

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**EFFECTO DE LA PROTOXINA Cry1Ac SOBRE LA
EXPRESIÓN DE MMP-9 POR CÉLULAS
MONONUCLEARES DE BAZO DE RATÓN.**

**TESIS QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
BIÓLOGO
PRESENTA:
SOCRATES AVILÉS VÁZQUEZ**

**DIRECTOR DE TESIS: DR. LUIS ARTURO BAIZA
GUTMAN**

LOS REYES IZTACALA, EDO. DE MÉX.

2006



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Biología del Desarrollo de la Unidad de Morfofisiología y Función de la FES-Iztacala, UNAM, bajo la dirección del Dr. Luis Arturo Baiza Gutman.

En este trabajo se contó con el apoyo de PAPIIT, DGAPA, UNAM proyecto N. IN206905-2 y el autor fue becario de este programa.

DEDICATORIA

A la memoria:

De mis abuelos Sergio+ y Tomasa+ por ser los pilares de esta gran familia.

A mis padres Sara y José:

Por haberme dado la vida, por su amor, sus consejos, sus cuidados, sus regaños, sus sugerencias, por que me brindaron todo lo que pudieron y porque con su apoyo he logrado esto, les estoy infinitamente agradecido.

A mis hermanos Chantal y Dante:

Por su apoyo, ayuda, sus bromas y aguantar mi carácter durante este tiempo.

A mi abuela Enriqueta:

Por su cariño, por cuidarme, por aguantar mis bromas y preocuparse por mí.

A Gyovana:

Por su amor, su ayuda, por cuidarme y preocuparse por mi, por aguantarme y por todo lo que hemos pasado.

A mi tío Chilo:

Por ser el gran amigo que es, por sus bromas, por estar ahí cuando lo necesito.

A mis tíos Juan y Elia:

Por su interés sobre mi carrera y el apoyo recibido.

A Toda mi familia, primos, tíos, sobrinos, etc.

AGRADECIMIENTOS

A la máxima casa de estudios:

Por la oportunidad que me dio de recibir una formación profesional de gran calidad.

Al Dr. Luis Arturo Baiza Gutman:

Por permitirme formar parte de su laboratorio, por compartir sus conocimientos conmigo, por su interés, apoyo, paciencia y asesoría de este trabajo.

A la M. en C. Guadalupe Martínez Hernández:

Por su gran ayuda en la parte experimental de este trabajo, por su apoyo y revisión de este trabajo.

A la Dra. Leticia Moreno Fierros:

Por el gran apoyo recibido, por permitirme trabajar y aprender en su laboratorio, por todas las facilidades para la realización de este trabajo.

A los colaboradores del Laboratorio de Inmunidad de Mucosas:

Leti, Rita, Irma, Marco, por la disponibilidad y ayuda recibida en la parte experimental del trabajo.

A la M. en C. Martha Salcedo Alvarez y a la Biol. Julia Reyes Reali:

Por la revisión y correcciones para la mejora de este trabajo.

ÍNDICE

GLOSARIO

RESUMEN

INTRODUCCION

ANTECEDENTES

JUSTIFICACIÓN

OBJETIVOS.

GENERAL

PARTICULARES

MATERIAL Y METODOS

RESULTADOS

EVOLUCION DEL CULTIVO

PROLIFERACIÓN CELULAR

CITOMETRÍA DE FLUJO

EXPRESION DE MMP-9

DISCUSIÓN

CONCLUSIONES

PERSPECTIVAS

ANEXOS

PRODUCCIÓN Y PURIFICACIÓN DE LA PROTOXINA Cry1Ac A PARTIR DE
Escherichia coli

OBTENCIÓN DE LINFOCITOS DE BAZO

BIBLIOGRAFÍA

GLOSARIO

- AMP** - Monofosfato de adenosina
- CFSE** - Carboxifluoresceína
- Con A** - Concanavalina A
- IgG** - Inmunoglobulina G
- IFN- β 1b** - Interferón beta 1b
- IFN- γ** - Interferón gama
- IL-1 β** - Interleucina 1b
- IL-2** - Interleucina 2
- IL-4** - Interleucina 4
- IL-12** - Interleucina 12
- LPS** - Lipopolisacarido
- MHC** - Complejo Principal de Histocompatibilidad
- MMP-1** Metaloproteinasa de matriz 1
- MMP-9** - Metaloproteinasa de matriz 9
- MMPs** - Metaloproteinasas de matriz
- MTT** - 4,5 dimetil tiazol 2,5 difeniltetrazolium
- PE** - Ficoeritrina
- PGE₂** - Prostaglandina E 2
- PMA** - forbol-12-miristato 13-acetato
- TGF- β** - Factor de crecimiento transformante beta
- TIMPs** - Inhibidores tisulares de metaloproteinasas
- TNF- α** - Factor de necrosis de tumor
- TPA** - 12-O-tetradecanoil-forbol 13-acetato
- VCAM-1** - Molécula de adhesión celular vascular 1
- VEGF** - Factor de crecimiento vascular endotelial
- Zn** - Zinc

RESUMEN

Como parte de la respuesta inmune los distintos tipos de leucocitos migran a través de los vasos sanguíneos a diversos tejidos, este proceso implica su interacción con el endotelio y los componentes de la matriz extracelular, éstos últimos son degradados por enzimas proteolíticas extracelulares que son secretadas localmente por las células, dentro de las cuales se encuentran las metaloproteinasas de matriz extracelular (MMP's), que son una familia de enzimas proteolíticas, dependientes de Zn.

La producción de MMP-9 es regulada por diversos factores entre los cuales se encuentran algunas citocinas. La protoxina Cry1Ac puede emplearse como adyuvante inmunológico y es capaz de activar linfocitos B y T CD4+ y de inducir la producción de IL-2. Mientras que la inmunización i.p. con Cry1Ac induce la expresión de IL-4 e IFN- γ en linfocitos de bazo. En el presente trabajo se evaluó el efecto de Cry1Ac sobre la expresión de MMP-9 en células mononucleares de bazo de ratón. Se encontró que las células provenientes de animales inmunizados mostraron una ligera tendencia a una menor producción de la enzima, sin ser significativamente diferente, y fue más notorio a las 48 horas de cultivo.

El tratamiento *in vitro* con Cry1Ac no mostró algún efecto sobre la producción de la enzima. Se observó que el tratamiento *in vitro* con 10 μ g de Cry1Ac aumentó la proliferación de células grandes, posiblemente monocitos/macrófagos, y al analizar por citometría de flujo se encontró que dicho tratamiento en presencia de suero aumentaba la población de células positivas para el marcador de macrófagos CD11b en ambos grupos inmunizado y no

inmunizado, así como la proliferación de estas. La habilidad de las células a reducir MTT fue mayor a las 5 horas y mínima a las 48 horas, lo que fue acompañado de una reducción en la viabilidad celular de un 98 a un 55%. Se concluye que en nuestras condiciones de cultivo Cry1Ac no tiene efecto sobre la producción de la enzima por células mononucleares de bazo, promueve la proliferación de monocitos/macrófagos *in vitro*.

INTRODUCCION

Las respuestas inmunitarias se dividen en innatas y específicas o adquiridas, las primeras están mediadas por los leucocitos polimorfonucleares, monocitos, macrófagos, células dendríticas entre otros; las segundas están mediadas por linfocitos que son capaces de reconocer específicamente diferentes antígenos (Abbas y cols., 2001).

Como parte de la respuesta inmune los distintos tipos de leucocitos migran a través de los vasos sanguíneos a diversos tejidos. Los linfocitos circulan continuamente desde la sangre hasta los tejidos linfoides periféricos en los que penetran pasando entre las células de las paredes de los capilares; posteriormente regresan a la sangre a través de los vasos linfáticos. Cuando hay infección los linfocitos que reconocen el agente infeccioso son detenidos en el tejido linfático en donde proliferan y se diferencian a células efectoras capaces de combatir la infección (Janeway y cols., 2003).

La exposición de los linfocitos a los antígenos provoca que éstos se activen, como consecuencia las células proliferan y se diferencian. La activación de los linfocitos es inducida también por lectinas como la concanavalina A (ConA) y la fitohemaglutinina (Dubois y cols., 1998). Las lectinas son moléculas de reconocimiento entre células, tienen propiedades aglutinantes y mitogénicas y provocan que estas se agreguen y proliferen; la activación también es causada por un grupo de compuestos conocidos como ésteres de forbol como el 12-O-

tetradecanoil-forbol 13-acetato (TPA) y el forbol-12-miristato 13-acetato (PMA), que son análogos del diacilglicerol e inducen la activación de una enzima de señalización intracelular, la proteína cinasa C.

La migración de linfocitos desde la circulación hacia los tejidos periféricos por la vía de las vénulas endoteliales implica su interacción con el endotelio y los componentes de la matriz extracelular incluyendo, colágenas, fibronectina y laminina (Faveeuw y cols., 2001) y también es necesaria para la detección de antígenos procesados en las células dendríticas y el inicio de la respuesta inmune específica.

La presencia de antígenos extraños e inflamación conduce a cambios en las moléculas de adhesión en la superficie de los leucocitos, como la activación de integrinas, además de la polarización funcional de la maquinaria de la migración celular en estas condiciones, los leucocitos viajan a lo largo del lado luminal de las células vasculares endoteliales, se adhieren a ellas y luego migran pasando entre ellas (Imof y Aurrand-Lions, 2004; figura 1).

Mecanismos moleculares únicos controlan la migración de los leucocitos, su adhesión y captura en la pared de los vasos sanguíneos involucran interacciones heterofílicas entre una clase de moléculas en el leucocito, y otra clase de moléculas en la célula endotelial (Muller, 2003).

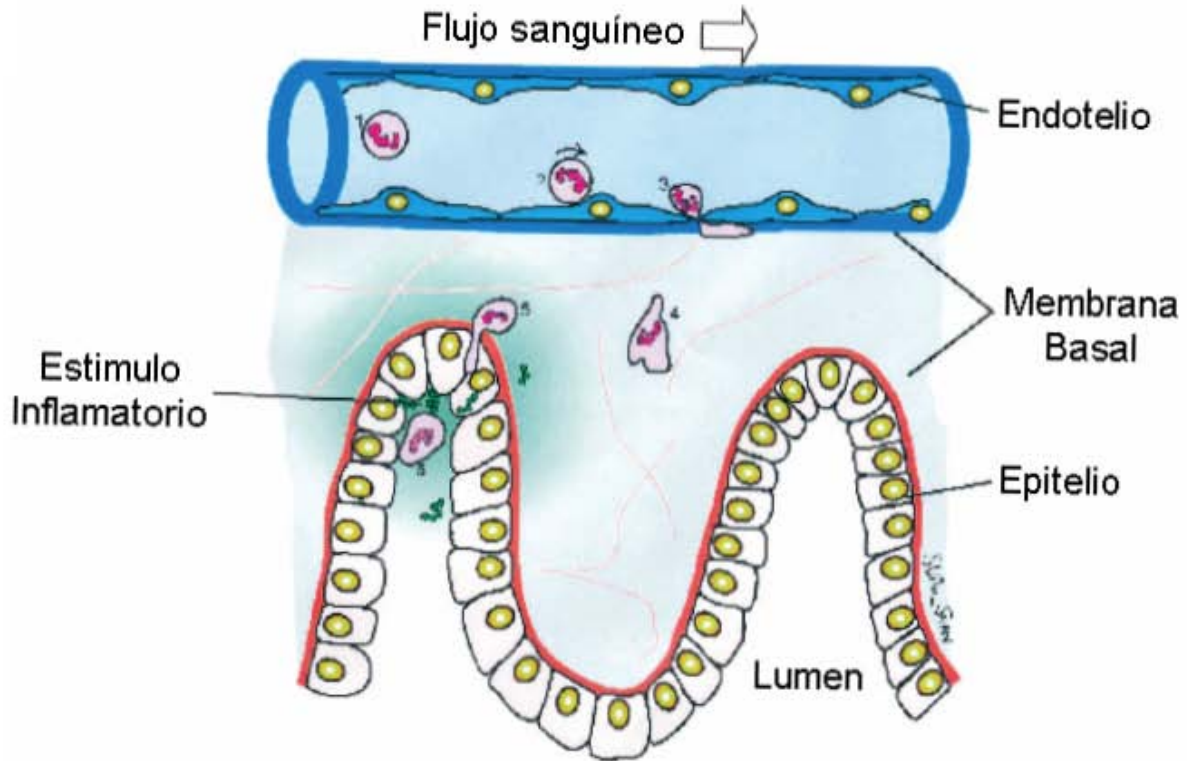


Figura 1. Reclutamiento y migración de leucocitos (modificado de Liu y cols, 2004).

Cuando las células migran a través de la lámina basal vascular en respuesta a una infección o una herida los componentes de la matriz son degradados por enzimas proteolíticas extracelulares que son secretadas localmente por las células (Alberts y cols., 1996).

Las metaloproteinasas de matriz extracelular (MMPs) son una familia de al menos 25 enzimas proteolíticas dependientes de Zn, que en conjunto pueden degradar a todos los componentes de la matriz extracelular. También actúan sobre otras proteinasas, inhibidores de proteinasas, moléculas quimiotácticas, factores de crecimiento latentes, receptores de superficie celular y moléculas de adhesión celular (Sternlicht, M.D., 2001).

Las MMPs son producidas por la mayoría de las células y juegan un papel importante en el desarrollo embrionario, el crecimiento, así como en el remodelado y reparación de tejidos, la excesiva o inadecuada expresión de MMPs puede contribuir a la patogénesis de varios procesos destructivos de tejidos como la artritis, esclerosis múltiple, enfermedades del corazón, progresión de tumores y enfermedades pulmonares crónicas (Shapiro, 1998). Sus componentes presentan gran homología en cuanto a su estructura (figura 2), en general están formadas por un pre-dominio el cual es un péptido señalizador para su secreción, un pro-dominio que le confiere un estado de latencia, un dominio catalítico con un sitio altamente conservado de unión a zinc, y un dominio de unión parecido a hemopexina en el cual se unen los inhibidores naturales de las MMPs, conocidos como inhibidores tisulares de metaloproteinasas (TIMPs), la mayoría de las MMPs son secretadas en forma de zimógeno, algunas tienen un dominio transmembranal y permanecen unidas a la membrana celular generalmente activas (Hoekstra y cols., 2001).

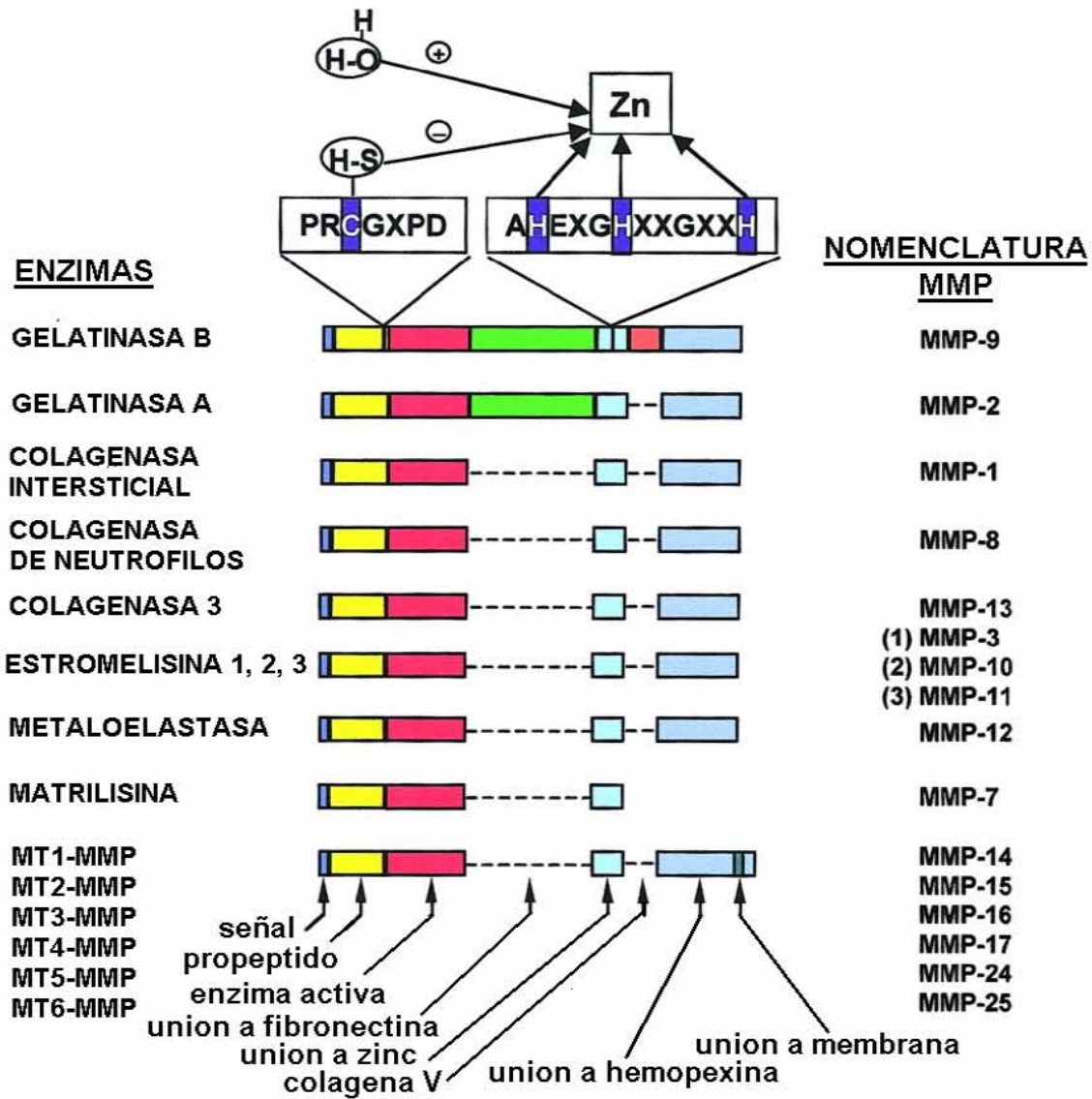


Figura 2. Las metaloproteinasas de la matriz extracelular (modificado de Opdenakker y cols., 2001)

La MMP-9 pertenece al grupo de metaloproteinasas denominadas gelatinasas, es una enzima multidominio secretada que es importante en la migración de células normales y tumorales; degrada colágenas desnaturalizadas y colágena tipo IV, la cual está presente en las membranas basales. En el sistema inmune su actividad ayuda a los linfocitos y a otros leucocitos a entrar y salir de la circulación sanguínea o linfática (Opdenakker y cols., 2001).

La producción de MMP-9 por los linfocitos es dependiente de la activación celular y su actividad puede también disminuirse por la producción concomitante de TIMP-1 (inhibidor tisular de metaloproteinasas 1).

La expresión de las MMPs por las células inmunes: leucocitos polimorfonucleares, monocitos, macrófagos y linfocitos es dependiente del estado funcional de las células y es regulada por citocinas y factores del crecimiento, por su interacción con la matriz extracelular y con otras células (Opdenakker y cols., 2001),

ANTECEDENTES

Bacillus thuringiensis (*Bt*) es una bacteria Gram-positiva, aerobia estricta, morfológicamente relacionada con *Bacillus cereus* y *Bacillus anthracis*, durante su esporulación, producen cuerpos de inclusión formados por proteínas denominadas “Cry” (Helgason, E. y cols., 2000).

Las proteínas Cry, son activas contra insectos, lepidópteros (mariposas), coleópteros (escarabajos), dípteros (mosquitos), himenópteros (hormigas), ácaros y también contra otros invertebrados como nemátodos, gusanos planos y protozoarios. Las toxinas de *Bt* se han utilizado como bioinsecticidas en agricultura durante los últimos 40 años, principalmente en cultivos de hortalizas y cereales.

Cry1Ac recombinante clonada a partir de *Bt* es altamente inmunogénica y posee efectos adyuvantes tanto a nivel intestinal como sistémico cuando se administra junto con albúmina sérica de bovino, o con el antígeno de la hepatitis B (Vázquez-Padrón y cols., 1999), al menos tan potentes como la toxina del cólera. Además la protoxina Cry1Ac es un eficiente adyuvante y acarreador de polisacáridos de pneumococos en ratones Balb/c (Moreno-Fierros y cols., 2003).

Al analizar el efecto *in vitro* de Cry1Ac en linfocitos de bazo y de placas de Peyer se ha observado que Cry1Ac es capaz de activar linfocitos B y T CD4+ y de inducir la producción de IL-2. Mientras que la inmunización i.p. con Cry1Ac induce la expresión de IL-4 e IFN- γ en linfocitos de bazo además incrementa la expresión de la integrina $\alpha 4\beta 1$ en linfocitos T del mismo órgano.

La expresión de metaloproteinasas por los linfocitos y monocitos depende de su estado funcional y es regulada por citocinas y moléculas de adhesión, como las que se expresan en ellos después de la interacción con Cry1Ac.

La activación de linfocitos por ésteres de forbol incrementa la actividad de MMP-9 en linfocitos B y T humanos (Zhou y cols., 1993., Lacraz y cols., 1994., Trocme y cols., 1998,). Por su parte la concanavalina A y la fitohemaglutinina, son importantes estimuladores de la producción de MMP-9 en células mononucleares de sangre periférica (Dubois y cols., 1998).

Algunas citocinas como la IL-4, el IFN β -1b, la IL-12 y el TGF- β inhiben la producción de MMP-9, mientras que la IL-1 β , la IL-2, el VEGF y el TNF- α la estimulan (Van den Steen y cols., 2002)

La IL-4 bloquea la producción de MMP-9 y MMP-1 en monocitos humanos estimulados con ConA, la que es restaurada por PGE₂ exógena o dibutiril AMP cíclico; ésto indica que la producción de ambas proteasas es dependiente de AMP cíclico y mediada por PGE₂ (Corcoran y cols. 1992).

El IFN β -1b es eficaz en el tratamiento de la esclerosis múltiple, suprime la migración de linfocitos T activados sobre fibronectina y la habilidad de las células T para degradar fibronectina, estos procesos son mediados por la MMP-9, cuyos niveles decrecieron por la acción de IFN β -1b (Stüve y cols. 1996).

La IL-12 es una citocina clave en la inmunidad innata e induce una respuesta mediada por IFN- γ caracterizada por un aumento de células CD8 y un programa angiostático en células endoteliales. Las células endoteliales aumentan el efecto inhibitorio de la IL-12 en la expresión de MMP-9 por células

mononucleares de sangre periférica activadas, así como su habilidad para migrar a través de la matriz extracelular. Estos resultados sugirieron la existencia de un circuito regulado por IL-12 entre el endotelio y los linfocitos, resultando en un cambio en la homeostasis proteolítica en el sitio del tejido dañado (Mitola y cols. 2003).

Se ha observado que los Interferones de tipo I y de tipo II reprimen la actividad gelatinolítica de MMP-9, a nivel de mRNA y de proteínas en el suero sanguíneo de pacientes con leucemia crónica de linfocitos B, que se caracteriza por una elevada angiogénesis y altos niveles de MMP-9 (Bauvois y cols., 2002).

La IL-1 β y el TNF- α estimulan la producción de MMP-9 en monocitos diferenciados a macrófagos *in vitro*, (Sarén y cols., 1996) y en monocitos extraídos de sangre periférica (Zhang y cols., 1998).

Se ha demostrado que la IL-2 aumenta la secreción de MMP-9 en linfocitos de sangre periférica y linfocitos provenientes de tumores (Montgomery y cols., 1993). La IL-2 además de inducir la secreción de MMP-9, aumenta la migración de linfocitos T a través de una membrana basal artificial *in vitro* (Leppert y cols., 1996).

En ratones portadores de tumor mamario inducido con D1-7,12-dimethylbenzantraceno-3 se producen altas cantidades de VEGF y los linfocitos T de bazo de ratón portadores de este tumor mamario producen altas cantidades de MMP-9, así como también de VEGF. El tratamiento de células normales con VEGF induce la secreción de MMP-9 (Owen y cols., 2003).

La expresión MMP-9 es mediada por la adhesión de los linfocitos mediante la integrina $\alpha_4\beta_1$ a dos de sus principales ligandos, a la fibronectina y a VCAM-1; la interacción de $\alpha_4\beta_1$ con VCAM-1 contribuye a la migración de linfocitos (Yakubenko y cols., 2000).

Por ello se plantea la hipótesis de que la activación de linfocitos e inducción de la secreción de citocinas por Cry1Ac, conduce a la proliferación de linfocitos y monocitos, además de cambios en la producción de MMP-9.

JUSTIFICACIÓN

Estudios recientes indican que la MMP-9 puede participar como un sintonizador y amplificador de las funciones inmunes, se ha observado que puede ser importante regulador de la inmunidad adaptativa y puede ser blanco para la inhibición terapéutica de varias enfermedades. Sin embargo diversos aspectos de la biología de esta proteasa no se conocen con precisión, ya que los mecanismos y condiciones de secreción de MMP-9 no son los mismos en la mayoría de tipos celulares donde se produce. El conocimiento de la Biología de esta enzima puede ser muy importante para el tratamiento de muchas enfermedades como: cáncer, artritis, formación de aneurismas, aterosclerosis, isquemia cerebral, y todas aquellas que implican un proceso de alteración celular.

Además algunas vacunas requieren la adición de adyuvantes que aumentan su inmunogenicidad, se piensa que la mayoría de los adyuvantes actúan sobre las células presentadoras de antígeno y reflejan la importancia de estas células en el inicio de las respuestas inmunitarias por lo que caracterizar el mecanismo inmunogénico de Cry1Ac sería muy útil en el desarrollo de vacunas.

OBJETIVOS

GENERAL

- Determinar el efecto de la protoxina Cry1Ac sobre la producción y secreción de MMP-9 por células mononucleares de bazo de ratón.

PARTICULARES

- Determinar si Cry1Ac induce la expresión de MMP-9 en células mononucleares provenientes de bazo en animales no inmunizados e inmunizados con Cry1Ac.
- Analizar si Cry1Ac induce la proliferación de células mononucleares y si esta se asocia con una mayor producción de MMP-9.
- Analizar la cinética del cultivo de células mononucleares de bazo.

MATERIAL Y METODOS.

La protoxina Cry1Ac se obtuvo acorde al procedimiento descrito en los anexos. Se inmunizaron ratones hembra Balb C de 8 a 10 semanas por vía intraperitoneal con 50 μ g de Cry1Ac (extracción de Cry Anexo I) cada 7 días x 3 semanas. 7 días después a la última inmunización fueron sacrificadas.

Las células mononucleares del bazo de animales inmunizados y no inmunizados, se obtuvieron por un gradiente de densidad de Ficoll Hypaque (Anexos) y se utilizaron en una concentración de 10^6 células por ml. Después las células provenientes de ambos grupos se cultivaron *in vitro* en medio RPMI 1640, sin suero y suplementado con albúmina sérica de bovino al 0.1%, penicilina 1 mg/ml y estreptomycin 10 mg/ml, en presencia de concanavalina A 10 μ g/ml, Cry1Ac 10 μ g/ml o sin ellas, siendo este último el tratamiento control.

El tipo de gelatinasa y la cantidad de MMP-9 se determinó en el medio de cultivo, empleando geles de poliacrilamida al 10%, con SDS conteniendo 1mg/ml de gelatina. Después de la electroforesis los geles se lavaron por 30 min. en Tritón X 100 al 2%. La actividad enzimática se reveló incubando durante 48 horas a 37°C en amortiguador revelador (50mM Tris HCL pH 7.5 conteniendo 10 mM CaCl₂, 150 mM NaCl y 0.5% Tritón X-100).

Después se procedió a teñir los geles con azul de Coomassie R-250, las proteínas que degradan gelatina se identifican como zonas blancas de lisis en un fondo azul. Los zimogramas fueron captados y se analizaron densitométricamente usando el analizador de geles Alpha-Image 2000.

La proliferación celular se determinó por la técnica de MTT (4,5 dimetil tiazol 2,5 difeniltetrazolium), la cual se basa en la conversión del MTT en formazan por las mitocondrias de las células activas. Los resultados fueron analizados por ANOVA y se les realizó la prueba de Tukey con un nivel de significancia $P < 0.05$.

Para la caracterización por citometría de las células mononucleares y su proliferación, se resuspendieron a una concentración de 5×10^6 células/ml en PBS con 5% de suero fetal de bovino y se incubaron con 120 μ l de carboxifluoresceína diluido 1:100 a temperatura ambiente durante 5 min en oscuridad. Las células fueron lavadas con 10 ml de PBS con suero por centrifugación durante 10 min a 1500 rpm. Posteriormente fueron cultivadas en medio RPMI 1640, suplementado con suero fetal de bovino al 10%, penicilina 1 mg/ml y estreptomicina 10 mg/ml, en presencia de concanavalina A 10 μ g/ml, Cry1Ac 10 μ g/ml o sin ellas (control) durante 5 días, con un cambio de medio a la mitad del tiempo de cultivo. Al término del cultivo, el fenotipo de superficie fue analizado usando anticuerpo monoclonal anti-CD11b PE anti-ratón (Becton Dickinson Technologies, Gaithersburg, MD). Las células se fijaron en 300 μ l de *p*-formaldehído al 1% y finalmente se almacenaron en oscuridad a 4°C hasta su análisis. Para ello, la intensidad de fluorescencia relativa se midió en un citómetro de flujo FACSCALIBUR (Becton Dickinson, San Jose, Ca). Se colectaron un mínimo de 20,000 eventos. El porcentaje de células marcadas con el anticuerpo utilizado fue calculado comparando con los controles de isotipo. Los datos fueron analizados usando el software WinMDi

RESULTADOS

EVOLUCION DEL CULTIVO

Con respecto a la morfología de las células cultivadas después de 24 o 48 horas de cultivo, en el grupo no inmunizado se observa que en el tratamiento control, la población celular estaba compuesta de células pequeñas birrefringentes aparentemente linfocitos, con alguna célula grande que al parecer se trato de monocitos/macrófagos ya que al lavar el pozo de cultivo permanecieron adheridos (figura 3a).

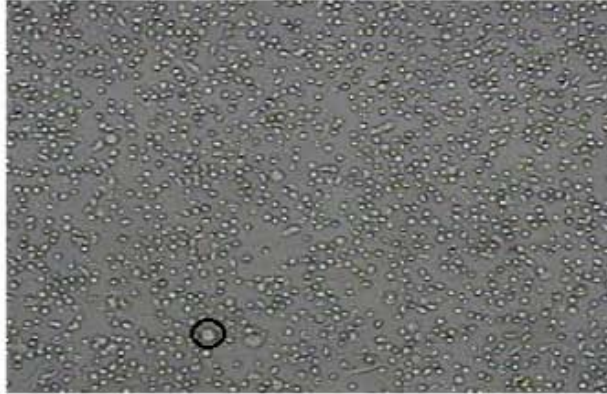
La concanavalina A ($10\mu\text{g/ml}$), causo la aglutinación de las células, las cuales en algún momento parecieron formar una especie de racimos o cadenas de hasta 20 células, y casi no había células solas (figura 3b). Con el tratamiento de $10\mu\text{g/ml}$ de Cry1Ac, se observó una mayor proporción de las células grandes, que se aglutinaban pero en menor grado que el cultivo tratado con concanavalina A (figura 3c).

En el grupo inmunizado de igual manera que en el grupo no inmunizado, se observa en el tratamiento control una población de células pequeñas, linfocitos, con alguna que otra célula grande (figura 4a). Con $10\mu\text{g/ml}$ de concanavalina A, también se observó aglutinación de las células, ligeramente mayor y con grupos más grandes de células que el grupo no inmunizado (figura 4b).

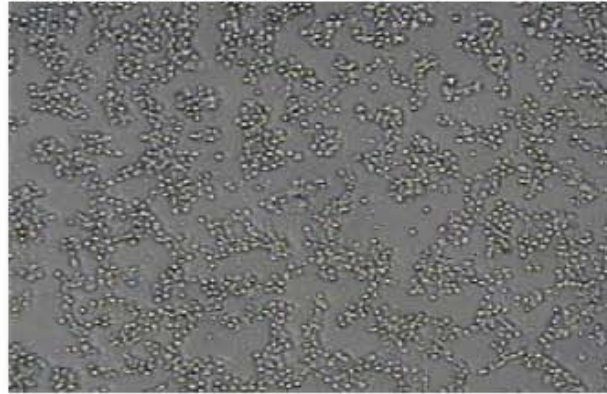
Con el tratamiento de $10\mu\text{g/ml}$ de Cry1Ac se observan de manera similar y ligeramente más marcadas que en el no inmunizado, las células grandes (macrófagos) y la aglutinación de estas células (figura 4c).

Cultivo celular del grupo no inmunizado

a) control



b) concanavalina A



c) cry



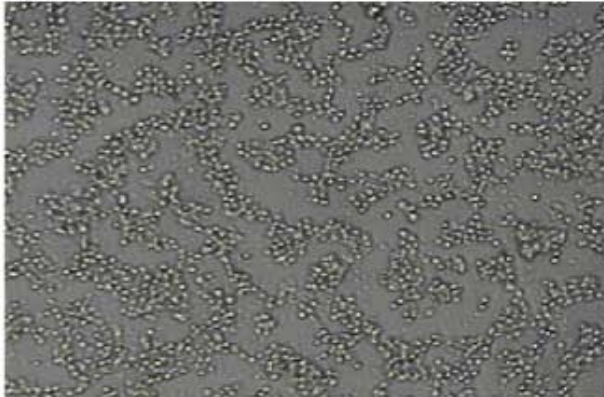
Figura 3.- Morfología de las células cultivadas provenientes del grupo no inmunizado. Las células provenientes del bazo de ratón sin inmunizar se llevaron a una concentración de 10^6 cels/ml; a), se observa en el cultivo control, una población uniforme con algunas células más grandes al parecer macrófagos (en el círculo); b), en el cultivo tratado con $10\mu\text{g/ml}$ de concanavalina A hubo una aglutinación de las células; y c), en el tratamiento con $10\mu\text{g/ml}$ de Cry1Ac se observa un mayor número de las células grandes presumiblemente macrófagos, y en algunas partes parecían agruparse (en el círculo). Amplificación 40x.

Cultivo celular del grupo inmunizado

a) control



b) concanavalina A



c) cry



Figura 4.- Morfología de las células cultivadas provenientes del grupo inmunizado. Las células provenientes del bazo de ratón sin inmunizar se llevaron a una concentración de 10^6 cels/ml; a), se observa en el cultivo sin tratamiento, una población uniforme de células pequeñas al parecer linfocitos; b), en el cultivo tratado con $10\mu\text{g/ml}$ de concanavalina A hubo aglutinación de las células; y c), en el tratamiento con $10\mu\text{g/ml}$ de Cry1Ac se observa un mayor número de las células grandes presumiblemente macrófagos, y agrupamientos de estas (círculo). Amplificación 40x.

PROLIFERACIÓN CELULAR

En cuanto a la prueba del MTT se observó una mayor formación de formazan a las 5 horas de cultivo en el grupo inmunizado y decreció conforme paso el tiempo de cultivo, a las 48 horas los valores fueron mínimos. No se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos control o con concanavalina A y Cry, si se encontraron diferencias significativas en relación al tiempo de cultivo entre las 5 y 24 con respecto a las 48 horas, siendo más notable en el grupo inmunizado (Fig. 5).

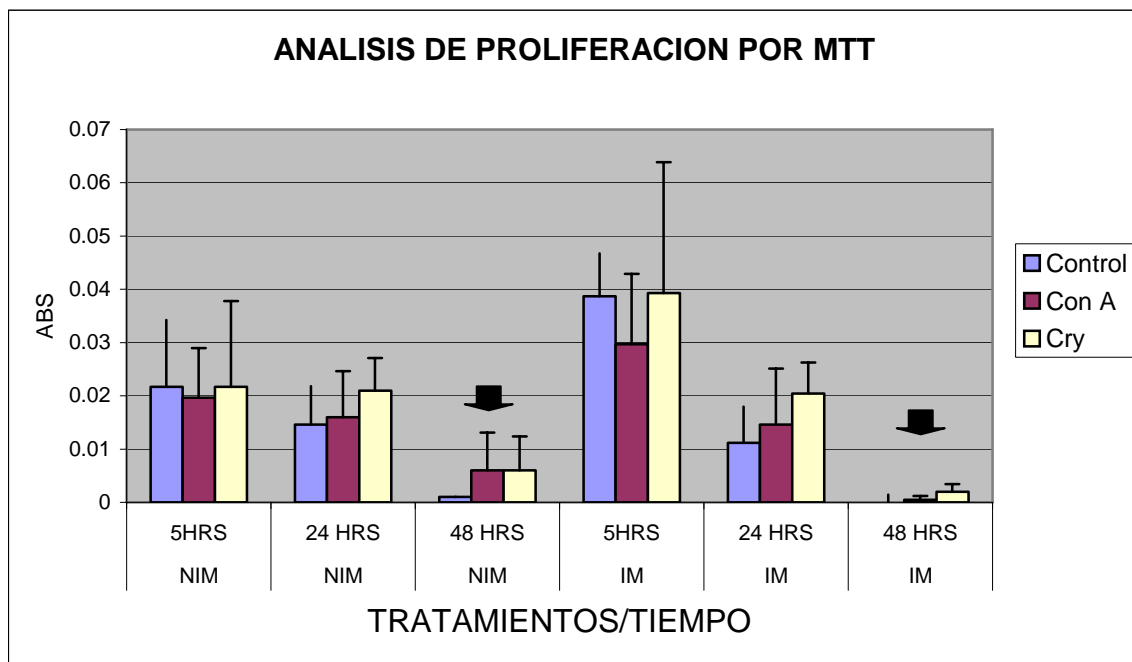


Fig. 5.- Análisis de proliferación por la técnica de MTT de las células cultivadas a las 5, 24 y 48 horas. Se observan diferencias a las 48 horas en ambos grupos inmunizado (IM) y no inmunizado (NIM) con respecto al control ($P < 0.05$).

Adicionalmente por la prueba de exclusión de colorante empleando azul de tripan se observó que la viabilidad fue similar en ambos grupos, se encontró un 95, 75 y 65 % de células viables a las 5, 24 y 48 horas de cultivo respectivamente.

CITOMETRÍA DE FLUJO

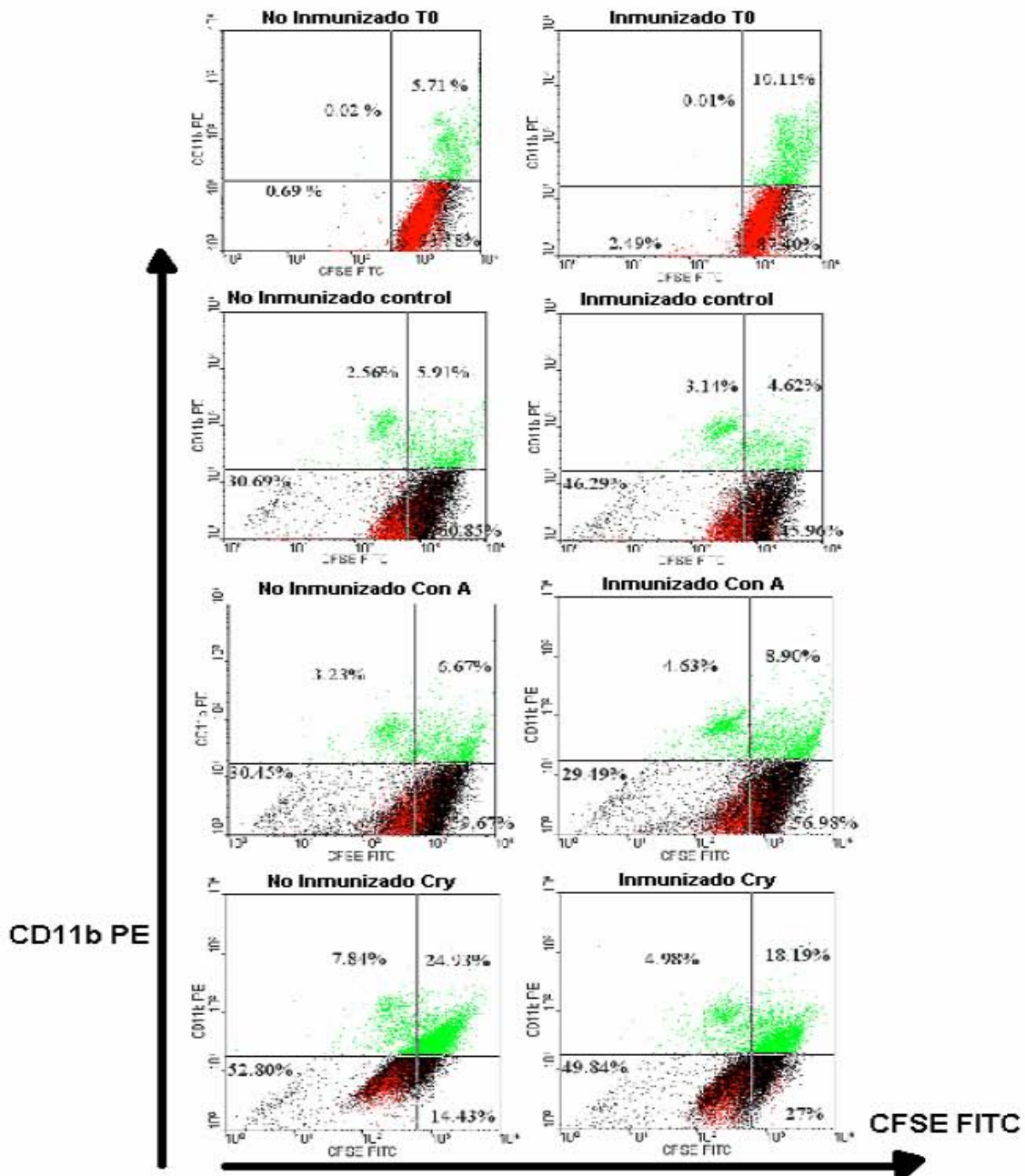


Figura 6.- Efecto de Cry1Ac sobre la subpoblación CD11b de las células mononucleares. Las células mononucleares se resuspendieron a una concentración de 5×10^6 células/ml con $120 \mu\text{l}$ de FITC diluido 1:100. Después fueron cultivadas en presencia de concanavalina A $10 \mu\text{g/ml}$, Cry1Ac $10 \mu\text{g/ml}$ o sin ellas (control). Al término del cultivo el fenotipo de superficie fue analizado usando anti CD11b. Cry1Ac aumentó las poblaciones que expresan CD11b correspondientes a macrófagos, y fue mayor en el grupo no inmunizado.

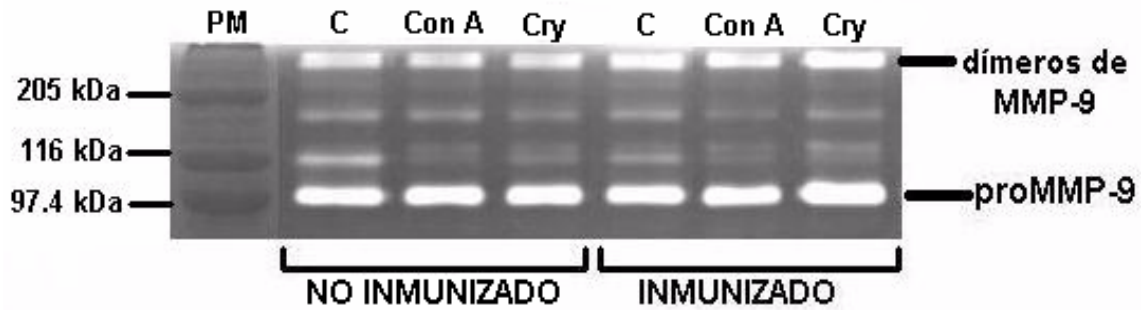
Por citometría de flujo se detectó una mayor cantidad de células dobles positivas para CD11b y CSFE después del tratamiento *in vitro* con Cry1Ac, alrededor del 24% del total de la población en el grupo no inmunizado y 18% en el inmunizado contra el 5.91 y el 4,62% que mostraron los controles respectivos, de igual manera las células CD11b+ que proliferaron fueron más en los tratamientos *in vitro* con Cry1Ac y más notable en el grupo no inmunizado con un 7.8% del total de células (figura 6).

EXPRESION DE MMP-9

En las zimografías en gelatina de los medios acondicionados se observan principalmente 4 bandas con actividad proteolítica , las más notables fueron una de 105 kDa correspondiente a la proMMP-9, una banda al tope del gel (240 kDa) que se ha descrito como dímeros de MMP-9 y bandas intermedias posiblemente MMP-9 asociada a otras proteínas (figura 7A).

A las 5 horas de cultivo se aprecia una ligera reducción de la expresión de la enzima en el grupo inmunizado, sin embargo, no hubo diferencias significativas entre los tratamientos ni entre grupos no inmunizado e inmunizado (figura 7B).

A) Zimografía



B) Análisis Densitométrico

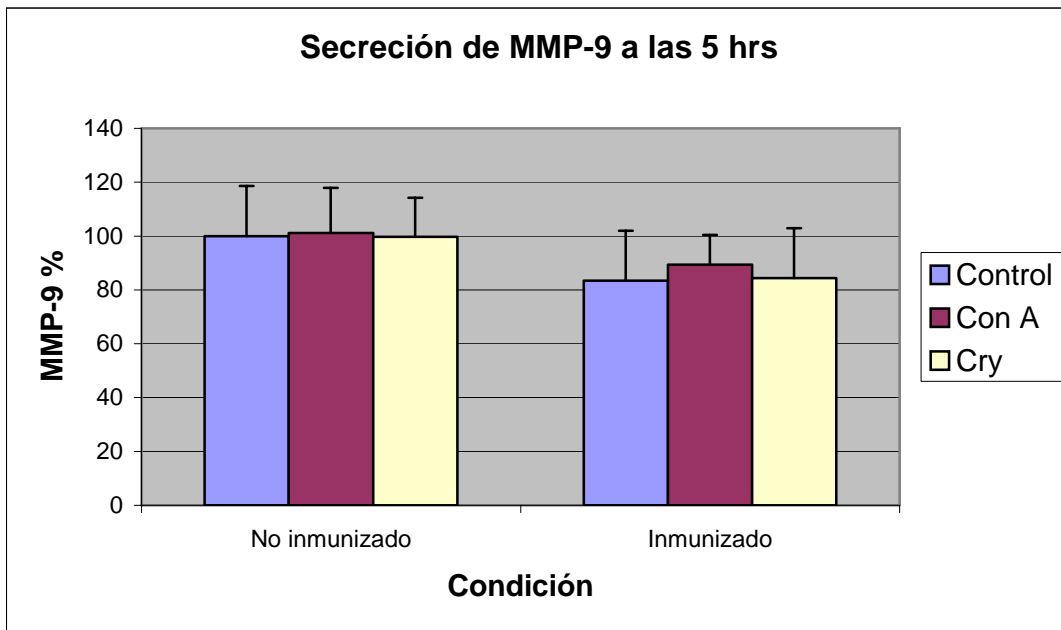
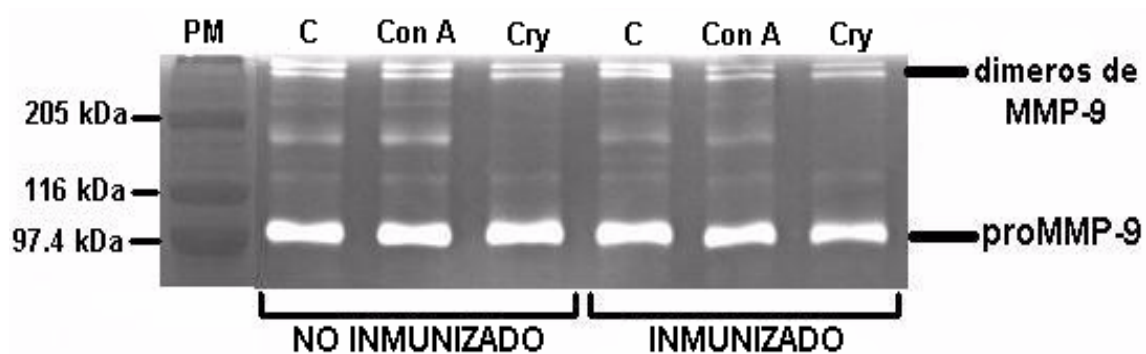


Figura 7.-Efecto de Cry1Ac sobre la secreción de MMP-9 por células mononucleares del bazo a las 5 horas de cultivo. A) se presenta el zimograma de los medios acondicionados por células mononucleares provenientes de animales inmunizados con la protóxina y no inmunizados a las 5 horas de cultivo. Las células fueron cultivadas en presencia de concanavalina A 10µg/ml (Con A), Cry1Ac 10µg/ml (Cry) o sin ellas (C), PM Peso Molecular. B) se presentan los porcentajes de la enzima secretada en relación al tratamiento control del grupo no inmunizado. La enzima se midió por densitometría en zimogramas. No se encontraron diferencias entre tratamientos ni en grupos control e inmunizado ($P < 0.05$).

Después de 24 horas de cultivo puede observarse ligeramente una menor actividad en los tratamientos del grupo inmunizado, siendo más evidente en el tratamiento con Cry, pero no se encontraron diferencias entre grupos no inmunizado e inmunizado, ni entre tratamientos (figura 8).

A) Zimografía



B) Análisis densitométrico

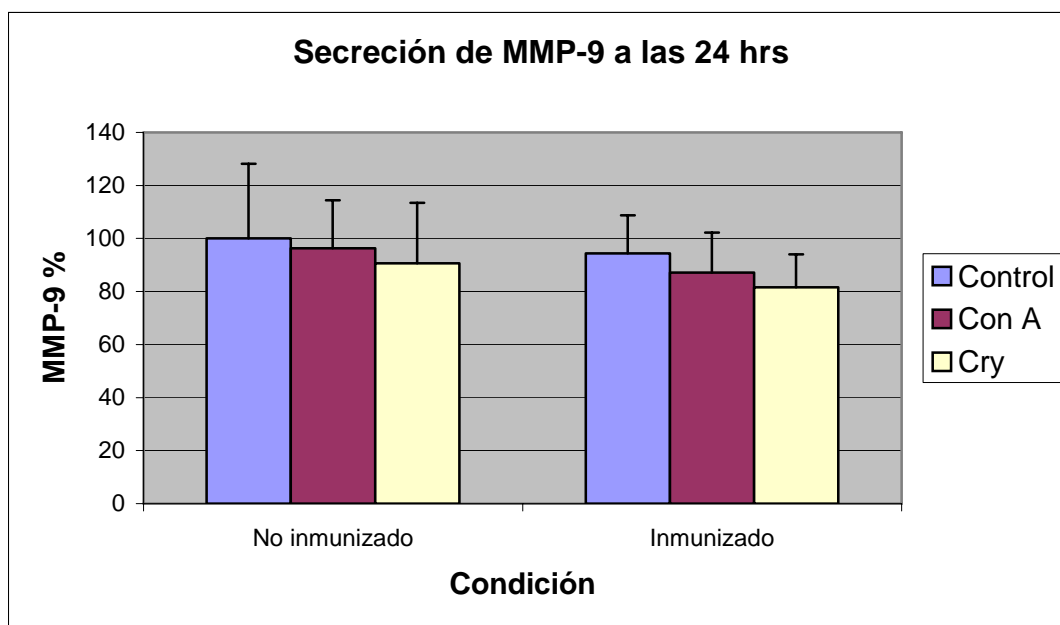
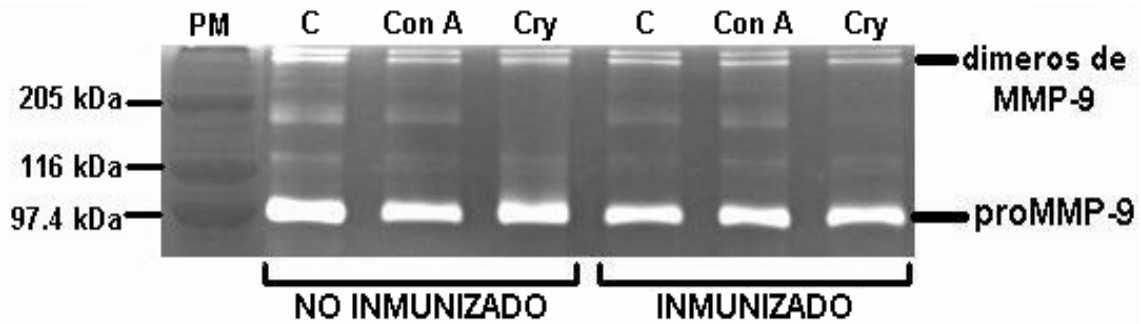


Figura 8.- Efecto de Cry1Ac sobre la secreción de MMP-9 por células mononucleares del bazo a las 24 horas de cultivo. A) zimograma de los medios acondicionados por células mononucleares provenientes de animales inmunizados con la protóxina y no inmunizados a las 24 horas de cultivo. Las células fueron cultivadas en presencia de concanavalina A 10µg/ml (Con A), Cry1Ac 10µg/ml (Cry) o sin ellas (C) PM Peso Molecular. B) porcentajes de la evaluación densitométrica de los zimogramas considerando como 100% al control no tratado. No se encontraron diferencias significativas entre grupos, ni tampoco entre tratamientos ($P < 0.05$).

A las 48 horas de cultivo se observó una menor actividad de MMP-9 en el grupo inmunizado, sin embargo, no hubo diferencias significativas en la expresión de la enzima por los diferentes tratamientos (figura 9).

A) Zimografía



B) Análisis densitométrico

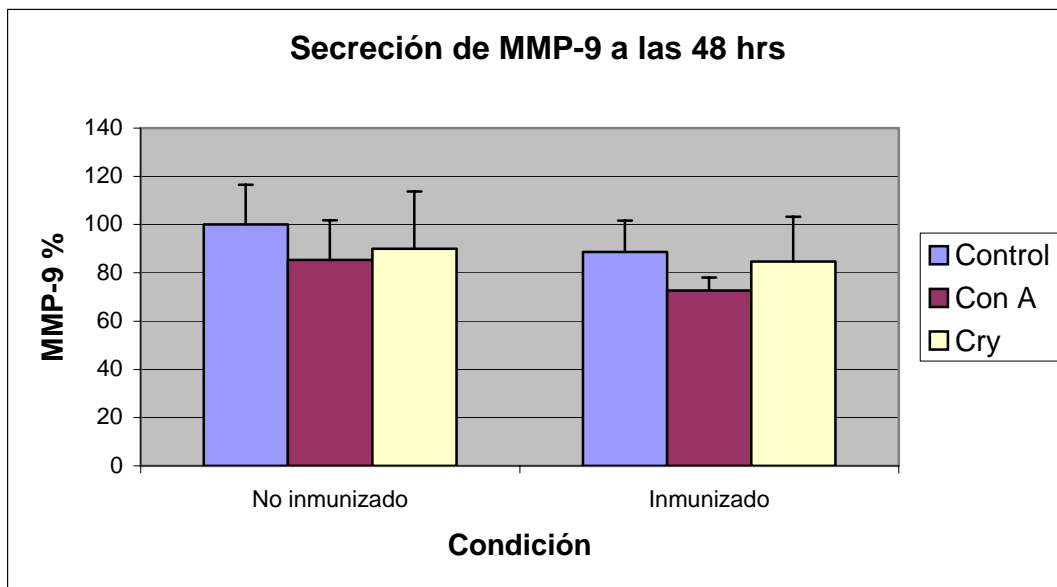


Figura 9.- Efecto de Cry1Ac sobre la secreción de MMP-9 por células mononucleares del bazo a las 48 horas de cultivo. A) zimograma de los medios acondicionados por células mononucleares de bazo provenientes de animales inmunizados con la protóxina y no inmunizados a las 48 horas de cultivo. Las células fueron cultivadas en presencia de concanavalina A 10µg/ml (Con A), Cry1Ac 10µg/ml (Cry) o sin ellas (C). No se observan diferencias entre los grupos ni entre tratamientos. B) Se presentan los porcentajes de la evaluación densitométrica de los zimogramas en relación al control no tratado, no se encontraron diferencias significativas entre grupos, ni tampoco entre tratamientos ($P < 0.05$). Se considera como 100% las células control a las 5 horas.

En la producción de la enzima respecto al tiempo de cultivo se observó una mayor acumulación de la enzima a las 24 horas, en ambos grupos no inmunizado e inmunizado, y fue ligeramente menor a las 48 horas. Entre tratamientos, en los grupos no inmunizado e inmunizado a los 3 tiempos de cultivo no hubo diferencias significativas (figura 10).

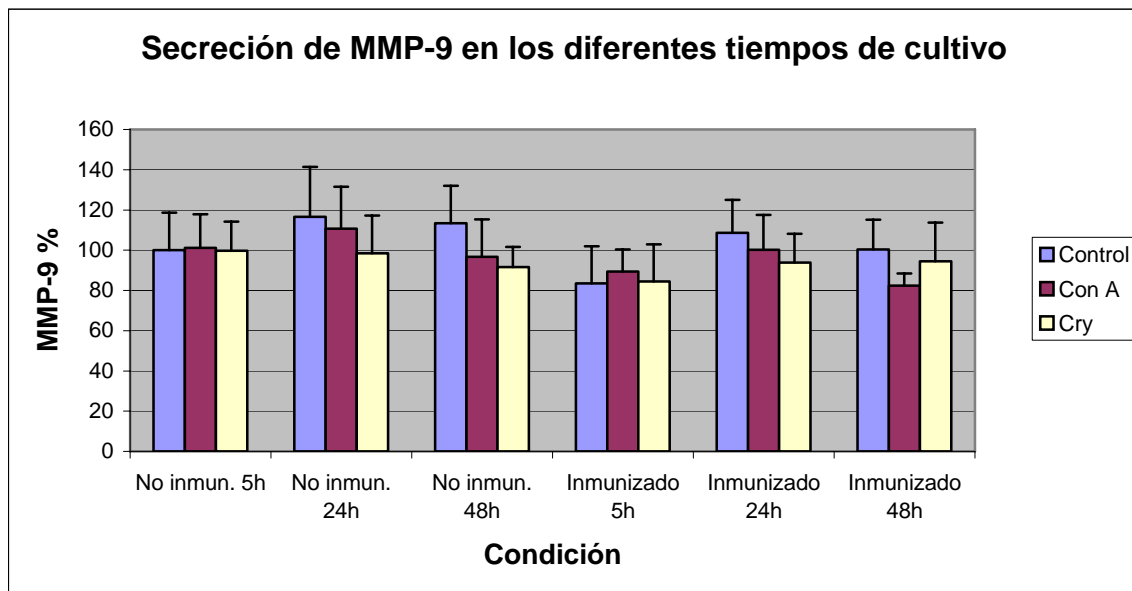


Figura 10.- Efecto de Cry1Ac sobre MMP-9 a las 5, 24 y 48 horas, porcentajes de la evaluación densitométrica de los zimogramas en relación al control no tratado a las 5 horas de cultivo, se observa mayor acumulación de la enzima a las 24 horas, sin embargo no se encuentran diferencias significativas entre grupos, ni entre tratamientos ($P < 0.05$).

DISCUSIÓN

Las células provenientes de animales inmunizados mostraron ligeramente una menor expresión de MMP-9 que las de animales no inmunizados, en los tres tratamientos, sin embargo, esto no fue significativamente diferente. Se podría esperar una inhibición o reducción de la producción de la enzima, considerando reportes previos que describen, que Cry induce la secreción de IFN- γ e IL-4, ambos están implicados en la inhibición de la expresión de MMP-9 por linfocitos B (Bauvois y cols., 2002; Trocme y cols. 1998); y la IL-4 lo hace en monocitos/macrófagos (Jovanovic y cols., 2000).

Además la IL-4 incrementa la migración y sobrevivencia de linfocitos B hacia el bazo (Mori y cols., 2000), efecto característico de citocinas tipo Th2, las cuales favorecen respuestas humorales y por lo tanto reduce la capacidad migratoria de linfocitos (Abraham, M., 2005). Por lo tanto la cantidad de linfocitos B en la población puede ser favorecida, pero la producción de MMP-9 esta siendo inhibida por el IFN- γ .

Cry1Ac también induce la expresión de IL-2 (Moreno-Fierros y cols., 2000), y esta aumenta la proliferación de linfocitos T CD4 (Foussat y cols., 2004), y la producción de MMP-9 en leucocitos de sangre periférica (Xue y cols., 2005), pero se ha visto que la IL-4 bloquea a los receptores para IL-2 en células NK (Saito y cols., 1996). Por lo que en nuestro sistema podría estar pasando lo mismo.

La inmunización intraperitoneal con Cry1Ac induce niveles altos de IgG a nivel sistémico (Vázquez-Padrón y cols., 1999; Moreno-Fierros y cols., 2000) y se

ha demostrado que la IgG inhibe la producción de MMP-9 en los macrófagos (Shapiro y cols., 2002).

Por la prueba de MTT no se aprecia proliferación celular en nuestras condiciones de cultivo, la falta de los componentes del suero pudo haber sido determinante. Los leucocitos son por lo general células poco activas y al ser estimuladas por diversos agentes inmunogénicos se vuelven más activas metabólicamente, la prueba del MTT evalúa la actividad de deshidrogenasas mitocondriales y se ha considerado que es proporcional al número de células por lo que se ha empleado para evaluar la proliferación celular o la disminución en el número de células por agentes citotóxicos, sin embargo en el caso de los leucocitos puede estar relacionada también con el grado de actividad celular además que al número de células.

La mayor actividad reductora sobre el MTT de las células de animales inmunizados al inicio del cultivo, puede deberse al efecto adyuvante o inmunogénico de Cry y a la subsecuente activación de los leucocitos. La IgG producida por la inmunización con Cry1Ac, reduce las poblaciones CD4 y CD8 de linfocitos (Aukrust y cols., 1997), y junto con la reducción de la viabilidad, puede explicar la baja formación de formazan conforme pasa el tiempo.

Se observó que el tratamiento con concanavalina A induce la aglutinación de células en ambos grupos control e inmunizado, debido a que es una lectina que se une a residuos de manosa y a componentes del MHC en los leucocitos (Van Damme y cols., 1998) y los agrupa en forma de racimos, sin embargo, ni el tratamiento con concanavalina A, ni con LPS, reportados en la literatura como estimulantes de la secreción de MMP-9 en leucocitos humanos, tuvieron efecto en

la producción de MMP-9 por las células mononucleares de bazo, coincidiendo con Owen y cols., 2003, posiblemente esto se pueda atribuir a una variación en el tipo de glicoproteínas presentes en las células mononucleares de ratones Balb/c, ya que dichos autores utilizan la misma cepa.

La población celular estaba formada principalmente de células pequeñas correspondientes a distintos leucocitos, incluyendo linfocitos y células un poco más grandes muy probablemente monocitos/macrófagos. Posiblemente los linfocitos sean los más abundantes, ya que son el tipo celular predominante en el bazo (Abbas y cols., 2001)

Por otra parte, en el tratamiento con Cry1Ac se observó una mayor cantidad de células grandes con respecto al tratamiento control, que al analizar por citometría de flujo se trato de monocitos/macrófagos, por que además se quedaban adheridos a la caja de cultivo, y dicho tratamiento aumento considerablemente las células positivas para el marcador de monocitos/macrófagos CD11b en ambos grupos inmunizado y no inmunizado. Estas células son parte de la primera línea de defensa contra antígenos extraños, y se requieren para presentar el antígeno a los linfocitos. Este efecto fue mayor en el grupo inmunizado, asociado posiblemente al efecto adyuvante o inmunogénico de Cry1Ac; ya que la IL-4 producida por las células en respuesta a Cry, aumenta los receptores de manosa en el macrófago, los cuales intervienen en la endocitosis (Martínez-Pomares y cols., 2003), y por consiguiente un mayor procesamiento y presentación de antígeno, así como una diferenciación de monocito a macrófago (Fricke y cols., 2004).

Por lo anterior, en nuestro sistema la producción de diversas citocinas, con efectos opuestos sobre la MMP-9, conduce a que no se detecte un efecto inhibitorio o estimulante neto sobre su producción.

CONCLUSIONES

- La inmunización con Cry1Ac no tuvo un efecto en la secreción de MMP-9 por células mononucleares de bazo.
- No se observó efecto de la concanavalina A en la producción de MMP-9, ni tampoco de Cry1Ac *in vitro*.
- Se observó una mayor proliferación de monocitos/macrófagos a partir de 24 h de tratamiento *in vitro* con Cry1Ac, en ambos grupos inmunizado y no inmunizado.
- En ausencia de suero no se detectó proliferación global de las células provenientes de animales inmunizados y no inmunizados.

PERSPECTIVAS

- ⌘ Trabajar con sub-poblaciones aisladas de las células mononucleares posiblemente puede tener resultados diferentes.
- ⌘ Evaluar que tanto Cry1Ac esta induciendo la diferenciación de monocitos y linfocitos B en macrófagos y células plasmáticas respectivamente.
- ⌘ Medir que citocinas se están produciendo en nuestras condiciones de cultivo.

ANEXOS

PRODUCCIÓN Y PURIFICACIÓN DE LA PROTOXINA Cry1Ac A PARTIR

DE *Escherichia coli*.

- Inocular una asada de *Escherichia coli* JM 103 (pOS9300) a un tubo con 5 ml de medio Luria-Bertani (LB) suplementado con kanamicina (30µg/ml) y ampicilina (50µg/ml).
- Incubar toda la noche a 37° C en agitación constante. De este inocular 1 ml en un matraz con 500 ml de medio LB con 0.5 ml de kanamicina, manteniendo en agitación por 5 h a 37° C.
- Las bacterias se cosechan por centrifugación a 4° C y 12 000 x g por 10 min, resuspender la pastilla con 50 ml de Trizma 50mM pH 8, EDTA 10 mM (TE), centrifugar nuevamente y resuspender la pastilla con 50 ml de TE, añadir 0.5 ml de lisozima (2 mg/ml) e incubar 1h a 37° C mezclando suavemente de vez en cuando.
- Repartir el volumen en dos tubos Nalgene de 50 ml y cada uno se va a sonicar tres veces mientras esta sumergido en hielo por 5 min. (Ultrasonic Homogeneizer 4710).
- Reunir los sonicados, y centrifugar la mezcla resultante a 10 000 x g durante 20 min a 4° C, después resuspender la pastilla en 50 ml de NaCl 0.5 M y Tritón X-100 1%, centrifugar a 10 000 x g por 15min a 4° C.
- Resuspender la pastilla en 50 ml de NaCl 0.5 M y Tritón X-100 al 1%, centrifugar a 10 000 rpm por 15min a 4° C, nuevamente resuspender la pastilla en 50 ml de NaCl 0.5 M, y centrifugar a 10 000 x g por 15 min a 4° C, ahora se resuspende en 30 ml de H₂O estéril fría, centrifugar a 10 000 x

g por 15 min a 4° C, después solubilizar la pastilla en 10 ml de amortiguador de carbonatos 0.1 M pH 9.6 y 50 µl de mercaptoetanol 30 min a 37 °C en agitación, por ultimo centrifugar a 10 000 x g 15min a 4 ° C, recuperar el sobrenadante y almacenar a 4° C.

OBTENCIÓN DE LINFOCITOS DE BAZO.

- Los bazos se tamizan en tela de organza con el émbolo de una jeringa, suavemente. Colectar las muestras con una pipeta Pasteur en un tubo cónico de 15 ml.
- Dejar reposar 10 minutos en hielo. Decantar el sobrenadante a otro tubo, para evitar eritrocitos.
- Centrifugar la muestra a 1300 rpm durante 7-10 minutos a 4°C (repetir 3 veces para lavar las células).
- Resuspender en HANKS, colocar con cuidado y despacio a un tubo cónico de 15 ml, previamente adicionado con 4 ml de Ficoll.
- Centrifugar las muestras de bazo a 2000 rpm x 30 minutos a temperatura ambiente. Recoger el anillo de linfocitos de la interfase y colocar en tubos cónicos de 15ml con 8ml con HANKS.
- Centrifugar a 1300 rpm durante 7 minutos a 4 °C. Desechar el sobrenadante y resuspender la muestra con 3 ml de RPMI
- A un tubo Eppendorf agregar 80µl de RPMI + 10 µl de azul de tripan al 2% más 10µl de la muestra que se va a contar. Se hace el conteo celular en un hemocitómetro.

BIBLIOGRAFÍA.

- Abbas, A., Lichtman, A. y Pober, J. 2001. *Inmunología Celular y Molecular*. 3° Ed. McGraw Hill. Madrid, España.
- Abraham, M., Shapiro, S., Karni, A., Weiner, H.L. y Miller, A. 2005. Gelatinases (MMP-2 and MMP-9) are preferentially expressed by Th1 vs. Th2 cells. *J. Neuroimmun.* 163:157-164.
- Alberts, B., Bray D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. y Watson J.D.. 1996. *Biología Molecular de la Célula*. 3° Ed. Omega. Barcelona, España.
- Aukrust, P., Müller, F., Nordoy, I., Haug, C.J., y Froland, S. 1997. Modulation of lymphocyte and monocyte activity after intravenous immunoglobulin administration *in vivo*. *Clin. Exp. Immunol.* 107: 50-56.
- Bavois B., J. Dumont, C. Mathiot y J. P. Kolb. 2002. Production of matrix metalloproteinase-9 in early stage B-CLL: supression by interferons. *Leukemia* 16:791-798.
- Chizzolini, c., Rezzonico, R., De Luca, C., Burger, D., y Dayer, J.M. 2000. Th2 cell membrane factors in association with IL-4 enhance matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) while decreasing MMP-9 production by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-differentiated human monocytes. *J. Immunol.* 164: 5952–5960.
- Corcoran, M.L., Stetler-Stevenson, W.G., Brown, P.D., y Wahl, L.M. 1992. Interleukin 4 inhibition of prostaglandin E₂ synthesis blocks interstitial collagenase and 92 kDa type IV collagenase production by human monocytes. *J. Biol. Chem.* 267:515-519.

- Faveeuw, C., Preece, G. y Ager, J. 2001. Transendothelial migration of lymphocytes across high endothelial venules into lymph nodes is affected by metalloproteinases. *Blood* 98:3, 688-695.
- Foussat, A., Bouchet-Delbos, L., Courderc, J., Berrebi, D., German-Fattal, M., Maillot, M.C., Durand-Gasselín, I., Galanaud, P., Di Santo, J. y Emilie, D. 2004. Effects of Exogenous IL-2 Administration on the Homeostasis of CD4+ Lymphocytes. *J. Clin. Immunol.* 24(5):503-514.
- Fricke, I., Mitchell, D., Petersen, F., Böhle, A., Bulfone-Paus, S. y Brandau, S. 2004. Platelet factor 4 in conjunction with IL-4 directs differentiation of human monocytes into specialized antigen presenting cells. *FASEB J.* 18:1588-1590.
- Helgason, E., Okstad, O. A., Caugant, D. A., Johansen, H. A., Fouet, A., Mock, M., Hegna, I. y Kolsto, A-B. 2000. *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis* one species on the basis of genetic evidence. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 2627-2630.
- Hoekstra, R., Eslens, F. y Verweij, J. 2001. Matrix metalloproteinase inhibitors: current developments and future perspectives. *The Oncol.* 6:415-427.
- Janeway, C., Travers, P., Walport., M. y Shlomchick, M.J. 2003 *Inmunobiología: El sistema inmunitario en condiciones de salud y enfermedad.* 2da ed. Masson. Barcelona, España.

- Jovanovic, D., Martell-Pelletier, J., Di Batista, J., Mineau, F., Jolicoeur, F., Benderdour, M. y Pelletier, J.P. Stimulation of MMP-9 production by IL-17 in human monocytes/macrophages. *Arth. Reumath.* 43(5):1134-1144.
- Lacraz, S., Isler, P., Vey, E., Welgus, H.G., y Dayer, J.M. 1994. Direct contact between T lymphocytes and monocytes is a major pathway for induction of mmetaloproteinase expression. *J. Biol. Chem.* 269:22027-22033.
- Liu, Y., Shaw, S.K., Ma, S., Yang, L., Luscinskas, F.W., y Parkos, C. 2004. Regulation of Leukocyte Transmigration: Cell Surface Interactions and Signaling Events. *J. Immunol.*
- Martínez-Pomares, L., Reyd, D.M., Brown, G.D., Taylor, P.R., Stillion, R.J., Linehan, S.A., Zamze, S., Gordon, S. y Wong, S. 2003. Analysis of mannose receptor regulation by IL-4, IL-10, and proteolytic processing using novel monoclonal antibodies. *J. Leukoc. Biol.* 73:604-613.
- Mitola S., Strasly, M., Prato, M., Ghia P. y Bussolino, F. 2003. IL-12 regulates an endothelial cell-lymphocyte network: effect on metalloproteinase-9 production. *J. Immunol*, 171: 3725–3733.
- Moreno-Fierros, L., García, N., Gutiérrez, R., López-Revilla R. y Vázquez-Padrón R. I. 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.* 2:885-890.

- Moreno-Fierros, L., Ruiz-Medina, E. J., Esquivel, R., López-Revilla, R. y Piña-Cruz, S. 2003. Intranasal Cry1Ac protoxin is an effective mucosal and systemic carrier and adjuvant of *Streptococcus pneumoniae* polysaccharides in mice. *Scan. J. Immunol.* 57:45-55.
- Mori, M., Morris, S., Orekhova, T., Marinaro, M., Giannini, E. y Finkelman, F. 2000. IL-4 promotes the migration of circulating B cells to the spleen and increases splenic B cell survival. *J. Immunol.* 164: 5704–5712.
- Opdenakker, G., Van den Steen, P.E., Dubois, B., Nelissen, I., Van Coillie, E., Masure, S., Proost, P. y Van Damme, J.. 2001. Gelatinase B functions as regulator and effector in leukocyte biology. *J. Leukoc. Biol.* 69:851-859.
- Opdenakker, G., Van den Oteen, P.E. y Van Damme, J. 2001. Gelatinase B: a tuner and amplifier of immune functions. *TRENDS Immunol.* 22:10, 571-578.
- Owen, J., Iragavarapu-Charyulu, V., Gunja-Smith, Z., Herbert, L., Grosso, J., y López, D. 2003. Up-regulation of matrix metalloproteinase-9 in T lymphocytes of mammary tumor bearers: role of vascular endothelial growth factor. *J. Immunol.* 171: 4340–4351.
- Sarén, P., Welgus, H., y Kovanen, P. 1996. TNF- α and IL-1 β selectively induce expression of 92-kDa gelatinase by human macrophages. *J. Immunol.* 157: 4159-4165.
- Saito, S., Umekage, H., Nishikawa, K., Morii, T., Narita, N., Enomoto, M., Sakakura, S., Harada, N., Ichijo, M. y Morikawa, H. 1996. Interleukin 4 (IL-4) blocks the IL-2-induced increase in natural killer activity and DNA synthesis

of decidual CD160/CD56bright NK cells by inhibiting expression of the IL-2 receptor α , β , and γ . *Cell. Immunol.*170:71-77.

- Shapiro, S., Shoenfeld, Y., Gilburd, B., Sobel, E. y Lahat, N. 2002. Intravenous gamma globulin inhibits the production of matrix metalloproteinase-9 in macrophages. *Cancer* 95:2032-2037.
- Sternlicht, M.D. y Werb, Z. 2001. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 17:463-516.
- Trocmé, C., Gaudin, P., Berthier, S., Barro, C., Zaoui, P. y Morel, F. 1998. Human B lymphocytes synthesize the 92 kDa gelatinase, matrix metalloproteinase-9. *J. Biol. Chem.* 273:20677-20684.
- Van Damme, E., Pelmans, W., Puztai, A. y Bardocz, S. 1998. Handbook of plant lectins: properties and biomedical applications. John Wiley and Sons. England.
- Van den Steen, P., Dubois, B., Nelissen, I., Rudd, P., Dwek, R., y Opdenakker, G. 2002. Biochemistry and molecular biology of gelatinase B or matrix metalloproteinase-9 (MMP-9). *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 37(6):375–536
- Vázquez-Padrón R., L. Moreno-Fierros, L. Neri-Bazan, G.A. de la Riva y R. López-Revilla. 1999. Intragastric and intraperitoneal administration of Cry1Ac protoxin from *Bacillus thuringiensis* induce systemic and mucosal antibody response in mice. *Life Sci.* 64:21, 1897-1912.

- Westermann J. y Bode, U. 1999. Distribution of activated T cells migrating through the body: a matter of life and death. *Immunol. Today*. 20:7, 302-306.
- Xue, M., Thompson, P., Clifton-Bligh, R., Fulcher, G., Gallery, E. y Jackson, C. 2005. Leukocyte MMP-9 is elevated and contributes to lymphocyte activation in type I diabetes. *J Biochem Cell Biol*. 37:2406-2416.
- Yakubenko V. P., R. R. Lobb, E. F. Plow y T. P. Ugarova. 2000. Differential Induction of gelatinase B (MMP-9) and gelatinase A (MMP-2) in T lymphocytes upon $\alpha_4\beta_1$ mediated adhesion to VCAM-1 and the CS-1 peptide of fibronectin. *Exp. Cell Res*. 260:73-84.
- Zhang, Y., McCluskey, K., Fujii, K., y Wahl, L. 1998. Differential regulation of monocyte matrix metalloproteinase and TIMP-1 production by TNF- α , granulocyte-macrophage CSF, and IL-1b through prostaglandin-dependent and Independent mechanisms. *J. Immunol*. 161: 3071–3076.
- Zhou H., E. Bernhard, F. E. Fox y P. C. Billings. 1993. Induction of metalloproteinase activity in human T lymphocytes. *Biochim. Biophys. Acta*. 1177:174-178.