmette-Guering (BCG) que tiene acciones específica e inespecífica; activa macrófagos, células T y la producción de interleuquina 2 (IL-2). Se aplica en la vacuna terapéutica contra el cáncer de vejiga, ovario, colon y melanomas.<sup>241, 242</sup>

Varios autores han descrito, la manera de inducir este tipo de respuesta linfocitaria, tal es el caso microorganismos y sus productos, como las micobacterias de la tuberculosis, incorporados al adyuvante completo de Freund (AFC), o mezcla de toxinas bacterianas inactivadas, usualmente derivadas de estreptococos, serratias, virus, saponinas, vitaminas A y E, lanolina y de dipéptido murámico (MDP), trehalosa dimicolato.(TDM), proteína P40 asociada al peptidoglicano de la pared bacteriana, lípido A, lipopolisacárido (LPS) proveniente de bacterias gram negativas, glucanos de hongos y polisacáridos de algas como adyuvantes, que junto con el estudio de bacterias inactivadas potencia un efecto inmunomodulador en diversas patologías.

Caso es en diversos ensayos que han comprobado que bacterias pertenecientes al género *Propionibacterium inactivas* han demostrado ser inmunogénicas y poseer capacidad de producir la activación de monocitos/macrófagos y linfocitos con la consecuente producción y liberación de citoquinas, especialmente de IL-1 y TNF- $\alpha$  <sup>244,245</sup>. En otro estudio, se observó que, en personas y ratones se obtuvo un incremento en los niveles de estimulación de INF- $\alpha$ , INF- $\beta$ , e INF- $\gamma$  como respuesta a un sinergismo entre LPS y *Propionibacterium* <sup>246-248</sup>. Ensayos in Vitro, utilizando células mononucleares de sangre periférica, un inmunomodulador compuesto por LPS detoxificado de *Escherichia coli* y células inactivadas de *Propionibacterium granulosum*, demostraron efectos inmunológicos, con la transcripción de RNA para IL-1 y TNF-a, expresión de CD25 así como la proliferación de linfocitos con dosis subóptimas de concavalina A<sup>249</sup> Se ha descrito en cerdos que la administración de la toxina LPS de *Escherichia coli* a dosis iguales o superiores a 1 $\mu$ g/Kg. resulta en una elevación de los niveles de TNF- $\alpha$  en suero así como el desarrollo de signos clínicos adversos <sup>250,251</sup>

El LPS es un componente que se encuentra en mayor proporción en la pared de bacterias gram negativas, siendo una de las mayores toxinas que poseen. El LPS es un potente estimulante del sistema inmunitario con diferentes efectos biológicos e inmunoestimulantes, del cual su efecto inmunológico depende, básicamente del lípido A <sup>252</sup> En medicina humana se ha utilizado como adyuvante para incrementar la respuesta inmune frente a la toxina del cólera, herpes simples, virus de Epstein Barr, Plasmodium falciparum y Neissaria meningitidis <sup>252,253</sup>

Se sabe que el LPS y la toxina del cólera son unos de los estimulantes mucosales más potentes y suelen ser muy eficaces en la inducción de anticuerpos IgA <sup>254-258</sup>

Se conoce que los macrófagos activados, como los monocitos producen varias moléculas biológicamente activas, incluyendo los intermedios de oxígenos reactivo, el nitrógeno reactivo citoquinas, y GM-CSF que está envuelto en los microorganismos intracelular patógenos y células tumorales. Por consiguiente, la potencia de actividad citotóxica de las células mononucleares por las sustancias naturales o sintéticas es esencial en las terapias de tratamiento de enfermedades infecciosas y cáncer.

En resumen se podría decir que esta toxina Cry1Ac del Bt., con un efecto inmunogenico podría influir básicamente sobre las células del sistema inmune estimulando en ellas una serie de mecanismos que participan de manera primordial en la respuesta inmunitaria en infecciones de *Escherichia coli* en el tracto urinario.

## CONCLUSIONES

- 1.- Cry1Ac tiene un potente efecto sobre la inhibición del crecimiento bacteriano de *Escherichia coli* y este efecto está relacionado con la producción de factores solubles por monocitos.
- 2.- Cry1Ac potencia la actividad bactericida de monocitos humanos a través del incremento de estos en la actividad fagocítica.
- 3.- Cry1Ac indujo un efecto en la activación de células mononucleares de sangre periférica, macrófagos alveolares, en citoquinas proinflamatorias como INF-g, TNF-a y IL-2, importantes para explicar el efecto bactericida y el efecto inmunomodulador de la toxina, lo que está en relación con el incremento como activación de las funciones fagocíticas y la polarización de la inmunidad tipo Th1.

## **REFERENCIAS:**

1. Roitt I. Inmunología. Ediciones Científicas y Técnicas, S.A. SALVAT. 3ra Edición. 994.
2. MacClintic J., Fisiología del Cuerpo Humano. Segunda Edición. Editorial Limusa. 1983; 19:364
3. Hernández-Urzúa AM, Alvarado-Navarro A. Interleucinas e Inmunidad Innata. Rev. Biomed. 2001;12(4):272-280.
4. Roitt Ivan. Inmunología. Fundamentos. Editorial Médica Panamericana. 9° Ed. 1998.
5. Regueiro JR, López Larrea C. Inmunología. Biología y Patología del Sistema Inmune Segunda Edición. Madrid, Editorial Médica Panamericana, 1997.
6. Roitt I, Brostoff J, Male D. Immunology Quinta Edición. London, Mosby, 1998.
7. Ortiz Maslloréns F. Iniciación a la inmunología. Fundación Jiménez Díaz. Bach Jean Francois. Inmunología. México. Limusa, Primera Edición; 1984.
8. García TF. Los antígenos. Fundamentos de Inmunología. México. Textos Universitarios UNAM. Primera Edición, 1997; 15:20-22
9. Guyton Hall. Tratado de Fisiología Médica. Editorial Mc Graw Hill. 10 Edición. 2001:489-490.
10. Von Adrian UH et al. T cell Function and migration. Two Sides of the Same Coin. New England J. Med. 2000; 392 (14): 1020-1034.
11. Kuby J. Immunology. Third edition. New York. W.H. Freeman & Company, 1997:370-3.
12. Gutiérrez RM, Tejada RM y Aguilar ME. Citocinas. La Terapia del Futuro. Rev Med Hosp. Gen. Mex. 1998; 62(2): 97-102
13. Abbas Ak, Lichtman AH. Inmunología Celular y Molecular. Interamericana 1995.
14. Rhodes D, Trowsdale J. Genetics and Molecular Genetics of the MHC. 1998. <http://www-immuno.path.cam.ac.uk/~immuno/mhc/mhc.html>
15. Frank Romanelli, Pharm D, BCPS. Cytokine-modifying Therapies in Inmune Disorders. Archive J. 2002:1-12. [www.patientcareonline.com/be\\_core/content/journals/data/2002/0201/cytokine.html](http://www.patientcareonline.com/be_core/content/journals/data/2002/0201/cytokine.html)
- 16-. Villaseca JM., Navarro GF., Mendoza HG., Nataro JP, Cravioto A, Eslava C. Pet toxin form enteroaggregative Escherichia coli produces cellular damage associated with fodrin disruption. Infect and Immun. 2000; 68:5920-5927.
17. Alkouwatli K., Leiva M., Ruiz BA., Jiménez VM. Procedures to Study the in Vivo Phagocytosis and Application for the Investigation of Immunomodulatory Activity of Antibiotics. Ars Pharm 2005; 46 (1): 43-55
18. Dougan,G. Molecular approaches to the characterization of bacterial virulence determinants J Gen Microbiol. 1989; 35:1397-1406
19. Haller D et al. Activation of human peripheral blood mononuclear cells by nonpathogenic bacteria in vitro evidence of NK cells as primary targets. Infect Immun 2000 68 (2): 752-759.

20. Sturgill-Koszycki S, Schlesinger PH, Chakraborty P, Haddix PL, Collins PL, Fok AK, et al. Lack of acidification in Mycobacterium phagosomes produced by exclusion of the vesicular proton-ATPase. *Science* 1994; 263: 678-681.
21. Estrés Oxidativo: (Internet-18/Jul/05)  
<http://solea.quim.ucm.es/teach/biol/neuropatología.040403/estrés>
22. Babior BM, Kipnes RS y Curnutte JT. Biological defense mechanisms. The production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent. *J Clin Invest.* 1973; 52, 741-744.
23. Maly FE y Schürer-Maly C. How and Why cells make superoxide: The "phagocytic NADPH oxidase. *NIPS.* 1995; 10: 233-238
24. Clark RA, Malech HL, Gallin JI, Nunoi H, Volpp BD, Pearson DW, et al. Genetic variants of chronic granulomatous disease: prevalence of deficiencies of two cytosolic components of the NADPH oxidase system. *New Engl J Med* 1989; 321: 647-652.
25. Curnutte JT. Molecular basis of the autosomal recessive forms of chronic granulomatous disease. *Immunodeficiency Rev.* 1992; 3: 149-172.
26. Smith RM, Curnutte JT. Molecular basis of chronic granulomatous disease. *Blood.* 1991; 77: 673-686.
27. Bahener RL, Nathan DG. Quantitative nitroblue tetrazolium test in chronic granulomatous disease. *New Engl J Med.* 1968; 278: 971-976.
28. Murray R K. Bioquímica de Harper. 13ª edición. Buenos Aires: El Manual Moderno SA, 1994:837-8.
29. Cascales M. Inmunosenescencia. Estrés Oxidativo, Envejecimiento y Enfermedad. Instituto de España. Madrid, 1999; 169-192.
30. Klebanoff SJ. Iodination of bacteria: a bactericidal mechanism. *J Exp Med* 1967; 126: 1063-1076.
31. Selvaraj RJ, Paul BB, Strauss RR, Jacobs AA, Sbarra AJ. Oxidative peptide cleavage and decarboxylation by the MPOH 2O<sub>2</sub>-Cl<sup>-</sup> antimicrobial system. *Infect Immun* 1974; 9: 255-260.
32. Gregory EM, Fridovich I. Oxygen toxicity and the superoxide dismutase. *J Bacteriol* 1973; 114: 1193-1197.
33. Del Maestro RF, Thaw HH, Bjork J, Planker M, Arfors KE. Free radicals as mediators of tissue injury. *Acta PhysiolScand* 1980; S492: 43-57.
34. Oscar Rojas-Espinosa, Patricia Arce-Paredes. Artículo de revisión Inmunología. Fagocitosis: mecanismos y consecuencias. *Bioquímica.* 2004; 29(2): 55-67.
35. Segal AW y Abo A the biochemical basis of the NADPH oxidase of phagocytes *TIBS.* 1993; 18: 43-47
36. P. Gurfinkel E., Genética y Biología Molecular en Cardiología (III) Infección y Aterosclerosis. *Rev. Cubana Med.* 2001; 40(4):273-87.
37. López-Jaramillo P. Bioquímica del endotelio vascular. Cuarta edición. Santiago de Cali: Editorial Univalle, 1998: 245.

38. Catalog R. D. Systems. IL-2 y IFN-gamma. Minneapolis. USA, 1999: 141-142.
39. Rodríguez-Orozco AR, Medina-Serriteño N. Inmunomoduladores "Rev, Alergia Inm. 2005
40. Abbas A:K:, A:H: Lichtman, J:S:, Pober. Cytokines. Cellular and Molecular Immunology. Pennsylvania, Saunders, USA, 1999; 2:240-260.
41. Stites D:P:, I:T: Abba. Basic and Clinic Immunology. A publishing division of prentice hall. Connecticut, Appleton and Lange. USA, 1999; 6: 86-96.
42. Cytokine Bulletin. Spring R&D systems, 2000: 5-8.
43. Ihle J:N:, et al. Signaling through the hematopoietic cytokine receptors. Annu. Rev. Immunol. 1995; 13:369-398.
44. Stites D:P:, et al. Inmunología Básica y Clínica. Científico Técnica. La Habana. 1999; 5: 91-102.
45. K. Abbas Abul, H. Lichtman Andrew, S. Pober Jordan, Inmunología celular y molecular, Interamericana Mc Graw-Hill, 2001; 3:285-290
46. G. Parslow Tristram, P. Stites Daniel. Inmunología básica y clínica, 10ª Ed, El Manual Moderno, 2002:171-174.
47. García T: F, Los antígenos. En: Fundamentos de Inmunobiología. México: textos universitarios UNAM, 1997; 160-177,
48. Andrew E, Hall JG. IgA antibodies in the bile of rats. I. Some characteristics of the primary response. Immunology 1982; 45:169-175.
49. M. L. Sanz. Inmunidad y Prevención de la Alergia a Alimentos. Alergol Immunol Clin 2001; 16 (2): 58-75.
50. Leclerk C, Ronco J. Introduction. New trends in vaccine research and development: adjuvants, delivery systems and antigen formulations. Res Immunol 1998; 149:9-11
51. Dougan Gordon. The molecular basis for the virulence of bacterial pathogens: implications for oral vaccine development. Colworth Prize Lecture. Infect Immun. 1994: 215-24.
52. Plotkin S. An overview of current vaccine development. New trends in vaccine research and development: adjuvants, delivery systems and antigen formulations. Res Immunol 1998; 149: 11-13
53. Eldridge JH, et al... Biodegradable microspheres as vaccine delivery system. Mol Immunol 1991; 28:287-294.
54. Hackett J. *Salmonella*-based vaccine 1998;8:5-11.
55. Czerninsky C, Russell MW, Lycke N, Lindblad M, Holmgren J. Oral administration of streptococcal antigen coupled to cholera toxin B subunit evokes strong antibody response in salivary glands and extramucosal tissues. Infect Immun. 1989; 57:1072-1077.
56. Hooper C. The new age of vaccines adjuvants. J NIH Res, 1991; 3:21-23.
57. Hui GSN, Chang SP, Gibson H, Hashimoto A, et al..., Influence of adjuvants on the antibody specificity to the *Plasmodium falciparum* major merozoite surface protein, gp 195. J Immunol. 1991; 147:3935-41.

58. Elson CO. Dertzbaugh M. Mucosal Adjuvants. In *Mucosal Immunology*. Washington. Academia Press. 1999:817-838
59. Luna Cruz I., Rodríguez Padilla C., Reyes S. Tamez Guerra, M. Alcocer J. Desarrollo de Vacunas Basadas en Bacterias Lácticas para Inducir Inmunidad en Mucosas contra VIH. *Ciencia UANL / vol.6, No. 1, 2003: 31-38*
60. Collins, FM, Vaccines and cell-mediated immunity. *Bacterial Rev*, 1974; 38: 371-402.
61. McGhee, JR., Mestecky, J., Dertzbaugh, MT., Eldridge, JH., Hirasawa, M., & Kimono, H. The mucosal immune system: from fundamental concepts to vaccine development. *Vaccine*.1992; 10:75-81.
62. Holmgren, SK & Czerkinsky, C. Cholera as an on model for research on mucosal immunity and development of oral vaccine. *Curr Opin Immunol*, 1992; 4:387-392.
63. Svennerholm, AM. & Holmgren, J. Oral combined B subunit-whole cell cholera vaccine. In *Development of Vaccines and Drugs Against Diarrhoea*, 11<sup>th</sup> Nobel Conference, Stockholm, Student-Literatur.1986: 33-43.
64. Winson, AD., Robinson, A., Irons, L. & Stokes, CR. Adjuvant action of cholera toxin and pertussis toxin in the induction of IgA antibody responses to orally administered antigen. *Vaccine*.1993; 11:113-118.
65. Lewis, DJM., Castello-Branco, LRR., Novotny, P., Doungan, G., & Griffin, GE., Circulating cellular immune response to oral immunization of humans with cholera toxin B-subunit. *Vaccine*.1993; 11:119-121.
66. Levine, MM., Kaper, JB., Herrington, D., Losonski, G., Morris, JG., Clements, ML., Black, RE., Tall, B & Hall, R. Volunteer studies of deletion mutants of *Vibrio cholera* 01 prepared by recombinant techniques. *Infect Immun*. 1988; 56: 161-171.
67. Lewis, DJM., Novotny, P., Dougan, G. & Griffin, GE. The early cellular and humoral immune response to primary and booster oral immunization with cholera toxin B-subunit in humans, *Vaccine*.1991; 21: 2087-2094.
68. Lycke, N., & Holmgren, J. Strong adjuvant properties of cholera toxin on gut mucosal immune responses to orally presented antigens. *Immunology*.1986; 59:301-308.
69. Maghazachi, AA. Cholera toxin inhibits interleukin 2 induced, but enhance pertussis toxin-induced T-cell proliferation: regulation by cyclic nucleotides. *Immunology*. 1992; 75:103-106.
70. Lycke, N., Tsuji, T & Holmgren, J. The adjuvant effect of *Vibrio cholera* and *Escherichia coli* heat-labile enterotoxins are linked to their ADP-ribosyltransferase activity. *Eur J Immunol*. 1992; 22:2277-2281
71. Wu, HY. & Russell, MW. Induction of mucosal immunity by intranasal application of a streptococcal surface protein antigen with the cholera toxin B subunit. *Infect Immun*.1993; 61: 314-322.
72. Jiménez Cruz F, Vera CD: "Infección urinaria. Terminología y etiopatogenia". En *Infección Urinaria. Monografías clínicas en enfermedades infecciosas*. Ed Doyma. 1991; 1: 1-8
73. Rodríguez E, Vargas B, Olivares P, Bidegain M, Guerrero B, Domic H, Bravo I. Infección del tracto urinario. *Rev Chile Pediatr* 1990; 61 (Supl 1): 14-6.

74. Smith E, Elder J. Double antimicrobial prophylaxis in girls with breakthrough urinary infections. *Urology* 1994; 43: 708-12
75. Valeria Prado J, Olivia Trucco A, Claudia Durán T., Rosana Mamani J<sup>J</sup>, Michel Royer F. Perfil de resistencia a los antimicrobianos en agentes causantes de infección del tracto urinario en niños chilenos. Programa de vigilancia PRONARES. *Rev.méd. Chile* v.129 n.8 Santiago ago. 2001
76. Stamm WE, Otón TM. Management of urinary tract infections in adults. *New England J Med* 1993; 329:1328-1334.
77. Sussman M. Urinary tract infections. *Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections*, 9<sup>th</sup> ed. London: Arnold; 1998: 601-621
78. Warren JW. Nosocomial urinary tract infections. In: Mandel GBJ, Dolin R, editors. *Principles and Practice of Infectious Disease*, vol. 5. Philadelphia: Churchill Livingstone; 2000. p. 3028-3039.
79. Warren J, Palumbo F, Fitterman L, Speedies S. Incidence and characteristics of antibiotic use in aged nursing home residents. *J Am Ger Soc* 1991; 39:963-969.
80. Salavert M, Gobernado M: "Bacteriuria de la infección al problema real". En *Patología infecciosa en Urología*. Carballido J y Gobernado M (eds) 3-22 (capítulo1). Ed. Ergon. Madrid, 1998
81. Zhanel GG, Harding CK, Gray DR: Asymptomatic bacteriuria. Which patients should be treated?" *Arch Intern Med* 1990; 150: 1.389-1.396
82. Gleckman R, Blagg N, Hibert B, Hall A, Crowley M, Pritchard A, et al. Acute pyelonephritis in the elderly. *Southern Medical Journal* 1982; 75(5):551-554.
83. Zhanel GG, Harding GKM, Nicolle LE. Asymptomatic bacteriuria in patients with diabetes mellitus. *Clin Infect Dis*. 1991; 13:150-154.
84. Expert-Feed-Back. [www.zambon.es/areasterapeuticas](http://www.zambon.es/areasterapeuticas). (revision en 10 Jun 2005)
85. Sobel J: Pathogenesis of urinary tract infection. *Infect Dis Clin North Am* 1997; 531-544.
86. Richardson J, Hricz L. Risk factors for the development of bacteremia in nursing home patient. *Arch Fam Med* 1995; 4:785-789.
87. Norman D, Toledo S. Infections in elderly persons. An altered clinical presentation. *Clin Ger Med* 1992; 8(4):713-719.
88. De Man P, Cedergren B, Werback S et al: Receptor-specific agglutination tests for the detection of bacteria the globoseries of glycolipids. *J Clin Microbiol* 1987; 25-401.
89. Lindsay E Nicolle, *Epidemiology of Urinary Tract Infection*. *Infect Med* 2001; 18(3):153-162.
90. Nicolle Le. Asymptomatic bacteriuria in the elderly. *Infect Dis Clin North Am* 1977; 11:647-662.
91. Warren JW. Catheter-associated urinary tract infections. *Infect Dis Clin North Am* 1997; 11:609-622.

92. Agace W, Connell H, Svanborg C: Host resistance to urinary tract infection. *Urinary Tract Infection: Molecular Pathogenesis and Clinical Management*. Washington, DC: American Society for Microbiology 1995; 221-243.
93. Prat V, Hatala M, Mohr HJ, Bacterial renal infection in rat produced by direct injection of bacteria into renal tissue. An experimental model. *Acta Biol Med Germ* 1971; 34: 1.499-1.507.
94. Dalet F, Del Río G: Patogenia de la infección urinaria. *Infecciones Urinarias*. Ene Publicidad SA 1996; 70-123.
95. Marild S, Helstrom M, Jodal U: Correlation of bacterial adherence and inflammatory response in the urinary tract. *Host Parasite Interactions in the Urinary Tract*. Chicago, Chicago University Press, 1987.
96. Svanborg-Edén C, Shahin R, Briles D: Host resistance to mucosal Gram-negative infection. Susceptibility of LPS non-responder mice. *J Immun* 1988; 140: 3180.
97. Guzmán Durán AM, Valdivieso Davila A; (grafica) *Infeccion Urinaria: Diagnostico y Tratamiento*. Vol. 26, No. 3, 1997.
98. Guzmán Durán AM, Valdivieso Davila A, *Infeccion Urinaria: Diagnostico y Tratamiento*. Vol. 26 No. 3, 1997.
99. Martín F, Papel de las bacterias anaerobias en las infecciones urinarias. *Infecciones por Anaerobios 100 años despues*. Grafimed Publicidad 1994; 139-147.
100. Cires Pujol M, Freijoso Santiesteban E, Vergara FE, Machado O, Alfonso I, Salas OL, Borrero GA, R. Hernandez DS, Reyes L, Sansó F., y García B. Guía para la práctica en infecciones del tracto urinario. *Rev Cubana Med Gen Integr* 2002; 18(2): 176-80.
101. Rodríguez-Angeles G. Principales características y diagnostico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. *Salud Pública de México*. Vol. 44, No. 5. Septem-Oct. 2002
102. Cortez-Ortiz IA, Rodríguez-Angeles G, Moreno EEE, Tenorio-Lara JM, Torres M. BP, Montiel VE., Brote causado por *Escherichia coli* en Chalco, México. *Salud Pública de México*. Vol. 44. No. 4. Cuernavaca July/ Aug. 2002.
103. A. Ammon. Surveillance of enterohaemorrhagic *E. coli* (EHEC), infections and haemolytic uraemic syndrome (HUS) in Europe. *EUROROUNDUP*. Vol. 12, No. 2. 1997: 1-18
104. Svanborg C, Godaly G. Bacterial Virulence in urinary tract infection. *Infec Dis Clin. North Am*. 1997; 3: 513-529.
105. Edwards JE: *Species of Candida*. In Mendell, Douglas y Bennett (Eds): *Principles and Practice of Infections Disease*. Churchill Livingstone Inc. New York. 4th Ed. 1977; 2.571-2.589.
106. Kucheria R, Dasgupta P, Sacks SH, Khan MS, Seerin NS. Urinary tract infections: new insights into a common problem. *Postgrad Med J* 2005; 81:83-86.
107. Mabeck CE, Orskov F, Orskov L: *Escherichia coli* serotypes and renal involvement in urinary-tract infection. *Lancet* 1971; 1: 1.312-1.314.
108. Mabeck C, Orskov F, Orskov L: Studies in urinary tract infections. *Escherichia coli* O: H serotypes in recurrent infections. *Acta Med Scand* 1971; 190: 279-282.

109. Marild S, Jodal U, Orskov L: Special virulence of the *Escherichia coli* O1: K1: H7 alone in acute pyelonephritis. *J Pediatr* 1989; 115: 40-45.
110. Hagberg L, Jodal U, Korhonen T, et al: Adhesion, hemagglutination, and virulence of *Escherichia coli* causing urinary tract infections. *Infect Immun* 1981; 31: 564-570.
111. De Man P, Cedergren B, Werback S et al: Receptor-specific agglutination tests for the detection of bacteria the globoseries of glycolipids. *J Clin Microbiol* 1987; 25:401.
112. Barry IE: *Enterobacterias. Principles and Practice of Infections Diseases*. Churchill Livingstone Inc. New York. 4th Edition. 1997; 2.199-2.217.
113. Flagelos y Pilis. <http://www.biologia.edu.ar/bacterias/micro5.2005.htm>.
114. Imágenes obtenidas del Protonic NanoMachine Group <http://www.fbs.osaka-u.ac.jp/en/seminar/09a.html> (Septm-Octu. 2005)
115. Abraham SN, Shin J5, Malaviya R. Type 1 Fimbriated *Escherichia coli*-mast cell interactions in cystitis. *J Infect Dis* 2001; 183:S51-55.
116. Plos K, Connell H, Modal U. Intestinal carriage of P fimbriated *Escherichia coli* and the susceptibility to urinary tract infection in young children. *J Infect Dis*. 1995; 171; 625-631.
117. Vela Navarrete R, Ale JM. "Sépsis de origen urológico". En *Infección de alto Riesgo*. Ed Salvat. Madrid. 1982; 8: 127-140.
118. Goiuszko P, Mseley SL, Truong LD, et al., Development of experimental model of chronic pyelonephritis with *Escherichia coli* 075:K5: h-bearing Dr fimbriae: mutation in the dra region prevented tubolointerstitial nephritis. *J Clin Invest* 1997; 99:1662-1672
119. Graingei RG, Longstaff AJ, Parsons MA. Xanthogranulomatous pyelonephritis. A Reappraisal. *Lancet*. 1982; 19: 1398.
120. Edwards, P.R. and Ewing, W.H. (1986). *Identification of Enterobacteriaceae*, 4th Ed., Elsevier Science Publishing Co. Inc., New York. Pages 135-172.
121. Bopp, C.A. et al. *Manual of Clinical Microbiology*, American Society for Microbiology, Washington, D.C. 7th Ed., 1999; 459-474.
122. Lomberg H, Hanson LA, Jacobsson B, et al. Correlation of P blood group, vesicoureteral reflux, and bacterial attachment in patients with recurrent pyelonephritis. *N Engl J Med*, 1983; 308; 1189-1192.
123. Gupta SK, Berk RS, Masinick S, and Hazlett LD: Pili and lipopolysaccharide of *P aeruginosa* bind to the glycolipid asialo-GM1. *Infect Immun* 1994; 62: 4.481-4.487.
124. Hofman P., Piche M., Farahi FD., Negrate G., Selva E., Landraud L, Alliana SA., Boquet P. and Rossib B. Increased *Escherichia coli* Phagocytosis in Neutrophils That Have Transmigrated across a Cultured Intestinal Epithelium. *Infection and immunity*, Vol. 68, No. 2. Feb. 2000: 449-455
125. Svanborg-Edén C, Andersson B, Aniansson G, et al: Bacterial virulence in urinary tract infection. *Infect Dis Cin North Arn* 1987; 1: 731-750.

126. Berger RE, Krieger J, Rothenger I, Muller CH, Millier SL: Bacteria in the prostate issue of men with idiopathic prostate inflammation. *J Urol* 1997; 157: 863-865.
127. Miyashita H, Troncoso P, Babaian RJ: BCG-induced granulomatous prostatitis. A comparative ultrasound and pathologic study. *Urology* 1992; 39: 364-367.
128. Doble A: Chronic prostatitis. *Br J Urol* 1994; 74: 537-541.
129. Indudhare R, Singh SK; Vaidyanathais S, Banerjee CK: Isolated invasive candidal prostatitis. *Urol Int* 1992; 48: 362-364.
130. Moon TD: Immunology of chronic prostatitis: Etiological and therapeutic considerations. *Cur Opin Urol* 1998; 8: 39-41.
131. Carithers H. The first use of an antibiotic in America. *Am J Dis Child* 1974; 128: 207-11.
132. MG., Mannino D, Eaton S, Moss M. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med* 2003; 348: 1546-54.
133. Beltrán BC. Antimicrobianos en Unidades de Cuidados Intensivos: Formas de administración. *Rev Chil Infect* 2003; 20 (Supl 1): S80 - S86
134. Bergoglio RM. Antibióticos. Buenos Aires, Editorial Médica Panamericana, n.S.A., 5ª ed., 1993.
135. Neu HC. Resistencia a los antibióticos: ¿un problema? Pfizer Inc., 1989.
136. León Jaramillo VE., Resistencia bacteriana a los antibióticos en la Unidad de Cuidados Intensivos, Hospital de Caldas, 1992-1994. *Colombia Médica* 1996; 27: 66-8
137. GA., Archer GL. New mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents. *N Engl J Med* 1991; 324: 601-12.
138. Kapusnik JE, Miller RT, Sande MA. Terapia antibacteriana en la terapia intensiva. En Shoemaker WC. Tratado de medicina crítica y terapia intensiva. Philadelphia, W.B. Saunders Co., 2ª ed., 1989.
139. Murray BE. Antibióticos en la unidad de cuidado intensivo. El Eterno Problema: la resistencia a los antibióticos. *J Infect Dis* 1991; 163: 1055-61.
140. Haley RW. Managing hospital infection control for cost-effectiveness. *Public Health Focus: Surveillance, Prevention and control of nosocomial infections. MMWR* 1992; 41: 783-87.
141. Jawetz E, Joseph LM, Adelberg EA. Manual de microbiología médica. México, El Manual Moderno, S.A., 5ª ed. 1973.
142. Raka L, Mulliqi-Osmani G, Berisha L, Begolli L, Omeragiq S, Parsons L, Sallinger M, Jaka A, Kurti A, Jakupi X. Etiology and susceptibility of urinary tract isolates in Kosova. *Int J Antimicrob Agents* 2004; 23S1:S2-S5.
143. Garner P, Provine HT. Manual of acute bacterial infections. Boston, Little Brown and Co., 1979.

144. Mathai E, Thomas RJ, Candí S, Mathai M, Bergstrom S. Antimicrobials for the treatment of urinary tract infection in pregnancy: practices in southern India. *Pharm Epid Drug Safety* 2004; 13:645-652.
145. Dellinger EP. Nosocomial infection. In *Infection*. Scientific American, Inc., 1993: 2-15.
146. Schimpff SC, De Jongh CA, Caplan ES. Infecciones en el paciente de terapia intensiva. En Shoemaker WC. *Tratado de medicina crítica y terapia intensiva*. Philadelphia, W.B. Saunders Co., 2ª ed., 1989.
147. O'Donnell JA, Gelone SP, Abrutyn E. Selecting drug regimens for urinary tract infections: Current recommendation. *Infect Med* 2002; 19(1):14-22.
148. Wright SW, Wrenn KD, Haynes ML, et al. Prevalence of risk factors for multidrug resistant uropathogens in ED patients. *Am J Emerg Med* 2000; 18: 143-146.
149. AM., Molstad S, Lundborg CS, Odenholt I and the Swedish Study group on Antibiotic Use. Management of urinary tract infections in primary care: A repeated 1-week diagnosis-prescribing study in five counties in Sweden in 2000 and 2002. *Scand J Infect Dis* 2004; 36:134-138.
150. Strandberg K, Beerman B, Lonnerholm C,. Treatment of urinary tract infections. Uppsala: Medical Product Agency; 1990; 3: 234-56
151. RW., Culver DH, White JW, et al. The efficacy of infection surveillance and control programs in preventing nosocomial infections in US hospitals. *Am J Epidemiol* 1985; 121: 182-205.
152. Semmelweis I. Etiología, concepto y profilaxis de la fiebre puerperal. En *El desafío de la epidemiología*. Publicación científica N° 505, Washington, OPS/OMS, 1988.
153. Sprunt K, Redman W, Leidy G. Antibacterial effectiveness of routine handwashing. *Pediatrics* 1973; 52: 264-71.
154. Hugles JM, Gómez JS, Favero MS. Pautas para el lavado de las manos y para el control del entorno en hospitales. En *Prevención y control de las infecciones nosocomiales*. 2ª ed. Bogotá, Laboratorios Undra S.A., 1992.
155. Geelhoed GW. New approaches to sepsis in the surgical patient. *Infect Surg* 1991; 1: 20-4.
156. Dyer IE, Sankany TM, Dawson JA. Antibiotic resistance in bacterial urinary tract infections, 1991 to 1997. *West J Med* 1998; 169:265-268.
157. Cass AS, Ireland GW, Aal C. Antibacterial perineal washing for prevention of recurrent urinary tract infections. *Urology* 1985; 25:492-494.
158. Hellinger WC. Confronting the problem of increasing antibiotic resistance. *South Med J* 2000; 93(9):842-8.
159. Mulvey MA, Joel SD, Hultgren SJ. Establishment of a persistent *Escherichia coli* reservoir during the acute phase of a bladder infection. *Infect Immun*. 2001; 69:4572-4579.
160. Knutton S, Lloyd DR, Mc Neish AS. Adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to human intestinal enterocytes and cultured human intestinal mucosa. *Infect Immun*. 1987; 55:69-77.

161. Patogénesis y en el Diseño de Estrategias de Control de Infecciones en el Tracto Urinario. Optimismo sobre el control de las infecciones del tracto urinario mediante el uso de vacunas. (Science, abril, 1997). <http://www.iladiba.com.co/revista/1997/06/acinfec.asp>
162. PÉREZ CC. Aspectos prácticos en la utilización de antimicrobianos; *Medición de niveles plasmáticos*. Rev. chil. Volumen 19, Infectol. 2002
163. Rodríguez Orozco AR. El reto de obtener respuestas inmunogénicas en mucosas. Uso de coadyuvantes. Revista Alergia México 2003; L (4):161-5.
164. Lycke N & Holmgren J. Intestinal mucosal memory and presence of memory cells in the lamina propria and Peyer's patches in mice 2 years after oral immunization with cholera toxin. Immunology. 1986; 59: 301-308
165. Carmona A, Aislamiento y Caracterización Parcial de una Cepa de *Bacillus thuringiensis* Tóxica a *Spodoptera frugiperda* (lepidoptera: noctuidae). World Journal of Microbiology and Biotechnology. 2001; 17:463.
166. Elson Co, Dertzbaugh M. Mucosal adjuvants In. Mucosal immunology. Washington. Academia Press, 1999: 817-838.
167. Brousseau R, Masson L. Bacillus thuringiensis insecticidal cristal toxins: genes estructura and mode of action. Biotechnol Adv 1988; 6:697-724.
168. Brown Nelly L., Whiteley HR. Isolation of the second Bacillus thuringiensis RNA polymerase that transcribes from a crystal protein gene promoter. USA, Washington. 1990: 6682-38.
169. Soberón M, Bravo A. Bacillus thuringiensis y sus toxinas insecticidas. (Jun/Jul/05) <http://www.biblioweb.dgsc.unam.mx/libros/microbios/cap12/videoas/c12an1.html>
170. Orietta Fernández-Larrea Vega: Tecnología de producción de Bacillus thuringiensis. Manejo integrado de Plagas y Agroecología. Costa Rica. 2002; 64: 110-115
171. International Programme on Chemical Safety. Environmental Health Criteria 217. *Bacillus thuringiensis*. <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc217.htm> (Jun-Jul-2005)
172. Cowles EA, Yunovitz H, Charles JF, Gill, SS. Comparison of toxin overlay and solid-phase binding assays to identify diverse Cry1Ac toxin-binding proteins in heliothis virescens midgut. California. 1995: 2738-44.
173. Lukac MH, Françoise J, Meter L, Huetter R, and Dietmar GB. Characterization of monoclonal antibodies to a Crystal protein of Bacillus thuringiensis subsp. Kurstaki. Switzerland, Zurich. 1986: 228-232
174. Custodio Alejandro M. Bacillus thuringiensis (13/ Junio/ 05) <http://www.bioinformatica.uab.es/biocomputación/treballs001/custodio/Bt-pag-ppal.htm>
175. Höfte, H. y H. R. Whiteley. 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. Microbiol. Rev. 53: 242-255.
176. Lambert, B. y M. Peferoen. 1992. Insecticidal promise of *Bacillus thuringiensis*: facts and mysteries about a successful biopesticide. BioScience 42: 112-122.
177. Schnepf, E., N. Crickmore, J. Vanrie, D. Lereclus, J. Baum, J. Feitelson, D. R. Zeigler y D.H. Dean. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 1998; 62: 775-806.

178. García-Yáñez J, Sánchez-Yáñez JM, López-Barbosa EC. Producción de bioinsecticida a base de *Bacillus thuringiensis*, Minirevisión. Cuatro Vientos UMSNH. Año 3, No. 14, 2000.
179. Crickmore, N., D. R. Zeigler, J. Feitelson, E. Schnepf, J. Vanrie, D. Lereclus, J. Baum y D. H. Dean. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 1998; 62: 807-813
180. McClintock JT, Schaffer CR & Sjoblad RD. A comparative review of the mammalian toxicity of *Bacillus thuringiensis* based pesticides. Pesticide Science. 1995: 45: 95-105.
181. Adang, M. J. *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins: gene structure, action and utilization. In: K. Maramorosch (ed.). Biotechnology for Biological Control of Pests and Vectors. CRC Press Boca Raton, Fla. 1991. 3-24
182. B.M. Ribeiro and N.E. Crook. Construction of occluded recombinant baculoviruses containing the full-length cry1Ab and cry1Ac genes from *Bacillus thuringiensis*. Braz J Med Biol Res, June Volume, 1998; 31(6) 763-769
183. C. Angelucci, G. Barrett-Wilt, D.F. Hunt, S. Howitt, P.D. East, R.J. Akhurst Binding sites for the Cry1Ac insecticidal crystal protein of *Bacillus thuringiensis Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: noctuidae). From proceedings of the 11th cotton conference Brisbane Convention and Exhibition Centre 13th - 15th August 2002.
184. Ge AZ, Pfister RM & Dean DH. Hyperexpression of a *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin-encoding gene in *Escherichia coli*: properties of the product. Gene. 1990; 93:49-54.
185. Hofmann C, Luthy P, Hutter R & Pliska V. Binding of the d-endotoxin from *Bacillus thuringiensis* to brush-border membrane vesicles of cabbage butterfly (*Pieris brassicae*). European Journal of Biochemistry. 1988; 173: 85-91.
186. Feitelson, J.S., J. Payne y L. Kim. *Bacillus thuringiensis*: Insects and beyond. Bio/Technology 1992;10: 271-275.
187. Iracheta Cárdenas M, Galán-Wong L, Ferré-Manzanero J, Pereyra-Alfárez B., Selección de Toxina Cry contra *Trichoplusia ni*. Ciencia UANL. Vol. 4, No.1, 2001
188. Whiteley, H. R. y H. E. Schnepf. The molecular biology of parasporal crystal body formation in *Bacillus thuringiensis*. Ann. Rev. Microbiol. 1986; 40: 549-576.
189. Koertge TE & Butler E. Dimeric Mouse IgA is transported into Mouse. Scandinavian. Journal of Immunology. 1986; 24:567-574
190. Lambert, B., H. Hofte, K. Annys, S. Jansens, P. Soetaert y M. Peferone. Novel *Bacillus thuringiensis*. Insecticidal crystal protein with a silent activity against coleopteran larvae. Appl. Environ. Microbiol. 1992a; 58: 2536-2542.
191. Lambert, B., W. Theunis, R. Aguda, K. Van Audenhove, C. Decok, S. Jansens, J. Seurinck y M. Peferoen. Nucleotide sequence of gene *cryIIID* encoding a novel coleopteran active crystal protein from strain BT1109P of *Bacillus thuringiensis* subsp. *Kurstaki*. Gene, 1992b; 110: 131-132.
192. Taylor, R., J. Tippett, G. Gibb, S. Pells, D. Pike, L. Jordan y S. Ely. Identification and characterization of a novel *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin entomocidal to coleopteran and lepidopteran larvae. Mol. Microbiol. 1992; 6: 1211-1217
193. A de la Riva G, and JM Adang. Expression of *Bacillus thuringiensis* delta-Endotoxin Genes in Transgenic Plants. Biotechnologia Aplicada, Vol. 13, No. 4 1996.

194. Rausell C, Pardo-Lopez L, Sanchez J, Munoz-Garay C, Morera C, Soberon M, Bravo A. Unfolding events in the water-soluble monomeric Cry1Ab toxin during transition to oligomeric pre-pore and membrane-inserted pore channel. *J Biol Chem*. 2004; 31; 279(53):55168-75.
195. Xie R, Zhuang M, Ross LS, Gomez I, Oltean DI, Bravo A, Soberon M, Gill SS. Single amino acid mutations in the cadherin receptor from *Heliothis virescens* affect its toxin binding ability to Cry1A toxins. *J Biol Chem*. 2005; 280(9):8416-25.
196. Ali H. Sayyed, Robert Haward, Salvador Herrero, Juan Ferré, and Denis J. Wright. Genetic and Biochemical Approach for Characterization of Resistance to *Bacillus thuringiensis* Toxin Cry1Ac in a Field Population of the Diamondback Moth, *Plutella xylostella*. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 66, No. 4. April 2000, p. 1509-1516
197. Dougan Gordon. The molecular basis for the virulence of bacterial pathogens: implications for oral vaccine development. Colworth Prize Lecture. *Infect Immun*. 1994: 215-24.
198. Murphy BR. Mucosal immunity to viruses In, *Handbook of Mucosal Immunology*. Academic Press, New York. 1994
199. Abreu-Martin MT & Targan SR. Regulation of immune response of the intestinal mucosa. *Critical Reviews in Immunology*. 1996; 16: 277-309.
200. Eldridge JH, et al. Biodegradable microspheres as vaccine delivery system. *Mol Immunol* 1991; 28:287-94
201. Hackett J. Samoella-based vaccines. *Vaccine*. 1998; 8:5-11
202. Keren DF, Brown JE, McDonald RA & Wassef JS. Secretory immunoglobulin A response to Shiga toxin in rabbits: kinetics of the initial mucosal immune response and inhibition to toxicity in vitro and vivo. *Infection and Immunity*. 1989; 57:1885-1889
203. Czersinsky C, Russell MW, Lycke N, Lindblad M, Holmgren J. Oral administration of streptococcal antigen coupled to cholera toxin B subunit evokes strong antibody response in salivary glands and extramucosal tissues. *Infect Immun*. 1989; 57:1072-77.
204. Roman-Calderon E, Rodríguez-Padilla C, Tamez-Guerra R, Madrid-Marina V, y Alcocer-Gonzalez JM. Construcción de adyuvantes genéticos basados en la fusión de toxinas bacterianas y antígenos. *Genética y Biomedicina Molecular. Rev Salud Pública y Nutrición*. No. 2-2000.
205. Prasad SSSV, Shetna YI. Enhancement of immune response by the proteinaceous crystal of *Bacillus thuringiensis*. *Biochem Biophys Res Commun* 1975; 62:517.
206. Prasad SSSV, Shetna YI. Antitumor immunity against YAS after treatment with the proteinaceous crystal of *Bacillus thuringiensis*. *Indian J Exp Biol* 1976; 14; 285.
207. Vázquez RI. Moreno-Fierros L, Neri-Bazán L, de la Riva GA, Lopez-Revilla R. *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac protoxin is a potent systemic and mucosal adjuvant. *Scand J Immunol* 1999; 49:578-584
208. Vazquez-Padron RI, Moreno-Fierros L, Neri-Bazán L, de la Riva GA & López Revilla R. Intra-gastric and intraperitoneal administration of Cry1Ac protoxin from *Bacillus thuringiensis* induce systemic and mucosal antibody response in mice. *Life Sciences*, 1999; 64: (21): 1897-1912.

209. Moreno-Fierros L, Garcia N, Gutierrez R, Lopez-Revilla R, Vazquez-Padron, RI. Intranasal, rectal and intraperitoneal immunization with protoxin Cry1Ac from *Bacillus thuringiensis* induces compartmentalized serum, intestinal, vaginal and pulmonary immune responses in Balb/c mice. *Microb Infect.* 200; 2:1-6.
210. Moreno-Fierros L, López-Revilla R, Reséndiz-Albor AA. Differences Between the large and small intestine in the immunodominant amoebic proteins recognized by IgG and IgA antibodies in BALB/c mice. *Scand J Immunol* 2002; 55:458-69.
211. Mayes ME, Held GA, Lau C, Seely JC, Roe RM, Dauterman WC & Kawanishi R. Characterization of the mammalian toxicity of the crystal polypeptides of *Bacillus thuringiensis* subsp israelensis. *Fundamental and Applied Toxicology.* 1989; 13: 310-16
212. Vazquez-Padron, Moreno-Fierros, L, Neri-Bazan L, Martínez-Gil AF, de la Riva GA, and Lopez-Revilla R. Characterization of the mucosal and systemic immune response induced by Cry1Ac protein from *Bacillus thuringiensis* HD 73 in mice. *Braz J Med Biol Res.* 2000; 33(2):147-155.
213. Koertge TE & Butler E. Dimeric Mouse IgA is transported into Mouse. *Scandinavian. Journal of Immunology.* 1986; 24:567-574
214. Rodríguez AR y cols. The adjuvant *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac protoxin is a potent monocyte activator a mitogen. *ACI. International Supplement. Session Infection and Immunity "In XVII International Congress of Allergology and Clinical Immunology"* Sidney, Australia. Seattle: Hogrefe and Publishers. 2000; (2): 766.
215. Rodríguez Orozco AR., Rico Rosillo G. & Lopez Revilla R. The effect of Cry1Ac on human monocytes and neutrophil activation. *Research Notes. Allergy Clin Immunol Int- J World Allergy Org.* 2005; 17(2):64-65.
216. Babior BM, Kipnes RS y Curnutte JT. Biological defense mechanisms. The production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent. *J Clin Invest.* 1973; 52: 741-744.
- 217.- Fernandez EE., *Microbiología Sanitaria.* Editorial EDUG. Vol. 1, 1981
- 218 Scriban R. *Biología, Cinéticas Microbianas,* 1985; 2(4): 132-165
- 219 Bruchmann EE. *Bioquímica Técnica.* Editorial Acribia, vol.2, 1980: 52-119
- 220 Helsen J. *An Introduction to Enzyme Kinetics.* Journal of Chemical Education. Vol.51.No.6., 1974: 381-86.
- 221 NCCLS. *Métodos de dilución para el estudio de susceptibilidad antimicrobiana para bacterias de crecimiento aeróbico.* Norma aprobada, NCCLS documento M7-A4, Pennsylvania 1997; 4(2):1-23.
222. - Unanue E. *Interactions of pathogens with the innate and adaptive immune system.* Cellular microbiology. Washington DC: ASM Press. 2000; 291-311.
- 223.- Kim SJ, Gershov D, Ma X, Brot N, Elkon KB. Opsonization of apoptotic cells and its effect on macrophage and T cell immune responses. *Ann NY. Acad Sci.* 2003; 987: 68-78.
- 224.- Rosenzweig SD, Holland SM. *Phagocyte immunodeficiencies and their infections,* J Allergy Clin Immunol. 2004; 113:620-626.

- 225.- Roth A. Enhancement of nonspecific resistance to bacterial infection by biological response modifiers, in: Roth JM, ed. *Virulence mechanisms of bacterial pathogens*. Washington DC: ASM Press. 1988; 329-342.
- 226.- Jimenez-Valera M, Moreno E, Ruiz-Bravo A. Immunomodulation by antimicrobial agents. *Recent Res Devel Antimicrob Agents Chemother*. 1997; 2: 83-94
- 227.- Janeway CA Jr, Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol*. 2002; 20: 197-216
- 228.- Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol*. 2003; 21: 335-376.
229. Ayala Mata F. Efecto inhibitorio de la proliferación bacteriana de los sobrenadantes de cultivos de células mononucleadas humanas, estimuladas por Cry1Ac in Vitro. Tesis de Licenciatura, Escuela de Químico-Farmacobiología, División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas. UMSNH. Morelia, Mich., Mx. 2005.
- 230.- Amsden GW. Anti-inflammatory effects of macrolides. An underappreciated benefit in the treatment of community-acquired respiratory tract infections and chronic conditions. *J Antimicrob Chemother*. 2005; 55:10-21
- 231.- Savill JS., Wyllie AH., Henson JE., Walport MJ., Henson PM., and Haslett C. Macrophage phagocytosis of aging neutrophils in inflammation : programmed cell death in the neutrophil leads to recognition by macrophages. *J Clin. Investig*. 1989; 83:865
- 232.- Madara JL. Stafford J., Dharmasathaphorn K., and Carson S. Structural analysis of a human intestinal epithelial cell line. *Gastroenterology*. 1987; 92: 1133-1145.
- 233.- Rodríguez Orozco Alain y cols, The effect of Cry 1 Ac on Human Monocytes and Neutrophil Activation México. D.F. 2005: 64-65.
- 234.- Rodríguez AR y cols. The adjuvant *Bacillus thuringiensis* Cry 1Ac protoxin is a potent monocyte activator a mitogen. *ACI. International Supplement. Session Infection and Immunity "In XVII International Congress of Allergology and Clinical Immunology"* Sidney, Australia. Seattle: Hogrefe and Publishers, 2000: (2):766.
- 235.- Rodríguez Orozco AR. El reto de obtener respuestas inmunogénicas en mucosas. Uso de coadyuvantes. México, D. F. 2003; 5:161-165.  
Hernandez-Urzuza M and Alvarado NA. Interleucinas e Inmunidad Innata, *Rev Biomed*, 2001; 12(4): 272-280.
- 236.- Hernandez-Urzuza M and Alvarado NA. Interleucinas e Inmunidad Innata, *Rev Biomed*, 2001; 12(4): 272-280.
- 237.- Brouckaert P, Libert C, Everaerd B, Takahashi N, Cauwels A, Fiers W. Tumor necrosis factor, its connection with interleukin 6. *Immunobiology* 1993; 187:317-29
- 238.- Isaac A, Lindenmann J. Virus interferente. I. The interferon. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 147-150)
- 239.- Sinigaglia F, D'Ambrosio D, Rogge L., Type 1 interferons and the Th1/Th2 paradigm. *Dev Comp Immunol*. 1987; 23:657—63
- 240.- Aggarwal BB. Rodríguez PC. Antiproliferative protein from *Bacillus thuringiensis* var., *thuringiensis*. *Microbiology*. 1999; 2. 1-18  
Spellberg B, Edwards JE. Type 1/Type2 immunity in infectious diseases. *Clin Infect Dis*

- 241.- Sensi ML, Farina C. Clonal expansion of T lymphocyte in human melanoma metastasis after treatment with haptan- modified autologous tumours vaccine. *J Clin Invest* 1997; 99:710-7.
- 242.- Hanna JR, Herbert C, Hoover JB, Vermoken JF, Harris H, et al. Adjuvant active specific. Immunotherapy of stage II and stage III. Colon cancer with an autologous tumour cell vaccine. First randomized phase III trials show promise. *Vaccine* 2001;19:2576-82.
- 243.- Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. *Inmunología celular y molecular*. 3 ed. Madrid: Interamericana McGraw-Hill, 2000:268-91.
- 244.- Mori H., Mihara M., Uesugi Y., Nagai H., Koda. Mechanism for macrophages activation against *Corynebacterium parvum* participation of T cells and this its lymphokines. *Microbiol Immunol* 1994; 38:938-988
- 245.- Rossol S., Voth R., Brunner S., Muller W.E., Buttner M., Gallati H., Meyer Zum Buschenfelde K.H., Hess G. *Corynebacterium parvum* (*Propionibacterium acnes*): an inducer of tumor necrosis factor-alpha in human peripheral blood mononuclear cells and monocytes in vitro. *Eur J Immunol* 1990; 20:1761-1765
- 246.- Okamura H., Kawaguchi K., Shoji K., Kawade Y. High-level induction of gamma interferon with various mitogens in mice pretreated with *Propionibacterium acnes*. *Infect Immun.*1982; 38:440-443
- 247.- Okamura H., Wada M., Nagata K., Tamura T., Shoji K. Induction of murine gamma interferon production by lipopolysaccharide and interleukin-2 in *Propionibacterium acnes*-induced peritoneal exudates cells. *Infect Immun* 1987; 55:335-341.
- 248.- Sugiyama M., Epstein L.B. Effect of *Corynebacterium parvum* on human T-Lymphocyte interferon production and T-Lymphocyte proliferation in vitro. *Cancer Res* 1987; 38:4467-4473
- 249.- Álvarez B., Ezquerro A., Gomez del Moral M., Alonso F., Tarés J., Marca J., Domínguez J. Análisis of the in Vitro effects of the compound Inmodulen of several parameters of the pig immune response. Proceeding 15 th IPVS, Birmingham, Reino Unido., 1998, pp 24.
- 250.- Klir J.J., Shahbazian M., Matteri R.L., Becker B.A., Effects of termal enviroment on response to acute peripheral lipopolysaccharide challenge exposure in neonatal pig. *AJVR.* 1997; 58:364-369
- 251.- Norimatsu M., Ono T., Auki A., Ohishi K., Takahashi T., Watanabe G., Taya K., Sasamoto S., Tamura Y. Lipopolysaccharide-induced apoptosis in swine lymphocytes in vivo. 1995; 63:1122-1126
- 252.- Alving C.R. Lipopolysaccharide, lipid A, and liposomes containing lipid A as immunologic adyuvants. *Immunobiol* 1993; 187:430-446.
- 253.- Verma J.N., Rao M., Amelem S., Krzych U., Alving C.R., Green S.J., Wassef N.M. Adyuvant effects of liposomas containing lipid A: enhancement of liposomal antigen presentation and recruitment of macrophages. *Infect Immun.* 1992; 60:2438-2444.
- 254.- Flo J., Golmand H., Roux M.E., Massouh E. Oral administration of bacterial immunomodulator enhances the immune response to cholera toxin. *Vaccine.* 1996; 14:1167-1173
- 255.- Hann L., Verweij W.R., Holtrop M., Brands R., Van Scharrenburg G.J., Palache A.M., Agsteribbe E., Wilschut J. Nasal or intramuscular immunization of mice with influenza subunit antigen and the B subunit of *Escherichia coli* heat-labile toxin induce IgA-or-IgG-mediated protective mucosal immunity. *Vaccine.* 2001; 19:2898-2907

256.- Kim P.H., Eckmann L., Lee W.J., Han W., Hagnoff M.F. Cholera toxin cholera toxin B subunit induce IgA switching through the action of TGF-beta 1. *J Immunol* 1998; 160: 1198-11203

257.- Van Der Verg, L.L., Hartman A.B., Bhattacharjee A.K., Tall B.D., Yuan L., Sasala K., Hadfield T.L., Zollinger W.D., Hoover D.L., Warren R.L. Outer membrane protein of *Neisseria meningitidis* as a mucosal adjuvant for lipopolysaccharide of *Brucella melitensis* in Mouse and guinea pig intranasal immunization models. *Infect Immun.* 1996; 64:5263-5268.

258.- Verweij W.R., Haan L., Holtrop M., Agsteribbe E., Brands R., Van Scharrenburg G.J.M., Wilschut J. Mucosal immunoadjuvant activity of recombinant *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin and its B subunit: induction of systemic IgG and secretory IgA response in mice by intranasal immunization with influenza virus surface antigen. *Vaccine* 1998; 16:2069-2076