

INDICE

I INTRODUCCIÓN.....	1
I.1 INFECCIONES RESPIRATORIAS	1
I.1.1 Generalidades.....	1
I.1.2 Principales agentes etiológicos causantes de Infecciones Respiratorias	2
I.1.3 Tratamiento y prevención de Infecciones Respiratorias	3
I.2 EXTRACTOS BACTERIANOS INMUNOMODULADORES.....	5
I.3 RUTA INTRANASAL COMO VÍA DE INMUNIZACIÓN DE MUCOSAS.....	6
I.4 INMUNIDAD EN EL SISTEMA RESPIRATORIO	9
I.4.1 Homeostasis del Sistema Respiratorio	9
I.4.2 Mecanismos de defensa contra patógenos aéreos.....	9
I.4.3 Células Dendríticas	12
I.4.4 Células Dendríticas Del Tracto Respiratorio	14
I.5 OBJETIVO GENERAL	17
I.6 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
II MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
II.1 EXTRACTOS BACTERIANOS.....	18
II.2 ANIMALES.....	19
II.3 AISLAMIENTO DE MACRÓFAGOS PERITONEALES.....	19
II.4 EVALUACIÓN DEL ESTADO DE ACTIVACIÓN DE MACRÓFAGOS ESTIMULADOS IN VITRO.	20
II.5 USO DE POLIMIXINA B PARA LA INACTIVACIÓN DEL LPS BACTERIANO	21
II.6 DETERMINACIÓN DE ÍNDICES DE PROLIFERACIÓN EN ESPLENOCITOS ESTIMULADOS <i>IN VITRO</i>	21
II.7 ENSAYO PARA DETERMINAR VIABILIDAD CELULAR	22
II.8 INMUNIZACIÓN INTRANASAL	22
II.9 LAVADOS BRONCOALVEOLARES (BAL).....	23
II.10 DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS POR ELISA	23
II.10.1 Anticuerpos Específicos.....	23

II.10.2	<i>Anticuerpos totales de tipo IgA e IgE</i>	24
II.11	EVALUACIÓN DE INMUNIDAD CELULAR SISTÉMICA	25
II.12	PREPARACIÓN DE SUSPENSIONES CELULARES DE PULMÓN	25
II.13	ANÁLISIS POR CITOMETRÍA DE FLUJO (FC) DE CÉLULAS T Y CÉLULAS DENDRÍTICAS PULMONARES	26
II.14	AISLAMIENTO Y AMPLIFICACIÓN POR RT-PCR DE MRNA TOTAL DE PULMÓN.	28
II.15	PCR EN TIEMPO REAL DE QUEMOQUINAS EN PULMÓN	29
II.16	DETERMINACIÓN DE CITOQUINAS POR ELISA	29
II.17	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	30
III	RESULTADOS	31
III.1	CARACTERIZACIÓN DEL EXTRACTO BACTERIANO	31
III.1.1	<i>Cuantificación de proteínas</i>	31
III.1.2	<i>Cuantificación de endotoxinas</i>	32
III.1.3	SDS-PAGE.....	33
III.2	ENSAYOS <i>IN VITRO</i>	34
III.2.1	<i>BE INDUCE ACTIVACIÓN DE MACROFAGOS MURINOS IN VITRO</i>	34
III.2.2	<i>BE NO INDUCE PROLIFERACIÓN DE ESPLENOCITOS MURINOS PERO MODULA LA PROLIFERACIÓN INDUCIDA POR UN MITÓGENO</i>	41
III.3	RESPUESTA INMUNE SISTÉMICA INDUCIDA POR LA ADMINISTRACIÓN I.N. DE CBE.....	43
III.3.1	<i>Respuesta de Anticuerpos en suero</i>	43
III.3.2	<i>Producción local de anticuerpos</i>	45
III.3.3	<i>Respuesta Inmune Celular</i>	45
III.4	RESPUESTA INMUNE LOCAL INDUCIDA POR LA ADMINISTRACIÓN I.N. DE CBE	56
III.4.1	<i>Puesta a punto de la preparación de suspensiones celulares de pulmón y análisis por FC</i>	56
III.4.2	<i>Análisis de las poblaciones celulares reclutadas hacia los pulmones</i>	57
III.4.3	<i>Expresión de mRNA de quemoquinas y citoquinas pro-inflamatorias en pulmón</i>	59
III.4.4	<i>Producción local de citoquinas</i>	61
III.4.5	<i>Respuesta inmune inducida luego de un desafío antigénico</i>	62
IV	DISCUSIÓN GENERAL	75
IV.1	CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD INMUNOESTIMULADORA, EN ENSAYOS <i>IN VITRO</i>	75

IV.1.1	BE induce activación de macrófagos murinos, in vitro.....	75
IV.1.2	La producción de NO se debe a antígenos bacterianos distintos a LPS.....	77
IV.1.3	BE modula la proliferación inducida por un mitógeno de células T.....	78
IV.2	INMUNOGENICIDAD DEL EXTRACTO BACTERIANO COLOIDAL.....	79
IV.2.1	CBE induce aumento de anticuerpos específicos en suero.....	79
IV.2.2	Aumento de IgA pulmonar luego de la inmunización.....	80
IV.2.3	CBE no induce aumento en los niveles de IgE.....	81
IV.3	CBE INDUCE UNA REACCIÓN INFLAMATORIA AGUDA EN PULMÓN.....	81
IV.3.1	Quemoquinas y Reclutamiento Celular.....	82
IV.3.2	La cantidad incrementada de DCs en pulmón se mantiene al día 7.....	83
IV.3.3	Las DCs reclutadas se activarían en un contexto propicio para el desarrollo de Respuesta de tipo Th1.....	85
V PRINCIPALES CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS.....		87
VI REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....		89

ANEXOS

- Anexo I.** Tabla conteniendo la nomenclatura actual de cada familia de quemoquinas, indicando los ligandos murinos y humanos conocidos, y sus receptores correspondientes.
- Anexo II.** A. Sistema Respiratorio – Generalidades.
B. Sistema Inmune de Mucosas asociado a Tracto Respiratorio - Generalidades
- Anexo II.** Artículo “*Intranasal Immunization with a Colloid-Formulated Bacterial Extract Induces an Acute Inflammatory Response in the Lungs and Elicits Specific Immune Responses*”.