



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
IZTACALA**

***CARACTERIZACIÓN DEL EFECTO ADYUVANTE DE LA TOXINA  
CryIAc.***

**T E S I S  
PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
BIÓLOGO**

**P R E S E N T A:  
OMAR CASTILLO RODRÍGUEZ  
DIRECTOR DE TESIS:  
DR. MARCO AURELIO RODRÍGUEZ MONROY**

**2012**





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 la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Estudios Superiores Iztacala.

Al Dr. Marco Aurelio Rodríguez Monroy, por brindarme la oportunidad de realizar mi tesis bajo su tutoría, por sus consejos, por todo el apoyo y por su invaluable amistad.

Al Dr. Marco Aurelio Rodríguez Monroy, Dra. Ma. Margarita Canales Martínez, M. en C. Ricardo Ortiz Ortega, M. en C. Luis Antonio Hernández González y Biol. Antonio Muñoz Torres por su revisión y observaciones para la redacción de mi tesis.

Este trabajo fue financiado por PAPIIT IN219310, IN218511, PAPCA 2010-11 proyecto 5.

## DEDICATORIA

Con todo mi amor a mis padres, soy un afortunado de tener unos padres como ustedes, su fortaleza, entereza y amor me ayudaron a superar los momentos difíciles. Este logro es de ustedes, porque llevan toda su vida trabajando para brindarnos un mejor futuro, me siento orgulloso de ustedes nunca terminaré de agradecerles, los amo mucho y gracias por creer en mí, por su apoyo y amor incondicional.

A mi hermano Jorge, carnal siempre me has apoyado en todos los aspectos, este logro también es tuyo, además de ser un excelente hermano has sido mi amigo y mi padre, tus consejos y regaños me ayudaron a madurar y a mejorar mi vida, eres un gran ejemplo, te admiro y te amo mucho.

A Betsa, porque en ti encontré a mi compañera perfecta, por demostrarme tanto amor, cariño y comprensión, por aguantarme, por vivir tantos momentos maravillosos juntos, por apoyarme en momentos difíciles, por cuidarme cuando enferme, gracias por existir en mi vida te amo demasiado.

A mis abuelitos maternos Esperanzita Rodríguez † y José Rodríguez † y a mis abuelitos paternos Luz Nava † y José Castillo †; por su amor, me inculcaron grandes valores como lealtad, honestidad, respeto y amor, siempre los llevo en el pensamiento y en mi corazón. A mi tía Concha, gracias por cuidarme y quererme como a un hijo te quiero mucho.

A mi primo Adrián, eres un gran ejemplo para mí, siempre me has apoyado, te admiro y te respeto, como si fueras mi papá, te quiero mucho. A mi tío Adolfo, gracias por apoyarnos en todo momento, lo quiero tío. A mi primo José Manuel, te quiero como a un hermano, anhelo esas vacaciones jugando fut todo el día, gracias por tan maravillosos recuerdos. A mi primo Rafa, gracias por enseñarme a utilizar herramienta en el trabajo, además eres una gran persona y un ejemplo en todos los aspectos. A mis tíos Chucho y Beatriz. A mi prima Blanca, gracias por tu apoyo y cariño, tengo un bonito recuerdo de ti. Al Doc. Marco Aurelio, me siento muy afortunado de conocerlo, nunca terminare de retribuirle todo lo que ha hecho por mí, es la mejor persona que he conocido, gracias por su amistad. A mis carnales Jorge, Ricardo, Angélica, Ernesto, Omar, Verónica B, Miguelin, Rodrigo, Leobardo, Max, los quiero como mis hermanos, gracias por escucharme, apoyarme y por las buenas fiestas. A mi familia del 118, Tía (Noe Betancourt) a la que quiero como mi mamá, Don Isra, Chica, Don Richar, Semey †, Elia, Mayito, Rubén, Sandra, Salo, Lety, Yeny, Karina, Irma, Martha, Jaime, Neri, hemos compartido toda una vida, llena de momentos maravillosos y de grandes pérdidas, es chido saber que cuento con ustedes. A mis entrenadores, Don Chuy, René Jiménez, Profe Miguel, Profe Leopoldo. A mis compañeros de laboratorio, Dra. Verdín, Oscar, Conchis, Ana y a los alumnos de LICyT, sin su ayuda en la fase experimental hubiese sido muy difícil terminar. A la Sra. Malena y a su familia.

A Hunter †, Güicho †, Didi, por alegrar mi vida.

## Índice General

Índice de tabla y figuras.	3
Lista de abreviaturas.	5
Resumen.	6
Introducción.	8
Inmunidad humoral y celular.	9
Sistema inmune común de mucosas.	10
Vacunas y adyuvantes.	11
Adyuvantes de mucosas.	12
Cry1Ac de <i>Bacillus thuringiensis</i> .	14
Objetivo general.	17
Objetivos particulares.	17
Material y métodos.	18
Obtención de la toxina Cry1Ac.	18
Digestión de la protoxina para obtener toxina Cry1Ac.	19
Inmunizaciones.	19
Obtención de muestras.	20
Evaluación de la respuesta de anticuerpos mediante la técnica de ELISA indirecta.	23
Análisis estadístico.	24
Resultados.	25
Obtención de la tCry1Ac.	25
La inmunización intranasal con la tCry1Ac induce una respuesta de anticuerpos a nivel de mucosas.	25
tCry1Ac induce respuesta de anticuerpos a nivel sistémico.	29
La toxina Cry1Ac tiene un efecto adyuvante en la producción de IgG a nivel de mucosas.	30
La tCry1Ac induce una respuesta Th2 a nivel de mucosas y sistémico.	33

Discusión.	38
Conclusiones.	42
Referencias.	43

## Índice de tablas y figuras

Fig. 1. Inmunización i.n.	20
Fig. 2. Punción cardiaca.	20
Fig. 3. Obtención suero.	20
Fig. 4. Lavados vaginales.	21
Fig. 5. Lavados nasales.	22
Fig. 6. Lavados traqueobronquiales.	22
Fig. 7. Lavados intestino grueso.	23
Fig. 8. Lavados intestino delgado.	23
Fig. 9. Obtención tCry1Ac (SDS-PAGE geles de poliacrilamida).	25
Fig. 10. Valores de las absorbancias, en muestras de lavados nasales (LN).	26
Fig. 11. Valores de las absorbancias, en muestras de lavados traqueobronquiales (TQB).	27
Fig. 12. Valores de las absorbancias, en muestras de lavados de intestino delgado (ID).	28
Fig. 13. Valores de las absorbancias, en muestras de lavados vaginales (LV).	28
Fig. 14. Valores de las absorbancias, en muestras de suero, obtenido por centrifugación, después de extraer la sangre mediante punción cardiaca.	30
Fig. 15. Valores de las absorbancias, en muestras de lavados traqueobronquiales (TQB).	31
Fig. 16. Valores de las absorbancias, en muestras de lavados nasales (LN).	32
Fig. 17. Valores de las absorbancias, en muestras de lavados de intestino delgado (ID).	32
Fig. 18. Valores de las absorbancias, en muestras de lavados de intestino grueso (IG).	33
Fig.19. Valores de las absorbancias, en muestras de lavados nasales (LN). Para detección de repuesta de anticuerpos tipo Th2.	34
Fig. 20. Valores de las absorbancias, en muestras de lavados traqueobronquiales (TQB). Para detección de repuesta de anticuerpos tipo Th2.	35
Fig. 21. Valores de las absorbancias, en muestras de lavados de intestino delgado (ID). Para detección de repuesta de anticuerpos tipo Th2.	35
Fig. 22. Valores de las absorbancias, en muestras de lavados de intestino grueso (IG). Para detección de repuesta de anticuerpos tipo Th2.	36
Fig. 23. Valores de las absorbancias, en muestras de suero, obtenido por centrifugación, después de extraer la sangre mediante punción cardiaca.	37



Para detección de respuesta de anticuerpos tipo Th2.

## Lista de Abreviaturas

AS	Antígenos de superficie.
BALT	Tejido linfoide asociado a los bronquios.
Bt	Bacillus thuringiensis.
Ct	Toxina de cólera. Del ingles cholera toxin.
ELISA	Ensayo inmunoenzimatico ligado a enzimas. Del ingles Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay.
GALT	Tejido linfoide asociado a intestino.
IgA	Inmunoglobulina A.
IgG	Inmunoglobulina G.
IgM	Inmunoglobulina M.
IL	Interleucina.
i.n.	Intranasal.
kDa	Kilodalton.
LB	Medio Luria-Bertoni.
LT	Toxina termolábil. Del inglés heat-labile toxin.
MALT	Tejido linfoide asociado a mucosas. Del inglés mucosal-associated lymphoid tissue.
NALT	Tejido linfoide asociado a la nasofaringe. Del ingles nasal associated lymphoid tissue.
OVA	Ovoalbúmina.
PBS	Amortiguador de fosfatos en solución salina. Del ingles phosphate-buffered saline.
PBS-T	Amortiguador de fosfatos en solución salina-Tween 20. Del inglés phosphate-buffered saline-Tween 20.
pCry1Ac	Protoxina Cry1Ac.
RPMI-1640	Medio Roswell Park Memorial Institute-1640.
tCry1Ac	Toxina Cry1Ac.
Th	T colaboradores. Del inglés T helper.

# CARACTERIZACIÓN DEL EFECTO ADYUVANTE DE LA TOXINA Cry1Ac

## Resumen

La protoxina Cry1Ac de *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) es una protoxina que ha demostrado ser un potente adyuvante e inmunógeno al aplicarse directamente en mucosas. Sin embargo, hasta el momento no se había estudiado si la toxina Cry1Ac tiene los mismos efectos que la pCry1Ac. En esta investigación se caracterizó el efecto adyuvante de la toxina Cry1Ac en ratones inmunizados intranasalmente. Nuestros resultados evidencian la capacidad adyuvante e inmunogénica de tCry1Ac de *Bt* al inmunizar con 50µg vía intranasal, ya que desencadenó respuestas tanto a nivel local como sistémico. Los niveles de IgA en las muestras de lavados (nasal, traqueobronquial, intestino y vaginal) nos indican que tCry1Ac confiere protección a nivel local, cabe destacar que tCry1Ac desencadenó respuesta de anticuerpos en sitios distantes a la inmunización (intestinos y vagina); los altos niveles de IgG en suero y mucosas, nos indican, la capacidad inmunogénica de tCry1Ac, para desencadenar una respuesta tanto a nivel local como sistémico. Además de estar presente en todos los sitios de análisis, siendo en lavados nasales y traqueobronquiales los registros más elevados. La presencia de IgG<sub>1</sub>, tanto en suero como en mucosas, confirma la respuesta generada a nivel sistémico, ya que este anticuerpo polariza a una respuesta Th2, que es de tipo humoral. Con base a lo anterior se pudo determinar que la tCry1Ac generó mayores repuestas de anticuerpos (IgA, IgG, IgG<sub>1</sub>) en comparación con la pCry1Ac y similares a toxina de cólera (CT). Esto al cotejar los títulos obtenidos en cada una de las muestras. Motivo por el cual, este trabajo aportó nuevas evidencias sobre los efectos de la toxina Cry1Ac, la cual es utilizada en diferentes plantas

transgénicas de consumo humano y que aparentemente su uso no entraña riesgos potenciales.

# CARACTERIZACIÓN DEL EFECTO ADYUVANTE DE LA TOXINA Cry1Ac

## Introducción

Durante su evolución, los vertebrados han desarrollado una variedad de mecanismos de defensa para restringir la naturaleza, la magnitud y la localización de las infecciones microbianas. Nuestro cuerpo está protegido contra las infecciones y la aparición de células cancerosas por una serie de mecanismos de defensa inespecíficos (resistencia) y específicos (inmunidad), que conforman lo que conocemos como sistema inmune. Sus funciones principales son *la protección, la vigilancia y el mantenimiento de la homeostasis* del organismo. La piel y las mucosas adyacentes constituyen barreras físicas y químicas que confinan a los microorganismos a las superficies externas del cuerpo (1). Estas defensas se complementan con el sistema inmunitario, cuya función fisiológica consiste en la defensa frente a los componentes de los organismos patógenos como virus, bacterias y parásitos; así como contra las macromoléculas que no conlleven un carácter infeccioso como proteínas y polisacáridos (2). Esta respuesta inmune se caracteriza por el reconocimiento de lo propio y no propio, para ello intervienen diferentes niveles moleculares: reconocimiento antigénico, moléculas accesorias y de coestimulación, transducción de señales intracelulares que darán lugar a la síntesis de citocinas o de anticuerpos que caracteriza a la respuesta efectora (3).

A su vez en el sistema inmunitario identificamos dos tipos de respuesta esenciales en la defensa contra infecciones, la inmunidad innata y la

inmunidad adaptativa, la inmunidad innata es la primer línea de defensa contra un agente infeccioso, está constituida por unos mecanismos de defensa celulares y bioquímicos ya instaurados incluso antes de contraerse la infección y preparados para responder con rapidez una vez producida, cuyos principales componentes son (barreras físicas y químicas, células fagocíticas, proteínas sanguíneas como los factores del sistema del complemento y mediadores de inflamación y citocinas), todos estos mecanismos son específicos para aquellas estructuras comunes a los grupos de microorganismos afines. Mientras que la inmunidad adaptativa se basa en su especificidad celular entre linfocito y antígeno, esta respuesta se desarrolla pasando 5 ó 6 días posteriores a la infección, existen dos tipos de respuestas inmunitarias adaptativas llamadas inmunidad humoral e inmunidad celular, en las que intervienen componentes diferentes del sistema inmunitario, sus principales componentes son los linfocitos T y B y sus productos de secreción (anticuerpos) (2,4).

### **Inmunidad humoral y celular**

La inmunidad humoral es el principal mecanismo de defensa contra los microorganismos extracelulares y sus toxinas, en ella intervienen los linfocitos B efectoras que darán origen a las células plasmáticas o plasmocitos capaces de secretar las distintas inmunoglobulinas con función de anticuerpos y los linfocitos B de memoria. Mientras que en la inmunidad celular intervienen los linfocitos T que se diferencian en subpoblaciones de linfocitos T reguladores, linfocitos T efectoras, que a su vez se diferencian en linfocitos T citotóxicos (Tc), reconocidos por el marcador de superficie CD8 y los linfocitos T colaboradores o helper (Th2 y algunas Th1) que poseen el marcador de superficie CD4 y se caracterizan por la producción de citocinas y por último los linfocitos T de memoria (3).

## **Sistema inmune común de mucosas**

Mientras que la inmunidad sistémica favorece las reacciones agresivas frente a antígenos extraños: reacciones específicas de citotoxicidad linfocitaria, citotoxicidad mediada por anticuerpos y la activación del complemento. Por el contrario, la inmunidad mucosal mantiene la absorción selectiva y la función barrera intestinal a pesar del continuo estímulo antigénico, discriminando entre patógenos y antígenos de la dieta (inofensivos). En las mucosas, por ser una interface entre el interior y el exterior de nuestro cuerpo, normalmente se encuentran grandes cantidades de moléculas extrañas y microorganismos. Se conoce que la mayor parte de los agentes patógenos entran al organismo a través de la piel y las mucosas, ésta es una de las razones por las que resulta atractivo inhibir su adhesión, replicación y colonización desde los sitios en que penetran a nuestro organismo (5).

Así, el sistema inmune de las mucosas debe inducir: una respuesta especializada que genere tolerancia o no reacción contra las moléculas benéficas; una respuesta inmune no esterilizante para la flora normal y una inmunidad esterilizante contra los patógenos. Esta triple función determina las diferencias principales entre el sistema inmune interno y el de las mucosas, por lo que las funciones principales del sistema inmune de las mucosas son *la inducción de tolerancia, la adaptación al medio y la protección* (6).

Este sistema protector está formado por la mayor colección de células inmunocompetentes del organismo. El sistema inmune común de mucosas se divide en dos: sitios inductores, donde el antígeno se capta, endocita, procesa y se presenta a los linfocitos T y B, y en sitios efectores, donde se lleva a cabo la respuesta inmune (7).

Así las principales mucosas del organismo quedan protegidas contra un patógeno determinado a través del sistema inmune mucosal común (MALT). Las células activadas llegan a las mucosas para su diferenciación final y se convierten en células efectoras, ya sea células plasmáticas productoras de anticuerpos en el caso de los linfocitos B o células productoras de citocinas en el caso de los linfocitos T. El tejido linfoide asociado a la nariz (NALT), a los bronquios (BALT) en el tracto respiratorio y las placas de Peyer en el gastrointestinal (GALT) son los sitios efectores más estudiados de esas mucosas. Ya que las células de memoria también se alojan en estos sitios, se les considera los lugares de recapitulación de la experiencia inmune del organismo; también se les ha llamado órganos linfáticos terciarios (8).

### **Vacunas y adyuvantes.**

A lo largo de la historia de la medicina, las vacunas, han sido la herramienta más poderosa para el control de las enfermedades infecciosas, por lo que el conocimiento de la inmunología se puede considerar como la base para entender los principios de la vacunación y por lo tanto la fisiología de la misma. La vacunación, entonces, debe adaptarse a la situación epidemiológica, los antígenos involucrados, e inclusive la declinación del título de anticuerpos maternos en cada individuo (9).

El mejor conocimiento de los fundamentos de la inmunología es prometedor en el desarrollo de nuevas vacunas. Se puede esperar que en el futuro sea posible dirigir la respuesta inmune en forma específica, por ejemplo, más o menos Th1 ó Th2 de acuerdo a la enfermedad y a los antígenos. El futuro es promisorio, conforme se conoce mejor la interacción de diferentes células, el papel de los antígenos de superficie (AS), las interleucinas (IL) y el descubrimiento de nuevas formas de ellas y el papel que juegan. El



conocimiento de sus códigos genéticos seguramente será de interés para el tratamiento de las enfermedades inmunes, tratamiento del cáncer y el desarrollo de una nueva generación de vacunas para el hombre (10).

Las vacunas que han sido adecuadamente inactivadas no tienen riesgo de virulencia específica. Sin embargo, usualmente se les tiene que adicionar un adyuvante para incrementar la eficiencia de la vacuna. Algunos adyuvantes son tan “potentes”, que su alta eficacia está acompañada por reacciones postvacunales que hoy en día no son aceptables. En los últimos años, se han creado grandes expectativas en el desarrollo de vacunas frente a las tan frecuentes infecciones mucosas y en el uso del sistema inmune de las mucosas para inducir tolerancia periférica en algunas enfermedades autoinmunes mediadas por células (11).

La inmunización parenteral ha demostrado ser eficaz en la generación de respuestas inmunes y está podría ser significativamente mejorada con el uso de adyuvantes de mucosas. Sin embargo la inmunización intranasal se ha convertido en una óptima estrategia de vacunación en roedores para la inducción de respuestas de anticuerpos en los tejidos genitales (12-14), y también demostró ser eficaz en humanos (13, 15, 16). Recientemente se publicó que la inmunización intranasal (i.n.) en ratones indujo una respuesta inmune tanto a nivel sistémico como en mucosas (17).

### **Adyuvantes de mucosas**

El sistema inmune de las mucosas (MALT), constituye la primera línea de defensa del organismo. Las membranas mucosas son la principal vía de entrada de microorganismos, alérgenos y carcinógenos. La superficie más vulnerable y extensa son los 400 m<sup>2</sup> de mucosa gastrointestinal (GALT, 200

veces mayor que la superficie cutánea), pero también la mucosa de las vías aéreas (NALT, BALT), urinaria y genital (RALT) y la conjuntiva que recubre los ojos (11). Por lo tanto, la búsqueda de nuevos inmunopotenciadores de mucosa representa una alternativa para la obtención de complementos para vacunas y para la formulación de inmunopreparados (5).

La búsqueda de nuevas sustancias con actividad adyuvante e inmunopotenciador constituye una de las tendencias más importantes en la investigación inmunológica actual.

Entre los nuevos adyuvantes se cuenta con los seleccionados por promover la respuesta inmune a nivel de mucosas. La toxina bacteriana del cólera (CT) y la toxina termolábil de *E.coli* (LT) estimulan eficientemente al sistema inmune cuando son administradas en mucosas y piel. Sin embargo, resultan ser tóxicas para el sistema nervioso central, además de que se acumulan en los nervios olfatorios cuando se administran por la vía intranasal (18). En un trabajo realizado en ratón, en el que se emplearon estas toxinas como vectores plasmídicos para vacunas de DNA de diversos antígenos virales, ambos vectores aumentaron fuertemente la respuesta de Th1 y Th2. Sin embargo, la respuesta humoral fue antígeno dependiente con rangos desde el no efecto a la supresión o elevación de la respuesta de inmunoglobulinas IgG1 e IgG2. Al comparar el efecto de ambas toxinas se encontró que LT estimulaba más eficientemente la respuesta celular que CT. Además, el empleo de las toxinas en forma individual, mostró una actividad adyuvante parcial (19). Por otra parte las formas mutantes no tóxicas de LT y CT que mantienen parcialmente la adyuvancia también son excesivamente costosas (20-23).

Existen pocas sustancias capaces de ejercer un potente efecto adyuvante en las mucosas y que, por otro lado, sean bien toleradas por el hombre. La búsqueda

de sustancias con estas propiedades beneficiaría el manejo de las infecciones y el diseño de vacunas (24).

### **Cry1Ac de *Bacillus thuringiensis***

Cry1Ac de *B. thuringiensis* es una protoxina con acciones inmunogénicas y adyuvante tan potente como la toxina de cólera (25). Por lo que ha llamado la atención para ser conjugada o administrada con otros antígenos y ser usada como acarreadora de epítopes vacunales (26).

*B. thuringiensis* (Bt), es una bacteria gram positiva, aerobia estricta, morfológicamente relacionada con *B. cereus* y *B. anthracis* (27). Considerada una bacteria ubicua 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. La cual se caracteriza por la producción de inclusiones proteicas cristalinas durante la fase de esporulación. Este cristal es el responsable de la actividad tóxica contra los insectos (28).

Estos cristales están formados por una o varias toxinas de naturaleza proteica llamadas  $\delta$ -endotoxinas o proteínas Cry o Cyt (29). Su entomopatogenicidad es específica para diferentes órdenes de insectos tales como: Lepidoptera, Diptera, Coleoptera, Himenoptera y Homoptera así como para ácaros y otros invertebrados (nemátodos y platelmintos). Esta toxina es sintetizada en forma de protoxina (toxina inactiva), la cual es convertida a su forma activa por la acción de proteasas presentes en el intestino medio de los insectos susceptibles, un fragmento de toxina activa pesa entre 60 y 70 kDa (30).

Estas toxinas activas interactúan con receptores presentes en células del epitelio intestinal, formando poros en la membrana plasmática, causando un desequilibrio osmótico en las células. Este suceso conduce a muerte celular,

pérdida de la permeabilidad de la membrana, interrupción de la alimentación y posteriormente la muerte de los insectos (31). Por esta razón es utilizado como biopesticida, por su escaso impacto en el medio ambiente y por ser altamente específico para los organismos susceptibles, además de ser inocua para los humanos (32, 33,34).

En el laboratorio se ha demostrado que la protoxina Cry1Ac es un potente inmunógeno y adyuvante de mucosas. Cry1Ac de *B. thuringiensis* es una protoxina con acciones inmunogénicas y adyuvante tan potente como la toxina del cólera (35). En estudios previos se determinó la alta actividad inmunogénica de la p-Cry1Ac, al ser administrada vía intranasal y rectal, en ratones Balb/c (36). También se demostró mediante pruebas de inmunohistoquímica que la protoxina Cry1Ac se une a la superficie de las mucosas de intestino en ratones. pCry1Ac inducida *in situ* estimuló cambios en las propiedades electrofisiológicas del yeyuno del intestino del ratón. Los datos obtenidos indican una posible interacción *in vivo* de proteínas Cry en intestino de animales que podría inducir cambios en el estado fisiológico del intestino (37).

Trabajos recientes han señalado que la protoxina de Cry1Ac incrementó la inmunidad protectora contra *Naegleria fowleri* en ratones inmunizados intranasalmente, al incrementar la proporción de linfocitos que expresan los marcadores de activación CD25 y CD69 en ambos tejidos nasales NALT y NP (pasajes nasales); aumentó la proporción de células T que espontáneamente producen IL-4, IL-5 e IL-10 y el efecto fue mayor en NP que en el NALT; indujo respuestas específicas de células IgA e IgG en NP y modificó la expresión de los receptores de homing en las células T y B y de las moléculas de adhesión del NALT. Estos datos contribuyen a explicar la potente

inmunogenicidad de Cry1Ac administrada por la vía i.n., además de sustentar que Cry1Ac es una herramienta valiosa para caracterizar la inducción de las respuestas inmunes (38). Sin embargo, es importante recalcar que todos estos estudios están dirigidos al efecto de la protoxina y se ha pasado de largo que en la industria agropecuaria, el fitomejoramiento genético vía introducción de genes Cry, que codifican para cristales proteicos insecticidas de la toxina Cry1Ac, constituye una alternativa para reducir el ataque de insectos en cultivos de interés comercial. Motivo por el cual, este trabajo aporta nuevas evidencias sobre los efectos de la toxina Cry1Ac, la cual es utilizada en diferentes plantas transgénicas de consumo humano.

### **Objetivo general.**

Determinar mediante la prueba de ELISA indirecta, si la toxina Cry1Ac recombinante funciona como adyuvante para la inducción de respuestas de anticuerpos sistémicos y mucosos hacia antígenos de naturaleza proteica.

### **Objetivos Particulares.**

- 1) Analizar mediante la prueba de ELISA indirecta, la respuesta de anticuerpos (IgA, IgG, IgM, IgG1, IgG2) anti-Ovoalbúmina (OVA) en suero, lavados nasales, traqueobronquiales, intestinales y vaginales en ratones hembras Balb/c inmunizados por la ruta intranasal con OVA, OVA coadministrada con pCry1Ac, tCRry1Ac o toxina de cólera (CT).
- 2) Comparar la respuesta inmune anti-OVA, inducida con tCry1Ac + OVA con la inducida por la coadministración con CT+OVA.

## Material y Métodos

### Obtención de la toxina Cry1Ac.

Se utilizaron células competentes TOP10 de *Escherichia coli*, donadas por el Dr. Donald Dean (Ohio State University, Columbus, USA) que expresan el plásmido pCry1Ac. Las cepas resistentes a la ampicilina se cultivaron en medio LB suplementado con 100 µg/ml de este antibiótico a 37°C con agitación constante (300 rpm). A las 48 h de cultivo las bacterias se cosecharon por centrifugación (7000 rpm por 7 min), se resuspendieron en buffer TE (10 mM TrisCl, 1 mM EDTA, pH 8), se incubaron durante 30 min a 37°C con 1 mg/ml de lisozima (Sigma, MO) y se lisaron por sonicación (Fisher Sonic Dismembrator Model 300). La fracción insoluble del lisado se lavó dos veces con TE/Tween-20 1%, dos veces con 0.5 M NaCl y una vez con agua bidestilada. La protoxina Cry1Ac se solubilizó disgregando la pastilla en buffer PBS 30 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 70 mM NaHCO<sub>3</sub>, 1 % (v/v) 2-mercaptoetanol, pH 9.6) e incubando durante 30 min a 37°C. Posteriormente se recuperó el sobrenadante por centrifugación a 16 000 g durante 10 min, se determinó la concentración de proteína por el método de micro Bradford y se analizó la pureza por SDS-PAGE en un gel al 7.5%. Una vez obtenida la pCry1Ac se eliminaron los restos de endotoxina que pudiera tener al pasarla por una columna de Polimixina (Affi-Prep® Polymyxin Matriz BIO-RAD 156-0010) para posteriormente verificar la ausencia de restos de endotoxina con la prueba de detección semicuantitativa de endotoxina Sigma E-TOXATE® (Limulusamebocytelysate). La proteína se almacenó a 4°C hasta ser usada.

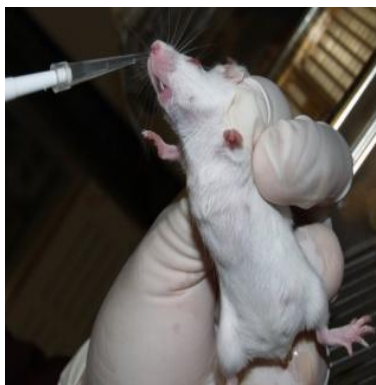
## **Digestión de la protoxina para obtener toxina Cry1Ac**

A partir de la concentración conocida de protoxina purificada se procedió a digerir con tripsina (1:50 w/w) por una hora 37°C en agitación ligera 250 rpm. Se colocaron 3 ml de muestra en filtros (Amicon Ultra, MILLIPORE de 50kDa de apertura de malla) y se agregaron 30µl de PMSF (1:100) para obtener una concentración final 1 mM. Se centrifugó 10 min. a 3000 rpm 4°C, se retiró el sobrenadante. Se agregó PBS1X completando un volumen de 3 ml en los filtros y centrifugar 10 min. a 3000 rpm 4°C (este procedimiento se repite al menos 4 veces). Se concentró a un 1ml, centrifugando 10 min. a 3000 rpm 4 °C la toxina purificada en PBS1X y se almacenó a 4° C para su uso posterior. Se determinó la concentración de proteínas por el método de micro Bradford y se verificó que la toxina muestre una banda limpia a través de SDS-PAGE (geles de poliacrilamida).

## **Inmunizaciones**

Administración intranasal de Cry1Ac conjugada o administrada con (CT) y (OVA), (Fig. 1). En todos los experimentos se usaron ratones hembras Balb/c de 8-10 semanas de edad. Se mantuvieron en jaulas con agua y alimento (Labdiet 5015, OMI Nutrition International). Los inmunógenos se administraron vía nasal colocándolos directamente en las fosas nasales 10 µl. Los grupos experimentales se conformaron por seis ratones hembras y cada uno recibió tres dosis de inmunógeno a los días 0, 7 y 14 para después ser sacrificados a los 7 días posteriores a la última inmunización. Para la inmunización se usaron como inmunógenos ovoalbúmina (OVA) sola 100 µg, pCry1Ac, tCry1Ac y toxina de cólera (CT) coadministrados con OVA (5µg de CT, 50 µg de tCry1Ac y 50µg de pCry1Ac + 50µg OVA). Se usaron animales inmunizados con PBS estéril como controles negativos.





**Fig.1 Inmunización i.n.**

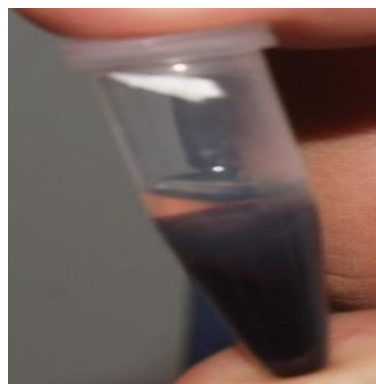
### **Obtención de muestras**

Se obtuvieron las muestras de secreciones de intestino delgado y grueso, vagina y de tracto respiratorio así como de suero.

Se obtuvo el suero a partir de la punción cardiaca con jeringas para tuberculina, (Fig. 2). El fluido se colectó en tubos de microcentrifuga eppendorf; para permitir la coagulación se mantuvieron a temperatura ambiente; después las muestras se centrifugaron a 8000 rpm. durante 10 minutos a 4°C y los sobrenadantes se almacenaron inmediatamente a -70°C (Fig. 3).

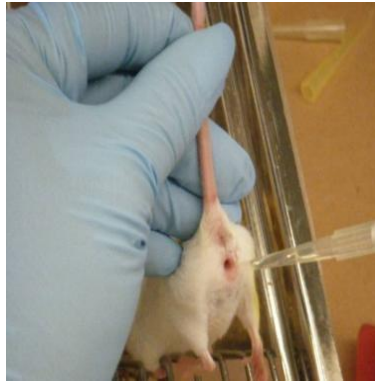


**Fig. 2 Punción cardiaca**



**Fig. 3 Suero**

Lavados Vaginales. Antes de sacrificar a los ratones se realizaron cinco lavados vaginales con 50  $\mu$ l de medio RPMI-1640 pH 7.4 (Sigma Chemical Co.) adicionado de garamicina (40  $\mu$ g/ml) (RPMI-G). El fluido se colectó en tubos de microcentrífuga eppendorf; las muestras se centrifugaron a 8000 rpm. durante 10 minutos a 4°C y los sobrenadantes se almacenaron inmediatamente a -70°C (Fig. 4).



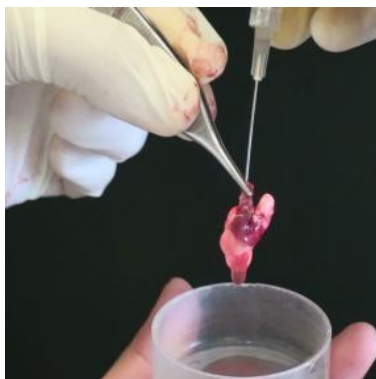
**Fig. 4 Lavados Vaginales**

Lavados nasales. Después de sacrificar a los ratones se realizaron los lavados mediante cánula con 150  $\mu$ l de medio PBS 1x. El fluido se colectó en tubos de microcentrífuga eppendorf; las muestras se centrifugaron a 8000 rpm. durante 10 minutos a 4°C y los sobrenadantes se almacenaron inmediatamente a -70°C (Fig. 5).



**Fig. 5 Lavados nasales**

Lavados traqueobronquiales. En el cuarto frío se disectaron cuidadosamente los pulmones unidos a la tráquea y se colocaron en una caja Petri. El exterior se lavó exhaustivamente con Hank's Balanced Salt (HBSS) (Sigma Chemical Co.). Con una jeringa con cánula conectada a la tráquea se pasaron 2 ml de medio RPMI-G en dos ocasiones y el líquido resultante se colocó en tubos de microcentrífuga eppendorf. Las muestras se centrifugaron a 8000 rpm. por 10 minutos a 4°C y los sobrenadantes se almacenaron inmediatamente a -70°C (Fig. 6).



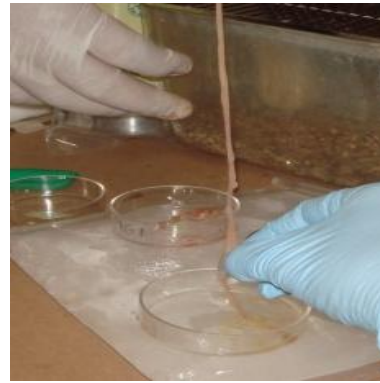
**Fig. 6 Lavados traqueobronquiales**

Líquidos intestinales. En el cuarto frío se disectaron los intestinos delgado y grueso y se colocaron en cajas Petri por separado (Fig. 7 y 8). El exterior se

lavó con HBSS. Se lavaron internamente mediante cánula con medio RPMI-G adicionado de ácido p-hidroximercuribenzoico (PHMB) (Sigma Chemical Co.) 100mM en trizma base 150mM (RPMI); para el intestino delgado se pasaron 5ml y para el grueso 3ml de medio RPMI. Las muestras se centrifugaron a 8000 rpm. durante 10 minutos a 4°C y los sobrenadantes se almacenaron inmediatamente a -70°C.



**Fig. 7 Lavados intestino grueso**



**Fig.8 Lavados intestino delgado**

### **Evaluación de la respuesta de anticuerpos mediante la técnica de ELISA indirecta.**

Se evaluó la respuesta de anticuerpos (IgA, IgG, IgM, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>), antígeno específico mediante la técnica de ELISA indirecta según el protocolo del distribuidor del kit (Peprotech).

Se utilizaron placas de 96 pozos de polivinilo. Se recubrió cada pozo con 100 µl de OVA [ ] 1µg/100µl en buffer de carbonatos pH 9.6. Las placas se incubaron durante 24 h a 4°C; se lavaron tres veces con PBS-T (PBS con Tween 20 al 0.05%). El bloqueo de los sitios reactivos se realizó con 100 µl de leche descremada (Sveltys) al 3% en PBS-T durante 2 h a temperatura ambiente, posteriormente se lavaron tres veces con PBS-T y una con PBS-1X.

Se agregaron 100 µl de PBS-1X a cada pozo. Los sueros se diluyeron en PBS-T 1:50. Los líquidos nasales, traqueobronquiales, intestinales y vaginales se colocaron directamente en los pozos de las placas. Se tomaron 100 µl de la muestra y se depositaron en el primer pozo, se mezcla y se toman 100 µl para hacer diluciones hacia abajo. (Todas las muestras se trabajaron por triplicado). Todas las muestras se incubaron durante 24 h a 4°C, posteriormente se lavaron tres veces con PBS-T y una con PBS-1X, para después colocarles el segundo anticuerpo y dejarlos incubar durante 2 h, los anticuerpos se diluyeron con PBS-1X (IgG e IgM 1:2000; IgA, IgG<sub>1</sub>, e IgG<sub>2</sub> 1:1000). Posteriormente se agrega el sustrato 100 µl de ABTS con peróxido de hidrogeno al 3% y se procede a registrar la absorbancia de las muestras a 405 nm en un lector de ELISA.

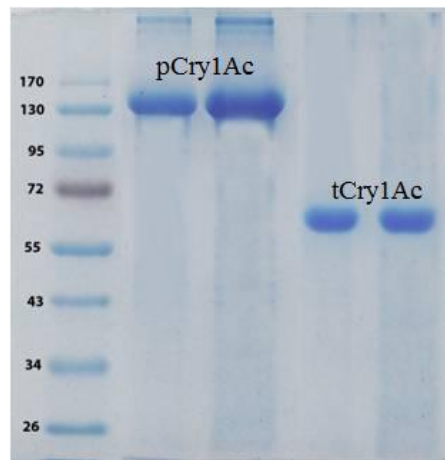
#### **Análisis estadístico.**

El análisis estadístico fue realizado con la técnica no paramétrica de Tukey, con una  $P < 0.05$  de significancia.

## Resultados

### Obtención de la tCry1Ac

Se obtuvo la tCry1Ac, a partir de la digestión con tripsina de la pCry1Ac. Se determinó la concentración de proteína a través del método de micro Bradford. Y se verificó que la banda resultante para tCry1Ac estuviera limpia a través de SDS-PAGE (geles de poliacrilamida) (Fig.9).



**Fig. 9 Obtención tCry1Ac (SDS-PAGE geles de poliacrilamida)**

**La inmunización intranasal con la tCry1Ac induce una respuesta de anticuerpos a nivel de mucosas.**

Determinar la capacidad de la tCry1Ac para aumentar la producción de anticuerpos a nivel de mucosas, fue el principal objetivo de este trabajo. Por tal motivo se analizó la capacidad inmunogénica de la tCry1Ac como adyuvante para estimular la producción de anticuerpos a nivel de mucosas.

Como se sabe la IgA es el principal anticuerpo que se encuentra en las secreciones mucosas, sobre todo en la mucosa de las vías aéreas, es esencial en la respuesta inmunológica innata, se genera más IgA por día (66 mg/kg/día)

que de cualquier otra clase de inmunoglobulina, esto representa dos tercios de la producción total de anticuerpos al día, en un ser humano adulto sano (39).

La presencia de IgA en lavados nasales (LN), demuestra que la inmunización intranasal con tCry1Ac desencadena respuestas a nivel mucosal. Para este isotipo los valores de absorbancia obtenidos en (LN) a partir de la técnica de ELISA indirecta, demuestran que la capacidad inmunogénica de la tCry1Ac fue superior a pCry1Ac y al grupo control ( $0.847 > 0.801 > 0.620$  respectivamente) (Fig. 10).

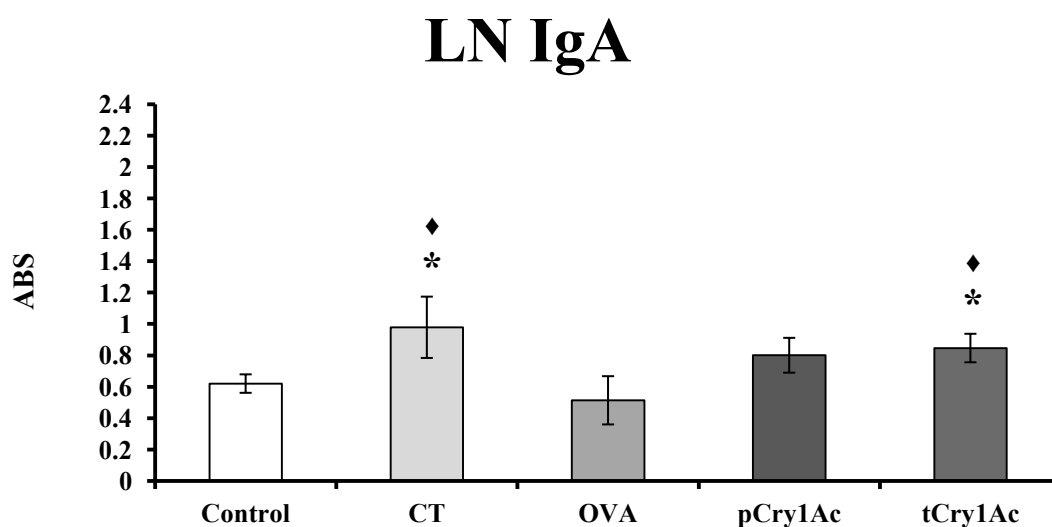
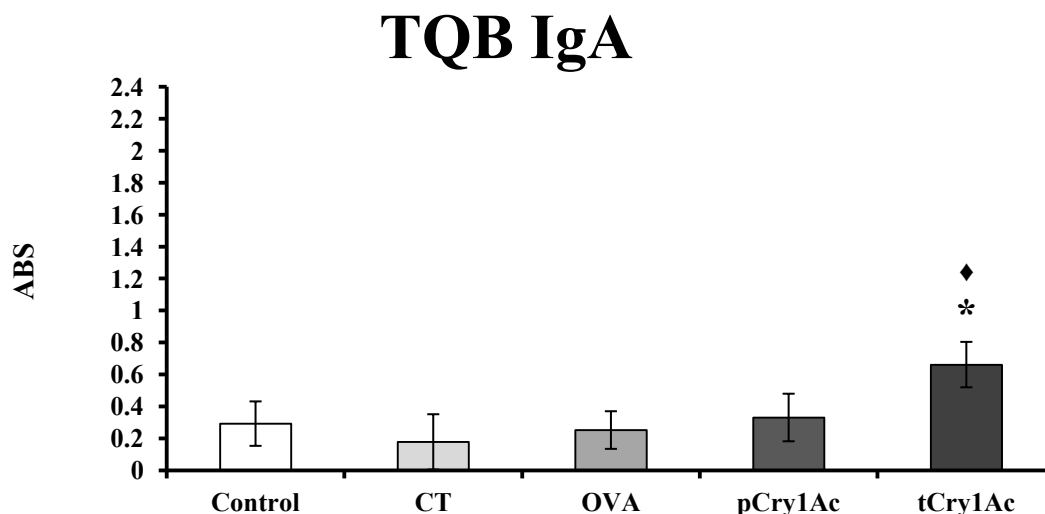


Fig. 10. Valores de las absorbancias para IgA, en muestras de lavados nasales (LN). Los valores representan la media de los porcentajes  $\pm$  la desviación estándar para el grupo control y los cuatro grupos experimentales. \* indica las diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre el grupo control y los grupos experimentales. ♦ indica las diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre el grupo inmunizado con la tCry1Ac y los grupos experimentales.

Al igual que en lavados traqueobronquiales (TQB), los valores de absorbancia registrados para el grupo inmunizado con tCry1Ac, fueron marcadamente mayores en relación con pCry1Ac y el grupo control, ( $0.661 > 0.330 > 0.292$  respectivamente) (Fig. 11).



**Fig. 11.** Valores de las absorbancias para IgA, en muestras de lavados traqueobronquiales (TQB). Los valores representan la media  $\pm$  la desviación estándar para el grupo control y los cuatro grupos experimentales. \* indica las diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre el grupo control y los grupos experimentales.  $\blacklozenge$  indica las diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) los grupos experimentales.

En intestino delgado (ID), sólo la tCry1Ac registró un aumento en la producción de IgA (0.324) de absorbancia, en comparación con la pCry1Ac y el grupo control que no registraron respuesta, (Fig. 12). En intestino grueso (IG) no existió respuesta de anticuerpos, para ningún grupo experimental.



## ID IgA

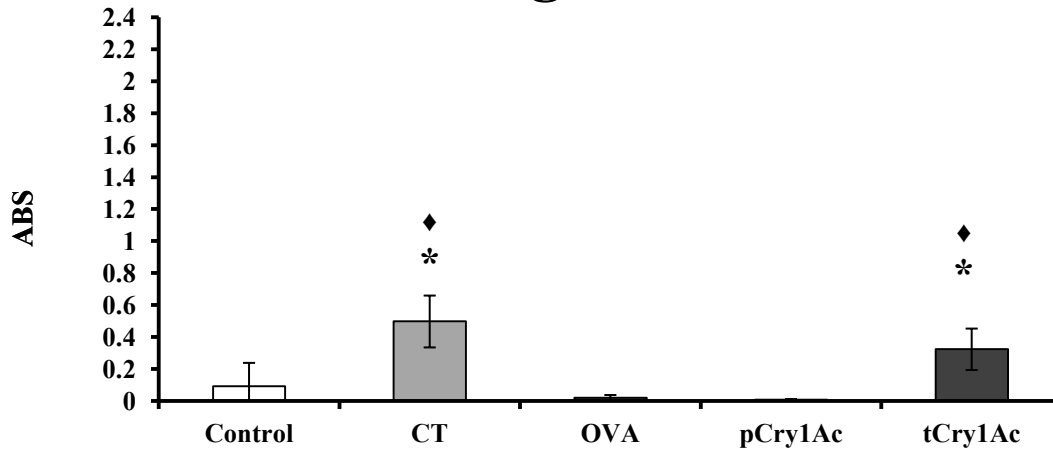


Fig. 12. Valores de las absorbancias para IgA, en muestras de lavados de intestino delgado (ID). Los valores representan la media  $\pm$  la desviación estándar para el grupo control y los cuatro grupos experimentales. \* indica las diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre el grupo control y los grupos experimentales. ♦ indica las diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los grupos experimentales.

Finalmente en lavados vaginales (LV), para el grupo inmunizado con tCry1Ac, se registraron los valores de absorbancia más elevados en relación a pCry1Ac ( $540 > 363$ ) y al grupo control que no generó respuesta, (Fig. 13).

## LV IgA

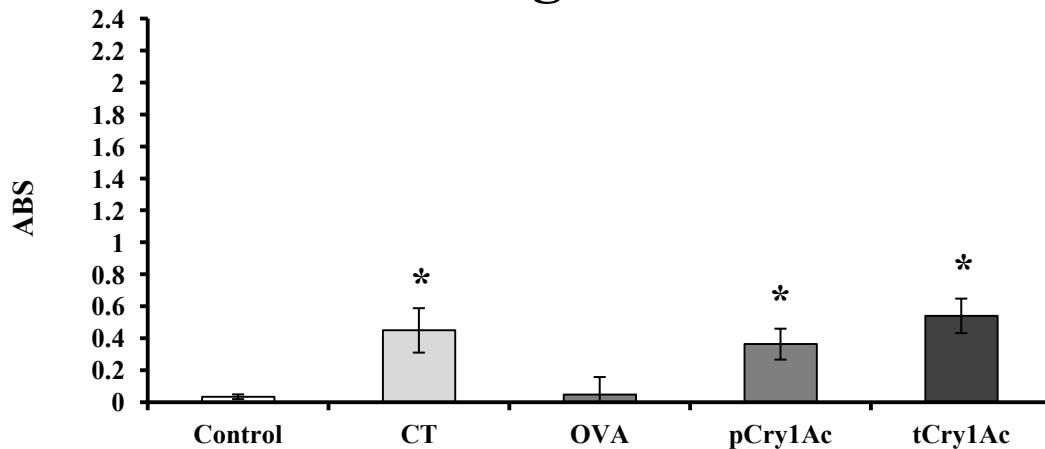


Fig. 13. Valores de las absorbancias, en muestras de lavados vaginales (LV). Los valores representan la media  $\pm$  la desviación estándar para el grupo control y los cuatro grupos experimentales. \* indica las diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre el grupo control y los grupos experimentales.

Resulta importante señalar que los mayores registros de la absorbancia para tCry1Ac y pCry1Ac, fue en lavados nasales (LN), destacando que esta es la vía de inmunización, se puede concluir que no existe diferencia entre ambos adyuvantes.

Cabe destacar que la tCry1Ac es capaz de inducir respuestas de anticuerpos en sitios distantes como la mucosa vaginal, siendo esta mayor, en comparación con la pCry1AC.

Es importante señalar que el efecto adyuvante de la tCry1Ac es en todas las mucosas igual o incluso mayor que la toxina del cólera (CT) como puede observarse en los lavados traqueobronquiales (TQB), ( $0.661 > 0.178$ ), (Fig. 11).

#### **tCry1Ac induce respuesta de anticuerpos a nivel sistémico.**

La inmunización intranasal con tCry1Ac no sólo fue capaz de generar respuesta a nivel mucosal, sino también a nivel sistémico. La presencia de IgG en suero confirma lo antes mencionado, este isotipo es el de mayor presencia en el suero y representa el 70-75% del reservorio total de inmunoglobulinas, además de ser la Ig. predominante en respuestas secundarias.

Incluso se observa que hay un aumento en la producción de las otras inmunoglobulinas comparados con el grupo control. Es importante señalar que a nivel sistémico la tCry1Ac tuvo un mayor efecto adyuvante con respecto a CT y pCry1Ac ( $1.645 > 1.583 > 1.524$  respectivamente), (Fig. 14).

# SUERO

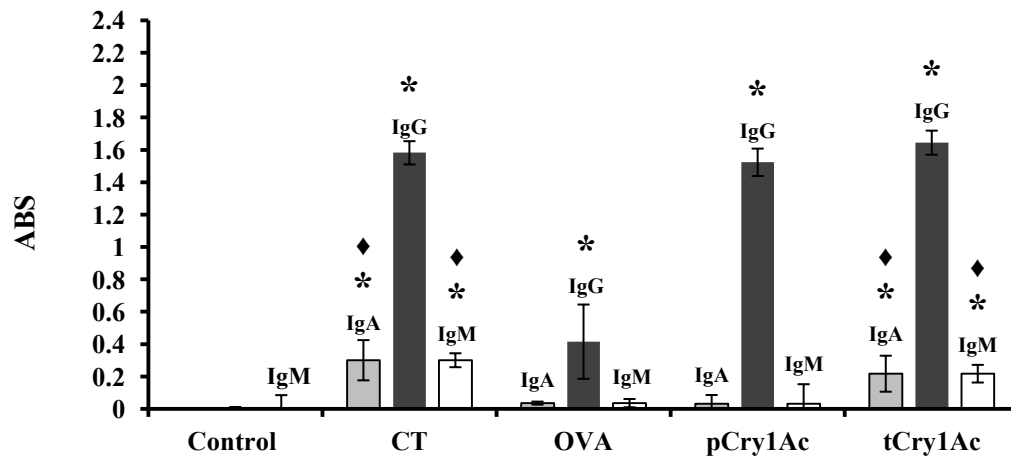


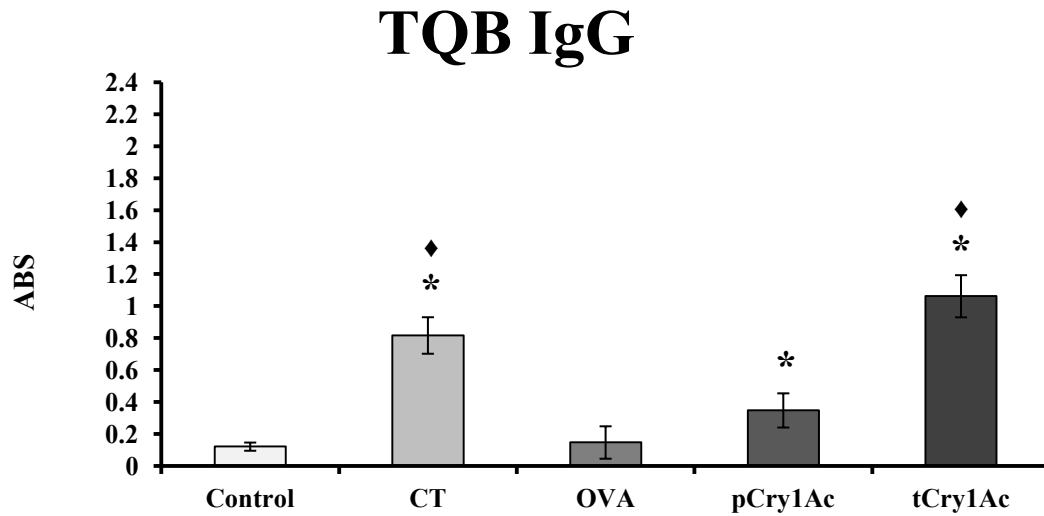
Fig. 14. Valores de las absorbancias, en muestras de suero, obtenido por centrifugación, después de extraer la sangre mediante punción cardiaca. Los valores representan la media  $\pm$  la desviación estándar para el grupo control y los cuatro grupos experimentales. \* indica las diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre el grupo control y los grupos experimentales. ♦ indica las diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los grupos experimentales.

**La toxina Cry1Ac tiene un efecto adyuvante en la producción de IgG a nivel de mucosas.**

Con base a los resultados anteriores, donde se observó que la tCry1Ac promueve la producción de IgG a nivel sistémico, se decidió evaluar la producción de IgG a nivel de mucosas.

Es importante mencionar que la presencia de IgG en mucosas no es originada por la presencia de esta en suero, ya que sus patrones de reconocimiento antigénico son diferentes, (40).

La producción de IgG en mucosas es menor a la sistémica, pero se puede observar un aumento en su producción, sobre todo en lavados traqueobronquiales (TQB), (Fig. 15).



**Fig. 15.** Valores de las absorbancias para IgG, en muestras de lavados traqueobronquiales (TQB). Los valores representan la media de los porcentajes  $\pm$  la desviación estándar para el grupo control y los cuatro grupos experimentales. \* indica las diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre el grupo control y los grupos experimentales. ♦ indica las diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los grupos experimentales.

En lavados nasales (LN), se observa que la producción de IgG fue mayor para el grupo experimental inmunizado con OVA + tCry1Ac en comparación al grupo de OVA + pCry1Ac, en todos los sitios analizados. Al igual que lo que ocurrió con IgA, la tCry1Ac en algunos casos, tuvo un efecto igual a la toxina de cólera (CT) como en lavados nasales (LN) e intestino delgado (ID) (Fig. 16 y 17) o incluso mayor como en lavados traqueobronquiales (TQB) e intestino grueso (IG), (Fig. 15 y 18).

## LN IgG

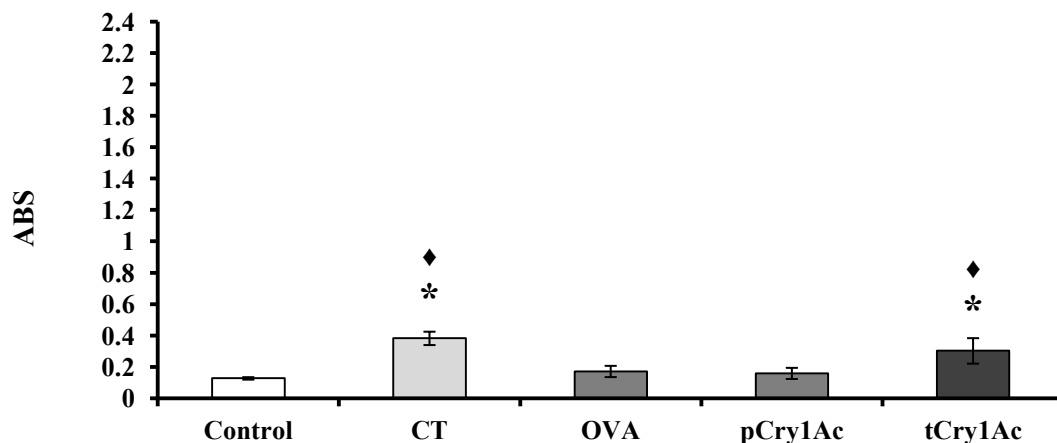


Fig. 16. Valores de las absorbancias para IgG, en muestras de lavados nasales (LN). Los valores representan la media  $\pm$  la desviación estándar para el grupo control y los cuatro grupos experimentales. \* indica las diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre el grupo control y los grupos experimentales. ♦ indica las diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los grupos experimentales.

## ID IgG

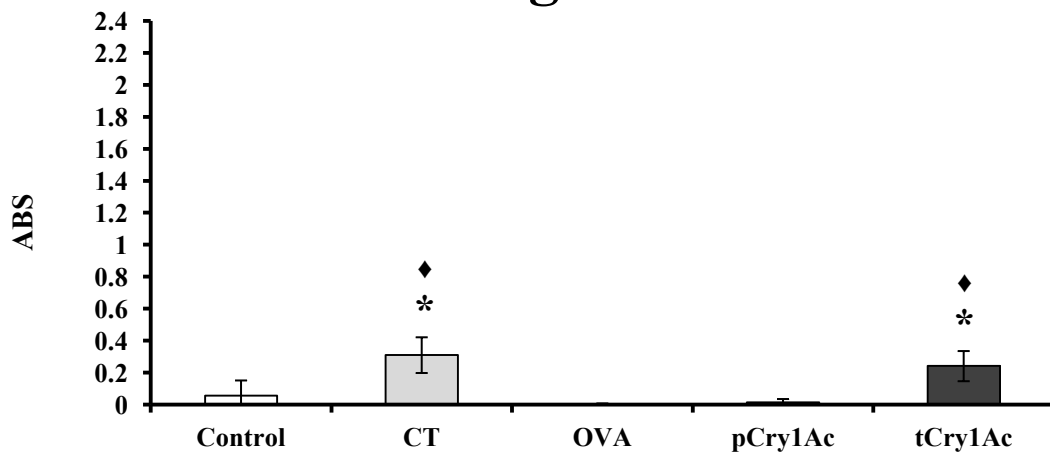


Fig. 17. Valores de las absorbancias para IgG, en muestras de lavados de intestino delgado (ID). Los valores representan la media  $\pm$  la desviación estándar para el grupo control y los cuatro grupos experimentales. \* indica las diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre el grupo control y los grupos experimentales. ♦ indica las diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los grupos experimentales.

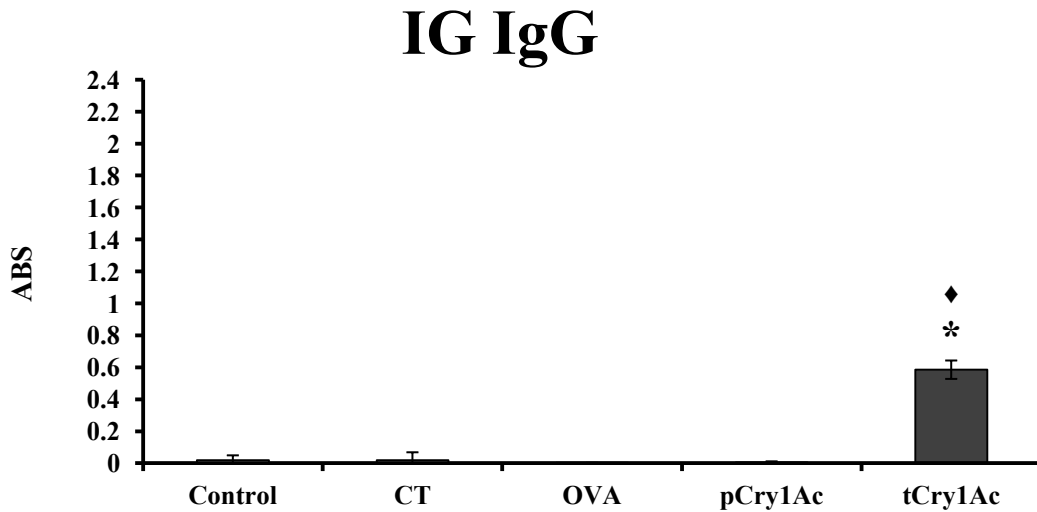


Fig. 18. Valores de las absorbancias para IgG, en muestras de lavados de intestino grueso (IG). Los valores representan la media  $\pm$  la desviación estándar para el grupo control y los cuatro grupos experimentales. \* indica las diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre el grupo control y los grupos experimentales.  $\blacklozenge$  indica las diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los grupos experimentales.

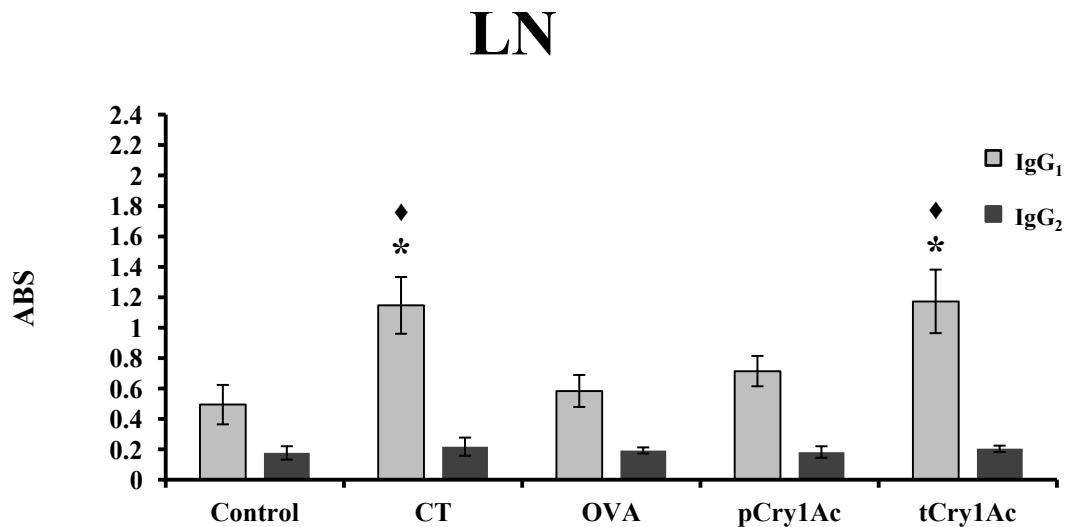
Los títulos de anticuerpos registrados en enfermedades inflamatorias de las mucosas, siempre serán mayores para IgG en relación con IgA, (41). Tal como resultó en nuestra investigación. Sin embargo un estudio realizado en E.U.A en la Agencia de Protección Ambiental (US Environmental Protection Agency), indica que *B. thuringiensis* formadora de las proteínas Cry, está libre de P-exotoxina y por lo tanto no produce efectos adversos significativos en ratas y ratones de laboratorio, (42).

### **La tCry1Ac induce una respuesta Th2 a nivel de mucosas y sistémico.**

Existen dos tipos de mecanismos en la respuesta inmune efectora, la mediada por células (Th1) caracterizada por producir INF-gamma, IL-2 y factor de necrosis tumoral beta (TNF-B) los cuales activan macrófagos y son responsables de la inmunidad mediada por células. En contraste la repuesta

(Th2) produce IL-4, IL-5, IL-10, e IL-13 y activan células B, las cuales son responsables de una fuerte respuesta por anticuerpos e inhiben muchas de las funciones del macrófago. Además está involucrada en la inmunidad de mucosas (2).

Por otra parte existen inmunoglobulinas que se relacionan con cada uno de estos tipos de respuesta para Th1 IgG<sub>2</sub> y para Th2 IgG<sub>1</sub>. En nuestros resultados, predomina IgG<sub>1</sub> en todas las mucosas, siendo siempre el título de absorbancia más alto para el grupo inmunizado con la tCry1Ac (Fig. 19 - 22).



**Fig.19.** Valores de las absorbancias, en muestras de lavados nasales (LN). Los valores representan la media de los porcentajes  $\pm$  la desviación estándar para el grupo control y los cuatro grupos experimentales. \* indica las diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre el grupo control y los grupos experimentales. ♦ indica las diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los grupos experimentales.

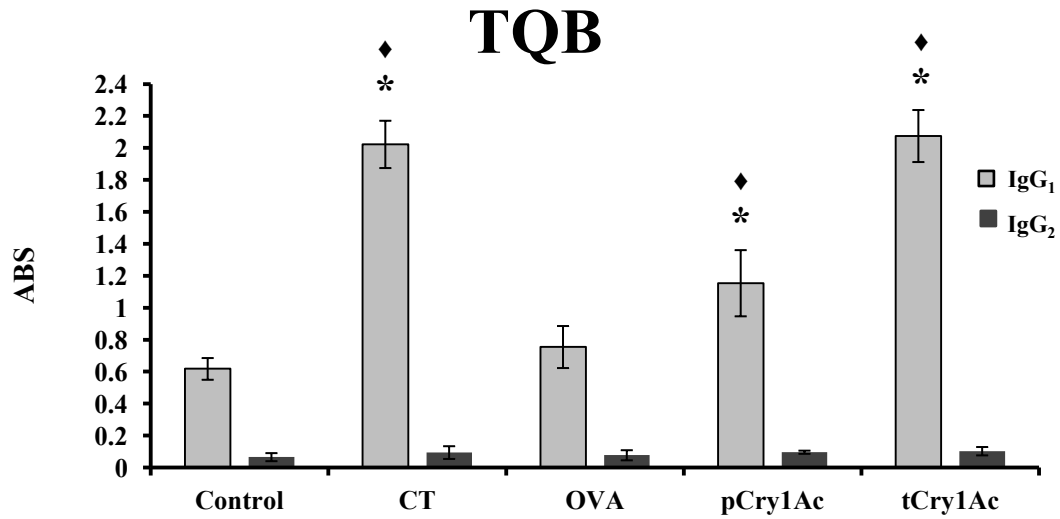


Fig. 20. Valores de las absorbancias, en muestras de lavados traqueobronquiales (TQB). Los valores representan la media de los porcentajes  $\pm$  la desviación estándar para el grupo control y los cuatro grupos experimentales. \* indica las diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre el grupo control y los grupos experimentales. ♦ indica las diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los grupos experimentales.

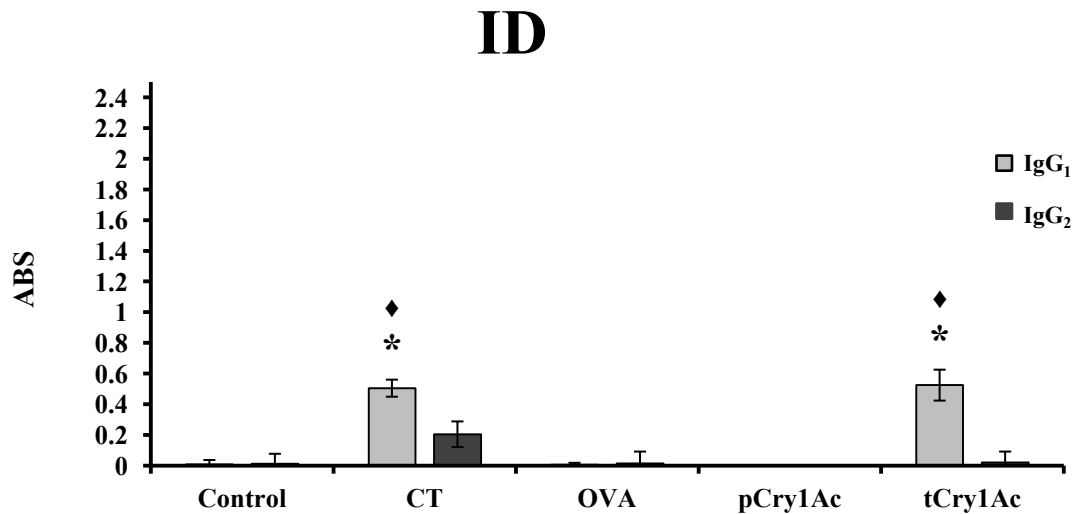


Fig. 21. Valores de las absorbancias, en muestras de lavados de intestino delgado (ID). Los valores representan la media  $\pm$  la desviación estándar para el grupo control y los cuatro grupos experimentales. \* indica las diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre el grupo control y los grupos experimentales. ♦ indica las diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los grupos experimentales.



# IG

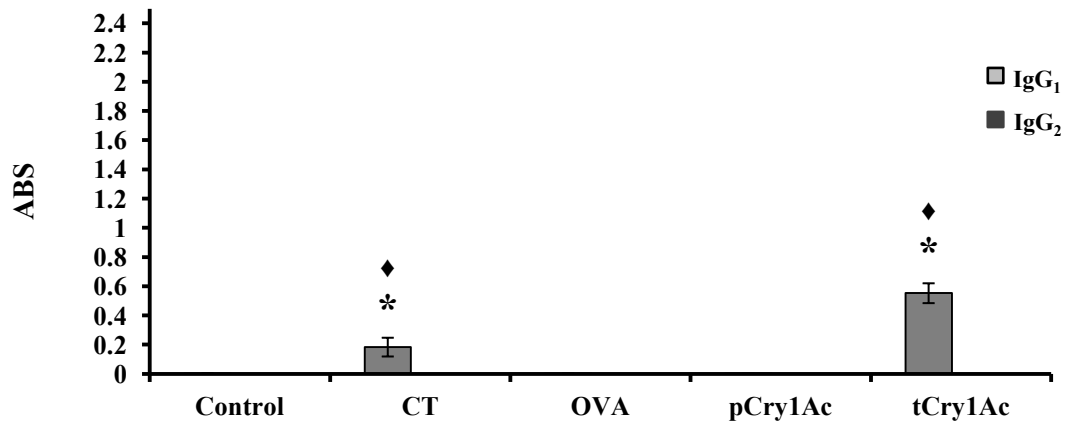


Fig. 22. Valores de las absorbancias, en muestras de lavados de intestino grueso (IG). Los valores representan la media  $\pm$  la desviación estándar para el grupo control y los cuatro grupos experimentales. \* indica las diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre el grupo control y los grupos experimentales. ♦ indica las diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los grupos experimentales.

Con respecto a toxina de cólera (CT) los valores de absorbancia son similares en todas las mucosas al igual que a nivel sistémico CT (1.850), tCry1Ac (1.750), (Fig.23).

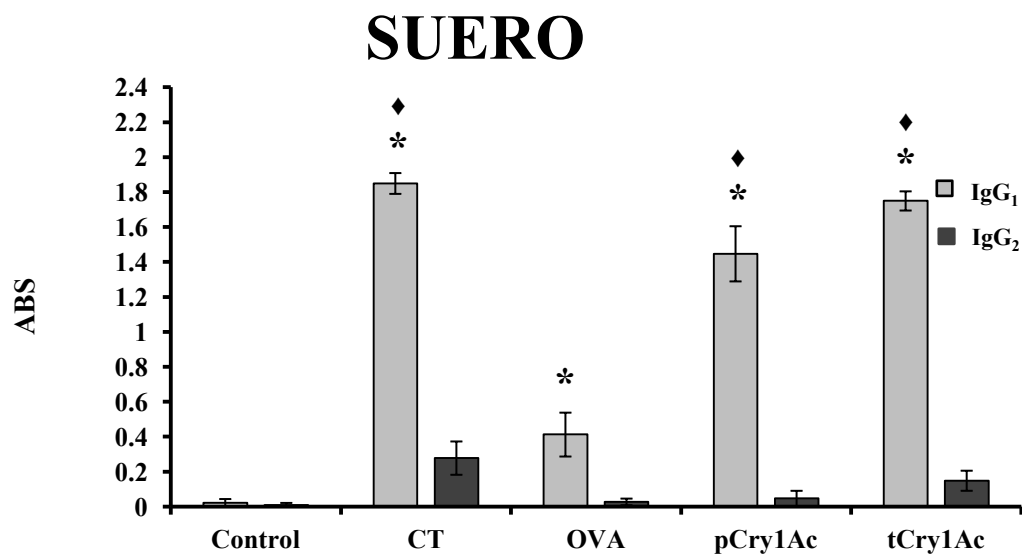


Fig. 23. Valores de las absorbancias, en muestras de suero, obtenido por centrifugación, después de extraer la sangre mediante punción cardiaca. Los valores representan la media  $\pm$  la desviación estándar para el grupo control y los cuatro grupos experimentales. \* indica las diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre el grupo control y los grupos experimentales. ♦ indica las diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los grupos experimentales.

## Discusión

El principal hallazgo de este trabajo fue el de demostrar que la inmunización intranasal con la tCry1Ac, es capaz de inducir la producción de anticuerpos tanto a nivel mucosal como sistémico. Este resultado es relevante ya que en comparación con pCry1Ac y toxina de cólera (CT), la tCry1Ac demostró ser igual de inmunogénica que ambas e incluso mejor.

Esto evidencia la capacidad adyuvante e inmunogénica de tCry1Ac de *Bt* al inmunizar con 50µg vía intranasal, ya que desencadenó respuestas tanto a nivel local como sistémico.

En estudios previos se determinó la alta actividad inmunogénica de la p-Cry1Ac de *Bt*, al ser administrada vía intranasal y rectal, en ratones Balb/c (36). Trabajos recientes han señalado que la protoxina de Cry1Ac incrementó la inmunidad protectora contra *Naegleria fowleri* en ratones inmunizados intranasalmente. Estos datos contribuyen a explicar la potente inmunogenicidad de Cry1Ac administrada por la vía i.n., además de sustentar que Cry1Ac es una herramienta valiosa para determinar la inducción de las respuestas inmunes (38). Sin embargo el efecto de la inmunización intranasal con la toxina Cry1Ac no había sido caracterizado. Por lo que uno de los principales hallazgos en esta investigación fue el comprobar el efecto adyuvante de tCry1Ac.

Los niveles de IgA en las muestras de lavados (nasal, traqueobronquial, intestino y vaginal) nos indican que tCry1Ac confiere protección a nivel local. Las mayores lecturas de este anticuerpo se registraron en los lavados nasales, esto se debe al sitio de inducción inmune, el NALT, ya que este tiene un

mayor número de células inmunocompetentes en proporción a los demás componentes del MALT, (43). Es importante destacar que se registraron lecturas de este anticuerpo en sitios tan distantes a la inmunización, como fue en intestino y en vagina, similar a lo reportado en un estudio en el que se demostró que la toxina de cólera subunidad B recombinante, al ser administrada vía intranasal generaba respuesta inmune tanto a nivel local (nasal, intestino, vagina) como sistémico, (44).

Los altos niveles de IgG en suero y mucosas, nos indican, la capacidad inmunogénica de Cry1Ac, para desencadenar una respuesta tanto a nivel local como sistémico. Además de estar presente en todos los sitios de análisis, siendo en lavados nasales y traqueobronquiales los registros más elevados. Este dato nos indica que probablemente hubo aumento en la permeabilidad de las mucosas (45). Este último dato concuerda con lo reportado por Mbawuike et al., donde explica de la protección que confiere a las mucosas la IgG, ya que se consideraba que su presencia era originada a partir de suero, y no secretada en mucosas (46).

La presencia de IgG<sub>1</sub> tanto en suero como en mucosas confirma la respuesta generada a nivel sistémico, ya que este anticuerpo polariza a una respuesta Th2, que es de tipo humoral. Estos datos son similares a los reportados en trabajos previos donde después de la inmunización intranasal con pCry1Ac coadministrada con extracto amebiano de *Naegleria fowleri*, se da una respuesta mucho mayor de IgG<sub>1</sub> que de IgG<sub>2</sub> (38).

Las respuestas observadas en este estudio de IgA e IgG al inmunizar con tCry1Ac son similares a las registradas para CT. Estos datos son congruentes con los reportados en trabajos anteriores, los cuales indican que CT es un buen adyuvante de mucosas e inmunógeno ya que genera repuestas tanto a nivel

local como sistémico, (45). Sin embargo se ha reportado, que al administrar por vía oral 5µg de CT purificada, fue suficiente para provocar diarrea en humanos, (47). Además de que se ha documentado que la CT es tóxica para el sistema nervioso central además de acumularse en los nervios olfatorios al ser administrada vía i.n. (48). Y aunque existen formas mutantes no tóxicas, su alto costo de producción, limita su uso.

En trabajos previos se había confirmado que la pCry1Ac era un potente adyuvante e inmunógeno de mucosas, luego de coadministrar pCry1Ac con albúmina bovina y antígeno de superficie de hepatitis B se obtuvieron mayores títulos de anticuerpos IgA, IgG e IgM contra albúmina bovina y contra antígeno de superficie de hepatitis B, que cuando estos antígenos se administraron sin pCry1Ac, se encontró que este efecto coadyuvante se obtenía en compartimientos sistémicos y de mucosa, tanto para la vía de administración nasogástrica como intraperitoneal y fue tan potente como el reportado para la toxina de cólera (35). También se determinó su alta actividad inmunogénica al ser administrada vía intranasal y rectal en ratones Balb/c (36). Recientemente se ha señalado que la pCry1Ac incrementó la inmunidad protectora contra *Naegleria fowleri* en ratones inmunizados intranasalmente (38).

En esta investigación se pudo determinar que la tCry1Ac generó mayores repuestas de anticuerpos (IgA, IgG, IgG<sub>1</sub>) en comparación con la protoxina y similares a CT. Esto al cotejar los títulos obtenidos en cada una de las muestras.

Estos datos contribuyen a explicar la potente inmunogenicidad de tCry1Ac administrada por la vía i.n., además de sustentar que tCry1Ac es una herramienta valiosa para caracterizar la inducción de las respuestas inmunes

(38). Las numerosas ventajas del uso de coadyuvantes sobre otras estrategias para aumentar la inmunogenicidad en las mucosas constituyen una buena razón para continuar trabajando en un tema donde la búsqueda de los mecanismos de acción de los nuevos coadyuvantes como tCry1Ac es sólo uno de los múltiples caminos a explorar. Motivo por el cual, este trabajo aportó nuevas evidencias sobre los efectos de la toxina Cry1Ac, la cual es utilizada en diferentes plantas transgénicas de consumo humano y que aparentemente su uso no entraña riesgos potenciales.

## **Conclusiones.**

La coadministración intranasal con tCry1Ac recombinante, demostró tener propiedades inmunogénicas y de adyuvante, al generar respuesta de anticuerpos en mucosas y a nivel sistémico.

Aumento considerablemente la producción de IgA en todas las mucosas, similar a CT y superando a pCry1Ac, brindando una protección inmunológica específica para todas las superficies mucosas, al producir un bloqueo a este nivel ante la penetración al organismo de agentes patógenos.

Los títulos de anticuerpos para IgG en suero, fueron más elevados que la pCry1Ac y CT.

También favoreció la producción de IgG en mucosas, lo que indica un aumento en la permeabilidad de estas.

La inmunización intranasal con la tCry1Ac, demostró la capacidad inmunogénica de la toxina, al ser capaz de generar respuesta de anticuerpos en sitios distantes a la inmunización, como lo indican los títulos de Ac. registrados en intestinos y lavados vaginales.

La tCry1Ac, desencadena respuestas de tipo Th2, registrada en todos los sitios de análisis.

tCry1Ac administrada intranasalmente, induce la respuesta inmune y favorece la producción de anticuerpos, similar a CT, pero difiere con respecto a esta, en representar bajo riesgo de toxicidad y costo de producción. La ventaja que provee la tCry1Ac al ser administrada en mucosas, la favorece para ser considerada como un fuerte candidato, para ser utilizada como adyuvante en la formulación de vacunas.

## REFERENCIAS

1. Parham P. 2005. The immune system. Garland Science. 2<sup>a</sup> ed. E.U.A. 560p.
2. Abbas A K, Litchman A H, Pillai S. 2008. Inmunología celular y molecular. 6<sup>a</sup>ed.Elsevier. 539p.
3. Negroni M. 2009. Microbiología estomatológica: fundamentos y guía práctica. 2<sup>a</sup> ed. Medica Panamericana. Argentina. 656p.
4. Janeway Jr, Travers, Walport & Shlomchik. 2003. Inmunobiología: El sistema inmunitario en condiciones de salud y enfermedad. 4<sup>a</sup> ed. MASSON, España. 623p.
5. Rodríguez-Orozco AR. 2006. Efecto adyuvante de la protoxina Cry1Ac en la inmunidad celular al administrarla con un buen agente patógeno de mucosas. *RevAlergMex*; 53 (4). 125-9.
6. Vega L M A. 2007. Inmunobiología de las mucosas, un nuevo enfoque de la protección y la adaptación al medio de nuestro organismo. *CINVESTAV*. 55-59.
7. Czerkinsky C, Russell MW, Lycke N, Lindblad M, & Holmgren J. 1989. Oral administration of a streptococcal antigen coupled to cholera toxin B subunit evokes strong antibody responses in salivary glands and extramucosal tissues. *InfectImm*; 57: 1072-1077.
8. Sanz M L. 2001. Inmunidad y prevención de la alergia a alimentos. *AlergolInmunolClin*; 16 (Extraordinario Núm. 2): 58-75.



9. Rodríguez-Orozco AR. 2004. Efecto de la protoxina Cry1Ac de *Bacillus thuringiensis* sobre células inmunocompetentes y su implicación en mecanismos de inmunogenicidad y adyuvancia. Tesis Doctorado en Ciencias en Biomedicina Molecular. IPN. Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía.
10. Vandeputte J. 2004. Introducción a la inmunología y Vacunología. Merial. Disponible en [http:// www.webveterinaria.com/merial/inmunologia](http://www.webveterinaria.com/merial/inmunologia).
11. Arranz E & Garrote J. A. 2006. El sistema inmune de la mucosa gastrointestinal. Inmunología General, 2º Medicina.
12. Tamura S, Shoji Y, Hasiguchi K, Aizawa C, Kurata T. 1994. Effects of cholera toxin adjuvant on IgE antibody response to orally or nasally administered ovalbumin. *Vaccine*; 12(13):1328–40.
13. Johansson EL, Rask C, Fredriksson M, Eriksson M, 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 Immune*; 66(2):514–20.
14. Nardelli-Haeffliger D, Benyacoub J, Lemoine R, Hopkins-Donaldson S, Potts A, Hartman F, Kraehenbuhl JP, De Grandi P. 2001. Nasal vaccination with attenuated *Salmonella typhimurium* strains expressing the Hepatitis B nucleocapsid: dose response analysis. *Vaccine*; 19(20–22):2854–61.
15. Russell MW, Moldoveanu Z, White PL, Sibert GJ, Mestecky J, Michalek SM. 1996. Salivary, nasal, genital, and systemic antibody responses in monkeys immunized intranasally with a bacterial protein antigen and the Cholera toxin B subunit. *Infect Immune*; 64(4):1272–83.

16. Bergquist C, Johansson EL, Lagergard T, Holmgren J, Rudin A. 1997. Intranasal vaccination of humans with recombinant cholera toxin B subunit induces systemic and local antibody responses in the upper respiratory tract and the vagina. *Infect Immune*; 65(7):2676–84.
17. Bermudez-Humaran LG, Cortes-Perez NG, Lefevre F, Guimaraes V, Rabot S, Alcocer-Gonzalez JM, Jean-Jacques G, Rodriguez-Padilla C, Tamez-Guerra RS, Corthier G, Gruss A, Langella P. 2005. A novel mucosal vaccine based on live Lactococci expressing E7 antigen and IL-12 induces systemic and mucosal immune responses and protects mice against human papillomavirus type 16-induced tumors. *J Immunol*; 175:7297–7302.
18. Gujhihashi K, Koga T, van Ginkel FW, Hagiwara Y, McGhee JR. 2002. A dilemma for mucosal vaccination: efficacy versus toxicity using enterotoxin based adjuvants. *Vaccine*, 20:2431-2438.
19. Arrington J, Braun RP, Dong L, Fuller DH, Macklin MD, Umlaf SW. 2002. Plasmid vectors encoding cholera toxin or the heat labile enterotoxin from *Escherichia coli* are strong adjuvants from DNA vaccines. *Journal of Virology*, 76(9):4536-4546.
20. Spangler BD. 1992. Structure and function of cholera toxin and the related *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. *Microbiol Rev*; 56: 622-647.
21. Dickinson BL and Clements JD. 1995. Dissociation of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin adjuvanticity from ADP-ribosyltransferase activity. *Infect Immun*; 63: 1617-1623.
22. 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.

23. Yamamoto S, Kiyono H, Yamamoto M et al. 1997. A nontoxic mutant of cholera toxin elicits Th2-type responses for enhanced mucosal immunity. *ProcNatlAcadSci U S A*; 94: 5267-5272.

24. Rodríguez-Orozco AR. 2003. The difficulty of obtaining immunologic response at mucosae. Use of coadyuvants. *RevAlergMex*; 50:161-5.

25. Vázquez RI, Moreno-Fierros L, Nery-Bazán L, de la Riva GA, López-Revilla R. 1999. *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac protoxin is a potent systemic and mucosal adjuvant. *Scand J Immunol*; 49: 578-84.

26. Rodríguez-Orozco AR, et al. 2007. El nuevo adyuvante de mucosas Cry1Ac potencia la capacidad de células mononucleadas humanas de inhibir el crecimiento bacteriano. *RevInvestClin*; 59 (2): 161-163

27. Helgason E, Okstad OA, Caugant DA, Johansen HA, Fouet A, Mock, M, Hegna I & Kolsto A-B. 2000. *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis*- One species on the basis of genetic evidence. *Appl.Envion. Microbiol.* 66, 2627-2630.

28. Miralles MP, Peres VJ. 2004. Aislamiento y establecimiento de una colección de *Bacillus thuringiensis*. In: Bravo, A. Ceron, J. (Eds.) *Bacillus thuringiensis* en el control biológico. Bogotá. 207-232p.

29. Crickmore N, Zeigler DR, Schnepf E, Van Rie J, Lereclus D, Baum J, Bravo A, Dean DH. *Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature. Disponible en: <http://www.biols.susx.ac.uk/Home/Neil>

30. Rukmini V, Reddy CY, Venkateswerlu G. 2000. *Bacillus thuringiensis* crystal  $\delta$ -endotoxin: Role of proteases in the conversion of protoxina to toxin. *Biochimie*. V. 82, 109-116p.
31. De Maagd RA, Bosch D, Stiekema W. 2003. Structure, diversity and evolution of protein toxins from spore-forming entomopathogenic bacteria. *Annual Review of Genetics*. V.37, 409-433p.
32. Burges HD, Hurst JA. 1978. Ecology of *Bacillus thuringiensis* in storage moths. *Journal of Invertebrate Pathology*. 131-139p.
33. McClintock JT, Schaffer CR, Sjoblad RD. 1995. A Comparative review of the mammalian toxicity of *Bacillus thuringiensis*- based pesticides. *PesticSci*; 45: 95-105.
34. Hofte H, Whiteley H. 1989. Insecticidal crystal protein of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol Rev*; 53: 242-55.
35. Vazquez RI, Moreno-Fierros L, Neri-Bazán L, de la Riva GA, López-Revilla R. 1999. *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac Protoxin is a Potent Systemic and Mucosal Adjuvant. *Scand J Immunol*; 49:578–584.
36. Moreno-Fierros L, Garcia N, Gutiérrez R, Lopez-Revilla R & Vazquez-Padron 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. *MicrobesInfect*; 2: 885-890.
37. Vazquez-Padron RI, Moreno-Fierros L, Neri-Bazan L, Martinez-Gil AF, de-la-Riva GA & Lopez-Revilla R. 2000. Characterization of the mucosal

and systemic immune response induced by Cry1Ac protein from *Bacillus thuringiensis* HD 73 in mice. *Braz J Med Biol Res*; 33: 147-155.

38. Rojas-Hernandez S, Rodriguez-Monroy MA, Lopez-Revilla R, Resendiz-Albor AA & Moreno-Fierros L. 2004. Intranasal coadministration of the Cry1Ac protoxin with amoebal lysates increases protection against *Naegleria fowleri* meningo encephalitis. *Infect Immun*; 72: 4368-4375.

39. Monteiro RC & Van de Winkel JC. 2003. IgA Fc Receptors. *Annual Review of Immunology* 21:177-204.

40. Wu HY, Nguyen HH, Russell MW. 1997. Nasal lymphoid tissue (NALT) as a mucosal immune inductive site. *Scand. J. Immunol* 46 506–513.

41. Reineker HC, Schreiber S, Stenson WF, & Macdermott RP. 1994. *Handbook of Mucosal Immunology*, Academic Press, New York. 439-456.

42. McClintock JT, Schaffer CR & Sjoblad RD. 1995. *Pestic. Sci.* 45 95-105.

43. Kuper CF, Koornstra PJ, Hameleers DMH, Biewenga J, Spit BJ, Duijvestijn AM, van Breda Vriesman PJC & Sminia T. 1992. The role of nasopharyngeal lymphoid tissue. *Immunology Today* Vol. 13, 219.

44. Wu HY & Russell MW. 1997. Induction of mucosal and systemic immune responses by intranasal immunization using recombinant cholera toxin B subunit as an adjuvant. *Vaccine*, Vol. 16, No. 2/3. pp. 286-292.

45. Wu HY, Russell MW, Gizurarson S, Tamura S, Kurata T, Hasiguchi K & Ogawa H. 1991. The effect of cholera toxin and cholera toxin B subunit on the nasal mucosa membrane. *Vaccine* 9, 825.

46. Mbawuike IN, Pacheco S, Acuna CL, Switzer KC, Zhang Y, Harriman GR. 1999. Mucosal immunity to influenza without IgA: an IgA knockout mouse model, *J. Immunol.* 162; 1230–1237.
47. Levine MM, Kaper JB, Black RE, Clements ML. 1983. New knowledge on pathogenesis of bacterial enteric infections as applied to vaccine development. *Microbiol Rev*;47:510–50.
48. Van Ginkel FW, Jackson RJ, Yuki Y, McGhee JR. 2000. The mucosal adjuvant cholera toxin redirects vaccine proteins into olfactory tissues. *J Immunol.* 165: 4778–82.