



# Universidad Nacional Autónoma de México

---

---

Facultad de Estudios Superiores Iztacala

CARACTERIZACIÓN DE LOS EFECTOS  
INMUNOMODULADORES DE LA  
PROTOXINA CRY1AC EN  
MACRÓFAGOS DE RATONES BALB/C

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
**B I Ó L O G O**  
P R E S E N T A:  
**LUCIO RIVERA SANTIAGO**



México

2008



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

## **Agradecimientos**

A mis padres y en especial a mi madre “Elo” por todo el apoyo brindado y los sacrificios que han hecho por mí, guardo en mi corazón un lugar especial para ustedes.

A mis hermanos Eduardo y Annette por todo el apoyo moral brindado parte de este logro es para ustedes

A mi tutora la Dra. Leticia Moreno Fierros por todo el apoyo brindado en la realización de esta tesis, sin su comprensión y paciencia no hubiera sido posible.

A mis superiores del laboratorio: el Dr. Marco por toda su sapiencia, consejos y ayuda brindada en el lab y sobre todo su amistad, a Verdín, por su súper apoyo, sin el manual que ella hizo no hubiera hecho nada y por cumplir todos mis caprichitos (súper linda).

A mis amigos del lab: Freddy, Ana, Oscar, Karla, Mary, Rodrigo, Paula, Ale, Steph, Laura, Phelps, Conchis.

A mis amigos de la carrera Lucho, Pingu, Greñas, Ramón, Adris, Cone, Vlas, Magdis, Lau, Dulce, que la verdad son un súper respaldo en las buenas y las malas, tantas cosas que compartimos juntos nunca se olvidaran la verdad que buenos momentos.

Mis hermanos del alma Will, Almendro, Enano, Porti, Angel y Paco (R.I.P.) que si llegan a ver esto van a ver que si se puede.

Agradezco también el apoyo brindado a este proyecto por UNAM PAPIIT IN221807.

Proyecto parcialmente apoyado por UNAM PAPIIT IN226610, CONACyT 080920 y al PAPIME PE203607.

Índice	
Abreviaturas.....	3
Resumen.....	4
Introducción.....	6
Inmunomodulación.....	7
Macrófagos.....	8
Moléculas coestimuladoras.....	10
Inflamación y citocinas proinflamatorias.....	12
Antecedentes.....	14
Planteamiento del problema.....	17
Objetivos.....	18
Metodología.....	19
Resultados.....	25
Discusión.....	37
Conclusiones.....	40
Bibliografía.....	41

## Abreviaturas

**APC's** Células presentadoras de antígeno (Antigen Presenting Cells)

**ACK** Ammonium Chloride Potassium

**IL** Interleucina

**TNF** Factor de necrosis tumoral (Tumoral Necrosis Factor)

**IFN** Interferón

**MCP** Proteína quimioatrayente de monocitos (Monocyte Chemoattractant Protein-1)

**LPS** Lipopolisacárido (Lypopolisaccharide)

**PBS** Amortiguador fosfato-salino (Phosphate Buffered Saline)

**RPMI** Roswell Park Memorial Institute

**EDTA** ácido etilendiaminetetraacético (Ethylenediaminetetraacetic Acid)

**TCR** Receptor de células T (T cell Receptor)

**MHC** Complejo Principal de Histocompatibilidad (Major Histocompatibility Complex)

**FITC** Isotiocianato Fluoresceina (Fluorescein Isothiocyanate)

**PE** Ficoeritrina (Phycoeritrin)

**CD** Marcador de diferenciación (Cluster Differentiation)

**FCS** Flow Cytometry Standard

## Resumen

La protoxina Cry1Ac recombinante clonada a partir de *Bacillus thuringiensis* es altamente inmunogénica y posee efectos adyuvantes tan potentes como los de la toxina del cólera tanto a nivel mucoso como sistémico, sin embargo se desconoce el mecanismo por el que ejerce su actividad adyuvante. Debido a que el mecanismo por el que actúan muchas moléculas microbianas que tienen actividad adyuvante es activando a las células presentadoras de antígeno (APC) tales como linfocitos B, células dendríticas y macrófagos (M $\alpha$ ), en este trabajo se planteó determinar si la protoxina Cry1Ac tenía la capacidad de activar M $\alpha$ . Se analizó si la proteína Cry1Ac inducía la expresión de moléculas coestimuladoras CD80 y CD86 en macrófagos de diferentes sitios a diferentes tiempos después de la administración *in vivo* por la vía intraperitoneal (i.p.): peritoneo, bazo, ganglio mesentérico (GM), o por la vía intranasal: pulmón y de lavados traqueoalveolares; así como después de la estimulación *in vitro* en macrófagos aislados de los diferentes sitios de animales no inmunizados. Se determinó también si la proteína Cry1Ac inducía la producción de citocinas proinflamatorias IL-6, IL-10, IL-12p70, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$  y MCP-1 en macrófagos estimulados *in vivo* e *in vitro*. Los efectos sobre activación y producción de citocinas de la protoxina Cry1Ac se compararon con los inducidos con LPS. Se encontró que Cry1Ac, de manera similar al LPS, incrementa los niveles de expresión de ambas moléculas coestimuladoras en macrófagos. Aunque siguiendo una cinética distinta dependiendo del sitio, ya que por la vía i.p. la activación ocurre a tiempos más tempranos en macrófagos aislados del peritoneo (el sitio de estimulación), y a tiempos posteriores en bazo, mientras que en el ganglio mesentérico la activación de macrófagos es menor y más tardía. Se encontró que la protoxina Cry1Ac induce la expresión de citocinas proinflamatorias en macrófagos y en algunos casos los efectos de Cry1Ac fueron similares a los inducidos con LPS (dosis no letal). Sin embargo en

general, los efectos de Cry1Ac y LPS en la inducción de las diferentes citocinas proinflamatorias variaron en los macrófagos de los diferentes tejidos. Por ejemplo, ambos tratamientos indujeron incrementos similares de  $TNF\alpha$  en  $M\phi$  alveolares, moderados en peritoneo y GM; y bajos en pulmón. También se observaron efectos similares de Cry1Ac y LPS en la expresión de IL-6, los incrementos fueron altos en pulmón y peritoneo, y moderados en GM. La producción de  $IFN\gamma$  se incrementó significativamente y de forma similar por ambos tratamientos en los macrófagos de todos los sitios analizados, excepto en peritoneo donde se detectó una expresión constitutiva alta. MCP-1 se incrementó también por efecto de LPS y Cry1Ac en GM y bazo pero no en peritoneo, mientras que en pulmonares y alveolares la alta producción constitutiva presentada no se modificó. En general se detectaron bajos niveles de IL-10 en todos los sitios, aunque en GM se detectaron los niveles más altos siendo mayores por efecto de LPS que por Cry1Ac. Es importante destacar que también se observaron efectos distintos de Cry1Ac y LPS en la expresión de algunas citocinas en macrófagos de los diferentes tejidos, por ejemplo en la expresión de  $TNF\alpha$  en el Bazo, y de IL-6 en  $M\alpha$  alveolares Cry1Ac provocó incrementos leves, mientras que LPS produjo marcados incrementos. Otra diferencia importante encontrada con respecto al efecto del LPS, fue que Cry1Ac no incrementa la expresión de IL-12p70. Los resultados encontrados sugieren que la actividad adyuvante que confiere esta proteína podría explicarse en parte por su capacidad de incrementar la expresión de moléculas coestimuladoras CD80 y CD86 en macrófagos y de inducir citocinas proinflamatorias tales como  $TNF\alpha$ ,  $IFN\gamma$  y MCP-1.

## Introducción

La respuesta inmune es esencial para proveer protección contra organismos infecciosos como bacterias, virus y parásitos, no es de sorprender que la respuesta este finamente capacitada para responder rápida y apropiadamente a estos agentes, no sólo se activa rápidamente, sino también se puede desactivar de la misma manera para prevenir respuestas inmunes con efectos adversos. Existen diversas maneras por las cuales la respuesta inmune es regulada; desde las fases iniciales en las cuales los linfocitos se encuentran con el antígeno hasta que la respuesta inmune va disminuyendo después de combatir una infección. No sólo la respuesta hacia antígenos exógenos es controlada sino también la generada por antígenos propios; una característica fundamental del sistema inmune es la falta de respuesta hacia algunos de estos antígenos, este estado es denominado tolerancia. Otro de los medios por los cuales la respuesta inmune es controlada incluyen: la señalización por el antígeno, receptores coestimuladores e inhibidores, citocinas y apoptosis (O'shea y Nutman, 2001). Tradicionalmente estas respuestas se han dividido en dos categorías: la respuesta inmune innata y respuesta inmune adquirida.

La respuesta inmune innata es la primera barrera defensiva del organismo y no requiere sensibilización previa. Este tipo de respuesta es mediada por células con capacidad fagocítica y células asesinas naturales, también se considera que es de respuesta rápida y actúa directamente sobre el patógeno sin necesidad de selección o maduración celular; lo que desencadena una respuesta celular y humoral caracterizada por la activación de neutrófilos, células endoteliales y macrófagos además de mediadores de la inflamación. La inmunidad específica, por su parte, es mucho más especializada, requiere tiempo para activarse y puede presentar memoria inmunológica; lo que le permite reaccionar más rápida y eficazmente a una amenaza ya conocida.

La diferencia más importante que existe entre ambos tipos de respuestas es que la innata no se modifica tras la exposición repetida a un agente infeccioso mientras que la respuesta adaptativa se intensifica al ir aumentando el número de exposiciones al mismo agente patógeno. Esto ha dirigido las investigaciones hacia la elaboración de sustancias que permitan potenciar esta respuesta; ejemplo de esto son las sustancias inmunomoduladoras.

## **Inmunomodulación**

La inmunomodulación se refiere al proceso de modificar la respuesta inmune de manera positiva o negativa por la administración de drogas o compuestos (Lawson *et al* 2007) y estas pueden afectar el comportamiento de varias células. Dentro de las sustancias inmunomoduladoras ocupan un lugar muy importante los agentes inmunopotenciadores. Estas sustancias son capaces de mejorar la respuesta inmune en diferentes formas: a) pueden incrementar la inmunogenicidad de antígenos poco inmunogénicos; b) pueden ser usados para incrementar la velocidad y duración de la respuesta inmune; (c) modular la avidéz, especificidad, isotipo o distribución de las subclases de anticuerpos; d) pueden estimular la inmunidad mediada por células; e) promover la inducción de inmunidad en mucosas; f) incrementar la respuesta inmune en individuos seniles o inmaduros inmunológicamente; g) además pueden disminuir la dosis de antígeno y reducir los costos de las vacunas (Singh y O' hagan , 2002).

Existen dos tipos de inmunomoduladores los de acción inespecífica y los de acción específica, los primeros, logran estimular o suprimir la respuesta inmune, sin que la actividad de las células estimuladas vaya dirigida hacia un antígeno determinado (Pirofski *et al*, 2006); y los de acción específica, que ejercen su función sobre células del sistema inmune, atribuible a la presencia de un antígeno o inmunógeno dado, por lo que

la acción de estas células para producir una respuesta inmune es específica y selectiva (Martínez, 2005).

En general, solo los adyuvantes inmunomoduladores pueden resultar en una regulación positiva de todo el sistema inmune, comúnmente resultan en la regulación positiva de ciertas citocinas y la regulación negativa de otras (Cox et al 1997). Existen dos principales poblaciones conocidas de células T; las CD4<sup>+</sup> y las CD8<sup>+</sup>, las Th1 y las Th2 que han sido bien descritas tanto para ratones como humanos; así como se ha postulado su existencia en otras especies. La respuesta Th<sub>1</sub> producen IFN $\gamma$ , TNF, los cuales activan macrófagos y están envueltos las reacciones DTH. Por el contraste, la respuesta de tipo Th<sub>2</sub> producen IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, las cuales son responsables de respuestas fuertes de anticuerpos, incluyendo la producción de IgE, e inhibir las funciones de macrófagos (Romagnani S. 1997).

### **Macrófagos**

Los macrófagos son parte del sistema inmune innato, reconociendo y destruyendo patógenos potenciales incluyendo bacterias, los protozoos, hongos y helmintos. Son capaces de reconocer las células singenésicas de tumores y algunas células infectadas por virus, así como las células normales que experimentan la muerte celular programada (Auger et al 1992). También intervienen en las primeras fases de activación de las células T, procesando y presentando los antígenos. Aparte de su papel en el sistema inmune innato, los macrófagos funcionan como células reguladoras y efectoras en respuestas del sistema inmune humoral. Cuando están activados los macrófagos adquieren actividades microbicidas y tumorocidas que involucran especies reactivas de oxígeno y metabolitos reactivos del nitrógeno. Otras de sus funciones es coordinar las respuestas adicionales al hospedero mediante la síntesis de un amplio

rango de mediadores de la inflamación que, finalmente, activan la respuesta inmune adaptativa y establecen la inmunidad protectora.

Durante la hematopoyesis en la médula ósea las células progenitoras de granulocitos y monocitos se diferencian en promonocitos, que salen de la médula ósea y pasan a la sangre, en donde se diferencian de modo adicional en monocitos maduros. Los monocitos circulan en el torrente sanguíneo alrededor de ocho horas, durante las cuales crecen; a continuación migran hacia los tejidos y se diferencian en macrófagos específicos de tejido (Goldsby *et al* 2004).

Los macrófagos están distribuidos a través de todo el cuerpo en varios órganos, tejidos y fluidos; razón por la cual son tan efectivos como la primera línea de defensa, y muestran gran diversidad de fenotipos y de funciones resultado de su habilidad para adaptarse al ambiente local tales como células de Kupffer en el hígado, macrófagos alveolares en los pulmones, microglia en el sistema nervioso central, y macrófagos en bazo y la cavidad peritoneal (Barrington *et al*, 2001; Gordon, 2003). La heterogeneidad de macrófagos puede ser importante para la diversidad, la flexibilidad y efectividad de las respuestas inmunes innatas y adaptativas a todas clases de estímulos (Kaufmann y Schaible, 2005). Un total entendimiento del origen y mecanismo de esta heterogeneidad se ha obstaculizado por el hecho de que no existen marcadores confiables para distinguir los diferentes estados de diferenciación y activación de estas líneas celulares, la clasificación actual esta basada en cierto numero de propiedades como la presencia de ciertas enzimas intracelulares, presencia de receptores en la superficie de la célula, carbohidratos y la habilidad de fagocitar IgG, lo que hace muy difícil que un solo marcador sea específico para todas las subpoblaciones de macrófagos (Coligan *et al*, 2006). La comprensión de los eventos moleculares que se llevan a cabo en los macrófagos como respuesta al reconocimiento de productos

bacterianos, peptidoglicanos y lipopolisacáridos (LPS) nos ayudan a comprender y caracterizar los procesos inflamatorios que estos conllevan. Los macrófagos activados son más fagocíticos e incrementan la expresión de MHC II y de moléculas coestimuladoras (Ripoll *et al*, 2005).

### **Moléculas coestimuladoras**

El sistema inmunológico demuestra una alta especificidad que permite reconocer y defender el cuerpo contra patógenos externos. Los receptores de antígeno de los linfocitos, los cuales le confieren la habilidad de reconocer y responder a estímulos ya sean externos e internos, estos abarcan un estimado de  $25 \times 10^6$  receptores de células T (TCR's) y entre  $10^4$  y  $10^{10}$  receptores de células B (Keir y Sharpe, 2005). Este número substancial de conjuntos de receptores de antígeno implican una gran tarea para el sistema inmunológico: mantener un repertorio sumamente diverso de la célula T. La familia de moléculas coseñalizadoras B7-CD28 es crucial para la activación de linfocitos T, la prevención de tolerancia y el desarrollo óptimo de la inmunidad de la célula T, estas moléculas coseñalizadoras no sólo proveen señales críticas positivas que estimulan el crecimiento de la célula T, la sobrerregulación en la producción de citocinas y la promoción en la diferenciación de la célula T, sino también contribuyen en señales negativas que limitan, terminan o atenúan la respuesta de la célula T (Carreno *et al*, 2002).

Las células T necesitan dos señales para ser activadas. La primera señal es dada vía el TCR, reconociendo el antígeno y ligándolo al complejo principal de histocompatibilidad (MHC). Esta señal por si sola puede llegar a producir anergia o tolerancia (Fleischer, 1996).

La segunda señal es la llamada “coestimuladora” o “accesoria”; esta señal es dada a las células T por moléculas coestimuladoras en la superficie de las APC's. La coestimulación es de interés terapéutico porque la manipulación de señales coestimuladoras pueden proveer el medio para aumentar o disminuir la respuesta inmune (Sharpe *et al*, 2002). La vía mejor caracterizada de coestimulación de la célula T implican a los ligandos B7-1 (CD80) y B7-2 (CD86) que comparte dos receptores: CD28 y CTLA-4 (CD152). La familia B7/CD28 se ha expandido en los últimos años, dos nuevas vías se han definido, el coestimulador inducible (ICOS) y su ligando B7H (también conocido como GL50, B7RP1, LICOS y B7-H2) y la muerte programada (PD-1) y sus ligandos PD-L1 y PD-L2 (también conocidos como B7-H1 y B7-DC, respectivamente. Ambos tienen papeles en regular la respuesta efectora de la célula T y son de gran interés por controlar las respuestas patogénicas de la misma. Dos miembros adicionales de la familia B7, B7-H3 y B7-H4; además de un miembro adicional de la familia CD28: BTLA también han sido identificados (Keir *et al* 2005).

CD28 proporciona señales que aumentan y sostienen la activación de la célula T junto con la señalización de los receptores de la célula T, mientras que CTLA-4 pone señales de TCR antagónicas, sirve para aminorar respuesta inmunes secundarias, e inducen tolerancia (. El equilibrio entre las señales positivas y negativas por CD28 y CTLA-4 respectivamente es el centro en la regulación de la proliferación, diferenciación, supervivencia y de las respuestas de la célula T dependientes de la célula B (Tsvetelina *et al* 2004).

B7-1 y B7-2 son expresadas en células dendríticas, células B y macrófagos. B7-2 e expresada constitutivamente expresada en la superficie celular de las APC's y es rápidamente sobrerregulada a la interacción con CD28. (Greenwald *et al*, 2005). La expresión de B7-1 es lentamente inducida y es estable por un largo periodo de tiempo

que B7-2, la cual es rápidamente inducida y con una expresión máxima de 48 hrs. (Bathia *et al*, 2006). B7-1 y B7-2 han demostrado que pueden modular la diferenciación de la célula T a Th1/Th2. Mientras que B7-1 favorece preferentemente la diferenciación hacia Th1, B7-2 favorece la diferenciación hacia Th2 (Kuchroo *et al*, 1995)

### **Inflamación y citocinas proinflamatorias**

Las citocinas están involucradas virtualmente en cada faceta de la inmunidad y la inflamación, incluyendo la inmunidad innata, la presentación de antígeno, la diferenciación celular de la médula ósea, el reclutamiento celular y la activación, y la expresión en la adhesión molecular. Las citocinas se producen en respuesta a un estímulo inmune y determina si la respuesta inmune subsecuente se torna citotóxica, humoral, mediada por células o alérgica (Borish *et al*, 2003). Las citocinas son pequeñas proteínas no estructurales con pesos moleculares entre los 8 y los 40000 D. (Dinarello 2000) las cuales regulan la función de las células que las producen y de otros tipos celulares. Las citocinas derivan primordialmente de células mononucleares fagocíticas y otras APC's, son particularmente efectivas promoviendo el infiltrado celular y el daño al tejido local característico de la inflamación. El procesamiento de antígenos es llevado a cabo por las APC's y presentados a los linfocitos T, lo cual proporcionan una vía para la producción de citocinas.

Existen actualmente 18 citocinas conocidas con el nombre de interleucina (IL). Otras citocinas han conservado su descripción biológica original, tal como el factor de necrosis tumoral (TNF). Otra manera de ver a las citocinas es su papel en la infección y/o la inflamación. Algunas citocinas promueven claramente la inflamación y se llaman citocinas proinflamatorias, mientras que otras suprimen la actividad de las citocinas proinflamatorias y se llaman citocinas antiinflamatorias (Dinarello, 2000). Las principales

citocinas que actúan en la inflamación son: Interleucina 1 (IL-1), Factor de Necrosis Tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), Interleucina 8 (IL-8), Interleucina 12 (IL-12), interleucina 6 (IL-6) e Interferón  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ). IFN $\gamma$  puede inducir a las células a bloquear o inhibir la replicación de una amplia variedad de virus, además tiene una función central en muchos procesos inmunoreguladores, que incluyen la regulación de fagocitos mononucleares. IL-12 e IL-6, actúan en la inmunidad específica, IL-12 es uno de los mediadores fundamentales de la diferenciación Th<sub>1</sub>, procede de manera típica de macrófagos o células dendríticas activadas, mientras que IL-6 es un factor autócrino de linfocitos B y está relacionado en la producción de plaquetas, aunque también IL-6 puede inhibir la síntesis de IL-1 y TNF; su acción fundamental es en la regulación del mecanismo de la inflamación (Borish *et al* 2003).

El daño tisular que infligen una herida o un microorganismo patógeno invasor induce una compleja secuencia de fenómenos que se conoce en conjunto como respuesta inflamatoria (Goldsby *et al*, 2004). El resultado final de la inflamación puede ser la inducción de una respuesta inmunitaria específica a la invasión o eliminación del invasor por componentes del sistema inmunitario innato. La inflamación consiste principalmente en una vasodilatación (aumento del diámetro de los vasos sanguíneos) de capilares cercanos a la infección; además de la contracción de vasos que eliminan sangre del área afectada originando una ingurgitación de la red capilar lo cual propicia el enrojecimiento del tejido y elevación de la temperatura de la piel. También existe un aumento en la permeabilidad capilar lo cual facilita la afluencia de células. Las células que actúan en el proceso inflamatorio tienen la actividad enzimática suficiente para elaborar leucotrienos, histamina y otros mediadores, particularmente los mastocitos, basófilos, neutrófilos, y macrófagos. Una vez que ocurre el proceso de inflamación comienza el reclutamiento de macrófagos, estos macrófagos son células activadas que

muestran el incremento de la fagocitosis y de la liberación de mediadores y citocinas que contribuyen a la inflamación (Abbas *et al* 2003). Los macrófagos tisulares activados secretan tres citocinas principalmente IL-1, IL-6 y TNF- $\alpha$  que inducen muchos de los cambios antes mencionados. Tanto TNF- $\alpha$  como IL-1 inducen aumento de la expresión de moléculas de adherencia endoteliales; particularmente TNF- $\alpha$  estimula la expresión de selectina E, una molécula de adherencia endotelial que participa en la fijación selectiva de las diversas moléculas de adherencia a los neutrófilos. La IL-1 ocasiona aumento de la expresión de ICAM-1 y VCAM-1, que se fijan a las integrinas situadas sobre los linfocitos y monocitos. Tanto TNF $\alpha$  como IL-1 activan macrófagos y neutrófilos, promoviendo su actividad fagocítica y la liberación de enzimas líticas hacia los espacios tisulares. La respuesta inflamatoria es beneficiosa cuando las monocinas se producen en cantidad adecuada; pero deletérea y fatal si se producen en exceso, las citocinas más tóxicas son IL-1 y TNF las cuales son las principales mediadoras de la respuesta aguda inflamatoria generalizada, característica del choque séptico y la falla multisistémica orgánica (Cohen J. 2002).

## **Antecedentes**

Durante la búsqueda de inmunopotenciadores se han encontrado diversas sustancias de acción específica e inespecífica tales como lipopolisacáridos bacterianos, sales de aluminio, citocinas, lectinas, adyuvantes genéticos y las toxinas de las bacterias. Dentro de las toxinas más estudiadas y que son utilizadas como adyuvantes de mucosas se encuentran la toxina del cólera (CT) de *Vibrio cholerae* y la enterotoxina termolábil (LT) de *Escherichia coli* (Williams *et al.*, 1999). CT y LT tienen efectos adyuvantes en las respuestas sistémicas y mucosas cuando se coadministran o se conjugan con proteínas solubles que no son inmunogénicas en mucosas (Wilson *et al.*,

1989; Kalambaheti *et al*, 1998; Tochikubo *et al*, 1998; Johansson *et al*, 1998); no obstante, su aplicación en humanos no es factible por su toxicidad (McGhee *et al*, 1999). Para resolver este problema se han diseñado mutantes no tóxicas que conserven su adyuvanticidad, como LT-G192, LT-K63 y LT-R72 (Douce *et al*, 1999; Ryan *et a.*, 1999). Sin embargo, su eficacia no ha sido probada aún en humanos. De lo anterior resalta la importancia de estudiar nuevos adyuvantes mucosos, que no sean tóxicos para humanos, que sean estables y de bajo costo, y que puedan aplicarse por vías mucosas. Recientes estudios han demostrado que la protoxina Cry1Ac reúne estas características, ya que las propiedades bioquímicas de las proteínas Cry son muy peculiares, presentan alta resistencia a proteólisis, son estables y solubles en pH alcalino. Al mismo tiempo son específicas para los insectos, no son tóxicas en vertebrados y sus costos de producción son bajos (Höfte y Whiteley 1989, McClintock *et al* 1995).

Además en reportes previos nuestro grupo demostró que la protoxina Cry1Ac de *Bacillus thuringiensis* es un potente inmunógeno (Vázquez-Padrón *et al* 1999<sup>a</sup>, Moreno-Fierros *et al* 2000, 2002,) y adyuvante mucosal (Vázquez-Padrón *et al* 1999b, Moreno-Fierros *et al* 2003).

*Bacillus thuringiensis* (*Bt*) es una bacteria Gram-positiva, aerobia estricta, morfológicamente relacionada con *Bacillus cereus* y *Bacillus anthracis*. *Bt* es considerada una bacteria cosmopolita ya que se ha aislado de todas partes del mundo y de muy diversos sistemas como suelo, agua, hojas de plantas, insectos muertos, telarañas, etc. A *Bt* se le diferencia de *B. cereus* y *B. anthracis* por contener un cuerpo paraesporal conocido como cristal, el cual es de naturaleza proteica y tiene propiedades insecticidas. Este cristal esta constituido por proteínas denominadas  $\delta$ -endotoxinas también conocidas como proteínas Cyt y Cry. Las Cry  $\delta$ -endotoxinas tiene 89 miembros

conocidos; los cuales tienen una masa molecular de 60-70 kDa en su forma activa y su estructura comprende tres dominios globulares (Derbyshire *et al* 2001). Las toxinas cristalinas están clasificadas sobre la base de una secuencia homóloga a un aminoácido, donde cada protoxina adquiere un nombre consistente al prefijo Cry, seguido de 4 rangos jerárquicos que consisten en números, mayúsculas, minúsculas y números, dependiendo de su lugar en un árbol filogenético (Maagd *et al* 2001).

Se ha demostrado que la forma cristalina y soluble de la protoxina Cry1Ac cuando son administrados por vía intraperitoneal e intragástrica inducen altas respuestas sistémicas, y sólo la forma soluble de Cry1Ac induce respuestas mucosales vía intragástrica. Se encontró que la respuesta de anticuerpos séricos inducida con Cry1Ac fue más alta que la inducida por CT. La protoxina Cry1Ac induce además altos niveles de IgG en fluidos intestinales. Estos resultados indicaron que Cry1Ac es un potente inmunógeno sistémico y de mucosas (Vázquez-Padrón *et al* 1999). En estudios posteriores se demostró que la proteína Cry1Ac también induce altas respuestas de anticuerpos por las vías intranasal [i.n.] y rectal [r] (Moreno-Fierros *et al* 2000). Además se evaluaron los efectos adyuvantes de la protoxina Cry1Ac en la respuesta de anticuerpos hacia diferentes antígenos de diferente naturaleza (proteínas y polisacáridos), encontrando efectos adyuvantes en la respuesta de anticuerpos hacia el antígeno de superficie de hepatitis B (Vázquez-Padrón *et al* 1999<sup>a</sup>), péptidos de VIH (Esquivel y Moreno-Fierros 2005) y polisacáridos de neumococos (Moreno-Fierros *et al* 2003). También se ha evaluado el potencial de esta proteína como acarreador vacunal de un polisacárido capsular 6B (Moreno-Fierros *et al* 2003) y de un epítipo de la toxina diftérica (Guerrero *et al* 2004, Guerrero y Moreno-Fierros 2007). Por otra parte, se encontró que la administración de Cry1Ac vía i.n. induce la activación de linfocitos nasales, mayoritariamente linfocitos B y T CD4.

Importantemente usando un modelo murino de meningoencefalitis amibiana primaria encontramos que la protoxina Cry1Ac como adyuvante incrementa considerablemente la protección ante la infección por *Naegleria fowleri*, además, observamos que la administración de la proteína Cry1Ac sola también confiere protección en este modelo de infección sugiriendo que esta proteína tiene la capacidad de activar la respuesta inmune innata. Por lo tanto en este proyecto consideramos importante evaluar si la protoxina Cry1Ac tenía la capacidad de activar macrófagos ya que uno de los mecanismos por el que otras moléculas de origen microbiano ejercen su actividad adyuvante es induciendo la expresión de moléculas coestimuladoras en células presentadoras de antígeno (Bromader 1991, Cox and Coulter 2001).

## **Planteamiento del problema**

La protoxina Cry1Ac recombinante clonada a partir de *Bacillus thuringiensis* es altamente inmunogénica y posee efectos adyuvantes tan potentes como los de la toxina del cólera tanto a nivel mucoso como sistémico (Vázquez *et al* 1999 y Moreno-Fierros *et al* 2000, 2002, 2003). Sin embargo se desconoce el mecanismo por el que ejerce su actividad adyuvante, debido a que el mecanismo por el que actúan muchas moléculas microbianas que tienen actividad adyuvante es activando a las APC's tales como linfocitos B, células dendríticas y macrófagos. En este trabajo se planteó determinar si la protoxina Cry1Ac tenía la capacidad de activar macrófagos.

## **Hipótesis**

La proteína Cry1Ac ejerce su actividad inmunomoduladora activando células presentadoras de antígeno tales como macrófagos vía el aumento de moléculas coestimuladoras y citocinas proinflamatorias.

## **Objetivo general**

Determinar si la protoxina Cry1Ac es capaz de activar macrófagos induciendo la producción de citocinas proinflamatorias (IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-12p70, MCP-1, IL-6, e IL-10.), y la expresión de moléculas coestimuladoras CD80 y CD86.

## **Objetivos particulares**

1. Determinar si la protoxina Cry1Ac induce la producción de moléculas coestimuladoras CD80 y CD86 de macrófagos de peritoneo, bazo, ganglio mesentérico, pulmón y de lavados traqueoalveolares a diferentes tiempos *in vivo*

2. Determinar si la protoxina Cry1Ac induce la producción de moléculas coestimuladoras CD80 y CD86 de macrófagos de peritoneo, bazo, ganglio mesentérico, pulmón y de lavados traqueoalveolares a diferentes tiempos *in vitro*

3. Determinar si la protoxina Cry1Ac induce la producción de citocinas proinflamatorias IL-1, IL-10, IL-12, TNF $\alpha$ , e IFN $\gamma$  de los ensayos *in vivo* e *in vitro*.

## **Materiales y métodos**

### *Efectos inmunomoduladores de Cry1Ac en Macrófagos.*

Para determinar si Cry1Ac era capaz de activar macrófagos y determinar si tiene efectos moduladores en la inmunidad innata se analizó la expresión de moléculas coestimuladoras y citocinas proinflamatorias. La estrategia experimental en resumen fue la siguiente: Se analizó por citometría de flujo si la protoxina Cry1Ac inducía la expresión de moléculas coestimuladoras CD80 y CD86 en macrófagos aislados de diferentes sitios, a diferentes tiempos después de la administración *in vivo* con una dosis de protoxina por la vía intraperitoneal (peritoneo, bazo, ganglio mesentérico), o por la vía intranasal (pulmón y de lavados traqueoalveolares); así como después de la estimulación *in vitro* en macrófagos aislados de los diferentes sitios de animales no inmunizados. Se determinó también si la protoxina Cry1Ac inducía la producción de citocinas proinflamatorias IL-1, IL-10, IL-12, TNF $\alpha$ , e IFN $\gamma$  en macrófagos estimulados *in vivo* e *in vitro*.

### *Obtención y purificación de la protoxina pCry1Ac*

Se utilizó la cepa recombinante de *E. coli*. Las bacterias se cultivaron en medio Luria Broth (USBiological Swampscott, MA 01907) y se adicionó ampicilina (100  $\mu$ g/ml). Posteriormente se incubó a 37° C por 48 hrs. a 300 rpm en agitación constante. Para la cosecha de las bacterias se centrifugó a 10000 rpm. a 4°C por 15 minutos y se lavaron dos veces con amortiguador TE (Tris-HCl 0.05M, EDTA 1mM, pH 8.0). Posteriormente se lisaron las bacterias incubándolas a 37°C durante 1 hora con 20 mg/ml de lisozima+ sacarosa al 15% para posteriormente sonicarlas durante 5 ciclos de 5 min. cada uno, a una amplitud de 100 Hz. Los cuerpos de inclusión se recuperaron por centrifugado a 10000 rpm a 4°C por 10 minutos, al termino la pastilla se lavó cinco veces con 50 ml de NaCl 0.5M más Triton X-100 al 1% sonicando entre cada lavado. Posteriormente se

realizó otra centrifugación bajo las mismas condiciones para resuspender la pastilla en 30 ml de agua bidestilada a 4°C. Una vez más se centrifugó a 10000 rpm por 15' a 4°C y se solubilizó la pastilla en 10 ml de amortiguador de carbonatos ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0.1M,  $\text{NaHCO}_3$  0.1M, pH 9.6 más 10mM de DTT) por 30 minutos a 37°C en agitación a 300 rpm. La pCry1Ac solubilizada se obtiene por centrifugación a 10000 rpm 4°C por 15 minutos, recuperando el sobrenadante. Los restos de endotoxina se eliminaron purificando la proteína por una columna de Polimixina (BioRad Lab, CA) y se verificó la ausencia de LPS mediante la prueba de E-Toxate. Finalmente la concentración de proteína se determinó por el método de Bradford y la pureza mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS- PAGE).

### *Animales*

Para los ensayos se utilizaron ratones hembras de la cepa Balb/c de entre 8 y 10 semanas proporcionados por el bioterio de la FES Iztacala, a los cuales se le administró una dosis de 5  $\mu\text{g}$ . de la protoxina Cry1ac por dos vías la intranasal (i.n.) y la intraperitoneal (i.p) y sacrificados a diferentes tiempos (24, 48, 72 y 96 hrs.). Como control positivo se utilizó LPS a dosis de 1mg/kg del ratón por ambas vías (dosis que no causa choque séptico). Después de la inmunización se aislaron los macrófagos de los diferentes tejidos dependiendo de la vía de administración: i.p. se aislaron bazo, ganglio mesentérico y células peritoneales; i.n. se aisló pulmón y de lavados traqueoalveolares. Se analizaron por citometría de flujo la expresión de moléculas coestimuladoras CD80 y CD86 utilizando Ab acoplados a fluorocromos. Y se analizó la expresión de citocinas proinflamatorias IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-12p70, MCP-1, IL-6, e IL-10 con el Kit CBA de Pharmigen.

### *Aislamiento y cultivo de macrófagos de la cavidad peritoneal*

Los ratones se sacrificaron por dislocación cervical, para después ser desinfectados en la zona del abdomen con etanol al 70%, inmediatamente se inyectaron 5 ml. de PBS estéril frío y se dispuso a masajear la zona del peritoneo aproximadamente por 5 min. Esto con la finalidad de que las células peritoneales se despegaran. La solución incorporada se obtuvo realizando una pequeña incisión lo suficientemente grande para que penetrase una pipeta Pasteur por debajo del esternón cuidando de no perforar los intestinos para no contaminar la muestra. El líquido recuperado se colocó en tubos cónicos de 15 ml. para después centrifugarlos a 1500 rpm por 10 min. a 4<sup>o</sup> C; se resuspendieron en ACK lysing buffer (Cloruro de amonio y Tris Base) durante 10 min. a T. A. y resuspendidos en RPMI 1640 con 5% de FCS. Se tomaron 10 µl. de la muestra y se le añadieron 80 µl. de RPMI 1640 y 10 µl de azul Tripán para verificar la viabilidad de células.

### *Aislamiento de macrófagos de Bazo y ganglio mesentérico*

Se retiró el bazo y el ganglio mesentérico, se maceraron con émbolo de plástico y fueron filtrados por organza al cual se le agregaron 8 ml de RPMI 1640 con 5% de FCS y colocados en un tubo cónico de 15 ml para después ser centrifugados a 1500 rpm por 5 min. a 4 ° C. La pastilla fue resuspendida en 8 ml de RPMI 1640 con 5% de FCS y centrifugados a 1500 rpm por 5' a 4 ° C. Posteriormente fueron resuspendidas las pastillas con 2 ml de RPMI 1640 con 5% de FCS. Se tomaron 10 µl. de la muestra y se le añadieron 80 µl. de RPMI 1640 y 10 µl de azul Tripán para la viabilidad de células.

### *Aislamiento de macrófagos de pulmón*

Para la obtención de macrófagos de pulmón se retiraron los pulmones del ratón y se le inyectaron 3 ml de solución salina estéril tibia por el ventrículo derecho del corazón con la finalidad de perfundir el pulmón y retirar los excesos de sangre, una vez hecho esto se disgregó el pulmón con el mismo procedimiento del bazo y el ganglio mesentérico.

### *Aislamiento de macrófagos traqueoalveolares*

Para la obtención de macrófagos traqueoalveolares se retiraron los pulmones con la tráquea a la cual se le hizo pasar una cánula y se le inyectaron 2 ml de PBS frío estéril y se recuperó esta solución en una caja Petri. Después fue centrifugada a 1500 rpm a 4 ° C por 10 min. La pastilla fue resuspendida en 8 ml de RPMI 1640 con 5% de FCS y centrifugados a 1500 rpm por 5' a 4 ° C. Posteriormente fueron resuspendidas las pastillas con 2 ml de RPMI 1640 con 5% de FCS.

Conteo de células. Se tomaron 10 µl. de la suspensión de muestra celular y se le añadieron 80 µl. de RPMI 1640 y 10 µl. de azul Tripan para exclusión de células.

### *Cultivo de macrófagos*

Para el cultivo de macrófagos de los diferentes tejidos se ajustó la suspensión a  $1.5 \times 10^6$  células/ml y se cultivaron en placas de 6 pozos con medio completo de RPMI suplementado con FCS 10%, 2mM de L-Glutamina, 20 mM de HEPES, 5 mM de 2-β mercaptoetanol, y 1% de aminoácidos esenciales (todo de Gibco RBL, NY 14072) por dos horas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> para que se adhieran los macrófagos a la placa. Pasado este lapso se desecharon las células no adherentes de la placa mediante lavados

vigorrosos con PBS-EDTA 10mM frío tres veces, y se comprobó la viabilidad nuevamente mediante exclusión de células con azul Tripan. Para la recuperación de las células adheridas las placas se lavaron tres veces con PBS-EDTA 10 mM frío las células recuperadas se centrifugaron a 1500 rpm 4°C por 5 min. y se prepararon para la tinción para citometría.

#### *Tinción de superficie para citometría de macrófagos aislados*

Las células aisladas se centrifugaron a 1500 rpm por 5 min. a 4°C, una vez centrifugados se decantaron y se les agregó 10 µl de la solución de los siguientes anticuerpos: CD86 FITC, CD80 Cy5PE y CD11BCy5 (todos de eBioscience) se resuspendieron y incubaron 30 min. a 4°C en oscuridad, pasado este lapso se les agregaron 500 µl de PBA para posteriormente centrifugarlos a 1500 rpm a 4°C por 7 min. Una vez hecho esto el sobrenadante fue decantado y se le agregaron 300 µl de paraformaldehído 1% y se resuspendió la pastilla, la solución se colocó en tubos de FACS y se adicionaron 150 µl de paraformaldehído 1% para leer en el citómetro de flujo FACScalibur adquiriendo los datos con el software BD CellQuest .

#### *Análisis de citocinas*

Para el análisis de las citocinas in vivo se utilizaron sueros de ratones control, inoculados con LPS (1mg/kg del peso del ratón) y con Cry1Ac (5 mg) a los diferentes tiempos, después se extrajo la sangre por la vena caudal y fue centrifugada para obtener el plasma a 10000 rpm por 10 min. Para obtener las citocinas de los macrófagos de los diferentes tejidos *in vitro* se utilizaron los cultivos previamente descritos, a los cuales a cada pozo se le agregó 0.5 µg/ml de LPS; y 0.5 µg/ml de pCry1Ac también a cada pozo. Se dejó incubar 24 hrs. a 37° C con 5% de CO<sub>2</sub> para después recuperar el sobrenadante

y realizar el análisis de citocinas. Para el análisis de citocinas *in vivo* e *in vitro* de las siguientes citocinas: IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-12p70, MCP-1(CCL2) , IL-6, e IL-10; se utilizó el BD CBA Mouse Inflammation Kit (BD Biosciences Pharmingen San Diego, CA), se mezcló 25  $\mu$ l de muestras con 25  $\mu$ l de las perlas que contienen cada una de las citocinas mas 25  $\mu$ l de agente de detección PE y se incubó por dos horas a temperatura ambiente, pasado este lapso se centrifugó a 1500 rpm por 5 min a 4° C, las pastilla se resuspendió con 300  $\mu$ l de Wash buffer 1x y se leyeron las muestras en el citómetro de flujo FACScalibur usando el CB BDA Software.

#### Análisis estadístico

Los datos obtenidos en la citometría de flujo fueron analizados por el software WinMidi 2.8 y por el software CBA Cell Quest. El análisis estadístico empleado fue al Anova del graphPad 5.0

## Resultados

Para determinar si uno de los efectos por el cual la proteína Cry1Ac ejerce su actividad inmunomoduladora es aumentando la expresión de moléculas coestimuladoras, se analizó la expresión de B7-1(CD80) y B7-2(CD86), que es la vía de coestimulación mejor estudiada.

### *Efecto in vivo de Cry1Ac y LPS en la expresión de CD80 y CD86 en macrófagos.*

Para analizar el efecto in vivo en macrófagos de diferentes tejidos, se inocularon por dos vías la i.p. o la i.n. ratones Balb/c aplicando una dosis de 5µg/µl de proteína y como control positivo se aplicó LPS (en una dosis de 5µg/µl la cual no induce shock séptico). A diferentes tiempos se sacrificaron los animales se extrajeron los tejidos a analizar dependiendo de la vía de estimulación; para la estimulación i.p. se extrajeron bazo, ganglio mesentérico y células peritoneales; para la i.n. se extrajeron pulmón y células obtenidas de lavados bronquiales. Las células obtenidas se tiñeron anticuerpos anti CD80 y CD86 y con un marcador para macrófagos el cual fue CD11b Cy5 (aunque no es exclusivo de macrófagos, marca a la mayoría de las poblaciones), y se realizó el análisis por citometría de las poblaciones que presentaran este marcador.

Los resultados de los efectos de la aplicación intraperitoneal de Cry1Ac y LPS en la activación de macrófagos se muestran en las Fig. 1, 2 y 3. En la Fig. 1 Después de la inoculación de los tratamientos vía i. p. con LPS y Cry1Ac se puede apreciar que a las 24 hrs. existe incremento de la expresión de CD80 en el sitio de inoculación, a las 48 hrs la expresión desciende continuamente hasta las 72 hrs., después vuelve a incrementarse a las 96 hrs se refleja mayoritariamente con Cry1Ac mientras que con LPS es menor la cantidad de macrófagos que expresan CD80, caso similar se presenta para CD86 aunque a las 24 hrs. existe un incremento en la expresión de moléculas

coestimuladoras es hasta las 48 hrs. donde esta expresión aumenta mayoritariamente para descender, en el caso de Cry1Ac a comparación de LPS decrece un poco más a las 72 hrs.; mientras que a las 96 hrs. ocurre de nueva cuenta un incremento en la expresión de estas molécula.

A las 24, 48, 72 y 96 hrs. de aplicado el estímulo se aprecia que ambos tratamientos provocan un marcado incremento en la proporción de macrófagos que expresan CD80 y CD86. El efecto de Cry1Ac y LPS en la expresión de moléculas coestimuladoras en peritoneo es similar ( $p>0.1$ ) mientras que es significativo con respecto al control ( $p<0.5$ ).

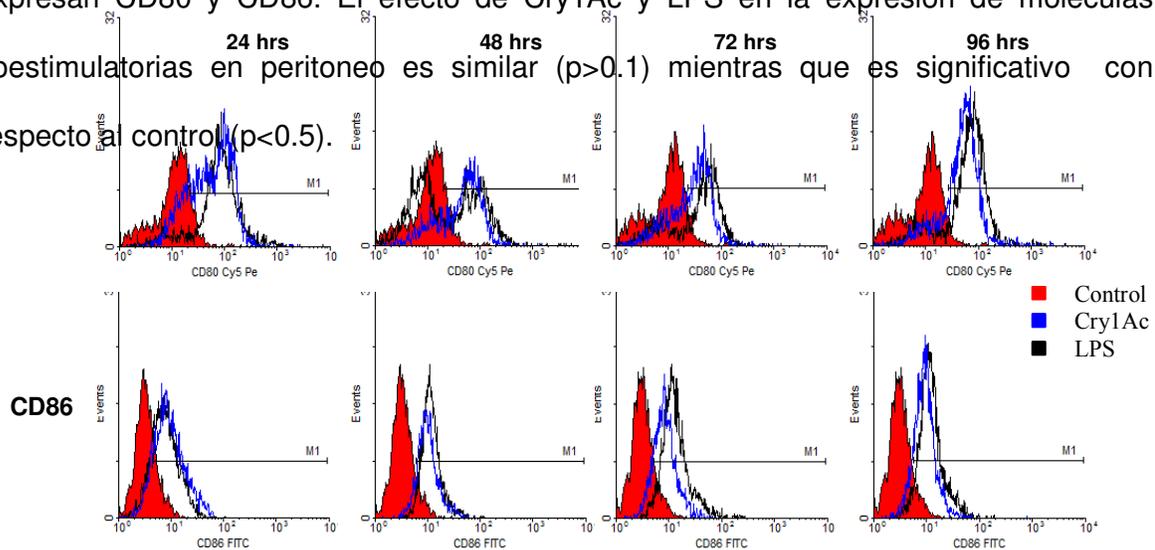


Fig.1.Efecto de la administración i.p. de la proteína Cry1Ac y LPS, en la expresión de moléculas coestimuladoras CD80 y CD86 en macrófagos de peritoneo. Se muestra la expresión a diferentes tiempos: 24; 48; 72.; y 96 hrs., se indica el porcentaje obtenido al comparar entre tratamientos.

		0	24	48	72	96
CD80	Cry1Ac	54.1±90	85.3 ±3.21	86.02 ±1.03	63.22 ±4.65	82.15 ±4.98
	LPS	54.1±90	91.16 ±8.43	86.01 ±2.3	68.1 ±5.98	83.18 ±3.89
CD86	Cry1Ac	22.3±59	59.00 ±2.31	85.44 ±4.53	85.67 ±6.93	90.65 ±8.32
	LPS	22.3±59	58.89 ±4.5	86.7 ±2.75	93.73 ±1.23	93.01 ±6.98

Dado que el peritoneo es un sitio efector de la respuesta inmune se decidió analizar uno de los sitios inductores más próximos a este, tal es el caso del bazo y el ganglio mesentérico.

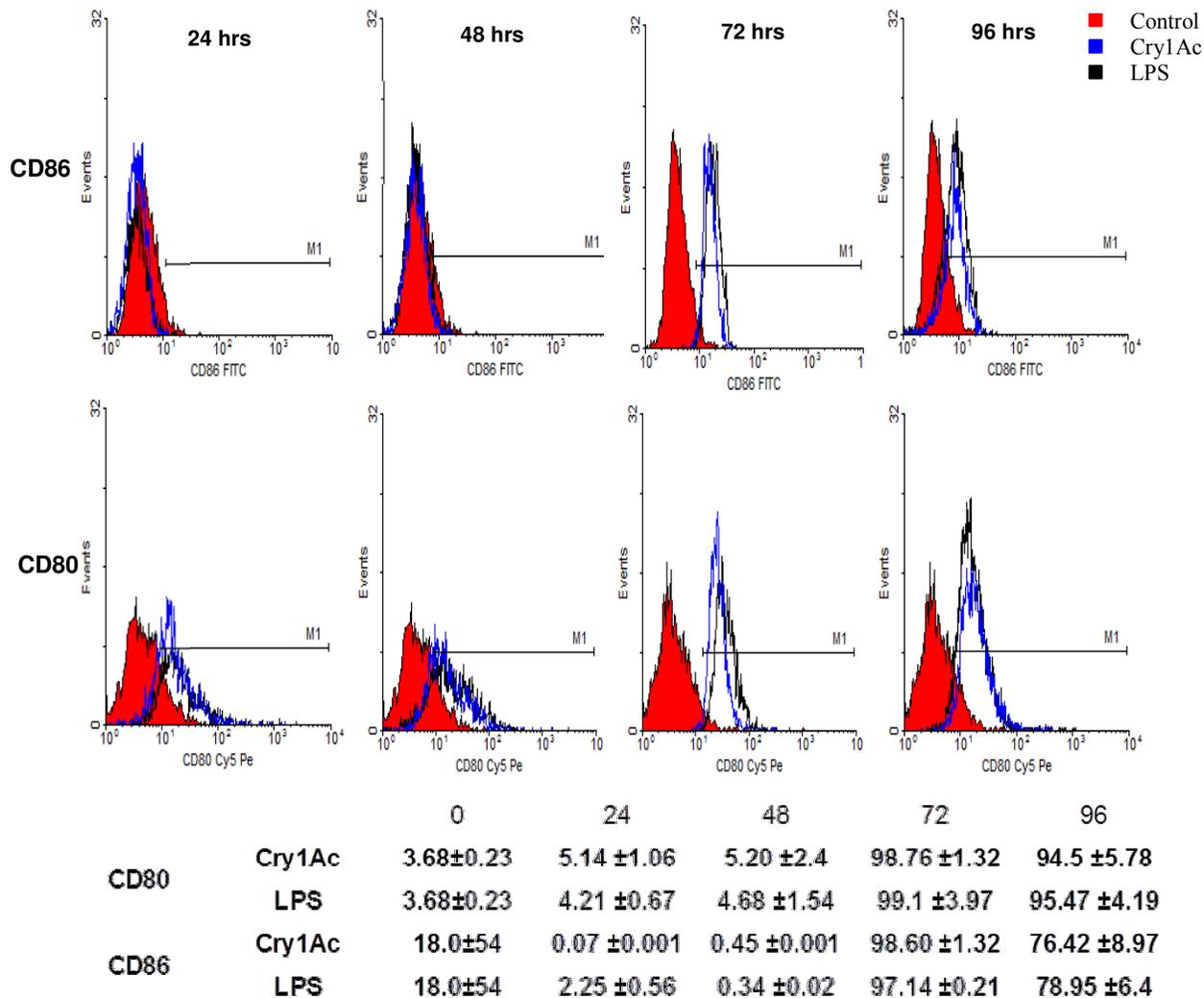


Fig. 2. Efecto de la administración i.p. de la proteína Cry1Ac y LPS, en la expresión de moléculas coestimuladoras CD80 y CD86 en macrófagos de bazo. Se muestra la expresión a diferentes tiempos: 24; 48; 72.; y 96 hrs. se indica el porcentaje obtenido al comparar entre tratamientos.

En la fig. 2 la molécula coestimuladora CD86, a las 24 hrs. de realizado el estímulo muestra que la respuesta inmune es inclusive menor a la generada por el control, sin embargo, esta va incrementando conforme aumentan el tiempo de inoculación del



estímulo con ambos tratamientos, haciéndose notorio que a las 72 hrs. de estímulo presentó la mayor expresión de CD86 la cual decrece hasta las 96 hrs. caso similar ocurre con CD80 que en las primeras horas del estímulo existe un menor incremento en la expresión de CD80, sin embargo esta aumenta en mayor cantidad a las 72 hrs., para ambos tratamientos y después empieza a decaer la actividad a las 96 hrs. del estímulo. De los tiempos analizados, el efecto de Cry1Ac en la expresión de las moléculas coestimuladoras B7.1 y B7.2 en macrófagos de bazo, fue similar al inducido por LPS, excepto a las 72 hrs. tiempo en que la expresión de CD80 inducida por LPS fue mayor.

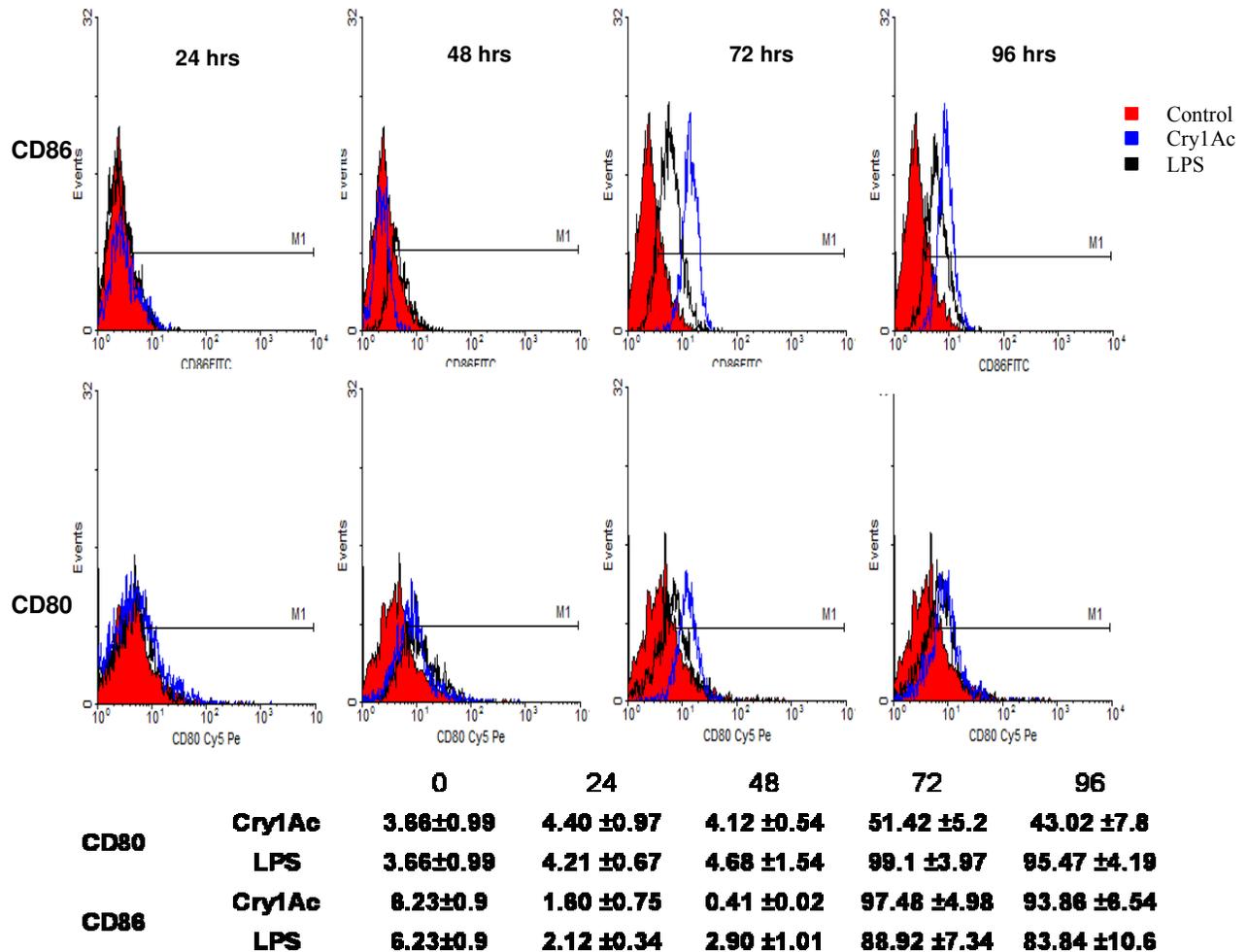


Fig. 3. Efecto de la administración i.p. de la proteína Cry1Ac y LPS, en la expresión de moléculas coestimuladoras CD80 y CD86 en macrófagos de ganglio mesentérico. Se muestra la expresión a diferentes tiempos: 24; 48; 72.; y 96 hrs. se indica el porcentaje obtenido al comparar entre tratamientos.

Los ganglios linfáticos más próximos al peritoneo que se analizaron fue el ganglio mesentérico. Los resultados obtenidos se muestran en la Fig. 3, la molécula coestimuladora CD86 para ambos tratamientos a las 24 hrs no presentó expresión relevante en comparación con el control negativo. A las 48 hrs se empieza a notar un incremento en la actividad de CD86 con LPS mientras que con Cry1Ac no hay aumento en la expresión; sin embargo a las 72 hrs del inóculo aumenta de manera considerable la expresión de B7-2 incluso esta expresión es mayor que la que genera LPS. Ambos tratamientos empiezan a disminuir la expresión de moléculas coestimuladoras a las 96 hrs. para CD86. La expresión de la molécula B7-1 a las 24 y 48 hrs. no presentó una expresión significativa para ambos tratamientos con respecto al control, después de las 72 hrs., la proteína Cry1Ac con respecto al LPS y el control mostró un incremento en mayor proporción la expresión de CD80; y ambos tratamientos comenzaron a disminuir la expresión de B7-1 a las 96 hrs. Los resultados de la fig. 3 muestran que en comparación con el peritoneo y bazo, en general en este órgano se detectó una menor proporción de macrófagos que presentaron expresión de moléculas coestimuladoras por efecto de la aplicación LPS y Cry1Ac. Además en este órgano se observaron diferencias entre los efectos de Cry1Ac y LPS. Dado que los efectos de un inmunomodulador en las poblaciones de células de los diferentes tejidos varían dependiendo de la ruta de aplicación, se midió la respuesta de la vía i.n., analizando macrófagos de pulmón y traquealveolares. Se encontró que el efecto de la aplicación intranasal de Cry1Ac y LPS en la expresión de CD80 y CD86 fue diferente en los macrófagos de pulmón con respecto a los alveolares, además se observaron diferencias en el efecto que tuvieron ambos antígenos.

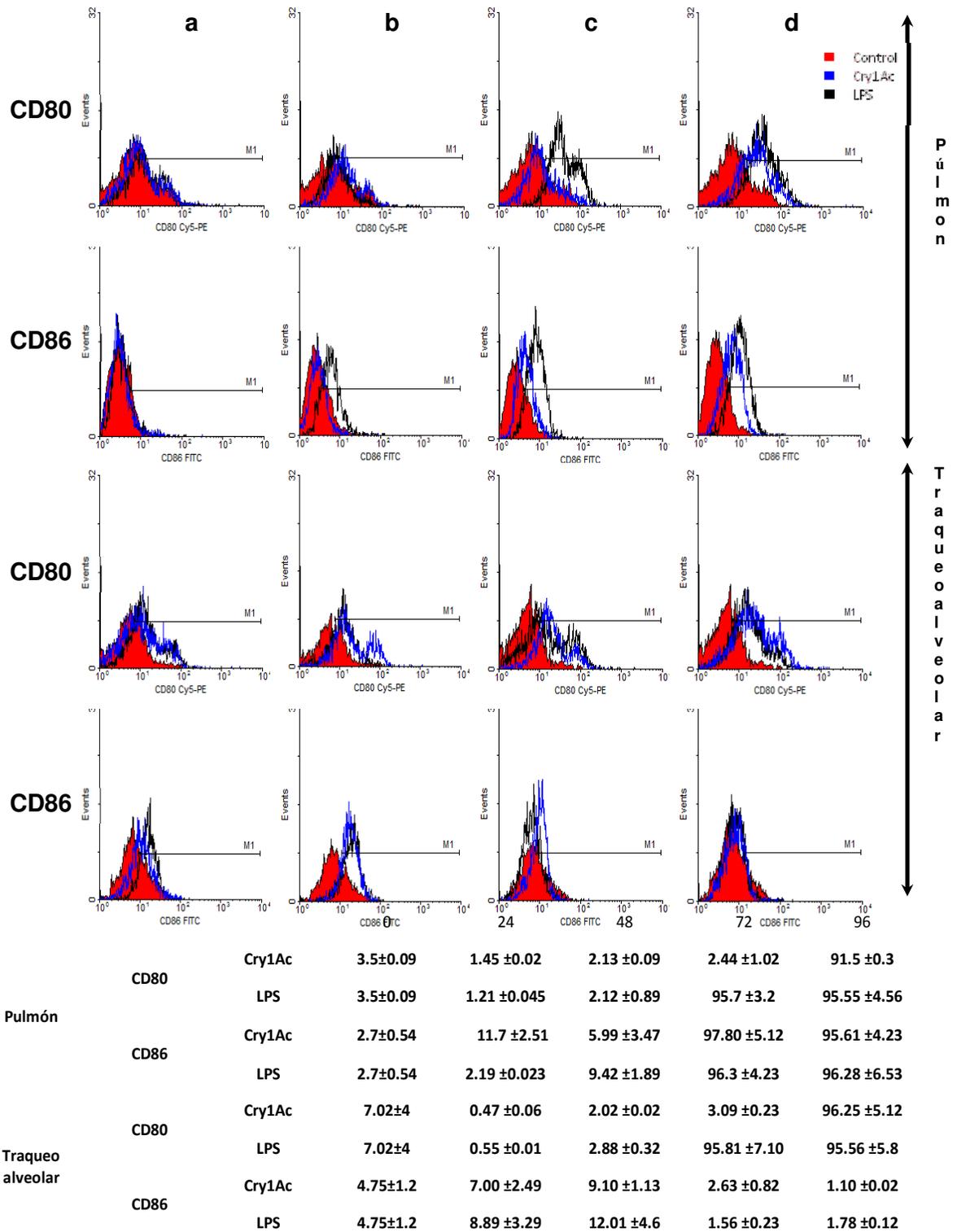


Fig. 4. Efecto de la administración i.n. de la proteína Cry1Ac y LPS, en la expresión de moléculas coestimuladoras CD80 y CD86 en macrófagos lavados traqueoalveolares y de pulmonares. Se muestra la expresión a diferentes tiempos: a) 24 hrs.; b) 48 hrs.; c) 72 hrs.; y d) 96 hrs., se indica el porcentaje obtenido al comparar entre tratamientos.

En la Fig. 4 se muestra que en macrófagos de pulmón que la expresión de CD80 a las 24 y 48 hrs. después del estímulo no se encuentran diferencias con respecto al estado basal de esta células, a las 72 hrs. hay un claro aumento en la expresión de B7-1 mediada por LPS mientras que Cry1Ac se mantienen de igual manera que el control negativo. Sin embargo, para las 96 hrs. después del estímulo aumenta la expresión de CD80 mediada por Cry1Ac mientras que la de LPS se mantiene. Mientras que CD86 a las 24 hrs. no presenta ningún aumento en la expresión de ninguno de los dos tratamientos, a las 48 hrs aumenta la actividad mediada por LPS, aunque a las 96 hrs. se aprecia como la expresión aumenta mayoritariamente para LPS que para Cry1Ac, esta última presentó un notorio aumento a las 96 hrs. y el control positivo se mantuvo en el mismo nivel de expresión.

De la población de macrófagos traqueoalveolares el análisis de la expresión de CD80 mostró que a las 24 y 48 hrs. para ambos tratamientos no se observa un incremento significativo de esta molécula; a las 72 horas del tratamiento ambos empiezan a incrementar la actividad de B7-1 y B7-2, ya para el último tiempo estudiado tanto LPS y Cry1Ac muestran el mayor incremento en la respuesta de esta molécula. En la expresión de B7-2 para estos dos tratamientos al tiempo 1 LPS presenta un aumento discreto con respecto al control, a las 48 hrs. después de la inoculación se muestra el tiempo que registra mayor expresión de los otros tres tiempos ya que después de estas 48 hrs. empiezan a descender la expresión hasta regresar al estado basal a las 96 hrs.

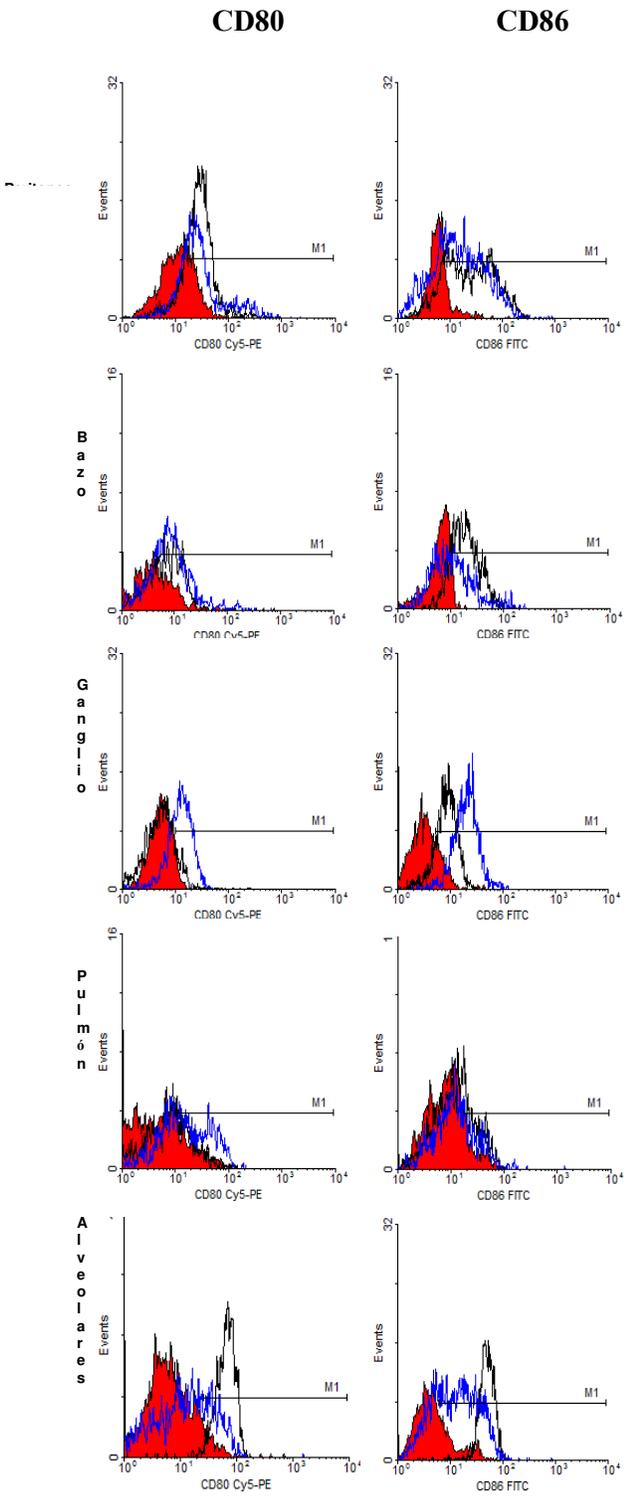
También se midieron los niveles de citocinas proinflamatorias en suero ya que el aumento de moléculas coestimuladoras está correlacionado con el aumento de la expresión de citocinas, sin embargo estos niveles de concentración fueron muy bajos y se aprecia que LPS induce un incremento a las 24 horas de TNF e IFN, mientras que Cry1Ac produce un incremento de IFN y MCP-1 a las 24 hrs. También se apreció que

LPS induce un incremento a las 24 horas de IL-6, mientras que Cry1Ac indujo un incremento de IL-6 a las 72 hrs. (datos no mostrados).

*Efecto in vivo de Cry1Ac y LPS en la expresión de CD80 y CD86 en macrófagos.*

Para demostrar los efectos de la proteína Cry1Ac en la modulación de moléculas coestimuladoras exclusivamente sobre macrófagos se procedió a realizar un análisis *in vitro*. Los macrófagos se aislaron y purificaron de los tejidos analizados y se estimularon con 0.5 µg/ml de la proteína Cry1Ac o LPS dejando incubar por 24 horas para su análisis, para así evitar las interacciones con otras células que pueden disminuir o intensificar la respuesta.

En la fig. 5 se muestran los resultados que se obtuvieron después del estímulo *in vitro*, donde se puede apreciar que tanto Cry1Ac y LPS actuaron preferentemente sobre la expresión de CD86, y las células del tejido que mostraron mayor expresión son las del bazo (Cry1Ac  $94.32 \pm 0.3185$  y LPS  $93.28 \pm 1.094$ ). Para CD80 el tejido que presenta un mayor incremento en la expresión de esta molécula fue el peritoneo por efecto de la proteína Cry1Ac ( $18.76 \pm 1.037$ ) y para LPS los macrófagos obtenidos de lavados traqueoalveolares ( $90.413 \pm 0.485$ ). Dado que en los resultados se muestra que Cry1Ac indujo un claro aumento en la expresión de moléculas coestimuladoras en macrófagos, y se sabe que estas moléculas son importantes para la inducción de una respuesta inmune, la cual está ligada a la expresión de citocinas proinflamatorias por parte del macrófago; se analizó el sobrenadante de los cultivos *in vitro* para corroborar si la protoxina Cry1Ac inducía las siguientes citocinas IL-6, IL-10, IL-12p70, IFN, TNF, y MCP-1 por su importancia en la respuesta inflamatoria.



	CD80	
	Cry1Ac(azul)	LPS(negro)
<b>Peritoneo</b>	18.76±1.037	18.89±4.53
<b>Bazo</b>	6.39±1.194	4.510±8358
<b>Ganglio mesentérico</b>	3.180±0.34	11.92±1.02
<b>Pulmón</b>	6.520±1.520	5.160±0.052
<b>Traqueoalveolar</b>	6.473±0.4303	90.413±0.485
	CD86	
<b>Peritoneo</b>	80.74±4.442	81.68±0.9329
<b>Bazo</b>	94.32±0.3185	93.28±1.094
<b>Ganglio mesentérico</b>	82.74±1.175	87.02±1.635
<b>Pulmón</b>	3.845±0.395	5.38±0.53
<b>Traqueoalveolar</b>	80.99±1.975	85.88±1.635

Fig. 5. Histogramas (derecha) de la expresión de CD80 y CD 86 en cultivos de macrófagos in vitro. Se muestra un incremento después de la estimulación con los dos tratamientos después de 24 hrs. El incremento es mas significativo en el ganglio mesentérico para la proteína Cry1Ac, como se muestra en la tabla (arriba), también el bazo y los macrófagos de lavados bronquiales presentan un incremento significativo para los dos tratamientos con respecto al control para la molécula CD86. Se indica el porcentaje obtenido al comparar entre tratamientos.

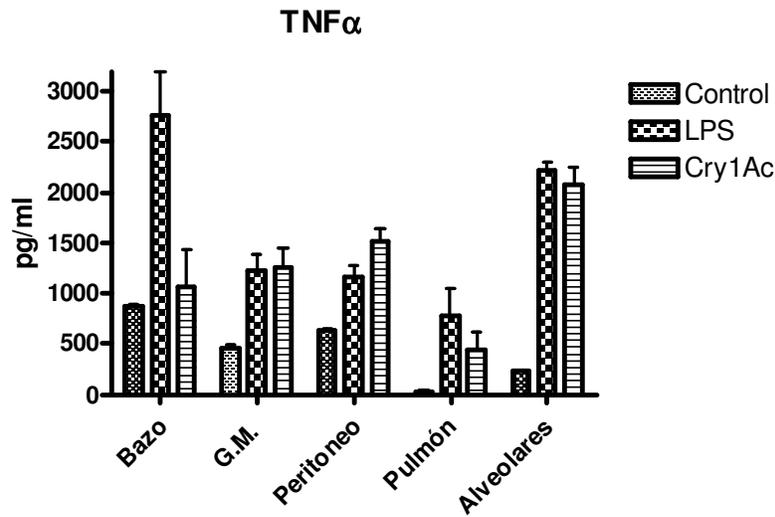


Fig. 6. Análisis de la citocina TNF de sobrenadantes de cultivos de macrófagos estimulados con Cry1Ac y LPS. En bazo se observa que se tuvo la mayor respuesta de LPS. Ganglio mesentérico, peritoneo, pulmón y alveolares se incrementa la expresión con respecto al control.

Del análisis de citocinas realizado con el kit CBA de Pharmigen se encontró que la protoxina Cry1Ac produce altos niveles de TNF en sobrenadantes de macrófagos de ganglio, peritoneo, pulmón, y macrófagos alveolares con respecto a los no estimulados, que fueron también similares a los que se obtiene con un activador clásico de macrófagos como lo es el LPS, aunque en bazo se encontró que el LPS produce altos niveles de TNF mientras que la protoxina Cry1Ac induce niveles similares al control.

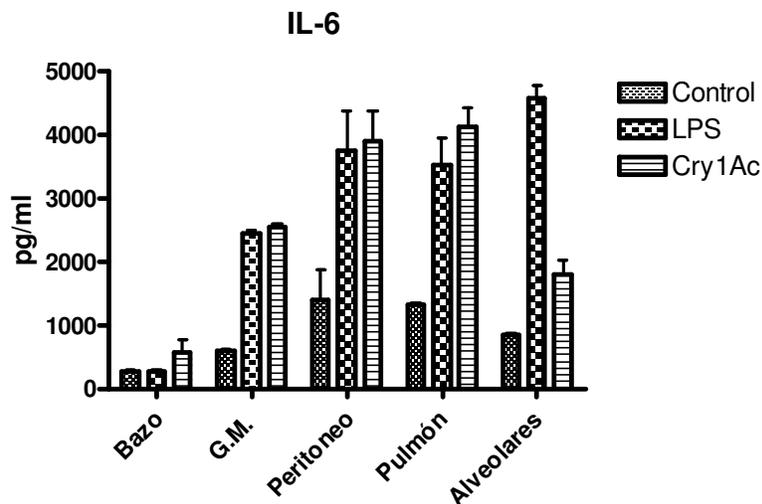


Fig. 7. Análisis de la citocina IL-6 de sobrenadantes de cultivos de macrófagos estimulados con Cry1Ac y LPS. En macrófagos alveolares se observa que se tuvo la mayor respuesta de LPS. En ganglio mesentérico, peritoneo y pulmón se observa que ambos tratamientos expresaron mayores cantidades con respecto al control.

Otra de las citocinas relacionadas con la inflamación es la IL-6, (Fig. 6.) aunque su papel es de citocina proinflamatoria también puede ser antiinflamatoria y es reguladora de TNF- $\alpha$  y se activa junto con IL-10, se puede apreciar que los niveles de IL-6 aumentaron por efecto de Cry1Ac y LPS de manera similar, en todos los tejidos estudiados excepto en bazo en donde estos fueron bajos.

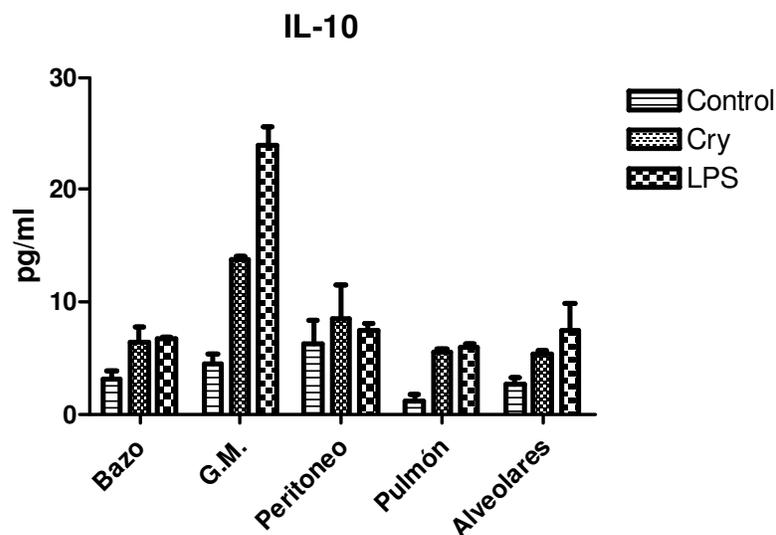


Fig. 8. Análisis de la citocina IL-10 de sobrenadantes de cultivos de macrófagos estimulados con Cry1Ac y LPS. En macrófagos de ganglio mesentérico se observa un mayor incremento e la expresión de esta citocina. El bazo, pulmón, y macrófagos alveolares presentan un mayor incremento con respecto al control.

Los niveles de TNF inducidos por LPS en bazo, aparentemente son inversamente proporcionales a los de IL-6, ya que la cantidad de TNF fue elevada mientras los niveles de IL-6 fueron bajos, lo que podría sugerir que en el bazo estas citocinas pueden estar contra-regulándose. Otra de las citocinas estudiadas fue MCP-1 por su importancia en el reclutamiento de células presentadoras de antígeno. En bazo y ganglio mesentérico se encontró aumentada la expresión de esta quimiocina, por efecto de Cry1Ac y LPS, mientras que para los otros tejidos no se encontraron diferencias significativas con respecto al control, lo que indica que el incremento de MCP-1 solo se da en macrófagos de los ganglios, que son los sitios inductores de la respuesta inmune.

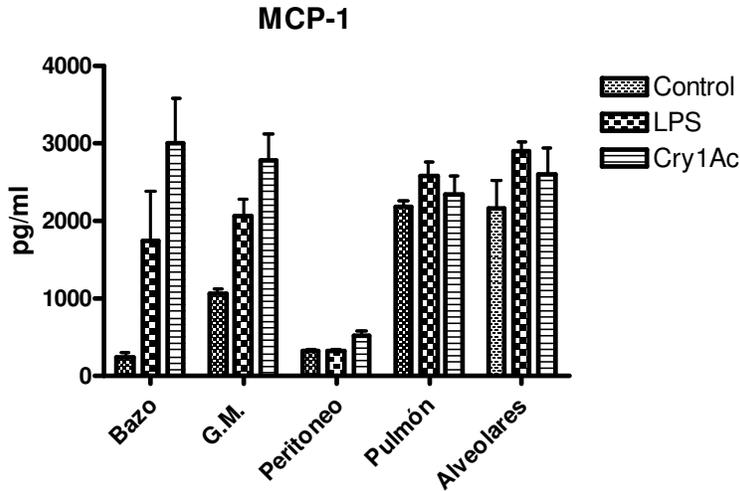


Fig. 9. Análisis de la quimiocina MCP-1(CCL-2) de sobrenadantes de cultivos de macrófagos estimulados con Cry1Ac y LPS. En macrófagos de ganglio mesentérico se observa un mayor incremento e la expresión de esta quimiocina. En pulmón y macrófagos alveolares no se presenta diferencias significativas en la expresión de esta quimiocina.

Sin embargo en macrófagos de pulmón y alveolares la expresión constitutiva de MCP-1 es elevada y no se modifica por efecto de Cry1Ac y LPS. En contraste en macrófagos peritoneales no se detectaron niveles constitutivos significativos de MCP-1 ni se modificaron por el estímulo.

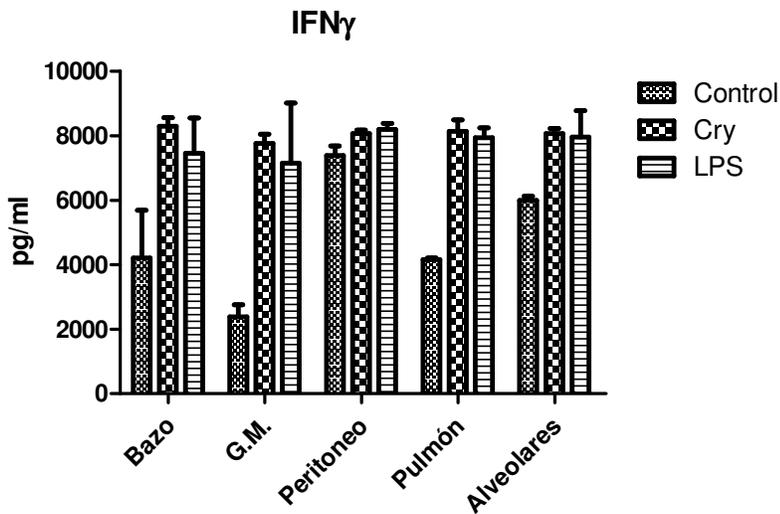


Fig. 9. Análisis de la citocina IFN de sobrenadantes de cultivos de macrófagos estimulados con Cry1Ac y LPS. En macrófagos de ganglio mesentérico y pulmón se observa un mayor incremento en la expresión de esta citocina. En peritoneo y macrófagos alveolares no se presenta diferencias significativas en la expresión de esta citocina.

Al estimular con Cry1Ac se encontró un aumento en la expresión de IFN $\gamma$  en macrófagos de bazo, ganglio mesentérico y pulmón similar al inducido por LPS, mientras que en macrófagos alveolares también de apreció un incremento por efecto de LPS y

Cry1Ac, aunque no fue tan notorio porque los macrófagos de este tejido presentan una alta expresión constitutiva de esta citocina. En macrófagos de peritoneo se observó también una alta expresión constitutiva de IFN que no se modificó al estimular con Cry1Ac y LPS.

También se analizó la expresión de IL-12 en cultivos de macrófagos sin embargo no se encontraron valores significativos.

### **Discusión**

La mayoría de los adyuvantes ejercen al menos parte de su actividad adyuvante a través de la inducción de citocinas y quimiocinas inflamatorias y la expresión de moléculas coestimuladoras B71 y B72 que es uno de los mecanismos por los que ejercen su actividad adyuvante varias toxinas bacterianas como el LPS y la CT.

Estudios anteriores habían demostrado que la protoxina recombinante de Cry1Ac administrada i.p. e i.g. había inducido respuestas inmunes de mucosas y sistémicas similares a las que presenta la CT (Vázquez-Padrón, 1999) hasta entonces el adyuvante mucosal de origen bacteriano más potente. En otros estudios se observó que Cry1Ac eleva la sobrevivencia de ratones infectados con *N. fowleri*, además de que incrementa la actividad de linfocitos T y la producción de citocinas como IL-4 e IL-10. Cry1Ac mostró que pudiera ser capaz de activar la inmunidad innata por lo cual se consideró importante estudiar el efecto de Cry1Ac en macrófagos y la expresión de moléculas coestimuladoras B71 y B72. Se le decidió comparar con LPS ya que éste es conocido por ser un activador clásico de macrófagos, se caracteriza por que a las primeras horas de la inyección con esta toxina se presentan altos niveles de TNF- $\alpha$  (Dinarello C. A, 1997) lo que modifica el patrón de la coagulación e induce muerte por shock séptico (Cohen, 2002). Sin embargo,

se han trabajado con dos dosis a lo largo de incontables experimentos, la dosis letal y una dosis que permite ver el efecto del LPS sin los riesgos de inducir la muerte en el sujeto en experimentación. Los datos que se han presentado con respecto al LPS en la expresión de moléculas coestimuladoras indican un aumento de estas, se ha encontrado que es mayor el aumento en B7-2 (Hatcock 1994), esto es debido a que las células T en reposo poseen niveles bajos de B7-2 los cuales son rápidamente sobreexpresados no así B7-1. Debido a que Cry1Ac es un buen adyuvante de mucosas se decidió probar su efecto en moléculas coestimuladoras de diferentes tejidos ya que se ha reportado que la respuesta varía en los diferentes compartimientos mucosales así como dependiendo del sitio de inmunización. Los efectos de Cry1Ac y LPS en la expresión de moléculas coestimuladoras así como en la producción de citocinas proinflamatorias fueron muy similares en varios casos, sin embargo se encontraron también algunas diferencias en la magnitud de los efectos observados dependiendo del estímulo y del sitio de obtención de macrófagos.

Los resultados obtenidos mostraron que si existe un incremento en la expresión de CD80 y CD86, este es más marcado hacia CD80 en el caso del análisis *in vivo*, para el caso del análisis *in vitro* la molécula más expresada fue CD86. Se sabe que tanto CD80 y CD86 son importantes en la señalización de la respuesta inmune, ya que sin la presencia de una señal coestimuladora adecuada la célula T se vuelve anérgica (Sharpe *et al* 2002). Existe una controversia en cuanto a la función específica de las moléculas, algunos autores plantean que el ligando CD28 cuando interactúa con B7-2 promueve la diferenciación hacia Th<sub>2</sub> y no hacia Th<sub>1</sub> (Kuchroo V. K. *et al* 1995); en contraste cuando CD28 interactúa con B7-1 la diferenciación hacia Th<sub>2</sub> es inhibitoria e integral la diferenciación de Th<sub>1</sub> (Rulifson I. C. 1998).

Nuestros resultados indican que Cry1Ac induce respuestas similares al LPS, los dos presentaron un aumento en la expresión de moléculas coestimuladoras en los sitios de inmunización y en cuanto al patrón de citocinas proinflamatorias se diferenció en cuanto a que algunos tejidos presentaron mayor respuesta al LPS que a nuestra proteína, tal es el caso de bazo y de lavados alveolares para la citocina TNF $\alpha$ , esto se puede explicar debido a que el sitio de contacto mas próximo al estímulo fueron estas células. Nuestros resultados concuerdan en la expresión de CD86 y CD80 en dos poblaciones de macrófagos (esplenocitos y peritoneo) los cuales encontraron que existen altos niveles de CD86 en bazo en comparación con peritoneo y que estos pueden exhibir distintas alteraciones cuando son expuestos a ciertos estímulos (Liu *et al* 2006) Se sabe que la IL-12 tiene un papel fundamental en la polarización de la respuesta inmune, ya que promueve la respuesta hacia tipo TH<sub>1</sub>, sin embargo en el presente trabajo no se encontraron niveles suficientes de esta citocina, se puede atribuir a que en trabajos anteriores la protoxina Cry1Ac promueve la diferenciación hacia TH<sub>2</sub> lo cual nos indicaría que posiblemente se incrementa la expresión de IL-4.

Se sabe que la fuente más importante de IL-6 son las células del sistema fagocítico y que entre sus funciones están el mediar la activación, crecimiento y diferenciación de la célula T; cuando interactúa con IL-1 posee propiedades inflamatorias, aunque también puede regular la síntesis de TNF e inhibir a IL-1. En nuestro trabajo se encontró en altos niveles en ganglio y peritoneo, en menor grado en pulmón, los altos niveles en peritoneo se debe al hecho que en el peritoneo la población más abundante de células son macrófagos y estos al ser estimulados produzcan esos niveles de IL-6 ya que el estímulo fue hecho i.p.

Los resultados en conjunto de las investigaciones realizadas por nuestro grupo hasta el momento indican que la protoxina Cry1Ac *Bacillus thuringiensis* es una proteína

inmunogénica, es adyuvante, puede funcionar como acarreador vacunal, puede incrementar la protección en contra la infección por *Naegleria fowleri* cuando es coadministrada con lisados amibianos por la ruta intranasal y ejerce efectos inmunomoduladores en linfocitos (induce activación, proliferación e induce y/o modifica la expresión de citocinas, modifica la expresión de receptores de migración homing y de moléculas de adhesión endotelial). Mientras que los resultados del presente estudio indican que en macrófagos la protoxina Cry1Ac incrementa la expresión de moléculas coestimuladoras induce la secreción de citocinas proinflamatorias.

Los resultados encontrados sugieren que la actividad adyuvante que confiere esta proteína podría explicarse por su capacidad de incrementar la expresión de moléculas coestimuladoras B7-1 y B7-2 en macrófagos, e inducir la expresión de citocinas. Sin embargo es necesario dilucidar el mecanismo y caracterizar con más detalle los efectos de la protoxina Cry1Ac en macrófagos y células dendríticas.

## **Conclusiones**

La protoxina Cry1Ac aumenta la expresión de moléculas coestimuladoras CD80 y CD86 en macrófagos

La protoxina Cry1Ac aumenta la expresión de citocinas proinflamatorias de manera similar a la inducida por LPS

## Bibliografía

Abbas A. K., Lichtman A. H., Pillai S. 2004. Cellular and molecular immunology. España. Ed. Mc Graw Hill. pp 566

Andreakos E., Williams R. O., Wales J., Foxwell B. M., Feldmann M. 2006. Activation of NF $\kappa$ B by the intracellular expression of NF $\kappa$ B-inducing kinase acts as a powerful vaccine adjuvant. *Immunology*. 103(93): 14459–14464.

Auger MJ, Ross JA. The biology of the macrophage 1992. Lewis CE, McGee JO. The Macrophage. Oxford: Oxford University. 1-57

Barrington R., Zhang M., Fischer M., Carroll M. C. 2001. The role of complement in inflammation and adaptive immunity. *Immunol Rev*. 180:5–15.

Barrios C. S., Johnson B. D., Henderson J. D., Kurup V. P., Fink J. N. 2005. The costimulatory molecules CD80, CD86 and OX40 L are up-regulated in *Aspergillus fumigatus* sensitized mice. *Clinical and experimental immunology*. 142:242–250.

Berkel van M. E. A. T., Schrijver E. H. R., Mourik van A., Tesselaar K., Ley van der P., Steeghs L., Oosterwegel M.A. 2007. A critical contribution of both CD28 and ICOS in the adjuvant activity of *Neisseria meningitidis* H44/76 LPS and *lpxL1* LPS. *Vaccine*. 25(24):4681-4688.

Bhatia S., Edidin M., Almo C.S., Nathenson S. G. 2006. B7-1 and B7-2: Similar costimulatory ligands with different biochemical, oligomeric and signaling properties. *Immunology letters*. 104: 70-75.

Bian Y., Hiraoka S., Tomura M., Zhou X., Yashiro-Ohtani Y., Mori Y., Shimizu J., Ono S., Dunussi-Joannopoulos K., Wolf S., Fujiwara H. 2005. The capacity of the natural ligands for CD28 to drive IL-4 expression in naïve and antigen-primed CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells. *The Japanese Society for Immunology*. 17(1):73-83.

Bird S., Zou J., Wang T., Munday B., Cunningham C., Secombes C. J. 2002. Evolution of interleukin-1. *Cytokine & Growth Factor Reviews*. 13:483–502.

Borish L. C., Steinke J. W. 2003. Cytokines and chemokines. *J. Allergy Clin. Immunol.* 111(2):460-475.

Broeren C. P. M., Gray G. S., Carreno B. M., June Carl H. 2000. Costimulation light: Activation of CD4<sup>+</sup> T cells with CD80 or CD86 rather than anti-CD28 lead to a Th2 cytokine profile. *The Journal of Immunology*. 165: 6908-6914.

Bromander A., Holmgren J., Lycke N. 1991. Cholera toxin stimulates IL-1 production and enhances antigen presentation by macrophages in vitro. *Journal of immunology*. 146:2908-2914.

Carreno B.M., Collins M. 2002. The B7 family of ligands and its receptors:news pathways for costimulation and inhibition of immune response. *Annu Rev. Immunol.* 20:29-53.

Chen T., Ma J., Mandelin J., Ceponis A., Miller N.E. 2003. Regulation of macrophage activation. *Cellular and molecular life sciences*. 60: 2334-2346.

Cohen J. 2002. The immunopathogenesis of sepsis. *Nature*. 420:19-26.

Coligan J. E., Vogel S. 2006. Innate Immunity. *Current protocols in immunology*. 73:14.1-4.

Cox J.C., Coulter A. R. 1997. Adjuvants: a classification and review of their modes of action..*Vaccine* 15:248-256.

Dinarello C.A. 2000. Proinflammatory cytokines. *Chest*. 118(2):503-508.

Dinarello C. A. Proinflammatory and anti-inflammatory cytokines as mediators in the pathogenesis of septic shock. 1997. *Chest*. 112: 321-329.

Douce G., Giannelli V., Pizza M., Lewis D., Everest P., Rappuoli R., Dougan G. 1999. Genetically detoxified mutants of heat-labile toxin from *Escherichia coli* are able to act as oral adjuvants. *Infect. Immun.* 67(9):4400-4406.

Eriksson K., Holmgren J. 2002. Recent advances in mucosal vaccines and adjuvants. *Curr. Op. Immunol.* 14:666-672.

Esquivel-Pérez R., Moreno-Fierros L. 2005. Mucosal and systemic adjuvant effects of cholera toxin and Cry1Ac protoxin on the specific antibody response to HIV-1 C4/V3 peptides are different and depend on the antigen co-administered. *Viral Immunol.* 18(4):695-708.>

Fleischer J., Soeth E., Reiling N., Grage-Griebenow E., Flad D., Ernst M. 1996. Differential expression and function of CD80 (B7-1) and CD86 (B7-2) on human peripheral blood monocytes. *Immunology.* 89:592-598.

Foss D. L., Zilliox M. J., Murtaugh M.P. 1999. Differential regulation of macrophage Interleukin-1 (IL-1), IL-12, and CD80-CD86 by two bacterial toxins. *Infect. Immunol.* 67(10):5275-5281.

Golsby A. R., Kindt T. J., Osborne B., Kubis J. 2004. *Inmunología*. Ed. Mc Graw Hill, 5 ed. Pp.665

Gordon S. 2003. Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol.* 3:23–35.

Greenwald R. J., Freeman G. J., Sharpe A. H. 2005. The B7 family revisited. *Annu. Rev. Immunol.* 23:515-48.

Hathcock K. S., Laszlo G., Pucillo C., Linsley P., Hodes R. J. 1994. Comparative analysis of B7-1 and B7-2 costimulatory ligands: expression and function. *The journal of experimental medicine.* 180:631-640.

Höfte, H., & H. Whiteley. 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. Microbiol. Rev. 53:242- 255.

Holmgren J., Czerkinsky C. 2005. Mucosal immunity and vaccines. Nature medicine. 11(4):s45-s53.

Holmgren J., Czerkinsky C., Eriksson K., Mharandi A. 2003. Mucosal immunization and adjuvants: a brief overview of recent advances and challenges. Vaccine. 21:89-95.

Johansson EL., Rask C., Fredriksson M., Eriksson K., Czerkinsky C., Holmgren J. 1998. Antibodies and antibody-secreting cells in the female genital tract after vaginal or intranasal immunization with cholera toxin B subunit or conjugates. Infect. Immun. 66(2):514-520.

Kalambaheti T., Chaisri U., Srimanote P., Pongponratn E., Chaicumpa W. 1998. Immunogenicity and protective role of three formulations of oral cholera vaccine. Vaccine. 16(2-3):201-207.

Kaufmann S. H. E., Schaible U. E. 2005. Antigen presentation and recognition in bacterial infections. Current opinion in immunology. 17:79-87.

Keir M. E., Sharpe A. H. 2005. The B7/CD28 costimulatory family in autoimmunity. Immunological reviews. 204:128-143.

Kuchroo V. K., Prabhu M. D., Brown J. A., Ranger M. A., Zamvil S. S. Sobel R. A. and Glimcher L. H. 1995. B7-1 and B7-2 Costimulatory molecules activate differentially the Th1/Th2 developmental pathways: application to autoimmune disease therapy. Cell, Vol 80:707-7.

Lee Y. G., Kim Y. L., Lee Y. J., Byeon S. E., Hong K. E., Lee J., Rhee M. H., Park H. J., Cho Y. J. 2007. Regulatory effects of *Codonopsis lanceolata* on macrophage-mediated immune responses. Journal of ethnopharmacology. 112(1):180-188.

Lenschow D. J., Walunas T. L., Bluestone J.A. 1996. CD28/B7 system of Tcell costimulation. *Annu. Rev. Immunol.* 14:233-258.

Li J., Derbyshire D. J., Promdonkoy B. and Ellar D.J. 2001. Structural implications for the transformation of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxins from water-soluble to membrane-inserted forms. *Biochemical Society Transactions* 29:571-577.

Liu G., Xia P., Gong S., Zhao Y. 2006. The macrophage heterogeneity: difference between mouse peritoneal exudate and splenic F4/80<sup>+</sup> macrophages. *Journal of Cellular Physiology.* 209:341-352.

Loppnow H., Libby P., Freudenberg M., Krauss J. H., Weckesser J., and Mayer H. 1990. Cytokine induction by lipopolysaccharide (LPS) corresponds to letal toxicity and is inhibited by nontoxic *Rhodobacter capsulatus* LPS. *Infection and immunity* 90: 3743-3750.

Lorence A., Darszon A., Bravo A. 1997. Aminopeptidase dependent pore formation of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin on *Trichoplusia ni* membranes. *FEBS Letters.* 414:303-307.

Lycke N., 2005. Targeted vaccine adjuvants based in modified cholera toxin. *Current Molecular Medicine.* 5:591-597.

Maagd de R. A., Bravo A., Crickmore N. 2001. How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect World. *Trends in genetics.* 17(4):193-199.

Martin M., Sharpe A., Clements J. D., Michalek S. M. 2002. Role of B7 costimulatory molecules in the adjuvant activity of the heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli*. *The journal of Immunology.* 169:1744-1752.

Martínez M. C. E. 2005. Modulación de la respuesta inmune. *Tendencias vigentes. Medisan.* 9(3):30-37.

McAdam A. J., Nicola S. A., Sharpe A. H. 1998. The role of B7 co-stimulation in activation and differentiation of CD4+and CD8+T cells. Immunological Reviews Vol. 165:251-247.

McClintock, J.T., Schaffer, C.R., R.D. Sjoblad. 1995. A comparative reviews of the mammalian toxicity of *Bacillus thuringiensis*-based pesticides. Pestic. Sci. 45:95-105.

McGhee J. R., Kiyono H., Kubota M., Kawabata S., Miller C.J., Lehner T., Imaoka K., Fujihashi K. 1999. Mucosal Th1- versus Th2-type responses for antibody- or cell-mediated immunity to simian immunodeficiency virus in rhesus macaques. J Infect Dis. 179 S3:480-484.

Montaner L.J., Silva da P. R., Sun J., Sutterwala S., Hollinshead M., Gordon S. 1999. Type 1 and Type 2 Cytokine Regulation of Macrophage Endocytosis: Differential Activation by IL-4/IL-13 as Opposed to IFN-g or IL-10. The journal of immunology. 162: 4606–4613.

Moreno-Fierros L, García N., Gutierrez R., López-Revilla R. Vázquez-Padrón R.I. 2000. Intranasal, Rectal and Intraperitoneal Immunization with Protoxin Cry1Ac from *Bacillus thuringiensis* Induces Compartmentalized Serum, Intestinal, Vaginal and Pulmonary Immune Responses in Balb/c Mice. Microbes and Infection. 2: 885-890.

Moreno-Fierros L., Pérez O., Palomar M. M. 2002. Slight influence of the estrous cycle stage on the Mucosal and systemic specific antibody response induced after vaginal and intraperitoneal immunization with protoxin Cry1Ac from *Bacillus thuringiensis* in mice. Life Sci. 71(22):2667-80.

Moreno-Fierros L., Ruiz-Medina J., Esquivel, R., López-Revilla R. and Piña-Cruz S. 2003. Cry1Ac protoxin as carrier and adjuvant for the induction of mucosal and systemic antibody immune responses to polysaccharides of *S. pneumoniae* by intranasal immunization in mice. Scand. J. Immunol. 57: 45.

Mukhopadhyay S., Peiser L., and Gordon S. 2004. Activation of murine macrophages by *Neisseria meningitidis* and IFN $\gamma$  in vitro: distinct roles of class A

scavenger and Toll-like pattern recognition receptors in selective modulation of surface phenotype. *Journal of Leukocyte Biology*. 76:577-584.

Nagurskaya E. V., Zaitseva L. G., Kobets N. V., Kireeva I. V., Bekhalo V. A., Kozlov A., Klimova R. R., Gur'yanova S. V., Andronova T. M., Shingarova L. N., Boldyreva E. F., Nekrasova O. V. 2005. Comparative Study of Macrophage Response in Mice after DNA Immunization and Infection with Herpes Simplex Virus Type 1. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 140(6):716-719.

Nelson R. P., Ballou M. 2003. Immunomodulation and immunotherapy: drugs, cytokines, cytokine receptors and antibodies. *J. Allergy Clin Immunol*. 111:S720-732.

Neurath M. F., Finotto S., Glimcher L. H. 2002. The role of Th1/Th2 polarization in mucosal immunity. *Nature medicine*. 8(6):567-573.

O'shea J. J., Nutman Thomas B. 2001. Immunoregulation. *Encyclopedia of life sciences*.

Pacheco S., Gómez I., Sato R., Bravo A., Soberón M.. 2006. Functional display of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin on T7 phage. *Journal of Invertebrate Pathology*. 92:45–49.

Pentcheva-Hoang T., Egen J. G., Wojnoonski K. and Allison P. J. 2004. B7-1 and B7-2 selectively recruit CTLA-4 and CD28 to the immunological synapse. *Immunity* 21: 401-413.

Pirofski L., Casadevall A. 2006. Immunomodulators as an antimicrobial tool. *Current opinion in microbiology*. 9:1-7.

Puddu P., Fantuzzi L., Borghi P., Varano B., Rainaldi G., Guillemard E., Malorni W., Nicaise P., Wolf S. F., Belardelli F., Gessani S. 1997. IL-12 induces IFN $\gamma$  expression and secretion in mouse peritoneal macrophages. *The journal of immunology*. 159:3490-3497.

Ripoll V. M., Hume D., Fontanilla M. R. 2005. Expresión específica de los genes de la respuesta inflamatoria en subpoblaciones de macrófagos. *Biomédica*. 25:261-270.

Rulifson I.C., Sperling A. I., Fields P.E., Fitch F. W., Bluestone J.A.1997. CD28 costimulation promotes the production of Th2 cytokines. *The journal of immunology*. 158:658-665.

Ryan E.J., Daly L.M., Mills K.H.G. Immunomodulators and delivery systems for vaccination by mucosal routes. *Trends Biotech* 2001, 19(8): 293-304.

Ryan M., McArthy L., Rappuoli R., Mahon B. P., Mills K. 1998. Pertussis toxin potentiates Th1 and Th2 responses to co-injected antigen: adjuvant action is associated with enhanced regulatory cytokine production and expression of the costimulatory molecules B7-1, B7-2 and CD28. *International Immunology* 10(4):651-662.

Sharpe A. H., Freeman G. J. 2002. The B7-CD28 superfamily. *Nature reviews* 2:116-126.

Sherry C. L., O'Connor J.C., Kramer J. M., Freund G. G. 2007. Augmented Lipopolysaccharide-Induced TNF $\alpha$  production by peritoneal macrophages in Type 2 diabetic mice is dependent on elevated glucose and requires p38 MAPK. *The journal of immunology*. 178:663-670.

Singh M., O'Hagan D. 2002. Recent advances in vaccine adjuvants. *Pharmaceutical Research*. 19(6):715

Subauste C.S., Waal M. R., Fuh F. 1998. Role of CD80 (B7.1) and CD86 (B7.2) in the immune response to an intracellular pathogen. *The Journal of Immunology*. 160:1831-1840.

Suvas S., Vohra H., Agrewala J. N. 2003. Modulation of the expression of M150 on macrophages by Th1/Th2 cytokines and costimulatory molecules CD40, B7-1, B7-2 and ICAM-1. *Clin. Exp. Immunol*. 134:232-237.

Tsvetelina Pentcheva-Hoang, Jackson G. Egen, Kathleen Wojnoonski. James P. Allison. 2004, *Immunity*, Vol. 21, 401–413,

Tochikubo K., Isaka M., Yasuda Y., Kozuka S., Matano K., Miura Y., Taniguchi T. 1998. Recombinant cholera toxin B subunit acts as an adjuvant for the mucosal and systemic responses of mice to mucosally co-administered bovine serum albumin. *Vaccine*. 16(2-3):150-155.

Totemeyer S., Sheppard M., Lloyd A., Roper D., Dowson C., Underhill D., Murray P., Maskell D., Bryant C. 2006. IFN- $\gamma$  Enhances Production of Nitric Oxide from Macrophages via a Mechanism That Depends on Nucleotide Oligomerization Domain-2. *The Journal of Immunology*. 176: 4804–4810.

Vázquez-Padrón R.I., Moreno-Fierros L., Neri-Bazán L., Del la Riva G.A., López-Revilla R. 1999. *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac protoxin is a potent systemic and mucosal adjuvant. *Scand. J. Immunol*. 46:578-584.

Vázquez-Padrón R. I., González-Cabrera J., García-Tovar C., Neri-Bazan L., López-Revilla R., Hernández M., Moreno-Fierros L., Riva de la G. A. 2000. Cry1Ac Protoxin from *Bacillus thuringiensis* sp. *kurstaki* HD73 Binds to Surface Proteins in the Mouse Small Intestine. *Biochemical and biophysical research communications*. 271(1):54-58.

Wang S., Chen L. 2004. Co-signaling molecules of the B7-Cd28 family in positive and negative regulation of T lymphocyte responses. *Microbes and infection*. 6:759-766.

Wei J., Hale K., Carta L., Platzer E., Wong C., Fang S., Aroian R. V. 2003. *Bacillus thuringiensis* crystal proteins that target nematodes. *Microbiology*. 100(5):2760-2765.

Williams N.A., Hirst T.R., Nashar T.O. 1999. Immune modulation by the cholera-like enterotoxins: from adjuvant to therapeutic. *Immunol. Today*. 20:95-101.

Zhang Y. Q., Neerven van R. J., Gool van S. W., Coorevits L., Mark Boer de M., Ceuppens J. L. 1997. B7–CD28 interaction is a late acting co-stimulatory signal for human T cell responses. *International Immunology*. 9(8): 1095–1102.

Zhang. P., Lewis P.J., Michalek S. M., Katz J. 2007. Role of CD80 and CD86 in host immune responses to the recombinant hemagglutinin domain of Porphyromonas gingivalis gingipain and in the adjuvanticity of cholera toxin B and monophosphoryl lipid A. Vaccine. 25:6201-6210.

[Zidek Z.](#), [Tucková L.](#), [Mára M.](#), [Barot-Ciorbaru R.](#), [Prokesová L.](#), [Tlaskalová-Hogenová H.](#) 1998. Stimulation of macrophages by *Bacillus firmus*: production of nitric oxide and cytokines. International journal of immunopharmacology. 20:359-368.