



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA
UNIDAD DE BIOMEDICINA

**IDENTIFICACIÓN DE RECEPTORES PARA LA TOXINA Cry1Ac EN
CÉLULAS LINFOIDES Y MIELOIDES MURINA.**

TESIS

Presenta

ALFREDO MEDINA JICALAN

Para Obtener el grado de:

BIOLOGO

Directora de Tesis: Dra. Leticia Moreno Fierros



“POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU”



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.

Índice

<i>Índice</i>	<i>¡Error! Marcador no definido.</i>
Índice de figuras	2
Abreviaturas	4
Resumen	6
Introducción	8
Adyuvantes vacunales	8
Adyuvantes de mucosas	9
Protoxina Cry1Ac	10
Estructura de Toxina Cry1Ac	12
Antecedentes	13
Planteamiento	14
Objetivo	16
Objetivos Particulares:	16
Metodología y estrategia experimental	17
Estrategia para la Identificación del posible receptor de proteínas Cry1Ac	17
Diagrama de flujo	20
Obtención de la toxina Cry1Ac	21
Conjugado Toxina Cry1Ac-FITC	21
Obtención de células de bazo	23
Incubación de toxina Cry1Ac-FITC con Células de Bazo	24
Identificación de receptor para la Toxina-Cry1Ac	24
Obtención de suero α -toxina Cry1Ac	24
Extracto de células de bazo.....	25
Transferencia de Geles a membranas de PVDF	26
Ensayo de blot-ligando.....	27
Localización del sitio de unión de toxina Cry1Ac a células linfoides y mieloides	27
Análisis estadístico	28
Resultados	29
Obtención de proteínas Cry1Ac	29
Digestión de protoxina	29
Conjugado de toxina Cry1Ac-FITC	30
LA toxina y protoxina Cry1Ac inducen ctivación de Linfocitos y mielocitos evaluada por la expresión de CD69, CD80 y CD86	31

Activación de Linfocitos T.....	31
Linfocitos B.....	32
Mielocitos	33
La toxina y protoxina Cry1Ac se unen a células linfoides y mieloides de bazo.....	34
Linfocitos T.....	36
Regiones de células mieloides	36
Comparación de Linfocitos B y T	37
Linfocitos B.....	38
Mielocitos	40
Inmunolocalización de unión de toxina y protoxina Cry1Ac en macrófagos y linfocitos.....	41
Obtención de sueros α -TCry1Ac y α -PCry1Ac	45
Blot-ligando de extracto de células de bazo	47
Discusión.....	49
Conclusiones	55
Referencias.....	57

Índice de figuras

Figura 1. Obtención de suero de coneja.....	26
Figura 2. Toxina y protoxina puras en un Gel SDS-PAGE 10%.....	30
Figura 3. Proteínas Cry1Ac conjugadas con FITC en un Gel de SDS-PAGE.....	31
Figura 4. La toxina y protoxina Cry1Ac inducen activación de linfocitos T	32
Figura 5. La toxina y protoxina Cry1Ac inducen activación de linfocitos B.....	33
Figura 6. Protoxina Cry1Ac induce activación de Mielocitos.....	35
Figura 7. Toxina Cry1Ac induce activación de Mielocitos.....	35
Figura 8. Porcentajes de las poblaciones de células linfoides (B220 y CD3) y mieloides CD11b y CD11c) a las que se unen toxina y protoxina Cry1Ac.	36
Figura 9. Regiones de células de bazo.....	37
Figura 10. Porcentajes de linfocitos B y T de bazo, que reconocen a la toxina y protoxina Cry1Ac.	38
Figura 11. Dot plot's de los porcentajes de subpoblaciones de linfocitos T,.....	39
Figura 12. Dot-plot's que muestran los porcentajes de células de bazo B220 y CD19 que unen toxina y protoxina Cry1Ac.....	40
Figura 13. Regiones de células de bazo.....	40
Figura 14. Toxina y protoxina Cry1Ac se unen a Mielocitos (CD11b y CD11c).....	41
Figura 15. Fotografía de Microscopio confocal.....	43
Figura 16. Microscopía confocal de Linfocitos	

T.....	44
Figura 17. Microscopía confocal de Linfocitos B.....	45
Figura 18. Inmunización de conejo.....	44
Imagen 19. Identificación de receptor para T y P Cry1Ac en un extracto de células de bazo.....	45

Abreviaturas

FITC ***Fluoresceína Isotiocinato***

PE ***Ficoeritrina***

Cy5 ***Cianina 5***

Cy5PE ***Cianina 5-ficoeritrina***

APC ***Aloficoeritrina***

APN ***Aminopectidasa***

CT ***Toxina de cólera***

LT ***Termolábil de E. Coli***

GM1 ***Receptor gangliósido***

pH ***Potencial de Hidrogeno***

BT ***Bacillus thuringiensis***

GalNac ***N-acetil-d-galactosamina***

INF ***Interferon Gama***

ml ***mililitro***

he ***hora***

hrs ***horas***

<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>DTT</i>	<i>Ditiotreitol</i>
<i>°C</i>	<i>Grados Celsius</i>
<i>PMSF</i>	<i>Fenil metil sulfonil fluoruro</i>
<i>RPMI</i>	<i>Medio de cultivo celular, por Roswell en el Park Memorial</i>
<i>Institut.</i>	
<i>min</i>	<i>Minutos</i>
<i>PBS</i>	<i>Fosfate buffer solutions (Solución de buffer de fosfatos)</i>
<i>T.A.</i>	<i>Temperatura ambiente</i>
<i>rpm</i>	<i>Revoluciones por minuto</i>
<i>μl</i>	<i>Microlitros</i>
<i>μg</i>	<i>Microgramos</i>
<i>kDa</i>	<i>Kilo Daltones</i>
<i>BSA</i>	<i>Bovine serum albumin (albumina de suero bovino)</i>
<i>PBA</i>	<i>PBS y BSA 5%</i>
<i>mM</i>	<i>mili molar</i>
<i>HRP</i>	<i>Peroxidasa</i>

Resumen

La protoxina Cry1Ac de *Bacillus thuringiensis* es un potente inmunógeno y adyuvante mucosal. Además tiene la capacidad de inducir activación y producción de citocinas en linfocitos y macrófagos estimulados "in vitro". La toxina es responsable de la inmunogenicidad, aunque se desconoce si tiene capacidad adyuvante. Se han identificado en invertebrados distintos receptores para las toxinas Cry1Ac, sin embargo no se han identificado receptores en vertebrados. Como objetivo del trabajo se determinó la posible existencia de receptores para la toxina y protoxina Cry1Ac en células linfoides o mieloides de bazo de ratón. Para lo cual se conjugaron toxina y protoxina Cry1Ac con FITC, se incubó con células de Bazo y anticuerpos acoplados a fluorocromos (PE, Cy5, Cy5PE y APC) para determinar por citometría de flujo a que poblaciones de linfocitos y/o células mieloides se unía, así como si era capaz de activar estos tipos celulares utilizando como marcadores (CD69, CD80 y CD86). Se identificó al posible receptor para toxina y protoxina Cry1Ac en un extracto de células de bazo y solo para toxina si esta unión dependía de los carbohidratos N-acetil galactosamina y N-acetil glucosamina por ensayo de blot-ligando; se Inmunolocalizó la unión mediante microscopia confocal. Se encontró que tanto la toxina como la protoxina Cry1Ac se unen preferentemente a macrófagos aunque también se une a linfocitos B y a las subpoblaciones de linfocitos T, CD8 y TCD4. Además tienen la capacidad activar macrófagos lo cual fue medido por la expresión de moléculas coestimuladoras (CD86, CD80); así como inducir la activación de linfocitos (expresión de CD69) CD3 y B220. Por el ensayo de blot ligando, se identificaron 4 bandas de proteínas

como posibles receptores para TCry1Ac y 5 bandas de proteínas para PCry1Ac, en el caso de la TCr1Ac la unión se inhibió por la presencia de GalNac y GlcNac. La unión de las dos proteínas Cry1Ac se localizó en la superficie de las células. Los resultados sugieren la existencia de receptores para toxina y protoxina Cry1Ac y estos se encuentran insertados en la membrana plasmática de células linfoides y mieloides de bazo de ratón.

Apoyado por UNAM-PAPIIT IN226610.

Introducción

Adyuvantes vacunales

Un alto porcentaje de agentes infecciosos, ingresan al organismo a través de las superficies mucosas gastrointestinales, respiratorias y genitourinarias, por lo que se requiere desarrollar estrategias de vacunación que induzcan una respuesta inmune protectora en los sitios mucosos donde invaden los patógenos (Holmgren y Czerkinsky 2003, Neutra and Kozlowski 2006, Eriksson y Holmgren 2003). Para incrementar las respuestas en mucosas se han evaluado una gran variedad de estrategias entre las que se incluye el uso de diferentes sistemas de entrega de antígeno (Mitragotri 2005, Eldridge *et al* 1991, Michalek *et al* 1994, Ryan *et al* 2001 Eriksson y Holmgren 2002, Kang y Compans 2003) y el uso adyuvantes mucosales (Ryan *et al* 2001. O'Hagan 2001).

Los adyuvantes son sustancias que incrementan la respuesta inmunitaria frente a los antígenos con los cuales se mezclan y coadministran, así estimulan una respuesta inmune de mayor magnitud. Estas sustancias pertenecen al grupo de los inmunomoduladores, estos son un conjunto de sustancias heterogéneas que poseen dos características fundamentales: la estimulación de la resistencia no específica del huésped contra las enfermedades infecciosas y el cáncer; y la potenciación de la inmunogenicidad de las vacunas comerciales. Las sustancias inmunopotenciadoras (adyuvantes), son preparados químicos que, incorporados al antígeno o inyectados simultáneamente con él, hacen más efectiva la respuesta inmune, además de no inducir propiedades biológicas adversas. Con su empleo

se logra economía de antígeno y de tiempo, así como un mayor nivel de anticuerpos específicos (Morris et al 1999).

Adyuvantes de mucosas

El uso de adyuvantes es una estrategia para mejorar la inducción de respuestas mucosas. Existen pocos adyuvantes mucosos efectivos descritos entre los que se incluyen el uso de algunas toxinas bacterianas, DNA conteniendo CpG y diferentes citocinas y quimosinas. (Ryan *et al* 2001, Holmgren *et al* 2003).

Entre las toxinas bacterianas con actividad adyuvante en mucosas más estudiadas se encuentran la toxina de cólera (CT) y la toxina termolábil de *E. Coli* (LT). Tanto CT (Lycke *et al* 1986,1991,) como LT (Clements *et al* 1988) tienen efectos adyuvantes en mucosas cuando se coadministran o se conjugan con proteínas solubles que no son inmunogénicas. Sin embargo a pesar de su potente actividad adyuvante la aplicación de CT y LT en humanos no es factible por su toxicidad y altos costos de producción. Recientemente se han desarrollado también mutantes no tóxicos que mantienen parcialmente la adyuvancia por la ruta intranasal (Dickinson *et al* 1995, Yamamoto *et al* 1997, Partidos *et al* 1996). Sin embargo existe preocupación acerca de la seguridad de la aplicación intranasal de las mutantes no tóxicas de CT y LT, ya que estas proteínas mantienen su capacidad de unirse a su receptor el gangliósido GM1, lo cual podría facilitar que las vacunas provocaran daño a los tejidos neuronales. De hecho se ha reportado que CT

puede redirigir a las proteínas vacunales hacia los tejidos neuronales vía el bulbo olfatorio (van Ginkel 2001).

El enfoque actual en el desarrollo de vacunas mucosas efectivas e inmunoterapias está dirigido a encontrar formas más eficientes de administración de antígenos al sistema inmune de mucosas y hacia el descubrimiento de adyuvantes de mucosas seguros o agentes inmunorreguladores que provean inmunidad o induzcan supresión de desórdenes.

Protoxina Cry1Ac

Existen pocas sustancias capaces de ejercer un potente efecto adyuvante en las mucosas que sean bien toleradas por el hombre. La obtención de sustancias con estas propiedades beneficiaría el manejo de las infecciones y el diseño de vacunas (Rodríguez-Orozco 2003). La protoxina Cry1Ac de *Bacillus thuringiensis* es un potente inmunógeno (Moreno–Fierros et al 2000, 2002, Vázquez-Padrón et al 1999a) y adyuvante mucosal tan potente como la toxina del cólera (Vázquez-Padrón et al 1999b, Moreno-Fierros et al 2003), Se ha reportado que la proteína Cry1Ac no es tóxica en humanos a las dosis que se usa convencionalmente como biopesticida, es resistente a la proteólisis y es estable a pH alcalino (McClintock JT et al 1995, Hofte and Whiteley 1989). La protoxina Cry1Ac tiene la capacidad de inducir preferentemente la activación de linfocitos B y T CD4, así como de inducir la producción de citocinas. También incrementa la proliferación y modifica la expresión de moléculas de adhesión endotelial así como de receptores de

migración en linfocitos (Moreno-Fierros datos no publicados). Los efectos inmunomoduladores de la protoxina Cry1Ac varían dependiendo del compartimiento mucosal analizado en general se inducen respuestas mezcladas Th1/Th2. La aplicación intranasal de Cry1Ac favorece la inducción de respuestas de citocinas tipo Th2 en linfocitos nasales (obtenidos del NALT y de pasajes nasales) (Rodríguez-Monroy 2008), Debido a estas propiedades se considera a la protoxina Cry1Ac como un adyuvante por su capacidad de reforzar la respuesta inmune. La protoxina Cry1Ac como adyuvante incrementa considerablemente la protección ante la infección por *Naegleria fowleri*, (Rojas et al 2004, 2007; Jarillo et al 2008) y además, la administración de la protoxina Cry1Ac sola también confiere protección en este modelo de infección sugiriendo que esta proteína tiene la capacidad de activar la respuesta inmune innata como se ha descrito para otros adyuvantes (Lavelle 2005, Bromader 1991, Cox and Coulter 1997).

Para definir la utilidad de toxina y protoxina Cry1Ac como adyuvantes vacunales es necesario comprender las bases celulares y moleculares del mecanismo inmunogénico y adyuvante. En células de vertebrado no se ha descrito la existencia de un receptor para las proteínas Cry1Ac. Estas proteínas son producidas como protoxinas cristalinas en los cuerpos parasitales de BT después de la ingestión por las larvas de insectos susceptibles, los cristales de las proteínas Cry1Ac son solubilizados y activados en el intestino medio siendo procesadas proteolíticamente por tripsina generándose las toxinas, sin embargo en base a los resultados de laboratorio en los que se ha encontrado que la protoxina Cry1Ac *in vitro* es capaz de activar linfocitos e inducir la producción de

citocinas en tiempos cortos (3 hrs.) estos datos sugieren que un receptor pudiera estar involucrado en el reconocimiento de las células por esta proteína (Vázquez padrón et al 1999a,b).

Estructura de Toxina Cry1Ac

La toxina Cry1Ac contiene ~1175 aminoácidos, está compuesta de una región NH₂-terminal, la región toxica y la región COOH. La región N-terminal está organizada en tres dominios como ha sido determinada por cristalografía de difracción de rayos-x (Grochulski et al., 1995; Galitsky et al., 2001). El dominio I, es un paquete de siete alfa hélices, involucrado en la formación del poro. El dominio II, formado por tres laminas beta antiparalelas y representa la parte más variable de la estructura en las Cry toxinas (Sanankaranarayanan et al., 1996; Shimizu y Morikawa, 1996). El dominio III, está formado por una β -plegada y dos laminas β -antiparalelas. Los dominios II y III están involucrados en la unión del receptor (Burton et al., 1999). Cinco regiones muy conservadas, en la región central de cada dominio o conectores, han sido identificados (Hofte and Whiteley, 1989). El dominio II de las toxinas Cry tiene un plegamiento estructural tipo lectina (como β -prisma plegada) es el fragmento más hipervariable de la región tóxica (Shimizu y Morikawa, 1996).

Antecedentes

Se ha reportado la existencia de receptores para las toxinas Cry1Ac en la membrana celular del epitelio del intestino medio de larvas de insectos (Vandlamudi et al., 1995) como la aminopeptidasa N 120 kDa (APN) (Knight et al., 1994). Únicamente en vertebrados ha sido reportada la unión de la protoxina Cry1Ac a enterocitos de ratón *in Vitro* (Vázquez-Padrón et al., 2000) y la unión no fue inhibida por GalNac, manosa o biotina sugiriendo que en mamíferos otro tipo de moléculas, diferentes a las que se une la toxina Cry1Ac en insectos, están interactuando con la protoxina Cry1Ac (Guerrero., et al 2007).

Se ha demostrado que la fuerte inmunogenicidad de la proteína Cry1Ac reside en la región amino terminal (Guerrero et al., 2004), ya que al inmunizar con la protoxina se encontró que la mayoría de los anticuerpos van dirigidos hacia la toxina. Además las toxinas Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Ac son similarmente inmunogénicas a la respectiva protoxina. Se ha sugerido también que las toxinas Cry1Ac pueden inducir respuestas inmunes humorales y celulares, debido a que inducen respuestas mezcladas de células Th1 y Th2. Después de la inmunización intranasal con toxina Cry1Ac se induce IFN γ además de cantidades significativas de interleucina 10. Asimismo se ha sugerido que las toxinas Cry1Ac podrían activar linfocitos y células presentadoras de antígeno, por la interacción molecular del dominio II con estos tipos celulares (Guerrero et al., 2004). Los datos antes mencionados sugieren la presencia de receptores para la región tóxica de la proteína Cry1Ac en células linfocitos o mieloides murina, debido a que la mayoría de las respuestas inmunes son dirigidas a la mitad de la región amino terminal.

Planteamiento

Se desconoce el mecanismo por el cual la toxina Cry1Ac ejerce sus efectos inmunomoduladores en linfocitos y células presentadoras de antígeno. En células de vertebrado no se ha descrito la existencia de un receptor de las toxinas Cry. Para contribuir a comprender las bases celulares y moleculares de los efectos inmunomoduladores de la toxina Cry1Ac de *Bacillus thuringiensis* en este trabajo se determinó si existe algún receptor para la toxina y protoxina Cry1Ac en alguna célula linfocítica o mielocítica murina. Para tal efecto se identificó por citometría de flujo las poblaciones linfocíticas y mielocíticas que unen toxina y protoxina Cry1Ac. También se realizaron ensayos de Inmunolocalización para conocer el sitio de unión de las proteínas a las células que las reconocen. Además se determinó por ensayos de blot-ligando el peso molecular relativo de las proteínas de células de bazo a las que se une la toxina y protoxina Cry1Ac.

Por otra parte, una vez que se ha determinado si existe algún receptor putativo de la toxina Cry1Ac en células de bazo se determinó si la interacción es homóloga a la descrita en insectos. Tomando en cuenta que los estudios sobre el modo de acción de las toxinas Cry1Ac han revelado que los ligandos con los que interactúan son principalmente N aminopeptidasas y E cadherinas que se localizan en el borde en cepillo epitelial del intestino de las larvas de insectos susceptibles. [Knight et al 1994, Vadlamudi et al 1995, Lee et al 1992]. Así como el hecho de que la toxina Cry1Ac de *Bacillus thuringiensis* ssp. Kurstaki HD-73 es una proteína formadora de poros específicamente tóxica para larvas de insectos lepidópteros que se une al receptor de superficie celular N-aminopeptidasa en el intestino

medio de *Manduca sexta* vía N-acetil-d-galactosamina (GalNac) (Pardo-López et al 2006, Dean et al 2001). En este proyecto se determinó si la unión de la toxina Cry1Ac a células linfoides y/o mieloides murina es mediada también vía GalNac y/o GlcNac. Para tal fin se realizaron ensayos de competencia con estos carbohidratos para dilucidar si la unión de proteína Cry1Ac a su potencial receptor se inhibe o se facilita.

Objetivo

Determinar si existe algún receptor para la protoxina y toxina Cry1Ac en células linfoides o mieloides de ratón.

Objetivos Particulares:

- A. Determinar si la toxina y protoxina Cry1Ac inducen activación de células linfoides y mieloides.
- B. Determinar los grupos celulares linfoides o mieloides que participan en el reconocimiento de toxina y protoxina Cry1Ac mediante citometría de flujo.
- C. Inmunolocalizar la unión de la toxina y protoxina en células linfoides y mieloides mediante microscopia confocal.
- D. Identificar el posible receptor de toxina y protoxina Cry1Ac en un extracto de células de bazo por ensayo de blot-ligando.
- E. Determinar si la unión de células de bazo a la toxina Cry1Ac depende de los carbohidratos N-acetil galactosamina y N-acetil glucosamina.

Metodología y estrategia experimental

Estrategia para la Identificación del posible receptor de proteínas

Cry1Ac

La estrategia que se siguió para determinar si existen los receptores para la toxina y protoxina Cry1Ac en células linfoides o mieloides murina descrita a continuación, también se observa en el diagrama de flujo.

- 1) Se purificaron protoxina y toxina Cry1Ac, una fracción de estas se conjugaron con Fluoresceína (FITC).
- 2) Para determinar si la toxina y protoxina Cry1Ac se unían a algún tipo celular, se incubaron suspensiones de células de bazo ajustadas a 2 millones de células por ml con las proteínas Cry1Ac marcadas con FITC durante 3 hrs. Se cosecharon las células y se incubaron con anti CD16/32 y se realizó la tinción de superficie con anticuerpos marcados con fluorocromos distintos a FITC (PE, Cy5, Cy5-PE, o APC) anti moléculas de superficie de linfocitos, macrófagos granulocitos o células dendríticas (por ejemplo anti: B220, CD11c, CD11b, CD3, CD4, CD8). Se lavaron, se fijaron y se analizaron por citometría de flujo para identificar si existe alguna población linfoide o mioide a la que la protoxina o la toxina Cry1Ac se unió preferentemente. Este procedimiento se utilizó también para la inmunolocalización de la unión de la toxina y protoxina Cry1Ac a macrófagos, linfocitos B y T. Para este caso se deshidrataron las células y

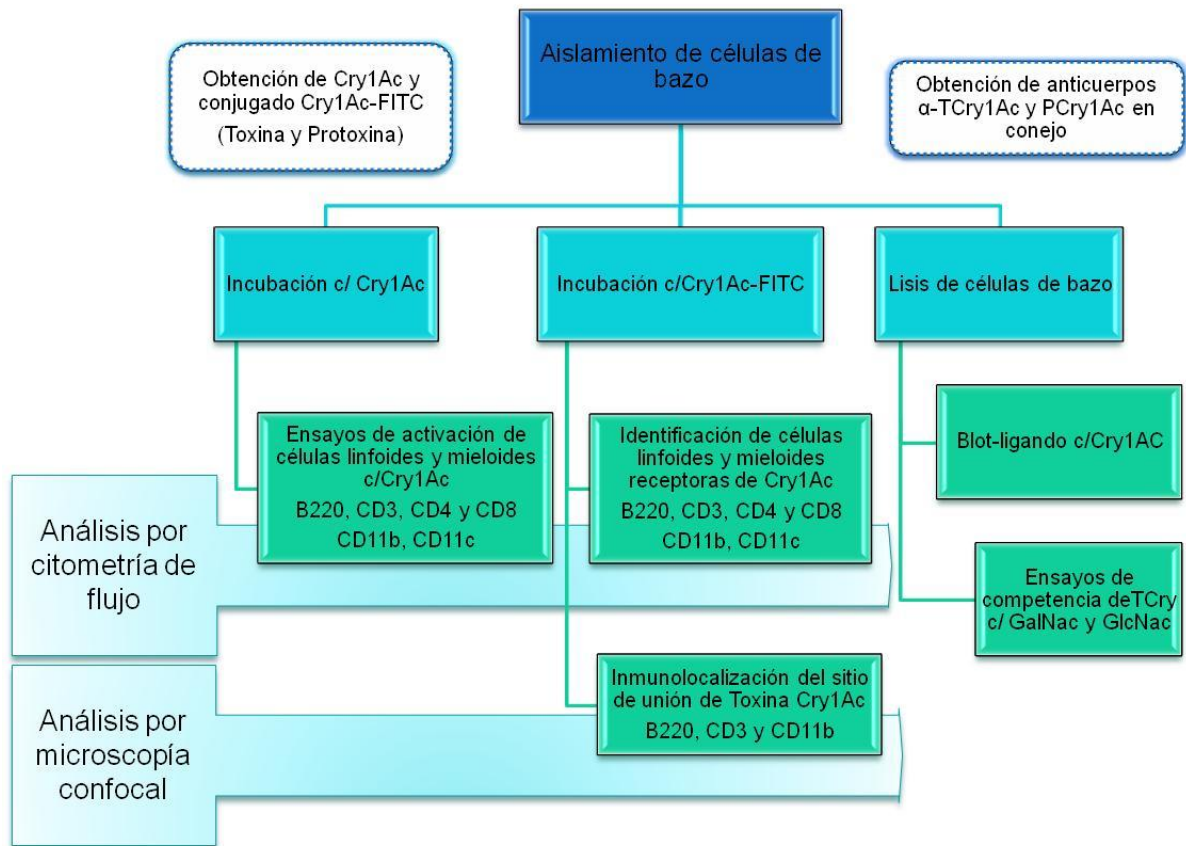
fueron fijadas en entellan y posteriormente se observaron en el microscopio confocal.

- 3) Para determinar si la toxina y la protoxina Cry1Ac inducen activación en células linfoides y mieloides. Se incubaron suspensiones de células de bazo ajustadas a 2 millones de células por ml con las proteínas Cry1Ac solas (sin FITC), se incubaron con anticuerpos fluorocromados anti: CD69 (linfocitos B y T) molécula involucrada en la proliferación de linfocitos. CD80 y CD86 (macrófagos y células dendríticas) que son moléculas coestimuladoras. Se cosecharon las células y se incubaron con anti CD16/32 y se realizó la tinción de superficie con anticuerpos marcados con fluorocromos distintos a (FITC, PE, Cy5, Cy5-PE, o APC) anti moléculas de superficie de linfocitos, macrófagos granulocitos o células dendríticas (por ejemplo anti: B220, CD11c, CD11b, CD3, CD4, CD8). Se lavaron, se fijaron y se analizaron por citometría de flujo para identificar si toxina y protoxina Cry1Ac inducen el incremento en la expresión de CD69, CD80 y CD86.
- 4) Para identificar los pesos moleculares de las proteínas de células de bazo a las que se unían las proteínas (toxina y protoxina Cry1Ac). Se realizaron ensayos de blot-ligando, para lo cual se obtuvieron extractos de proteínas totales y de membrana de células de bazo mismos que se corrieron por electroforesis SDS-PAGE y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa para realizar ensayos de blot-ligando. Las membranas con los extractos de proteínas se incubaron con las proteínas Cry1Ac, y después se incubaron con suero de conejo anti toxina y protoxina Cry1Ac, y posteriormente se

incubaron con proteína A anti Ing. de conejo acoplado a peroxidasa y se reveló con sustrato peróxido de hidrógeno 4-cloronaftol.

- 5) Para determinar si la unión de toxina Cry1ac a células de bazo es dependiente de carbohidratos. Se realizaron ensayos de competencia en los que, una vez identificados los pesos moleculares de las bandas reveladas correspondientes a los receptores putativos de la toxina Cry1Ac, se repitieron los ensayos que se describen en el inciso, c), y ahora estas membranas fueron preincubadas con exceso de N-acetil glucosamina, N-acetil galactosamina, para determinar si la unión fue bloqueada, lo que es indicador de que estos ligandos están involucrados con el o los receptores de las proteínas Cry1Ac en células de mamífero, tal y como se ha descrito en células intestinales de insectos en los que se ha encontrado que la toxina Cry1Ac se une a un receptor N aminopeptidasa vía el carbohidrato (GalNac).

Diagrama de flujo



Obtención de la toxina Cry1Ac

La protoxina Cry1Ac se obtuvo de una cepa de *E. Coli* recombinante, bacteria que posee un plásmido que incluye el gen que codifica para la protoxina Cry1Ac, la cual fue crecida en medio Luria-Broth más antibiótico Ampicilina 100µg/ml, y se incubados por 48h en agitación constante (250-300rpm) a 37 °C, se cosecharon las células centrifugando a 10 000rpm durante 10min a 4 °C, las bacterias fueron lisadas en presencia de Lisozima y Tris 0.05 M-EDTA 1 mM, los cristales de Protoxina Cry1Ac se obtuvieron al sonicar en varios ciclos de 5x3 min en hielo a 100 de amplitud, entre 17-20 watts, solubilizando los restos de bacterias en amortiguador de carbonatos 0.1M pH 9.6 mas 10mM de DTT, eliminando los restos mediante centrifugación y recuperando la protoxina Cry1Ac en el sobrenadante, la protoxina fue examinada mediante SDS-PAGE (Laemmli, 1970) y la concentración de proteína fue determinada utilizando el método de Bradford (Bradford, 1976). La purificación de la protoxina Cry1Ac se llevo a cabo mediante centrifugación con filtros de exclusión molecular de 100 kDa. Para la obtención de la toxina a partir de la protoxina se llevo a cabo una digestión con tripsina (1:50 w/w) por una hora a 37 °C (Burton, 1999), inhibiendo la acción de proteasas con PMSF (fenil metil sulfonil fluoruro) 100mM (Research organics).

Conjugado Toxina Cry1Ac-FITC

La fluoresceína (vial con 1mg) se reconstituyó con 100 µl de DMF (dimetilformamida) fue pipeteado hasta disolver en amortiguador de Boratos

(0.67M), 1 ml a pH 8.5. Volumen de 100µl se cambio a una solución amortiguadora de boratos mediante diálisis dejando flotar sobre este 24hrs a 4 °C en agitación constante y oscuridad total. Las cantidades se calcularon con las siguientes formulas:

$$\text{ml proteína} \times \frac{\text{mg de proteína}}{\text{mmol proteína}} \times \frac{24\text{mmol FITC}}{\text{mmol FITC}} = \text{mmol FITC}$$

$$\text{ml de proteína} \quad \text{mg de proteína} \quad \text{mmol proteína}$$

$$\text{ml proteína} \times \frac{1.8 \mu\text{g Cry1Ac}}{\text{mmol proteína}} \times \frac{24\text{mmol FITC}}{\text{mmol FITC}} = 0.00061\text{mmol FITC}$$

$$\text{ml de proteína} \quad 70,000 \text{ kDa} \quad \text{mmol proteína}$$

Calcular la cantidad de FITC para la reacción:

$$\text{Mmol FITC} \times \frac{389\text{mg}}{\text{mmol FITC}} \times \frac{100\mu\text{l}}{1\text{mg}} = \mu\text{l FITC}$$

$$\text{mmol FITC} \quad 1\text{mg}$$

$$0.00061\text{Mmol FITC} \times \frac{389\text{mg}}{\text{mmol FITC}} \times \frac{100\mu\text{l}}{1\text{mg}} = 23.72 \mu\text{l FITC}$$

$$\text{mmol FITC} \quad 1\text{mg}$$

Se Agregó FITC a la toxina y protoxina Cry1Ac y se incubó para cada proteína la mezcla de reacción durante 60 min a T.A. en oscuridad total se removió el exceso de fluorescencia en una columna de desalación reconstituida con 25 ml de PBS se adicionó la muestra de proteína marcada con FITC, se dejo que la proteína entrara en la columna y fluyera en ella para posteriormente coleccionar en tubos de ensayo en porciones de 0.5 ml del amortiguador. Se monitoreó el contenido de proteína midiendo la absorvancia. Para cada fracción a 280 nm el primer pico apareció

cuando 1 ml de la proteína marcada paso por la columna, este pico contenía a la proteína marcada y esta fracción pudo ser combinada. La proteína que no reacciono con la fluoresceína salió de la columna en fracciones subsecuentes las cuales se descartaron una vez que se confirmó que todas las fracciones hayan sido colectadas. Finalmente se regeneraron columnas con 50ml de PBS. Para comprobar la conjugación Toxina y protoxina Cry1Ac-FITC, se corrió el conjugado en SDS-PAGE y se verificó en un transiluminador UV la fluorescencia de la banda, y que coincidiera con el PM esperado de 65 000 kDa para toxina Cry1Ac y 133 kDa para protoxina Cry1Ac.

Obtención de células de bazo

Para cada ensayo se obtuvo el bazo de un ratón testigo Balb/c, se maceró con tela de organza y con embolo de plástico en 2 ml de RPMI, se filtró con tela de organza colocando el filtrado en un tubo cónico de 15ml llevando el volumen a 12ml de RPMI, se centrifugó 10´ a 1500 rpm a 4 °C, se recuperó la pastilla. Para lizar las células eritroides, se agregaron 3ml de amortiguador de lisis a 4 °C y se dejó reposar 7 min a temperatura ambiente, cumplido el tiempo de lisis se llevó a 12 ml con PBS estéril a T.A. y se centrifugó 10´ a 1500 rpm, se recuperó la pastilla y agregaron 500 µl de suero de neonato de bovino, se llevaron a 10ml con RPMI y se resuspendieron las pastillas, se diluyeron 1:10 para conteo de células.

Incubación de toxina Cry1Ac–FITC con Células de Bazo

Las células bazo de ratón Balb/c se incubaron en suspensiones ajustadas a 2×10^6 /ml células con las proteínas (toxina y protoxina) Cry1Ac marcadas con FITC por 3 hrs. Se cosecharon las células y se incubaron primero con anti CD16/32 (1 μ l) y posteriormente se realizó la tinción de superficie con anticuerpos marcados con fluorocromos distintos a FITC (PE, Cy5, Cy5-PE, o APC) anti moléculas de superficie de linfocitos, macrófagos granulocitos o células dendríticas (por ejemplo anti: B220, CD11c, CD11b, CD4, CD8). Se lavan, se fijan y se analizan por citometría de flujo para identificar si existe alguna población linfoide o mioide a la que la TCry1Ac y PCry1Ac se unieron preferentemente, posteriormente cada conjugado fue leído en el citómetro.

Identificación de receptor para la Toxina-Cry1Ac

Obtención de suero α -toxina Cry1Ac

Se inmunizó una coneja de 3 meses de edad con una mezcla de toxina Cry1Ac 500 μ g en 500 μ l de adyuvante completo de Freund en relación 1:1 la primera aplicación, la inmunización se distribuyó en distintas partes del cuerpo, se inyectaron 5 inmunizaciones como refuerzos con adyuvante incompleto de Freund utilizando la misma cantidad de toxina relación 1:1, los últimos 3 refuerzos se realizaron con 300 μ g de toxina Cry1Ac misma relación con adyuvante incompleto de Freund.



Figura 1. Obtención de suero de coneja con anticuerpos α -PCry1Ac y α -TCry1Ac, mediante sangrado de la oreja.

Para la obtención del suero se colocó a la coneja en una caja de acrílico sujetadora de conejos para inmunizarlo y se le cubrieron los ojos, se realizaron dos sangrados de oreja, calentando con un foco de 100 watts hasta dilatar las venas, posteriormente se realizó un corte transversal vertiendo la sangre en un tubo cónico de 15 ml. En el primer sangrado se obtuvo 1 tubo de 10 ml y en el segundo sangrado se obtuvieron 2 tubos para un total de 30ml de sangre, la cual se dejó coagular a temperatura ambiente, se despegó el coágulo de las paredes del tubo, se colectó el suero y se congeló a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se probó la especificidad realizando un inmunoblot con toxina y protoxina para constatar la presencia de los anticuerpos α -TCry1Ac y α PCry1Ac, dicha prueba mostró que el anticuerpo del suero se adhiere específicamente a las proteínas Cry1Ac.

Extracto de células de bazo

Una vez obtenidas las células se lavaron en PBS frío $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se tiró el sobrenadante adicionando 1 ml de amortiguador de RIPA (Tris HCl 50 mM, NaCl

150 mM, EDTA 1mM, Tritón 100X 1%) para 1×10^8 células, y se agregaron 100µl del cocktail de inhibidores Mini Complete, se incubaron en hielo por 20', agitando 2 o 3 veces durante este periodo de tiempo, se centrifugaron por 5' a 4 °C a 10,000 rpm en micro centrífuga, se transfirió el sobrenadante en tubos eppendorf limpios y se hicieron alícuotas de 50µl, se almacenaron a -20 °C para uso diario o a -80 °C para su uso a largo plazo. Se evito repetir el descongelar. La determinación de proteínas se hizo por el método de Lowry modificado.

Transferencia de Geles a membranas de PVDF

Se corrieron las muestras de extracto de células de bazo en geles SDS-PAGE, se obtuvieron 2 geles, uno se tiñó con azul de Commassie para verificar si el patrón de proteínas era adecuado, el gel restante se utilizó para la transferencia de las proteínas: con 2 fibras Scotch-Brite blancas, papel filtro grueso Watman #3 doble, papel PDVF hidratado con Metanol y posteriormente con PBS-T 1% 1 hr; tamaño 7x10cm, gel SDS-PAGE, papel filtro 2 fibras; debe mantenerse en amortiguador de transferencia mientras se arma el paquete. Se colocó el paquete en el equipo para transferencias (sandwichera de color negro con transparente); se verificó que el papel vaya hacia el lado positivo de la cámara de transferencia, y se conectó a la fuente de poder a 100 volts con un amperaje de 200 por 1 hr. Pasado el tiempo se colocó el papel de PDVF en el colorante de rojo Ponceu en agitación ligera hasta que aparezcan las bandas (el gel utilizado en la transferencia se tiño con azul de Commassie para verificar que la transferencia se haya realizado correctamente), para poder cortar las tiras recuperando las zonas donde se encuentran las

bandas, una vez que se tuvieron las tiras, se destiñeron con agua destilada y se realizó la inmunodetección.

Ensayo de blot-ligando

Se bloqueo el papel de PVDF con leche sveltys al 2% para los ensayos con PCry1Ac y con albúmina al 2% para ensayos con TCry1Ac en PBS-Tween toda la noche a 4 °C, se lavó 3 veces con PBS-T, incubaron a temperatura ambiente con Toxina Cry1Ac y/o protoxina Cry1Ac 100 µg/µl de toxina en PBS-T por 2 hrs, se lavaron con PBS-T 3 veces por 5', incubaron con suero de conejo 1:1000 (α-Toxina Cry1Ac) por 2 hrs a temperatura ambiente, se lavaron con PBS-T 3 veces por 5', incubaron con anticuerpo de chivo anti-conejo peroxidado (PCry1Ac) (Jackson immunorecherch laboratorios, INC.), con proteína A peroxidada (TCry1Ac) diluido 1:1000 a temperatura ambiente por 1hr, se reveló con solución sustrato de cromógeno (4-cloronaftol y H₂O₂), hasta que aparecieron las bandas y se lavaron con agua.

Localización del sitio de unión de toxina Cry1Ac a células linfoides y mieloides

Se obtuvo la suspensión celular de bazo por la técnica antes descrita y se hicieron alícuotas de 2×10^6 en cada tubo, se centrifugó 5 min a 1500 rpm a 4 °C y se decanto el sobrenadante, a la pastilla se le agregaron 30µl de la solución de

marcadores fluorocromados y se incubó 30 min a 4 °C en oscuridad, pasado el tiempo se adicionó 1ml de PBA, se resuspendió y centrifugó 1500 rpm 5 min a 4 °C, se decantó y se agregaron 300 µl de paraformaldehído al 1% se incubaron 20 min a T. A. se adicionó 1 ml de agua destilada y centrifugó a 150 rpm por 5 min a 4 °C, se repitió dos veces el paso anterior, en el ultimo lavado se decantó y se adicionó 100 µl de H₂O y se re suspendió, de esta solución se colocaron 4 gotas de 10 µl en el porta objeto y se dejaron secar. Posteriormente se cubrieron con Metanol y dejaron secar (post fijación) se deshidrataron en OH 90% por 1 min, en OH 100% por 1min y xilol 1 min, después de esto se fijaron con entellan. Nota: se guardaron en oscuridad y a -20 °C.

Análisis estadístico

Los datos fueron analizados usando el análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguida por la prueba estadística de Tukey con el programa GraphPad Prism 4. En el que se compararon los porcentajes de células linfoides y mieloides que unen toxina y protoxina Cry1Ac. Los datos son expresados como la media ± el error estándar. Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas a $p \leq 0.01$.

Resultados

Obtención de proteínas Cry1Ac

Digestión de protoxina

Se obtuvo una cosecha de protoxina Cry1Ac 120 kDa (Imagen 2, al centro) y se logró obtener toxina Cry1Ac 65 kDa pura (Imagen 2 a la derecha), a partir de una digestión de protoxina utilizando la enzima digestiva, tripsina.

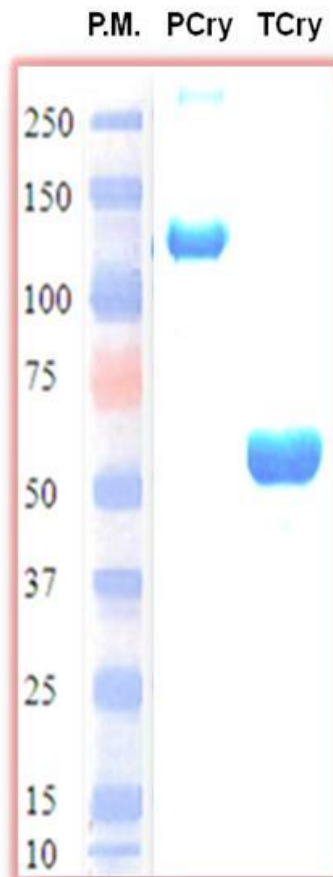


Figura 2. Toxina y protoxina puras en un Gel SDS-PAGE 10%. Muestra PCry1Ac (protoxina) de 133 kDa (1), y TCry1Ac (toxina) de 65 kDa (2). PM marcador de peso molecular (a la izquierda).

Conjugado de toxina Cry1Ac-FITC

Se obtuvieron conjugados de toxina y protoxina Cry1Ac los cuales fueron evaluados corriendo dichos complejos en geles de SDS-PAGE, se obtuvo la imagen en un fotodocumentador de iluminación ultravioleta, dicha luz excita el fluorocromo FITC. La foto del conjugado se muestra en la en la figura 3.

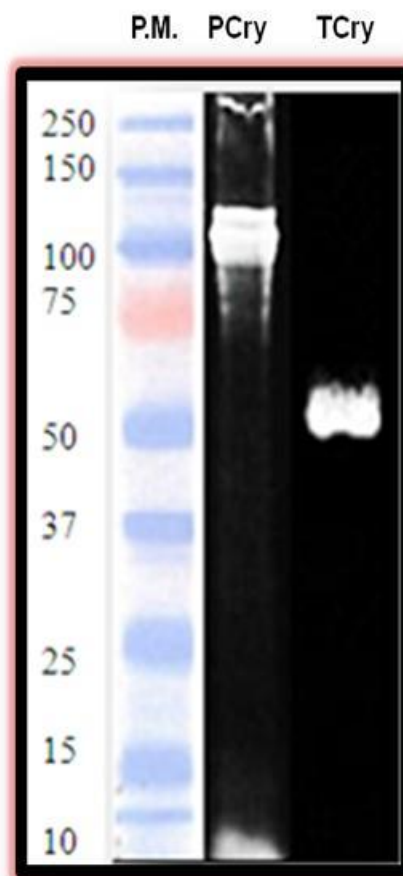


Figura 3. Proteínas Cry1Ac conjugadas con FITC en un Gel de SDS-PAGE imagen obtenida con iluminación ultravioleta. PCry1Ac (al centro) y TCry1Ac (a la derecha), PM (a la izquierda).

LA toxina y protoxina Cry1Ac inducen activación de Linfocitos y mielocitos evaluada por la expresión de CD69, CD80 y CD86

Activación de Linfocitos T

Las proteínas Cry1Ac (toxina y protoxina) tienen la capacidad de inducir incremento en la expresión de CD69 en linfocitos T, CD4 y CD8. La molécula CD69 es una lectina tipo C involucrada en la proliferación de linfocitos y en la expresión de diferentes moléculas de superficie (Janeway et al 2000), lo que indica que estas proteínas tienen el potencial de inducir activación en estos linfocitos, estas células tienen funciones efectoras, los resultados encontrados se muestran en las siguientes imágenes en histogramas de citometría de flujo. Nota: Este ensayo se realizó con las proteínas PCry1Ac y TCry1Ac no conjugadas con FITC.

11

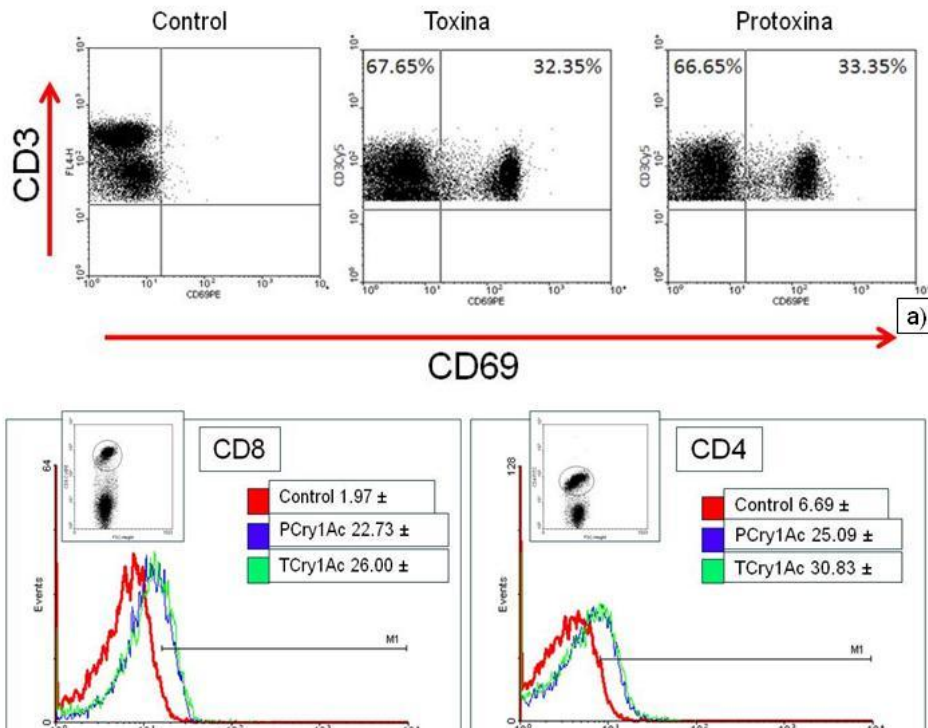


Figura 4. La toxina y protoxina Cry1Ac inducen activación de linfocitos T. a) Dot-plot's de células CD3 que presentan incremento en la expresión de CD69 inducido por toxina (al centro) y protoxina (a la derecha) Cry1Ac con respecto al control (a la izquierda). b) y c) Histogramas que muestran el porcentaje de células TCD4 y TCD8 que mostraron un incremento en la expresión de CD69 inducido por toxina y protoxina.

Linfocitos B

Las proteínas Cry1Ac (toxina y protoxina) tienen la capacidad incrementar la expresión de CD69 en células B (B220) este dato indica que las dos proteínas tienen la capacidad de inducir activación de los linfocitos B, aunque TCry1Ac presenta una mayor proporción que PCry1Ac.

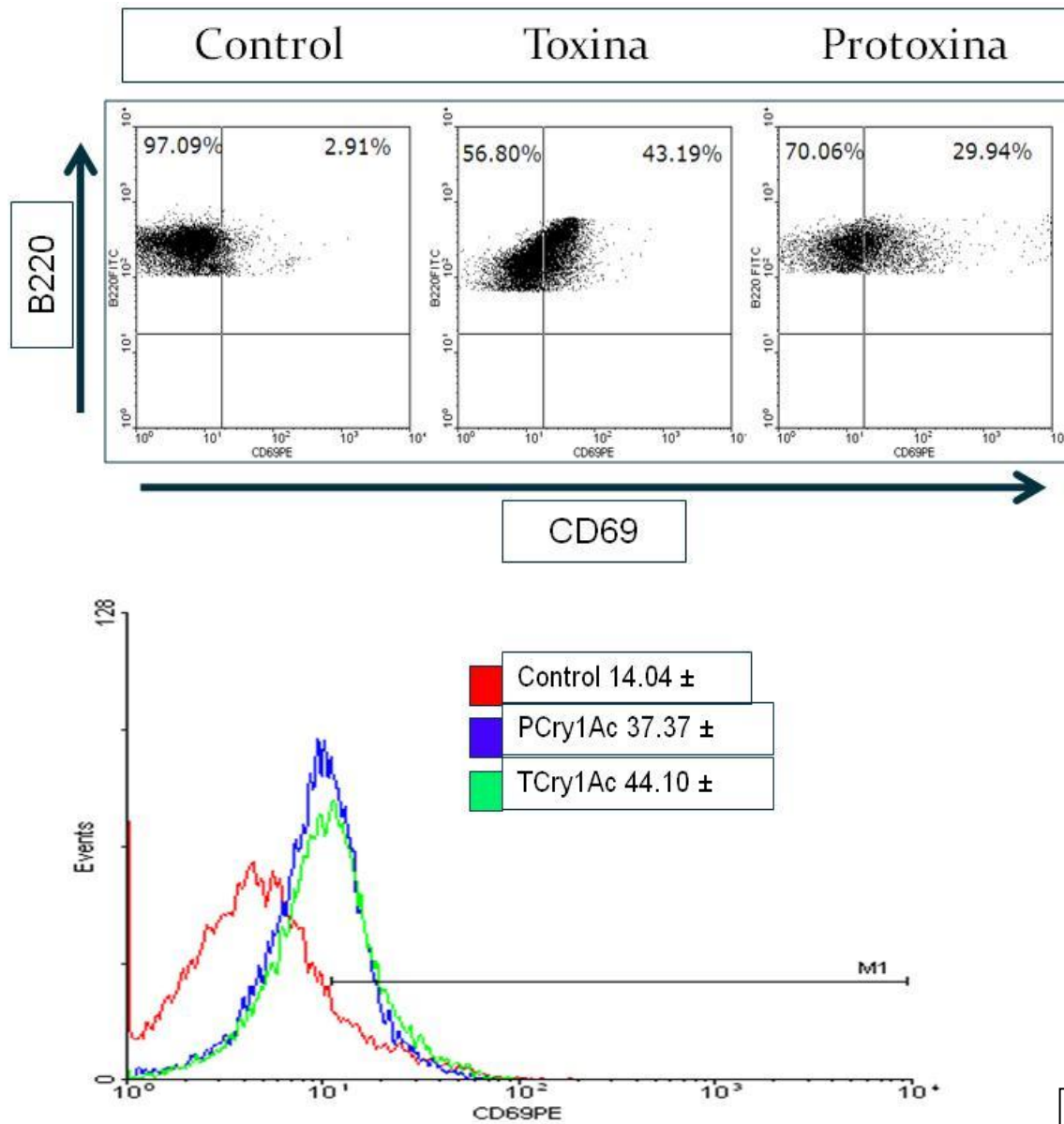


Figura 5. La toxina y protoxina Cry1Ac inducen activación de linfocitos B. a) Dot-plot's de células B (B220) que presentan incremento en la expresión de CD69 inducido por Cry1Ac toxina (verde) y protoxina Cry1Ac (azul) con respecto al control (rojo).

Mielocitos

Los datos muestran que las proteínas PCry1Ac y TCry1Ac también activan células mieloides debido a que tienen la capacidad de inducir incremento en la expresión de B7: B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), las B7 son moléculas coestimuladoras tan importantes ya que en presencia de estas en la presentación de antígeno por las APC, estimulan la proliferación de las células *Tnaive*. Los mielocitos presentan un mayor porcentaje de células activadas que los porcentajes de linfocitos activados. Las dos proteínas obtuvieron porcentajes similares de activación, aunque se repite el patrón en el que TCry1Ac presenta mayores porcentajes que PCry1Ac.

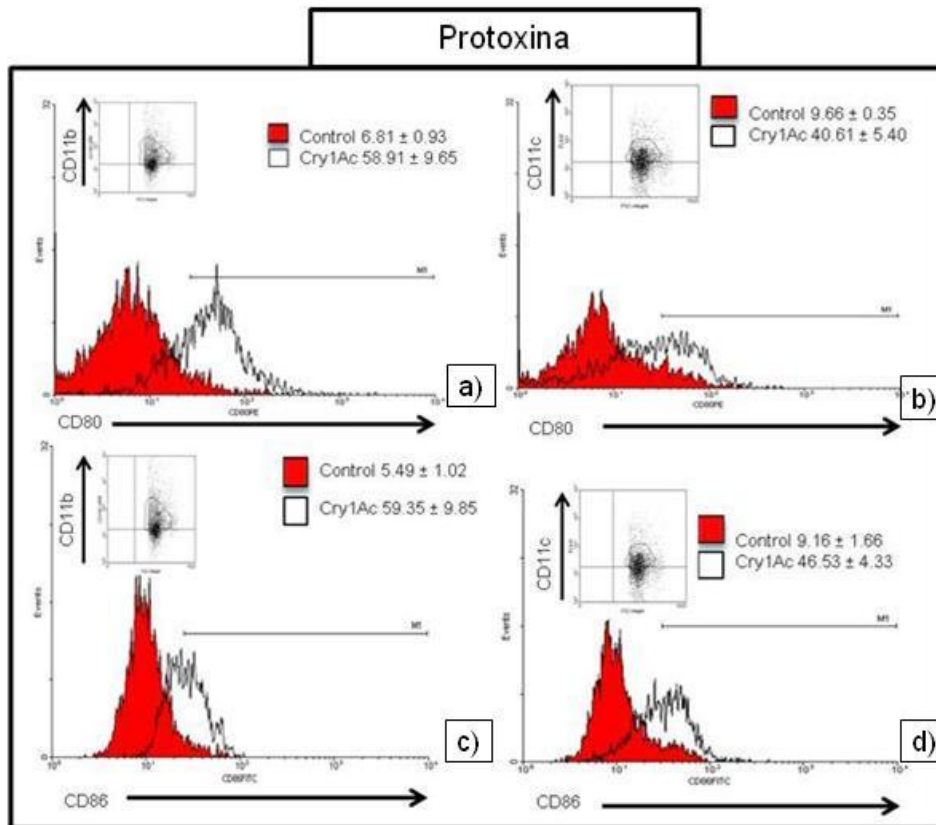


Figura 6. Protoxina Cry1Ac induce activación de Mielocitos. Los histogramas muestran poblaciones de mielocitos que presentan porcentajes de incremento en la expresión de CD80 y CD86, en presencia de Protoxina Cry1Ac. a) CD11b con CD80. b) CD11c con CD80. c) CD11b con CD86. d) CD11c con CD86.

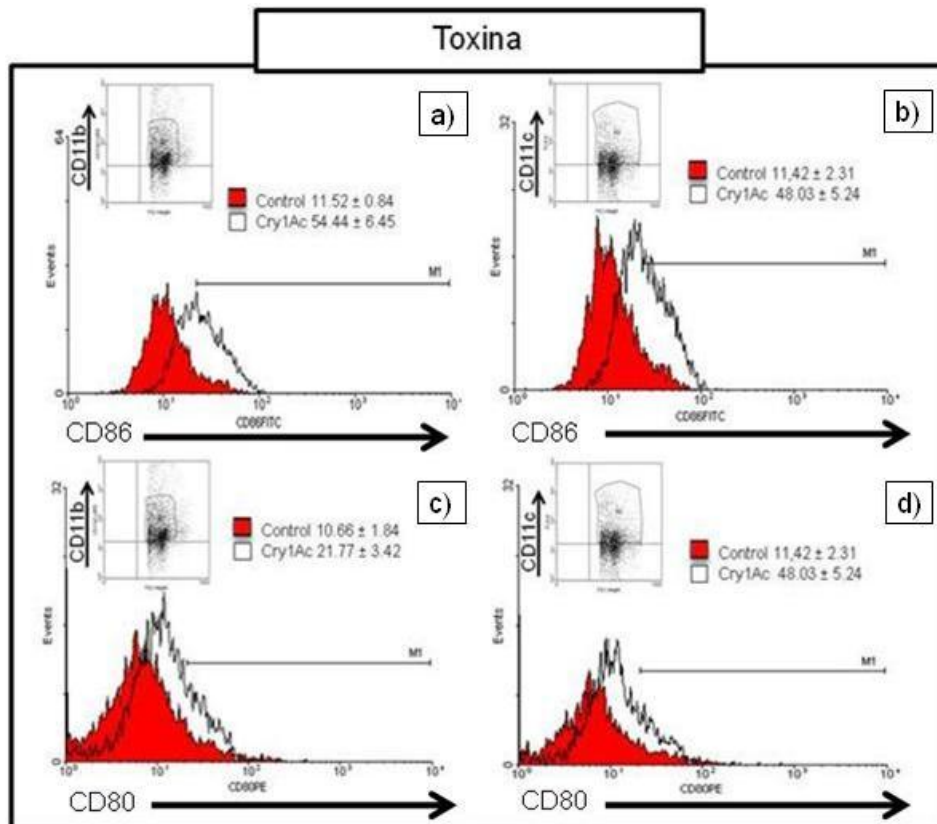


Figura 7. Toxina Cry1Ac induce activación de Mielocitos. Histogramas que muestran poblaciones de mielocitos que presentan un porcentaje de incremento en la expresión de CD80 y CD86, en presencia de Toxina Cry1Ac. a) CD11b con CD86, b) CD11c con CD86, c) CD11b con CD80, d) CD11c con CD80.

La toxina y protoxina Cry1Ac se unen a células linfoides y mieloides de bazo

Se encontró que la toxina Cry1Ac-FITC y la protoxina Cry1Ac-FITC son unidas por células linfoides y mieloides, la toxina Cry1Ac-FITC se unió a un 25.30% de linfocitos B, CD3 23.54% mientras que células mieloides evaluadas obtuvieron porcentajes más altos de adhesión: macrófagos y células dendríticas, 50.67% y un 45.63% respectivamente; mientras que protoxina Cry1Ac se unió a proporciones similares para los distintos tipos celulares: macrófagos 47.33%,

células dendríticas 37.66%, linfocitos B 26.77%, linfocitos T 24.39%, los porcentajes obtenidos para las dos proteínas son muy similares, aunque TCry1Ac muestra un incremento porcentual mayor en todos los casos con respecto a PCry1Ac.

Porcentaje de total células que fijaron Cry1Ac FITC

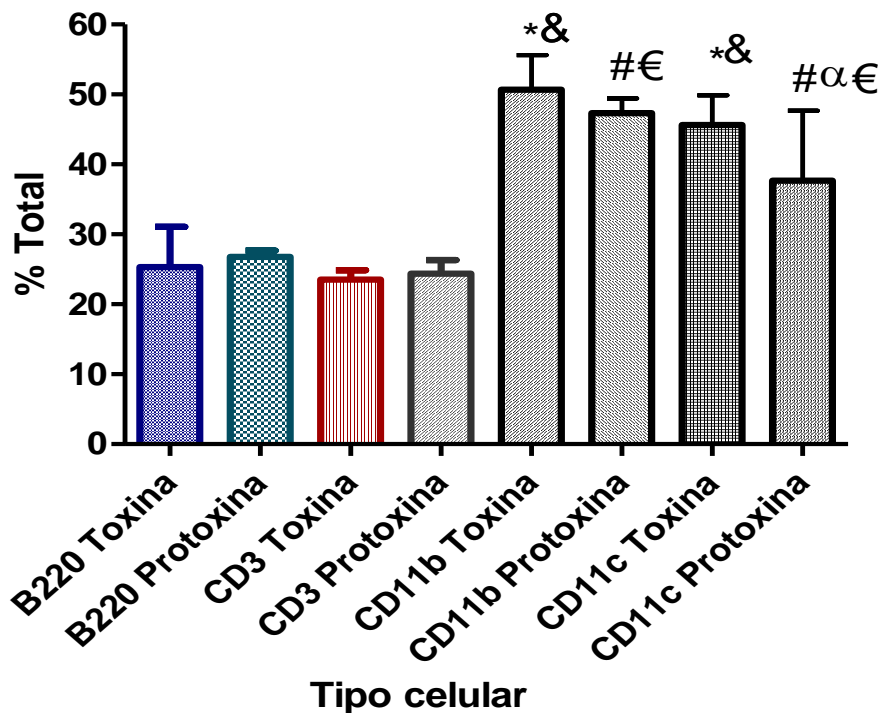


Figura 8. Porcentajes de las poblaciones de células linfoides (B220 y CD3) y mieloides (CD11b y CD11c) a las que se unen toxina y protoxina Cry1Ac. Se observa que la unión de toxina y protoxina Cry1Ac al mismo tipo celular es muy parecida y no presenta diferencias significativas. Sin embargo es notable que toxina y protoxina Cry1Ac se unen preferentemente a las células mieloides que a las células linfoides, debido a que los macrófagos (CD11b) y células dendríticas (CD11c) unen en mayor proporción a la toxina y protoxina Cry1Ac que los linfocitos B (B220) y los linfocitos T (CD3), de manera significativa. * En comparación a B220 Toxina $P < 0.001$; # en comparación a B220 Protoxina $P < 0.001$; α en comparación a B220 Protoxina $P < 0.01$; & en comparación a CD3 Toxina $P < 0.001$; € en comparación a CD3 Protoxina $P < 0.001$.

Linfocitos T

Los linfocitos T CD3, CD4 y CD8; unen toxina Cry1Ac en porcentajes muy similares con excepción de CD8-toxina que mostro porcentajes más altos que el resto de las muestras un 18.65% de CD3, del cual el 27.45% son CD8 y el 22.96% son linfocitos CD4, mientras que para el control positivo protoxina Cry1Ac se adhirieron 19.06%, de los cuales el 22.89% fueron linfocitos CD8 y el 23.85% fueron CD4.

Regiones de células mieloides

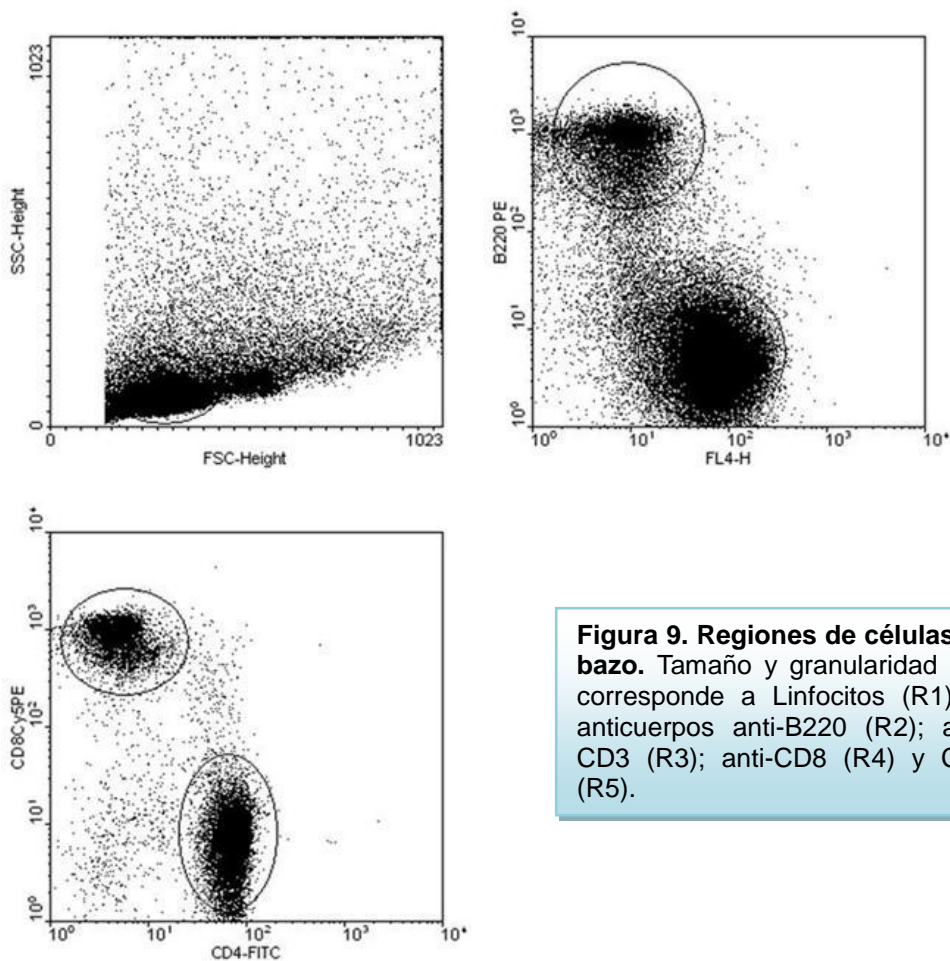


Figura 9. Regiones de células de bazo. Tamaño y granularidad que corresponde a Linfocitos (R1), Y anticuerpos anti-B220 (R2); anti-CD3 (R3); anti-CD8 (R4) y CD4 (R5).

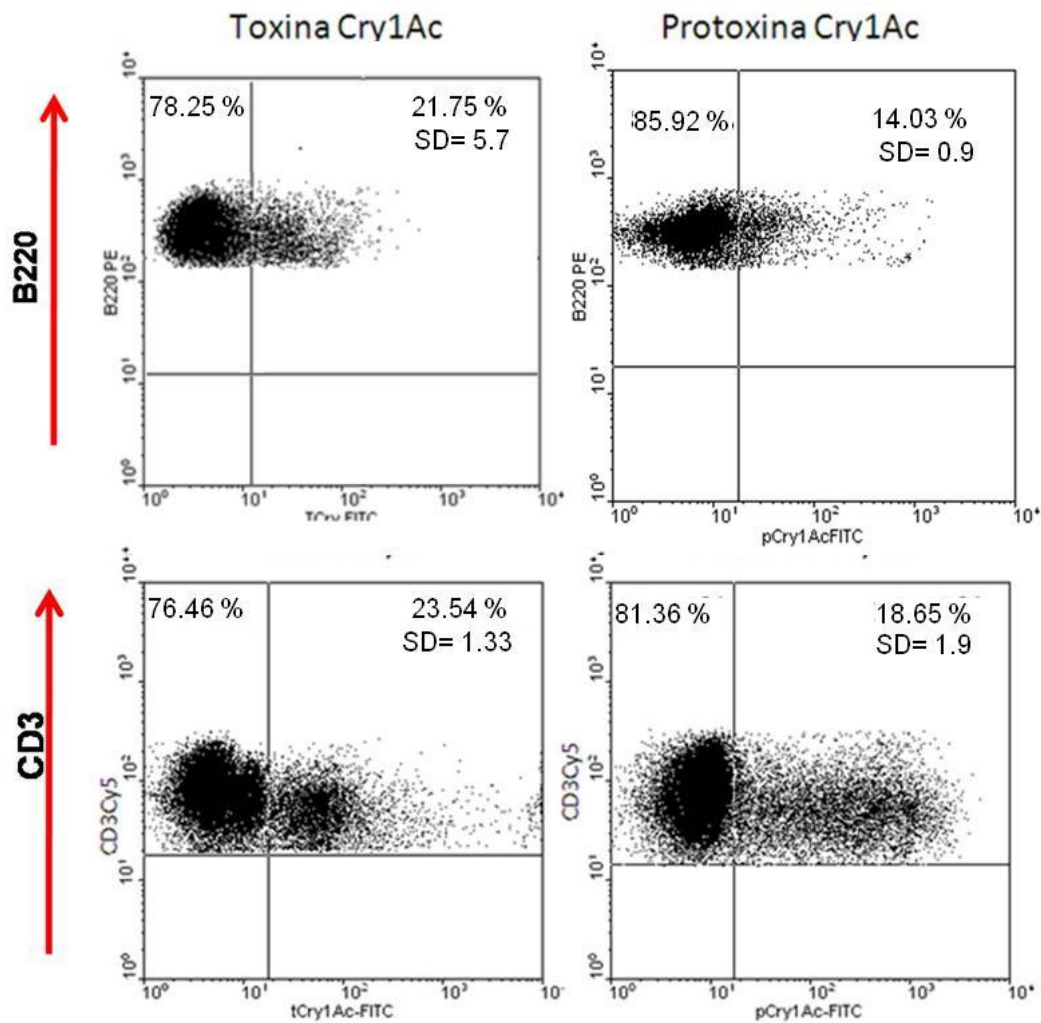


Figura 10. Porcentajes de linfocitos B y T de bazo, que reconocen a la toxina y protoxina Cry1Ac. Se muestra Dot plot representativo de la región (R1) correspondiente al tamaño y granularidad de linfocitos.

Comparación de Linfocitos B y T

Comparando las poblaciones de linfocitos T y B a las que se unen las proteínas TCry1Ac y PCry1Ac, obtuvieron porcentajes más altos las células T (CD3) 23.54 % y 18.65 % (toxina y protoxina respectivamente) que los porcentajes de las células B (B220) 21.75 % y 14.03 % (toxina y protoxina respectivamente).

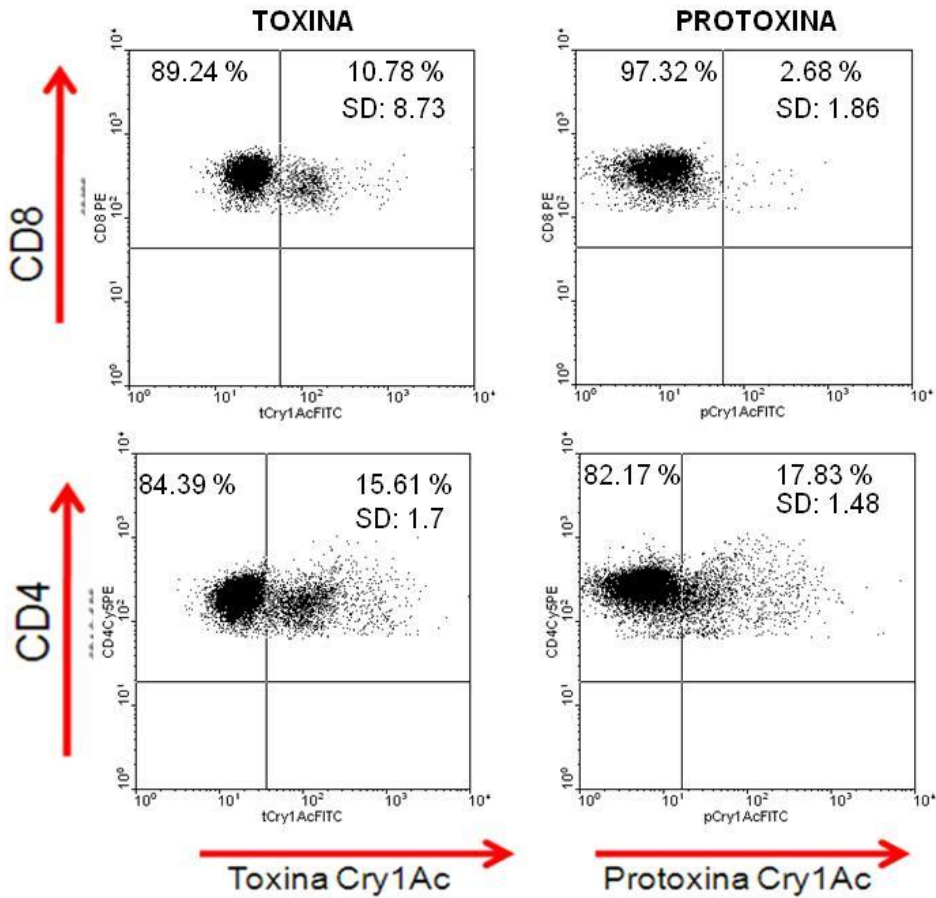


Figura 11. Dot plot's de los porcentajes de subpoblaciones de linfocitos T, CD4 y CD8 a las que se unen a la toxina y la protoxina Cry1Ac. Se muestran Dot plot's representativos correspondientes a las regiones R1 (linfocitos) y R2 (CD3+).

Linfocitos B

Los linfocitos B (CD19 y B220), presentaron adhesión de toxina y protoxina Cry1Ac. Mostrando una diferencia marcada con respecto a toxina-CD19 de los demás grupos con 38.75% mientras que protoxina-CD19 obtuvo 21.75%. Para el marcador B220 el promedio de adhesión, se mantuvo similar para los dos casos (toxina y protoxina) 36.42%, 14.03% respectivamente.

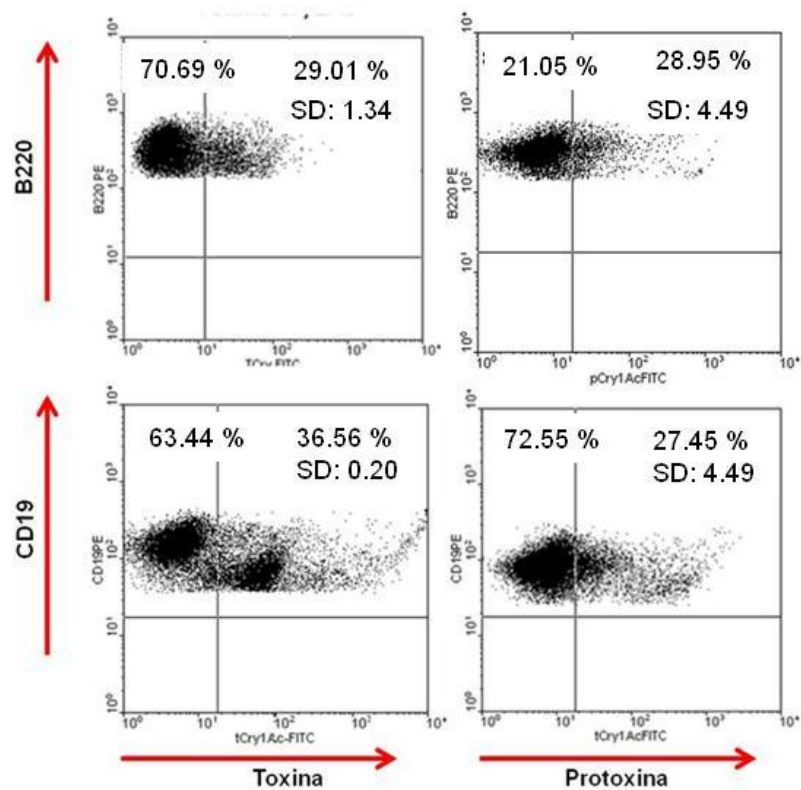


Figura 12. Dot-plot's que muestran los porcentajes de células de bazo B220 y CD19 que unen toxina y protóxina Cry1Ac. Los ensayos de B220 y CD19 muestran porcentajes de unión similares entre toxina y protóxina Cry1Ac.

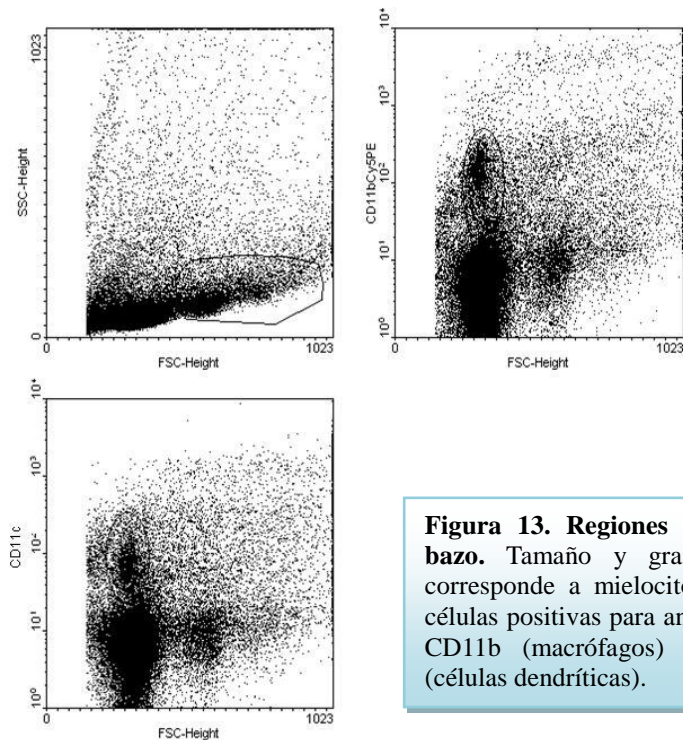


Figura 13. Regiones de células de bazo. Tamaño y granularidad que corresponde a mielocitos (R1), y las células positivas para anticuerpos anti-CD11b (macrófagos) y anti-CD11c (células dendríticas).

Mielocitos

Se observó que en los macrófagos (CD11b) y células dendríticas (CD11c) obtuvieron promedios similares adhesión de toxina y protoxina a sus receptores: macrófagos 45.66% para toxina; 48.35% para protoxina. En células dendríticas el promedio para toxina es de 50.90% y el de protoxina 49.66%.

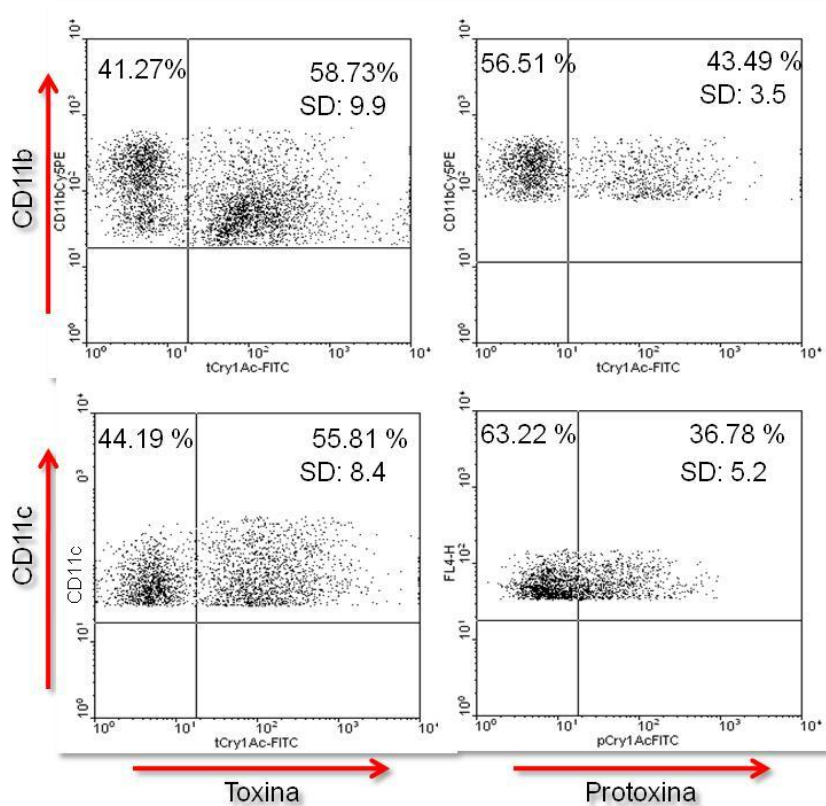


Figura 14. Toxina y protoxina Cry1Ac se unen a Mielocitos (CD11b y CD11c). Dot-plot's que muestran los porcentajes de células de bazo CD11b (macrófagos) y CD11c (dendríticas) que unieron toxina y protoxina Cry1Ac

Inmunolocalización de unión de toxina y protoxina Cry1Ac en macrófagos y linfocitos

Para corroborar y localizar la unión de la Toxina y la Protoxina Cry1Ac a linfocitos B, T y macrófagos, realizamos el análisis por microscopía confocal de las células marcadas con Cry1Ac-FITC (toxina y protoxina) por 3 hrs y posteriormente con anticuerpos α -marcadores de superficie de linfocitos B, T y macrófagos (CD45, CD3 y CD11b respectivamente).

Se observan Macrófagos marcados con CD11b-Cy5 (azul), y toxina Cry1Ac-FITC (verde) analizadas en el microscopio confocal: a) TCry1Ac-FITC; y d) PCry1Ac-FITC; b) CD11b-Cy5; e) CD11b-Cy5; c) y f) muestran células dobles positivos (overlay) para las dos tinciones. Nota: las imágenes muestran diferentes escaneos de profundidad haciendo visible que el marcador toxina Cry1Ac-FITC se adhiere a su receptor a nivel de la membrana plasmática.

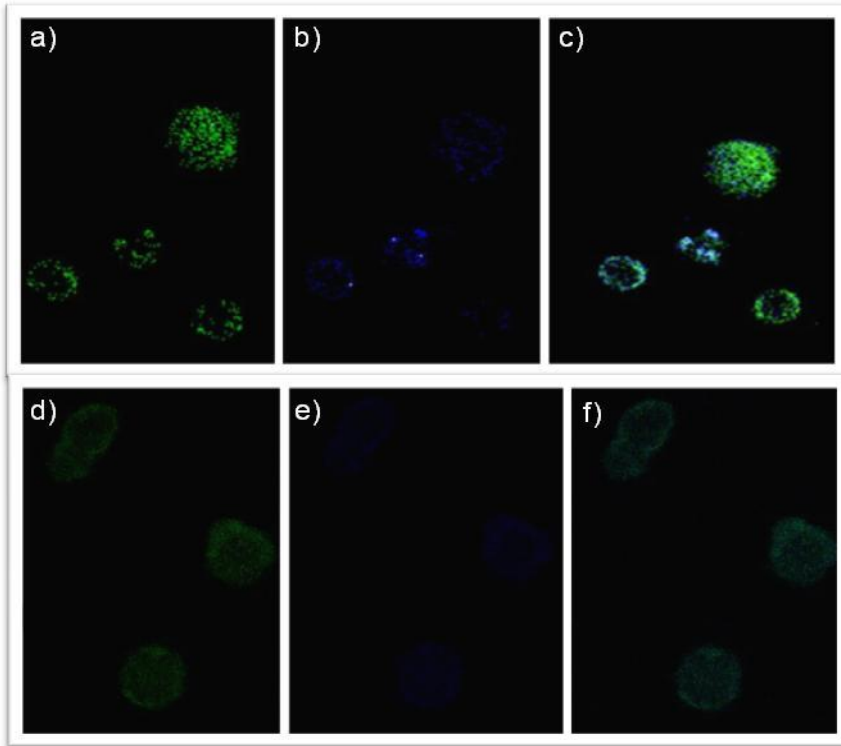


Figura 15. Fotografía de Microscopio confocal.

Mmacrófagos marcados con CD11b-Cy5 de color azul (centro), y Cry1Ac-FITC de color verde (izquierda), dobles positivos u overlay a la (derecha). a),b) y c) TCry1Ac; d), e) y f) PCry1Ac.

Linfocitos T marcados con CD3-Cy5 (azul) y toxina Cry1Ac-FITC (verde) analizados por microscopía confocal: a) TCry1Ac-FITC; y d) PCry1Ac-FITC; b) CD3-Cy5; e) CD3-Cy5; c) y f) muestran células dobles positivos (overlay) para las dos tinciones, las imágenes muestran que toxina y protoxina Cry1Ac se unen en la membrana plasmática.

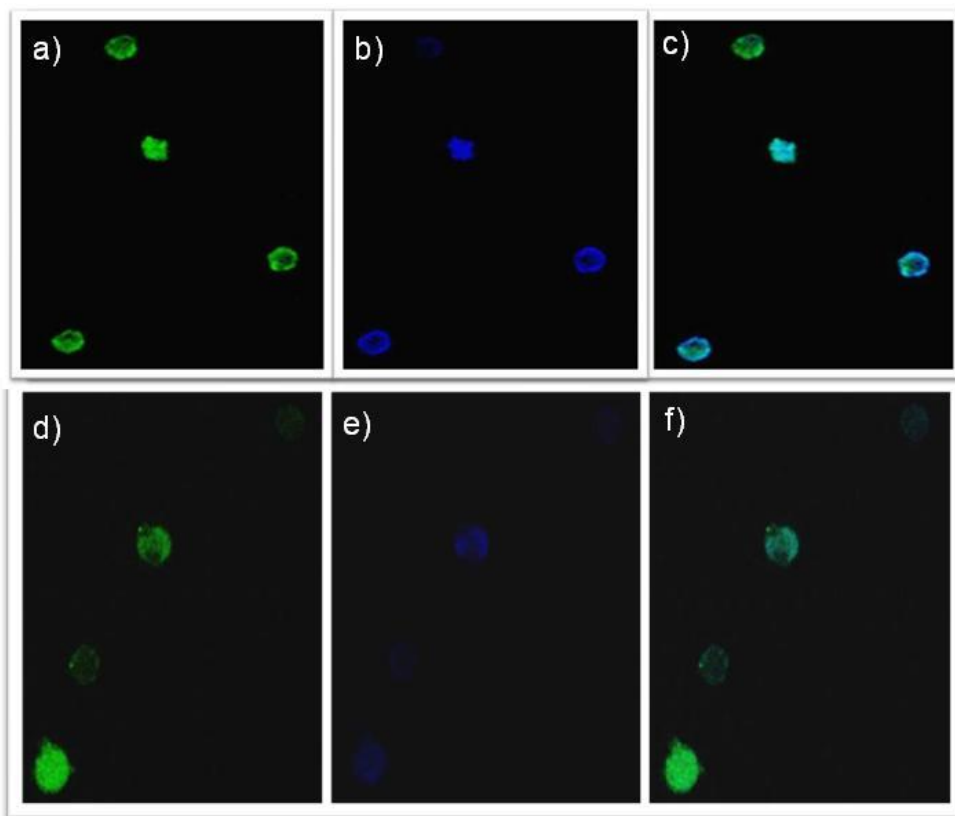


Figura.16 Microscopía confocal de Linfocitos T. Células marcadas con CD3-Cy5 de color azul (centro), y Cry1Ac-FITC de color verde (izquierda), overlay (derecha). a), b) y c) TCry1Ac; d), e) y f) PCry1Ac.

Linfocitos B identificados mediante marcaje con CD45-Cy5 (azul) y toxina Cry1Ac-FITC (verde) observados en el microscopio confocal: a) TCry1Ac-FITC; y d) PCry1Ac-FITC; b) CD45-Cy5; e) CD45-Cy5; c) y f) muestran células dobles positivos (overlay) para las dos tinciones, en este caso también se muestra que la unión se lleva a cabo a nivel de la membrana plasmática

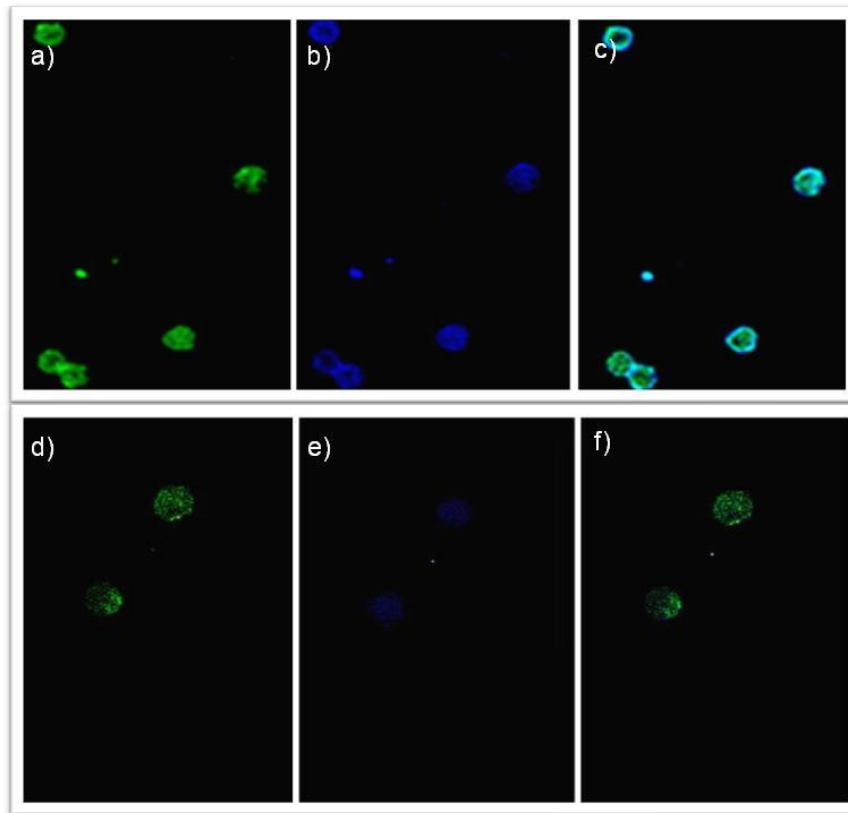


Figura 17. Microscopía confocal de Linfocitos B. Células marcadas con CD45-Cy5 de color azul (centro), y Cry1Ac-FITC de color verde (izquierda), overlay (derecha). a), b) y c) TCry1Ac; d), e) y f) PCry1Ac.

Obtención de sueros α -TCry1Ac y α -PCry1Ac

Los sueros α -toxina y α -protoxina Cry1Ac resultaron específicos debido a que los anticuerpos contenidos en el suero reconocen en buena proporción a sus correspondientes proteínas, esta evaluación se puede verificar en la imagen (7) en donde se muestra un inmunoblot donde se corrió toxina Cry1Ac, así mismo fue transferida a membranas de papel de PVDF e incubada con el suero α -toxina Cr1Ac, posteriormente se incubó con anticuerpo de chivo-HRP α -conejo y se reveló con sustrato de cromógeno (4-cloronaftol). Esto prueba que el anticuerpo es efectivo en el reconocimiento de toxina Cry1Ac, ya que apareció una banda oscura en área que corresponde a la toxina de 65 kDa y protoxina 133 kDa.



Figura 18. Inmunización de conejo

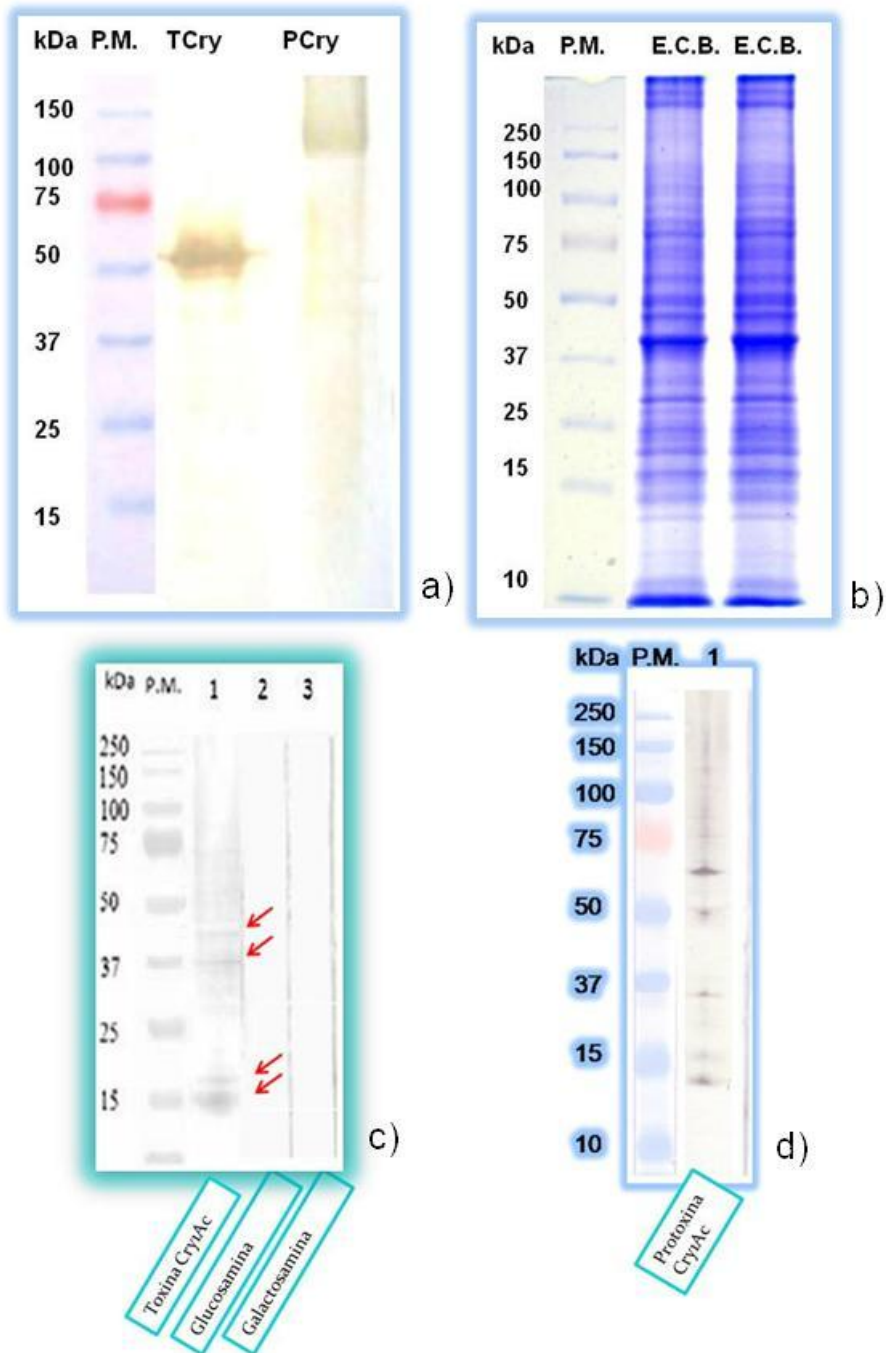


Imagen 19. Identificación de receptor para T y P Cry1Ac en un extracto de células de bazo. a) Inmunoblot que muestra la especificidad de los anticuerpos generados en conejo anti P y T Cry1Ac. b) Patrón de proteínas totales de células de bazo de ratón en Gel SDS-PAGE. c) Blot ligando que muestra (1) 4 bandas de proteínas de bazo a las que se une preferentemente TCry1Ac; la unión es inhibida en presencia de glucosamina (2) y galactosamina (3). d) Blot ligando que muestra 5 bandas de proteínas de bazo a las que se une PCry1Ac.

Blot-ligando de extracto de células de bazo

La toxina y se une preferentemente a 4 Distintas bandas de proteínas de 44, 37, 17 y 15 kDa de toxina Cry1Ac (65 kDa) de *Bacillus thuringiensis*, mientras que para protoxina Cr1Ac, se encontró que se adhiere a 5 bandas de proteínas de 68, 50, 33, 15 y 14 kDa en el Blot del extracto de células de bazo.

Discusión

Este trabajo presenta evidencia que sugiere la presencia de receptores para toxina y protoxina Cry1Ac en células de bazo de ratón, es importante destacar que es el primer reporte que indica la existencia de receptores en células de mamífero para estas proteínas, ya que anteriormente solo se ha descrito el receptor de superficie para toxina Cry1Ac en invertebrados. Estudios anteriores sobre el modo de acción de las toxinas Cry1Ac han revelado que los ligandos con los que interactúan son principalmente N aminopeptidasas y E cadherinas que se localizan en la membrana epitelial del intestino medio de las larvas de insectos susceptibles. (Knight et al 1994, Vadlamudi et al 1995).

Se encontraron datos contundentes en la búsqueda de células receptoras de las proteínas Cry1Ac en células de bazo de ratón. En el análisis que se llevó a cabo por citometría de flujo, se encontró que las proteínas Cry1Ac (toxina y protoxina) marcados con FITC, se unen a poblaciones de Linfocitos B, T (CD4 y CD8); células dendríticas y Macrófagos, siendo estas últimas células las que unen en mayor proporción las proteínas Cry1Ac (toxina y protoxina). Esto indica que las proteínas Cry1Ac tienen la capacidad de activar poblaciones de células tanto de la inmunidad innata como de la inmunidad adquirida en tiempos cortos (3 hrs) de incubación *in vitro*.

Por medio de microscopía confocal, se encontró que la toxina y protoxina Cry1Ac, en un tiempo de tres horas, se unen a la superficie celular de macrófagos, linfocitos B y T como se muestra en las imágenes 7, 8 y 9 respectivamente. Este

resultado nos indica que durante la exposición temprana (3 hrs) de los linfocitos B, T y macrófagos a T y P Cry1Ac frente a se lleva a cabo el reconocimiento y unión del antígeno a receptores putativos que se encuentran insertados en las membranas plasmáticas de estos tipos celulares. Las imágenes obtenidas a este tiempo de exposición muestran que no hay internalización aparente de las proteínas Cry1Ac a las células en cuestión. Anteriormente sólo se había reportado en cortes de intestino por inmunofluorescencia la unión de la protoxina Cry1Ac a enterocitos de ratón (Vázquez-Padrón et al., 2000), pero este es el primer trabajo en el que se demuestra que tanto la protoxina como la toxina Cry1Ac se unen a distintos tipos celulares específicos en mamíferos, ya que las proteínas Cry1Ac se unen a linfocitos y mielocitos aislados de bazo de ratón.

Se sugiere la existencia de receptores para la toxina y protoxina Cry1Ac en células de mamífero, debido a que estas proteínas tienen la capacidad de inducir la activación de linfocitos y mielocitos in vitro en tiempos cortos (3 hs). De hecho, se encontró en células de linaje linfoide, que las proteínas Cry1Ac (toxina y protoxina) tienen la capacidad de inducir la expresión de CD69 (antígeno de activación temprana) en poblaciones de linfocitos B, TCD4 y TCD8 aunque en estas últimas se encontró activación en menor proporción. La molécula CD69 es una lectina tipo C involucrada en la proliferación de linfocitos y en la expresión de diferentes moléculas de superficie (Janeway et al 2000). Lo que indica que las proteínas Cry1Ac tienen la capacidad de inducir activación de los linfocitos B, TCD4 y TCD8 (TCD8 en menor proporción), a diferencia de los controles en los que se excluyó la incubación con toxina y protoxina Cry1Ac, y en estos no se

encontró la presencia de CD69. Evidenciando de forma contundente que las proteínas Cry1Ac al unir a su receptor putativo, deben activar poblaciones de linfocitos B y T.

El ensayo donde se analizó por citometría de flujo a células de linaje mieloide, se encontró que las proteínas Cry1Ac inducen la expresión de moléculas coestimuladoras B7-1 y B7-2 (CD80 y CD86) para células CD11b y Cd11c positivas (macrófagos y células dendríticas). Lo que nos hace saber que las proteínas Cry1Ac, son activadoras de distintas líneas celulares de origen mieloide. 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 (Lavelle 2004, Bromader 1991, Cox y Coulter 2001). Por lo que al encontrar incremento en la expresión de moléculas B7-1 y B7-2 el cual se indujo por la presencia de las proteínas (toxina y protoxina) Cry1Ac, se complementa la explicación del efecto adyuvante de Cry1Ac ahora también en células de bazo de ratón. Tal como menciona Vázquez-Padrón *et al* 1999 y Moreno-Fierros *et al* 2003, que la protoxina Cry1Ac es un potente adyuvante mucosal.

Se realizaron ensayos de blot-ligando del extracto de células de bazo, con el fin de identificar el peso molecular del receptor para protoxina Cry1Ac. En este ensayo y se encontraron 5 bandas definidas de distintos pesos moleculares los cuales son: 68, 50, 33, 15 y 14 kDa, siendo la banda de 68 kDa la más definida en el blot-ligando. Las 2 bandas de péptidos más grandes de 68 y 50 parecen coincidir con los péptidos de las bandas de 62 y 51 kDa que se han reportado en un estudio

previo en el que se hicieron ensayos de blot ligando en extractos de células intestinales de ratón, en el que se encontró que la protoxina se une a 6 bandas de proteínas de 102, 87, 62, 55, 51, and 39 kDa. Y la unión no parece depender de carbohidratos ya que no se bloqueó la unión de la protoxina Cry1Ac a sus proteínas receptoras previamente descritas, al competir con manosa, n-acetil-galactosamina, n-acetil-glucosamina ni con biotina (Vázquez-padrón et al., 2000).

Mientras que la unión de la toxina si parece depender de carbohidrato, ya que cuando realizamos el mismo ensayo de blot ligando con toxina Cry1Ac, bloqueando con leche al 2% se encontró alta unión inespecífica en la tira de papel PVDF, por lo que la estrategia de bloqueo para este ensayo se cambio posteriormente a BSA 2%, con este cambio se encontraron 4 bandas de proteínas bien definidas de los siguientes pesos moleculares: 44, 37, 18, 15 kDa. Un dato importante que se observa es que las 4 bandas de proteínas a las que se une toxina Cry1Ac antes mencionadas e identificadas en el blot-ligando del extracto de células de bazo parecen coincidir, siendo las mismas proteínas o glicoproteínas que identifican tanto a toxina como a protoxina Cry1Ac en el extracto de células de bazo, este dato es interesante debido a que si esto es verdad y las dos proteínas se unen a los mismos receptores posiblemente la unión se lleva a cabo en regiones distintas de las moléculas que las unen, debido a que TCry1Ac muestra unión inespecífica en presencia de los carbohidratos presentes en la leche, mientras que en el caso de la PCry1Ac estos carbohidratos no intervienen con la unión.

Estimamos que la adhesión de toxina Cry1Ac a sus moléculas receptoras

encontradas posiblemente son glicoproteínas, aun cuando desconocemos cuales son, podemos inferir que Glucosamina y Galactosamina (presentes en la leche) intervienen con la unión. Se sabe que otras proteínas bacterianas con excepcionales propiedades inmunológicas como toxina de cólera y la enterotoxina lábil de *E. Coli* (LT) se unen a los gangliósidos GM1 presentes en la superficie intestinal de los vertebrados (Williams, N. A., Hirst, T. R.). En el caso de la toxina Cry1Ac cuando se realizo este mismo ensayo se encontró unión inespecífica y generalizada en toda la tira de papel PVDF, lo que nos hace pensar que con la toxina a diferencia de lo que sucede con la protoxina, GalNac (presente en la leche) interviene directamente en la unión de la toxina Cry1Ac a sus receptores, generándose así unión inespecífica, coincidiendo con lo reportado por Pardo-López et al 2006, y Dean et al 2001, que mencionan que la toxina Cry1Ac de *Bacillus thuringiensis ssp. Kurstaki* HD-73 que es una proteína formadora de poros específicamente tóxica para larvas de insectos lepidópteros que se une al receptor de superficie celular N-aminopeptidasa en el intestino medio de *Manduca sexta* vía N-acetil-d-galactosamina (GalNac). Lo que nos hace saber que el cambio de la proteína Cry1Ac de protoxina (133 kDa) a toxina (65 kDa) después de la digestión con tripsina, es determinante para la unión de las proteínas Cry1Ac a sus receptores encontrados en ambos casos.

En base a los antecedentes mencionados se realizaron ensayos de competencia con dos glicoproteínas: GlcNac y GalNac, en este experimento se incubaron dichas glicoproteínas durante 30 min, previos a la incubación con toxina. En este caso no se encontraron bandas que evidenciaran la unión de toxina Cry1Ac a sus

receptores previamente encontrados, lo que indica que GlcNac y GalNac, interfieren con la unión de la toxina Cry1Ac (65 kDa) a las moléculas receptoras encontradas previamente en el extracto células de bazo a las que se unen. Lo que coincide en el caso de GalNac con lo reportado anteriormente en invertebrados donde se menciona que la unión de Cry1Ac a su receptor putativo N-aminopeptidasa es especialmente inhibida por GalNac, y difiere en el caso GlcNac ya que menciona que la unión no es inhibida por este carbohidrato (Knight et al., 1994) estos reportes sugieren que Cry1Ac reconoce GalNac en el receptor N-aminopeptidasa (Burton et al 1999). No obstante sería recomendable afinar el ensayo principalmente realizándolo con un extracto de un tipo celular específico, para tal caso sería recomendable realizarlo con macrófagos, debido a que son el tipo celular que presenta el mayor porcentaje de células que unen tanto a toxina como protoxina Cry1Ac.

Sería pertinente realizar estudios en tiempos posteriores al reconocimiento, para conocer qué es lo que sucede con el procesamiento de estas proteínas una vez que son reconocidas por Macrófagos, linfocitos B y T. Y para identificar con precisión a los posibles receptores de las proteínas Cry1Ac se requiere realizar estudios de inmunoprecipitación, para detectar y conocer el peso molecular del receptor o receptores que están involucrados en la adhesión de las proteínas Cry1Ac, a las células en cuestión.

Conclusiones

- Los resultados sugieren la existencia de receptores para la toxina y protoxina Cry1Ac en células de bazo de ratón.
- La unión se localiza en la superficie de células de bazo lo que indica que el receptor se localiza en la membrana plasmática.
- Toxina y protoxina se unen principalmente a macrófagos y células dendríticas, aunque también a linfocitos T (CD4 y CD8) y B en menor proporción.
- Toxina se une a poblaciones definidas de CD8 mientras que protoxina no es reconocida por este tipo de células.
- Tanto toxina como protoxina inducen la expresión de CD69 (linfoides); CD80 y CD86 (mieloides) lo que sugiere que tienen la capacidad de inducir activación de células linfoides y mieloides.
- Se encontraron 4 bandas de proteínas receptoras para toxina Cry1Ac de los siguientes pesos moleculares: 44, 37, 17, 15 kDa, y 5 bandas de proteínas para protoxina Cry1Ac de los siguientes pesos moleculares: 68, 50, 33, 15 y 14 kDa.
- La unión de protoxina a sus receptores no se inhibe con los carbohidratos presentes en la leche.

- En el caso de toxina si se inhibe la unión a sus receptores con los carbohidratos galactosamina y glucosamina.

Referencias

1. Bradford, M. M. 1976 *Anal. Biochem.* 72, 248–254
2. Burton, S.L., Ellar, D.J., Li, J., Derbyshire, D.J., 1999. N-acetylgalactosamine on the putative insect receptor aminopeptidase N is recognised by a site on the domain III lectin-like fold of a *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxin. *J. Mol. Biol.* 287, 1011–1022.
3. Clements, J.D., N.M. Hartzog, and F.L. Lyon. 1988. Adjuvant activity of *Escherichia coli* heat labile enterotoxin and effect on the induction of oral tolerance in mice to unrelated protein antigens. *Vaccine* 6:229.
4. Cox JC and Coulter AR, 1997. Adjuvants- a classification and review of their modes of action. *Vaccine* 15:248-256.
5. Dean J. Derbyshire, a² David J. Ellar and Jade Lia, 2001 Crystallization of the *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac and its complex with the receptor ligand N-acetyl-D-galactosamine *Acta Cryst.* D57, 1938±1944
6. Dickinson, B.L, and J.D Clements. 1995. Dissociation of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin adjuvant activity from ADP-Ribosyltransferase activity. *Infect. Immun.* 63:1617.
7. Eriksson K., Holmgren J., 2002. Recent advances in mucosal vaccines and adjuvants. *Curr. Op. Immunol.* 14:666-672

8. Eldridge, J.H., Staas, J.K., Meulbroek, J.A., McGhee, J.R., Tice, T.R., _
R.M. Gilley. 1991. Biodegradable microspheres as vaccine delivery
system. *Mol. Immunol.* 28:287-294.
9. Galitsky, N., Cody, A.V., Wojtczark, D., Ghosh, J.R., Panghorn, W.L.,
English, L., 2001. Structure of the insecticidal bacterial delta endotoxin
Cry3Bb1 of *Bacillus thuringiensis*. *Acta D: Biol. Crystallogr.* 57, 1101–
1109.
10. Grochulski, P., Masson, L., Borisova, S., Pusztai-Carey, M., Schwartz,
J.L., Brousseau, R., Cygler, M., 1995. *Bacillus thuringiensis* Cry1A (a)
insecticidal toxin: crystal structure and channel formation. *J. Mol. Biol.*
254, 447–464.
11. Guerrero-Manríquez GG, Dean H, Moreno-Fierros L., 2004. Structural
Implication of the induced immune response by *Bacillus thuringiensis*
Cry proteins. *Molecular Immunology Volume 41, Issue 12, November,*
Pages 1177-1183.
12. Guerrero GG, Russell, WM, and L. Moreno-Fierros, 2007. Analysis of the
cellular immune response induced by *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxins
in mice: Effect of the hydrophobic motif from diphtheria toxin. *Mol*
Immunol. Feb; 44 (6):1209-17. Epub 2006 Aug 22.
13. Höfte, H., H. Whiteley. 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus*
thuringiensis. *Microbiol. Rev.* 53:242- 255.

14. Holmgren J., Czerkinsky C., Eriksson K., Mharandi A., 2003. Mucosal immunization and adjuvants: a brief overview of recent advances and challenges. *Vaccine*, 21:S2/89-S2/95
15. Janeway Ch., Travers P., Walport Mark., Capra J. 2000, INMUNOBIOLOGIA “el sistema inmunitario en condiciones de salud y enfermedad”, by Elsevier Science, Barcelona (España).
16. Holmgren J, Czerkinsky C. Mucosal immunity and vaccines. *Nat Med*. 2005 Apr; 11(4 Suppl):S45-53. Review.
17. Jarillo-Luna A, Moreno-Fierros L, Campos-Rodríguez R, Rodríguez-Monroy MA, Lara-Padilla and Rojas-Hernández S., 2008. Intranasal immunization with *Naegleria fowleri* lysates and Cry1Ac induces metaplasia in the olfactory epithelium and increases IgA secretion. *Parasite Immunol Prensa* 27 09 07, *Parasite Immunol*. Jan; 30 (1):31-8.
18. Kang SM, Compans RW, 2003. Enhancement of mucosal immunization with virus-like particles of simian immunodeficiency virus. *J Virol*. Mar; 77 (6):3615-23.
19. Knight, P., Crickmore, N., and Ellar, D. J., 1994. The receptor for *Bacillus thuringiensis* Cry1A (c) delta-endotoxin in the brush border membrane of the lepidoptero *Manduca sexta* is aminopeptidase N, *Mol. Microbiol*. 11, 429-436.
20. Lavelle, E.C., Jarnicki, A., McNeela, E., Armstrong, M.E., Higgins, S.C.,

- Leavy, O., Mills, K.H.G., 2004. Effects of cholera toxin on innate and adaptive immunity and its application as an immunomodulatory agent. *J. Leuc. Biol.* 75, 756–763.
21. Lavelle EC., 2005. Generation of improved mucosal vaccines by induction of innate immunity. *Cell Mol Life Sci.* Dec; 62 (23):2750-70. Review.
22. Lis, H., Sharon, N., 1998. Lectins: carbohydrate-specific proteins that mediate cellular recognition. *Chem. Rev.* 98, 637–674.
23. Lycke, N., & J. Holmgren. 1986. Strong adjuvant properties of cholera toxin on gut mucosal immune responses to orally presented antigens. *Immunology* 59:301-308.
24. Lyke, N., A. Karlsson, A. Sjölander, and K.E. Magnusson. 1991. The adjuvant action of cholera toxin is associated with an increased intestinal permeability for luminal antigens. *Scand. J. Immunol.* 33:691.
25. 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.
26. Mitragotri S. Immunization without needles .*Nat Rev Immunol.* 2005 Dec; 5 (12):905-16.
27. Michalek, S.M., Eldridge, J.H., Curtiss III, R., _ K.L. Rosenthal. 1994. Antigen delivery systems: new approaches to mucosal immunization. In

Handbook of Mucosal Immunology.(PL Ogra, W Strober, J. Mesteckey, ME Iamm, JR McGhee, J, Bienestock. (Ed), (1994) pp. 373-390. Academic Press Inc, USA.

28. Moreno-Fierros L, García N, Gutiérrez R, López-Revilla R and Vázquez-padrón RI., 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.
29. Moreno-Fierros L, Pérez Ordóñez and Martín Palomar Morales. 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*:2667-80.
30. Moreno-Fierros, L., Ruiz-Medina, J., Esquivel, R., López-Revilla, R. and Piña-Cruz Saúl. 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.
31. Neutra MR, Kozlowski PA., 2006. Mucosal vaccines: the promise and the challenge. *Nat Rev Immunol.*, 148-58. Review.

32. Morris-Quevedo H, Martínez-Manrique C, Abdala-Díaz R, Campos-Orama D. 1999. ADYUVANTES INMUNOLÓGICOS, 18(2):130-7
33. O'Hagan D., MacKichan M., Singh M., 2001. Recent developments in adjuvants for vaccines against infectious diseases. *Biomolecular Engineering*, 18, 69-85.
34. Pardo-López L, Gómez I, Rausell C, Sanchez J, Soberón M, Bravo A., 2006. Structural changes of the Cry1Ac oligomeric pre-pore from bacillus thuringiensis induced by N-acetylgalactosamine facilitates toxin membrane insertion. *Biochemistry*. 45(34):10329-36.
35. Partidos CD, Pizza M, Rappuoli R and Steward MW. 1996. The Adjuvant Effect of a non-toxic mutant of heat labile Enterotoxin of Escherichia coli for the Induction of measles virus-specific CTL responses after Intranasal Co-immunization with a Synthetic Peptide. *Immunology* 89: 483-487.
36. Rodríguez-Monroy MA, Moreno-Fierros L., 2008. Increased antibody responses, activation and cytokine production in NALT and Nasal passages Lymphocytes induced by intranasal immunization with Cry1Ac. *Mucosal Immunology*
37. Rodríguez-Orozco AR., 2003. The difficulty of obtaining immunologic response at mucosae. Use of adjuvants. *Rev Alerg Mex*; 50: 161-5.
38. Rojas-Hernandez S, Jarillo-Luna A, Rodríguez-Monroy M, Moreno-Fierros L, Campos-Rodríguez R., 2004. Immunohistochemical

characterization of the initial stages of *Naegleria fowleri* meningoencephalitis in mice. *Parasitol Res.* 94(1):31-6.

39. Rojas-Hernández S, Marco Rodríguez Monroy, Leticia Moreno-Fierros, Adriana Jarillo-Luna, Marisela Carrasco-Yepe, Angel Miliar-García, Rafael Campos-Rodríguez., 2007. Nitric oxide production and nitric oxide synthases immunoreactivity in *Naegleria fowleri*. *Parasitol Res.* 101(2):269-74.
40. Ryan E.J., Daly L.M., Mills K.H.G., 2001. Immunomodulators and delivery systems for vaccination by mucosal routes. *Trends Biotech,* 19(8): 293-304.
41. Sankaranarayanan, R., Sekar, K., Banerjee, R., Sharma, V., Surolia, A., Vijayan, M., 1996. A novel mode of carbohydrate recognition in jacalin, a Moraceae plant lectin with a β -prism fold. *Nat. Struct. Biol.* 3, 596–603.
42. Shimizu, T., Morikawa, K., 1996. The β -prism: a new folding motif. *Trend Biochem. Sci.* 21, 3–6. Spangler BD. Structure and function of cholera toxin and related *Escherichia coli* heat labile enterotoxin. *Microbiol;* 46:622–47.
43. Vadlamudi, R.K., Weber, E., Ji, I., Ji, T.H., Bulla, L.A., 1995. Cloning and expression of a receptor for an insecticidal toxin of *Bacillus thuringiensis*. *J. Biol. Chem.* 270, 5490–5494.
44. Van Ginkel FW, Jackson RJ, Yuki Y, McGhee JR., 2001. Cutting edge:

the mucosal adjuvant cholera toxin redirects vaccine proteins into olfactory tissues. *J Immunol* 165: 4778-4782.

45. Vázquez-Padrón RI, Moreno-Fierros L, Neri-Bazán L, Del la Riva GA and Lopez- Revilla R. 1999a. *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac protoxin is a potent systemic and mucosal adjuvant. *Scand. J. Immunol.* 46:578-584.
46. Vázquez-Padrón RI, Moreno-Fierros L, Neri-Bazán L, Del la Riva GA and López- Revilla R. 1999b. Intragastric and intraperitoneal administration of Cry1Ac protoxin from *Bacillus thuringiensis* induces systemic and mucosal antibody response in mice. *Life Sciences* 64:1897.1912.
47. Vázquez-Padrón, R.I., González-Cabrera, J., García Tovar, C., Neri-Bazán, L., Hernández, M., Moreno-Fierros, L., López-Revilla, R., de la Riva, G.A., 2000. Cry1Ac protoxin from *Bacillus thuringiensis* sp. *Kurstaki* HD 73 binds to surface proteins in the mouse small intestine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 271, 54–58.
48. Williams N.A., Hirst T.R., Nashar T.O., Immune modulation by the cholera-like enterotoxins: from adjuvant to therapeutic. *Immunol. Today* 20 (1999) 95-101.
49. Yamamoto S, Kiyono H, Yamamoto M *et al.* A nontoxic mutant of cholera toxin elicits Th2-type response for enhanced mucosal immunity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:5267–72.