



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

“IDENTIFICACIÓN DE RECEPTORES DE LA PROTEÍNA CRY1Ac DE *Bacillus thuringiensis* EN MONOCITOS MURINOS”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

ILHUICATZI ALVARADO DAMARIS

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: Dra. LETICIA MORENO FIERROS
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM

COMITÉ TUTOR: Dr. ENRIQUE OTHON HERNANDEZ GONZALEZ
CENTRO DE INVESTIGACION Y DE ESTUDIOS AVANZADOS, IPN

COMITÉ TUTOR: Dra. EMMA BERTA GUTIÉRREZ CIRLOSMADRID
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM

MÉXICO, D.F.

DICIEMBRE, 2015



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.

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 31 de agosto de 2015, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** de la alumna **ILHUICATZI ALVARADO DAMARIS**, con número de cuenta **512013909**, con la tesis titulada **"IDENTIFICACIÓN DE RECEPTORES DE LA PROTEÍNA Cry1Ac DE *Bacillus thuringiensis* EN MONOCITOS MURINOS"**, realizada bajo la dirección de la **DRA. LETICIA MORENO FIERROS**:

Presidente: DR. LUIS ARTURO BAIZA GUTMAN
Vocal: DR. JUAN PABLO REYES GRAJEDA
Secretario: DR. ENRIQUE OTHON HERNÁNDEZ GONZÁLEZ
Suplente: DR. ALBERTO MONROY GARCÍA
Suplente: DRA. GLADIS DEL CARMEN FRAGOSO GONZÁLEZ

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 4 de noviembre de 2015.

M. del Coro Arizmendi
DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA



c.c.p. Expediente del (la) interesado (a)

AGRADECIMIENTOS

Un entero agradecimiento al Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM, por darme la oportunidad de cursar este posgrado y a su personal que en su mayoría siempre estuvieron dispuestos para atenderme y orientarme de la mejor manera.

Durante la realización del presente trabajo de investigación se contó con el apoyo del programa de Becas para Estudios de Posgrado del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) con número (CVU/Becario): 407495/262494.

Este proyecto fue financiado gracias a los siguientes apoyos:

- UNAM-PAPIIT IN219013
- SEP-CONACYT CB177612
- PAPCA

A la Dra. Leticia Moreno Fierros por ser mi directora de tesis.

Al Dr. Enrique Othon Hernández González y la Dra. Emma Berta Gutiérrez CirlosMadrid, miembros de mi comité tutorial, por apoyarme y orientarme en todo el camino que llevó este proyecto, por su siempre disposición muchas gracias.

ÍNDICE

<u>ABREVIATURAS</u>	3
<u>RESUMEN</u>	4
<u>ABSTRACT</u>	5
<u>INTRODUCCION</u>	6
INMUNIDAD EN MUCOSAS.....	6
VACUNAS MUCOSALES.....	7
ADYUVANTES MUCOSALES.....	8
PROTEÍNAS PROTOXINA Y TOXINA CRY1Ac.....	11
ESTRUCTURA Y FUNCIÓN.....	11
MECANISMO DE ACCIÓN CONOCIDO EN INVERTEBRADOS.....	12
RECEPTORES DESCRITOS EN INSECTOS PARA LAS PROTEÍNAS CRY1Ac.....	13
<u>ANTECEDENTES</u>	16
<u>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN</u>	18
<u>HIPÓTESIS</u>	18
<u>OBJETIVOS</u>	19
<u>MATERIALES Y MÉTODOS</u>	21
CULTIVO CELULAR.....	21
PURIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS CRY1Ac.....	21
DETERMINACIÓN DE LA UNIÓN DE CRY1Ac AMACRÓFAGOS MURINOS.....	22
INTERNALIZACIÓN DE LAS PROTEÍNAS CRY1Ac.....	23
EVALUACIÓN DE LA INDUCCIÓN DE MOLÉCULAS COESTIMULADORAS.....	23
DETERMINACIÓN DE LA INDUCCIÓN DE CITOCINAS.....	24
OBTENCIÓN DE LISADOS TOTALES Y PROTEÍNAS DE MEMBRANA DE MACRÓFAGOS MURINOS.....	24
ENSAYOS DE “BLOT” LIGANDO DE LISADOS TOTALES Y PROTEÍNAS DE MEMBRANA.....	25
IDENTIFICACIÓN DE RECEPTORES POR INMUNOPRECIPITACIÓN.....	26
IDENTIFICACIÓN DE RECEPTORES POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS.....	27
ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	27
<u>RESULTADOS</u>	28
OBTENCIÓN DE LAS PROTEÍNAS Cry1Ac.....	28

IDENTIFICACIÓN DE LA UNIÓN DE LAS PROTEÍNAS CRY1Ac A MACRÓFAGOS J774 POR CITOMETRIAYMICROSCOPIA CONFOCAL.....	29
INTERNALIZACIÓN DE LAS PROTEÍNAS CRY1Ac EN MACRÓFAGOS J774.....	31
INDUCCIÓN DE MOLÉCULAS COESTIMULADORAS CD80, CD86 CD40 EN MACRÓFAGOS J774 CON LAS PROTEÍNAS CRY1Ac.....	34
INDUCCIÓN DE MOLÉCULAS COESTIMULADORAS CD80, CD86 Y CD40 EN MACRÓFAGOS RAW 264.7 CON LAS PROTEÍNAS CRY1Ac.....	36
INDUCCIÓN DE CITOCINAS IL6, TNF- α , MCP-1 E IL10 EN MACRÓFAGOS RAW 264.7 CON LAS PROTEÍNAS CRY1Ac.....	40
IDENTIFICACIÓN DE RECEPTORES PARA LAS PROTEÍNAS CRY1Ac EN MACRÓFAGOS J774 POR ENSAYOS DE “BLOT” LIGANDO DE LISADOS TOTALES Y PROTEÍNAS DE MEMBRANA.....	41
IDENTIFICACIÓN DE RECEPTORES PARA LAS PROTEÍNAS CRY1Ac EN MACRÓFAGOS J774 POR ENSAYOS DE INMUNOPRECIPITACIÓN.....	44
RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE PROTEÓMICA Y PROPUESTA DE RECEPTORES PARA LAS PROTEÍNAS CRY1Ac EN CÉLULAS J774	48
IDENTIFICACIÓN DE RECEPTORES PARA LA PROTOXINA CRY1Ac EN MACRÓFAGOS RAW 264.7 POR ENSAYOS DE “BLOT” LIGANDO DE LISADOS TOTALES Y PROTEÍNAS DE MEMBRANA.....	49
IDENTIFICACIÓN DE RECEPTORES PARA LA TOXINA CRY1Ac EN MACRÓFAGOS RAW 264.7 POR ENSAYOS DE “BLOT” LIGANDO DE LISADOS TOTALES Y PROTEÍNAS DE MEMBRANA.....	51
IDENTIFICACIÓN DE RECEPTORES PARA LAS PROTEÍNAS CRY1Ac EN MACRÓFAGOS RAW 264.7 POR ENSAYOS DE INMUNOPRECIPITACIÓN.....	53
RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE PROTEÓMICA Y PROPUESTA DE RECEPTORES PARA LAS PROTEÍNAS CRY1Ac EN CÉLULAS RAW 264.7.....	58
<u>DISCUSIÓN</u>	61
<u>CONCLUSIONES</u>	70
<u>PERSPECTIVAS</u>	71
<u>ANEXOS</u>	72
<u>BIBLIOGRAFÍA</u>	73

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Modo de acción de los adyuvantes.....	8
Figura 2. Estructura y mecanismo de acción de las proteínas Cry1Ac.....	15
Figura 3. Estrategia experimental.....	20
Figura 4. Gel SDS-page y conjugación de las proteínas Cry1Ac con FITC.....	28
Figura 5. Unión temporal de la protoxina y toxina Cry1Ac a las células J774 por citometría.....	29
Figura 6. Unión de la protoxina y toxina Cry1Ac a las células J774 por microscopía confocal.....	30
Figura 7. Análisis por microscopía confocal de la colocalización de la protoxina y toxina Cry1Ac con Rab 5 y Rab 7 en macrófagos J774.....	31
Figura 8. Efecto de la protoxina y toxina Cry1Ac en la expresión de moléculas coestimuladoras en células J774.....	35
Figura 9. Unión temporal de protoxina y toxina Cry1Ac a la línea celular Raw 264.7 por citometría.....	36
Figura 10. Efecto de la protoxina y toxina Cry1Ac en la expresión de moléculas coestimuladoras en células Raw 264.7.....	38
Figura 11. Efecto de la protoxina y toxina Cry1Ac en la expresión de citocinas en células Raw 264.7.....	40
Figura 12. Identificación de posibles receptores para las proteínas Cry en ensayos de “blot” ligando en proteínas totales de células J774.....	42
Figura 13. Identificación de posibles receptores para las proteínas Cry en ensayos de “blot” ligando de proteínas de membrana en células J774.....	43
Figura 14. Identificación de posibles receptores para las proteínas Cry en ensayos de inmunoprecipitación y “blot” ligando de la inmunoprecipitación con células J774.....	45
Figura 15. Comparación de pesos moleculares de los resultados obtenidos con los diferentes ensayos de” blot” ligando con las células J774.....	47
Tabla 1: Tabla de resumen con los resultados de proteómica con los candidatos receptores para las proteínas Cry1Ac.....	48
Figura 16. Identificación de posibles receptores para la protoxina Cry1Ac en ensayos de “blot” ligando de proteínas totales, proteínas de membrana y citoplasma con las células Raw 264.7.....	49

Figura 17. Identificación de posibles receptores para la toxina Cry1Ac por ensayos de “blot” ligando de proteínas totales, de membrana y citoplasma con las células Raw 264.7.....	51
Figura 18. Identificación de posibles receptores para la protoxina Cry1Ac por ensayos de inmunoprecipitación con las células Raw 264.7.....	53
Figura 19. Comparación entre las bandas obtenidas en la inmunoprecipitación con la protoxina y los ensayos de “blot” ligando de las células Raw 264.7.....	54
Figura 20. Identificación de posibles receptores para la toxina Cry1Ac por ensayos de inmunoprecipitación con las células Raw 264.7.....	55
Figura 21. Comparación entre las bandas obtenidas en la inmunoprecipitación y los ensayos de “blot” ligando de la toxina Cry1Ac en las células Raw 264.7.....	56
Figura 22. Comparación entre los resultados del “blot” ligando de la PCry1Ac y la TCry1Ac.....	57
Tabla 2: Tabla de resumen con los resultados de proteómica de los candidatos a receptores para las proteínas Cry1Ac para las células Raw 264.7.....	58
Figura 23. Blast del porcentaje de homología entre el sitio de unión de la cadherina de insectos con la cadherina de ratón.....	59
Figura 24. Blast del porcentaje de homología entre la fosfatasa alcalina de insecto y la fosfatasa de macrófagos.....	60

ABREVIATURAS

ADP:	Adenosin di fosfato	Ig:	Inmunoglobulina
APCs:	Células presentadoras de antígeno	IL:	Interleucina
APC:	Alofococianina	LPS:	Lipopolisacárido
ALP:	Fosfatasa alcalina	LT:	Enterotoxina termolábil
APN:	Aminopeptidasa N	MALT:	Tejido linfoide asociado a mucosas
BCG:	Vacuna contra Bacillus Calmette-Guerín	MCP-1	Proteína quimio atrayente de monocitos
BSA:	Albúmina sérica bovina	NALT:	Tejido linfoide asociado a nariz
BT:	<i>Bacillus thuringiensis</i>	PBA:	Amortiguador de fosfatos salinos con albúmina
CAD:	Cadherina	PE:	Ficoeritrina
cAMP:	Adenosin mono fosfato cíclico	PE-Cy5:	Ficoeritrina-cianina
Cy5:	Cianina 5	PFA:	Paraformadehido
DCs:	Células dentríticas	PRRs:	Receptores de reconocimiento de patrones
DTT:	Ditiotreitol	SFB:	Suero fetal bovino
FITC:	Fluoresceína	TLRs:	Receptores tipo toll
GALT:	Tejido linfoide asociado al intestino	TNFα:	Factor de necrosis tumoral alpa
GM1:	Gangliosido GM1		
GPI:	Glicosilfosfatidil-inositol		

RESUMEN

Ante la falta de adyuvantes seguros y eficaces a nivel mucoso y dada la vulnerabilidad que las superficies mucosas presentan a la entrada de patógenos y agentes infecciosos, es necesaria la búsqueda de inmunoestimuladores capaces de inducir protección en estos sitios, por lo que nuestro grupo de trabajo propone a las proteínas Cry1Ac derivadas de *Bacillus thuringiensis* (protoxina y toxina) como buenos candidatos. Estas proteínas son ampliamente utilizadas como biopesticidas seguros, no tóxicos para vertebrados y actualmente se comercializan cultivos transgénicos que expresan de manera recombinante la toxina Cry1Ac por su aparente inocuidad. Sin embargo, hemos demostrado que estas proteínas son potentes inmunógenos y tienen potencial adyuvante en ratones BALB/c cuando son administradas por diversas vías de inmunización, también tienen la capacidad de activar *in vitro* cultivos primarios de macrófagos, linfocitos B y linfocitos T induciendo la sobreexpresión de moléculas coestimuladoras y producción de citocinas proinflamatorias en macrófagos. De esta manera, el objetivo de este trabajo fue identificar los posibles receptores para estas proteínas en una línea celular de monocito-macrófago murino. Para ello se determinó la unión de las proteínas Cry1Ac a macrófagos murinos de la línea celular J774 y Raw 264.7, también se encontró que ambas proteínas incrementan la expresión de marcadores de activación como CD80, CD86 y la producción de citocinas proinflamatorias como IL-6, TNF- α y MCP-1. Los estudios realizados por microscopía confocal muestran a las proteínas Cry1Ac en la superficie celular y en el citoplasma de los macrófagos colocalizando con vesículas de endosomas tempranos (Rab 5 y Rab 7) por lo que se sugiere que estas proteínas son internalizadas por medio de un receptor. En los ensayos de Inmunoprecipitación y de “blot” ligando de las proteínas totales y de proteínas de membrana, se identificaron las proteínas responsables de unión a Cry1Ac, las cuales fueron secuenciadas mediante espectrometría de masas. Los resultados obtenidos sugieren 3 proteínas de unión a Cry1Ac pero presumimos que solo 2 (SCUBE 1 y Tmprss 13) para protoxina y toxina respectivamente pueden ser los receptores, que al unirse a estas proteínas son activados e inducen los efectos observados en este trabajo como el incremento en las moléculas de activación y la producción de citocinas proinflamatorias en macrófagos de la línea celular J774. En las células Raw 264.7 los candidatos más fuertes a receptores para la PCry1Ac fue la α -enolasa y para la Tcry1Ac la fosfatasa alcalina. Las perspectivas de este trabajo son demostrar la especificidad de los receptores para la PCry1Ac realizando el bloqueo mediante RNA de interferencia y demostrar la presencia de este receptor en otras líneas celulares de mamíferos así como su papel *in vivo*, esto dará la pauta para conocer más sobre los efectos de estas proteínas en mamíferos y su posible utilización como adyuvantes seguros y eficaces.

ABSTRACT

Mucosal surfaces are highly vulnerable to invasion of pathogens, and it is difficult to achieve significant immune responses at these mucosal sites, because they are highly regulated. One strategy to improve vaccines is the use of adjuvants but there are not still safe mucosal adjuvants available. We have proposed that Cry1Ac proteins from *Bacillus thuringiensis*, protoxin (pCry1Ac) and toxin (tCry1Ac), may function as good mucosal adjuvant candidates, because particularly pCry1Ac is a potent systemic and mucosal immunogen and adjuvant able to increase protection against several infection models. These proteins are widely used as bio pesticides and are considered no toxic for vertebrates. Currently, transgenic crops expressing Cry1Ac toxin has been commercialized and some are used for human consume. Previous studies from our group have shown that recombinant soluble (pCry1Ac) and (tCry1Ac) are able to activate the adherent macrophage-enriched cells, T lymphocytes and B lymphocytes isolated from different sources detached of the mice. In macrophages we have observed upregulation of the costimulatory molecules B7.1 (CD80) and B7.2 (CD86) and the induction of proinflammatory cytokines. This work was focused in investigating the existence of the possible receptors for theses Cry protein, pCry1Ac and tCry1Ac in a cell line of monocytes-macrophages. **Methodology.** First we determined the binding of Cry proteins to the cell line. The binding assays and internalization of pCry1Ac-FITC in the macrophage cell line was analyzed by flow cytometry and confocal microscopy. The endocytic vesicles were visualized with (Rab5-Pe and Rab7-Cy5) looking for colocalization with pCry1Ac-FITC. We also identified proteins as possible receptor candidates by blot ligand assays in total lysates and in macrophages membrane proteins which were later confirmed by immunoprecipitation assays and identified by mass spectrometry. **Results.** Flow cytometry and confocal microscopy data confirmed the ability of Cry1Ac proteins to bind surface of macrophages. Was also observed that part of the protein was being endocytosed and colocalized with Rab5 and Rab7 these results led us to suggest this process is mediated by a receptor. The activation of RAW 264.7 murine macrophage cell line was confirmed by activation of the costimulatory molecules (CD80) and (CD86) and the induction of proinflammatory cytokines IL6, TNF- α and MCP-1. In the blot ligand and immunoprecipitation assays are showed bands that suggest the existence of possible receptors for the protoxin and toxin; these may be responsible for the activation effects caused by the pCry1Ac and tCry1Ac in macrophages. The results by mass spectrometry indicate to Scube 1 and Tmprss 13 as possible for protoxin and toxin respectively in the J774 cell line. While in the Raw 264.7 cell line the receptor candidate are the α -enolase and some heat-shock proteins for the pCry1Ac and alkaline phosphatase for the tCry1Ac. The next assays are to demonstrate the functional role of these receptors for the Cry1Ac-induced activation of macrophages. These assays may contemplate the use of interference RNA for these receptors to determine if the activation effects induced by Cry1Ac are blocked. **Conclusion.** Cry1Ac protoxin binds to the membrane and induce macrophages activation by the presence of specific receptors such a as HSP70 and α -enolase, but its role still need to be confirmed.

INTRODUCCIÓN

INMUNIDAD EN MUCOSAS

La mayoría de los agentes infecciosos que penetran al organismo utilizan como puerta de entrada las superficies mucosas como: gastrointestinales, respiratorias y genitourinarias, por lo que lo ideal sería desarrollar vacunas que nos protejan desde la entrada del patógeno (Zhang et al., 2014). Sin embargo, la inmunidad de mucosas implica una compleja participación de los componentes de la respuesta inmune innata y adaptativa; ya que las superficies de mucosas mantienen el equilibrio entre los patógenos externos, la gran cantidad de microorganismos comensales y los diversos componentes de la dieta (Zhou et al., 2013b). Este equilibrio inmunológico mucoso es mediado por el constante muestreo de antígenos que realizan los distintos tipos de células, como las células “microfold” (M) y las presentadoras de antígeno (APCs) en los tejidos mucosos: incluyendo células dendríticas (DCs), macrófagos y células B (Zhu et al., 2013, Shao et al., 2013).

Los diferentes tejidos mucosos se encuentran inmunológicamente conectados cada uno para formar el sistema inmune mucoso conocido como tejido linfoide asociado a mucosas (MALT) (Zhou et al., 2013a). Este sistema puede actuar independientemente del sistema inmune sistémico (Zhang et al., 2013). A pesar de la separación anatómica, las diferentes regiones del MALT están funcionalmente conectadas y entrecruzadas, lo que permite que las células B y células T, activadas por el antígeno en un lugar, aparezcan como células efectoras en otros sitios mucosos distantes (Zhang et al., 2013). Por ejemplo, la inmunización oral e intranasal puede estimular la respuesta de células B y T, en el tracto intestinal y urogenital. A pesar de esta conectividad funcional, la inmunización a través del tejido linfoide asociado a nariz (NALT), preferentemente induce inmunidad antígeno específica, en el tracto respiratorio y reproductivo, mientras que la inmunización por el tejido linfoide asociado a intestino

(GALT), conduce predominantemente una respuesta protectora y efectiva solo en el tejido gastrointestinal (Hu et al., 2009).

Estos hallazgos pueden ofrecer herramientas para el diseño de vacunas mucosas; ya que se podrían administrar por vía intranasal y prevenir infecciones genitourinarias evitando así el inconveniente de administrar la protección por vía vaginal. (Chen et al., 2010, Holmgren et al., 2003, Lawson et al., 2011).

Sin embargo, solo un número pequeño de vacunas mucosas han sido aprobadas para su administración en humanos y sacadas al mercado.

VACUNAS MUCOSAS.

La mayoría de las vacunas que hay en la actualidad son administradas por vía parental e inducen una buena respuesta sistémica, pero una pobre respuesta inmunológica en mucosas, por lo tanto; son menos efectivas contra infecciones en las mucosas (Rhee et al., 2012).

La vacunación por mucosas es la capacidad de inducir una respuesta inmune protectora tanto en los compartimientos inmunes mucosos como sistémicos. Dentro de las ventajas de las vacunas en mucosas es que pueden ofrecer bajos costos de producción, fácil administración, una mejor vía de inmunización, acceso libre de agujas, así como una alta capacidad de inmunización en caso de pandemias (Holmgren et al., 2003, Rhee et al., 2012).

A pesar de las muchas ventajas que se han mencionado de estas vacunas mucosas, existen también algunas desventajas, como la poca inmunogenicidad debido a la tolerancia inmunológica propia de las mucosas. En este ámbito, se están desarrollando herramientas para superarlas como el uso de adyuvantes para mejorar los sistemas de entrega de antígenos.

La vacunación mucosa, en contraste de las vacunas inyectadas, ofrecen una protección adicional por la secreción de anticuerpos específicos en los sitios mucosos (Neutra and Kozlowski, 2006). Sin embargo, existen algunas limitaciones, por vía mucosa los antígenos son generalmente menos inmunogénicos y son aptos para inducir tolerancia, donde el hospedero se esfuerza por mantener la homeostasis de la mucosa al responder a antígenos

de la mucosa. Además, solo un número limitado de vacunas mucosas han sido probados en humanos y salidos al mercado: la vacuna oral de la polio, la vacuna oral atenuada de la subunidad B contra el cólera, otra contra la fiebre tifoidea, igualmente atenuada, y la también conocida Bacillus Calmette-Guerín (BCG) contra la tuberculosis. Actualmente se han adicionado dos vacunas más, una vacuna oral atenuada contra el rotavirus y la otra intranasal contra la influenza con una enterotoxina como adyuvante que estuvo poco tiempo en el mercado y fue retirada después por sus reacciones adversas como parálisis facial. Cabe señalar que todas estas vacunas son administradas con los patógenos vivos atenuados dando una probabilidad de riesgo para los vacunados y para asegurar la seguridad a los pacientes, lo ideal de una vacuna sería que contenga solo los epítopes inmunogénicos, sin presentar el riesgo de contraer la enfermedad (Holmgren et al., 2003).

Esto ilustra la complejidad en el desarrollo de las vacunas mucosas. Al respecto, la inducción de la inmunidad mucosa a través de la vacunación es una tarea verdaderamente difícil, y potentes adyuvantes mucosos, vectores u otros sistemas de entrega de antígeno se requiere para una vacunación mucosa exitosa (Fujikuyama et al., 2012).

ADYUVANTES DE MUCOSAS.

Los adyuvantes son generalmente definidos como agentes que pueden potenciar y modular las reacciones inmunes contra los antígenos. El término adyuvantes esta derivado del latín *adjuvare*, que significa “ayudar”. Los adyuvantes son requeridos para ayudar a las vacunas a inducir una mayor respuesta inmune protectora por más tiempo (Rhee et al., 2012).

Un buen adyuvante debe cumplir con las siguientes propiedades: debe ser no tóxico en el rango de la dosis de su efecto adyuvante, estimular fuertemente la inmunidad celular como humoral, ofrecer una buena memoria inmunológica, no inducir reacciones de autoinmunidad e hipersensibilidad, no ser mutagénico, carcinogénico, teratogénico y ser estable a la temperatura y pH para su almacenamiento (Marciani, 2003).

Los adyuvantes pueden actuar aumentando la respuesta inmune adaptativa y generando una memoria inmunológica efectiva. Fácilmente la inmunidad protectora puede ser

generada como el resultado de una armoniosa interacción entre la inmunidad innata y adaptativa. Muchos de los adyuvantes actúan sobre las APCs, tal como las DCs. Como se describe en la Fig. 1, las células requieren de diferentes señales para inducir una respuesta inmune potente: la señal 0 que se refiere al reconocimiento del antígeno y activación de la APCs; señal 1 que es la presentación de antígeno y señal 2 conocida como la coestimulación (Schijns, 2001). Los adyuvantes influyen en la migración, maduración, presentación y expresión de moléculas coestimuladoras de las DCs y estos efectos favorecen o permiten la respuesta de las células T y B hacia el antígeno.

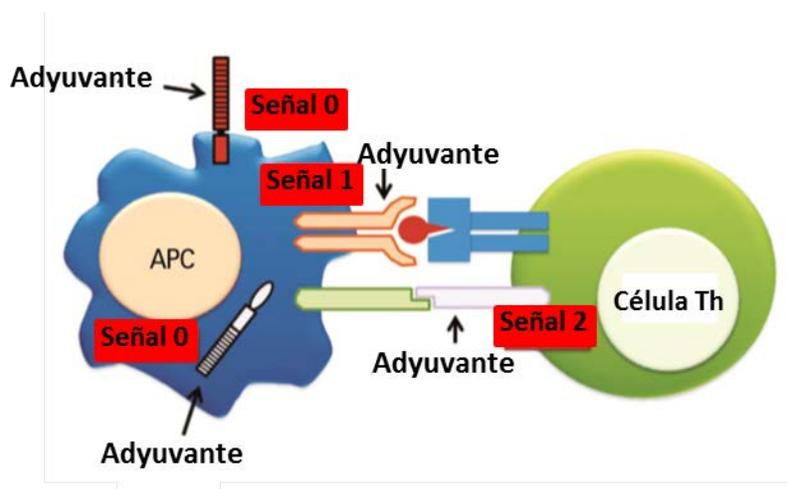


Figura 1. El objetivo de la vacunación con adyuvantes: El modo de acción de muchos adyuvantes se resume en la activación de las APCs por tres señales; señal 0 optimizar el reconocimiento del antígeno, señal 1 favorecer la presentación del antígeno a los linfocitos T y señal 2 incrementar la coestimulación en presencia de moléculas coestimuladoras y citocinas (Guy, 2007).

Las DCs se activan a través de los receptores de reconocimiento de patógenos por la vía de los receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) que expresan altos niveles de moléculas coestimuladoras y citocinas, migrando a los nódulos linfoides regionales para promover la activación de las células T.

Los adyuvantes de mucosas más prometedores se derivan de las toxinas bacterianas, ligandos de los receptores tipo “toll” (TLRs), inmunoestimulantes no TLRs, y nuevas moléculas pequeñas (Chen et al., 2010, Holmgren et al., 2003)

Ejemplo de estos adyuvantes mucosos son la flagelina, ligando del TLR5, los oligonucleótidos CpG ligando del TLR9, LPS ligando del TLR4, entre otros. Estos componentes actúan como adyuvantes naturales por que la señalización TLR tiene mucho efectos sobre la presentación de antígeno en las APCs, aunque la desventaja que pudieran tener son los efectos colaterales inflamatorios y la inducción de posibles reacciones autoinmunes (Duthie et al., 2011)

Otros adyuvantes mucosos, quizás los más usados experimentalmente en animales, son la toxina de cólera (Namjou et al.), la enterotoxina termolábil de *Escherichia coli* (LT) y sus mutantes y subunidades. Estas enterotoxinas ejercen una poderosa respuesta de anticuerpos de tipo IgA en la mucosa y IgG de manera sistémica. Están compuestas de las subunidades A que es la parte activa y la B la de unión. La subunidad A, tiene actividad enzimática ADP-ribosilación sobre las proteínas Gs y subsecuentemente puede producir grandes cantidades de cAMP y afectar a las células, mientras que la subunidad B encargada de la unión, se une al gangliósido GM1 expresado en la superficie de muchos tipos celulares, incluyendo las neuronas (de Haan and Hirst, 2000). La CT y LT pueden ser uno de los adyuvantes mucosos más efectivos reportados hasta la fecha. Sin embargo, son considerados tóxicos para su uso en humanos (Neutra and Kozlowski, 2006, Holmgren and Czerkinsky, 2005) Y se han reportado que la CT puede dirigir las proteínas vacunales a los tejidos neuronales vía bulbo olfatorio (Chen et al., 2013).

Por otro lado por varias décadas las sales de aluminio han sido de los adyuvantes vacunales más utilizados en humanos pero solo es efectivo en vacunas sistémicas y es pobre al inducir inmunidad mucosa (Duthie et al., 2011, Guy, 2007).

Por lo tanto, los enfoques actuales para superar obstáculos y desarrollar vacunas mucosales efectivas y/o inmunoterapias están dirigidas 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 inmunoreguladores que provean inmunidad

protectora hacia los agentes infecciosos o induzcan supresión periférica de desórdenes inmunopatológicos (Lavelle, 2005, Neutra and Kozlowski, 2006).

PROTOXINA Y TOXINA CRY1Ac

Bacillus thuringiensis (Bt) es una bacteria Gram positiva. Las especies de *Bacillus* esporulan para sobrevivir en condiciones extremas. Una característica distinguida de Bt es que durante la esporulación produce una gran cantidad de proteínas insecticidas (proteína paraesporal y/o proteínas Cry) que cristalizan dentro de la célula madre junto a la espora como se muestra en la Fig.2a (Crickmore et al., 1998, de Maagd et al., 2001).

Las proteínas Cry de *Bacillus thuringiensis* (Bt) es el insecticida biológico más utilizado comercialmente y se ha ocupado por años para el control de insectos plaga en la agricultura y de mosquitos vectores de enfermedades como la malaria y el dengue. Una característica importante de las proteínas Cry producidas por esta bacteria, es que son altamente específicas, no tóxicas para vertebrados y otros insectos no blanco, además de que son económicas, resistentes a pH alcalino, etc (Jimenez-Juarez et al., 2008).

Estas cualidades particulares de las proteínas Cry han favorecido la búsqueda de otras aplicaciones en otras ramas de la ciencia como la inmunología, donde se ha observado su aplicación como un potente inmunógeno, adyuvante e incluso como un protector contra microorganismos que ingresan a través de superficies mucosas (Moreno-Fierros et al., 2003, Rojas-Hernandez et al., 2004).

ESTRUCTURA Y FUNCIÓN.

Hay más de 200 tipos de toxinas individuales descubiertas hasta la fecha con insectos blanco diferentes y la mayoría pertenece al grupo de las toxinas Cry de los tres dominios (toxinas 3d-Cry) que son moléculas globulares que contienen tres distintos dominios estructurales conectados por enlaces simples (de Maagd et al., 2001, Jimenez-Juarez et al., 2008).

El dominio I está constituido por siete hélices α antiparalelas y anfipáticas. Éste es el dominio que forma el poro iónico en el insecto blanco.

El dominio II está formado por tres láminas plegadas β y por tres asas. Este dominio juega un papel fundamental en la especificidad de la toxina, donde las asas interactúan con el receptor localizado en las microvellosidades de las células epiteliales del intestino medio.

El dominio III está formado por dos láminas β antiparalelas formando un sándwich. Dicha estructura se muestra resumida en la Fig. 2b (de Maagd et al., 2003).

Las asas “loops” de superficie de las láminas β del dominio II, presentan cierta similitud a los sitios de unión antígeno-anticuerpo y son los candidatos para la unión al receptor (Schnepf et al., 1998).

Una característica particular de los miembros de las proteínas Cry, es la presencia de dos diferentes proteínas, la protoxina de 130 kDa que se considera la precursora y la toxina de 65 kDa considerada la parte activa. La diferencia radica en una extensión del C-terminal en la protoxina, que es degradada en presencia de proteasas del intestino medio del insecto y permite liberar la parte activa y tóxica, la toxina (de Maagd et al., 2001).

La estructura cristalizada en este año de la protoxina, se encuentra constituida por 7 dominios como se observa en la Fig. 2c, 4 pertenecientes a la protoxina que forman una especie de hoja y 3 dominios relacionados al núcleo de la toxina ya descrita anteriormente, todos ellos agrupados en dímeros unidos por varios enlaces Fig.2d (Evdokimov et al., 2014).

Los dominios IV y VI son alfa hélices mientras que V y VII son en su mayoría β -plegadas, similar a los dominios II Y III del núcleo de la toxina, estructuras similares en sitios de unión a carbohidratos encontradas en ciertas hidrolasas de azúcares (Cid et al., 2010).

MECANISMO DE ACCIÓN CONOCIDO EN INVERTEBRADOS.

Las toxinas Cry son proteínas formadoras de poro. Esto significa que para matar a su insecto blanco (ejemplo lepidópteros) deben ser ingeridas (Jimenez-Juarez et al., 2008, Gomez et al., 2007). Cuando la larva susceptible ingiere a la protoxina es solubilizada y activada por proteasas

en el intestino, liberando un fragmento tóxico de 60 kDa, la toxina compuesta por los tres dominios antes descrita. La toxina activada, se une a los receptores ubicados en la membrana del borde del intestino del insecto por oligomerización formando poros que causan la muerte de la célula por choque osmótico (Jimenez-Juarez et al., 2008, Gomez et al., 2007). Fig 2e.

Los síntomas que se observan a partir de que las larvas de insectos susceptibles ingieren los cristales y esporas de *Bt* son: cese de la ingesta, parálisis del intestino, diarrea, parálisis total y finalmente la muerte (Schnepf et al., 1998, Bravo et al., 2004).

RECEPTORES DESCRITOS PARA LAS PROTEÍNAS CRY1Ac EN INSECTOS.

Las proteínas que se han propuesto como receptores de las toxinas Cry1Ac en insectos (lepidópteros) son la aminopeptidasa N (APN), proteínas de tipo cadherina (CAD) y fosfatasa alcalina (ALP). La primera interacción de unión de la toxina Cry1Ac con los receptores de ALP y APN es de baja afinidad. La APN es una proteína de 120 kDa muy abundante y se encuentra anclada a la membrana a través del glicosilfosfatidil-inositol (GPI) al igual que la ALP de 65 kDa. La interacción con estas dos primeras proteínas concentran la actividad tóxica en la membrana de las células donde la toxina es entonces capaz de unirse con interacciones más fuertes a los receptores de la cadherina que tiene una masa de entre 175 a 210 kDa (Gomez et al., 2007). Varios grupos han demostrado que la interacción de la toxina con el receptor CAD promueve un corte adicional del extremo amino terminal, facilitando la formación de un oligómero o preporo formado por cuatro monómeros que es el responsable de la inserción a la membrana y la formación del poro. Para que el pre-poro se inserte a la membrana, se requiere que interaccione con el receptor APN y ALP. Las proteínas ancladas a la membrana por GPI se distribuyen de manera preferencial en regiones específicas de la membrana, conocidas como *balsas lipídicas*, que tienen características particulares debido a su alto contenido de colesterol y glicolípidos. La

interacción del pre-poro de la toxina Cry con la APN y ALP facilita la inserción del oligómero en las balsas lipídicas membranales, lo que resulta en la formación del poro (Bravo et al., 2004).

Además de estos receptores de membrana otros componentes se han identificado que tienen la capacidad de interaccionar con las toxinas Cry tales como glicolípidos o proteínas intracelulares como la ATPasa subunidad A y la actina. Sin embargo, el papel de estas proteínas todavía no es muy claro (Pardo-Lopez et al., 2013).

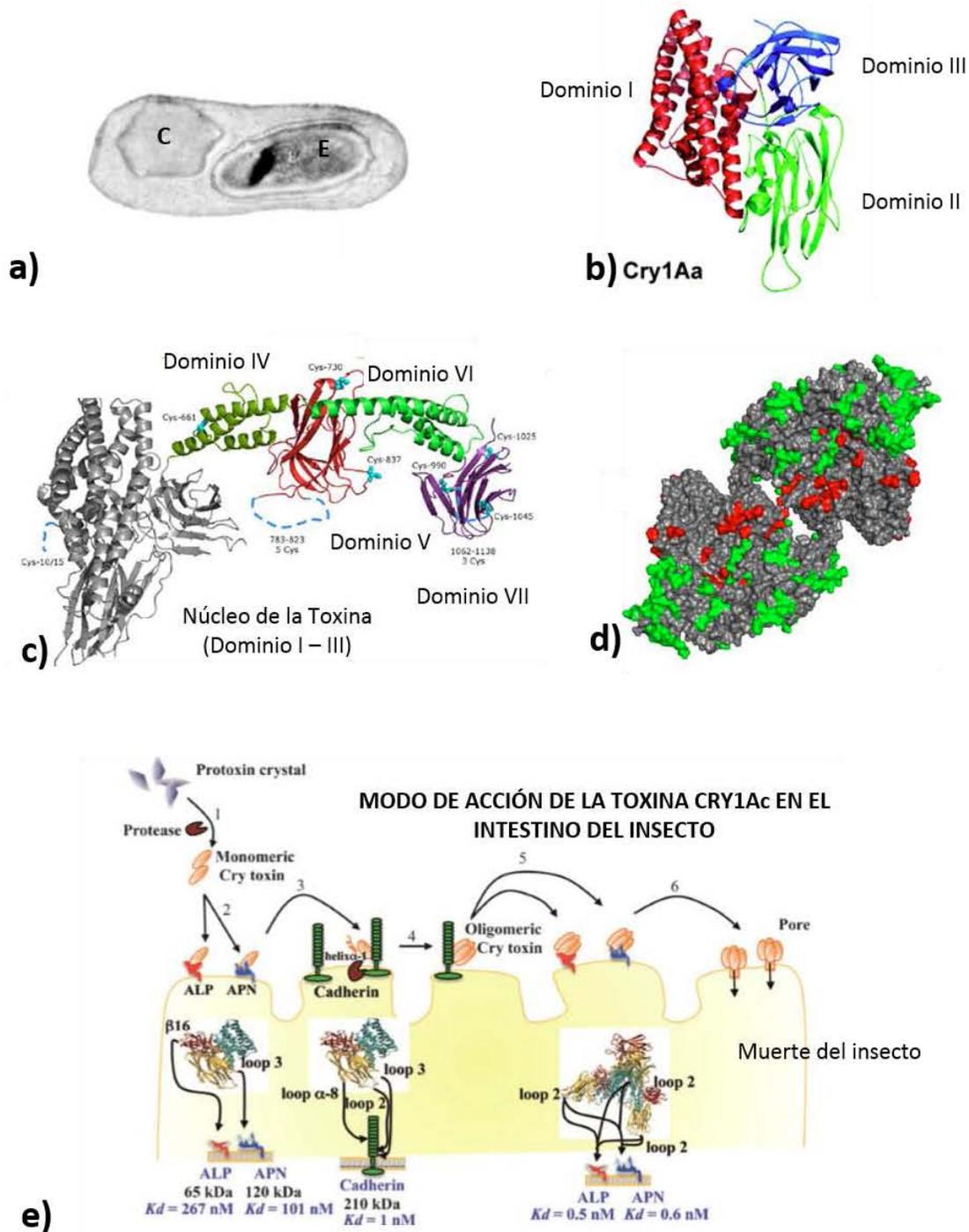


Fig.2. Estructura y mecanismo de acción de las proteínas Cry1Ac. **a)** Imagen por microscopía electrónica de transmisión de cepa de *Bt* donde se muestra el cristal paraesporal (C) y la espora (E). **b)** Estructura cristalizada de la toxina Cry1Aa donde se señala sus tres dominios. **c)** Protoxina Cry1Ac cristalizada en monómero con sus 7 dominios incluyendo el núcleo de la toxina. **d)** Protoxina Cry1Ac en dímero, en verde y rojo se muestran los dominios de la protoxina y en gris los de la toxina Cry1Ac. **e)** Mecanismo de acción de las toxinas Cry1Ac en el intestino del insecto. 1.-Las larvas ingieren la protoxina que se digiere en presencia de proteasas en el intestino. 2.- El monómero de la toxina se une a receptores tipo ALP y APN. 3.- El monómero de toxina se une al receptor de CAD por uniones de alta afinidad. 4.- La toxina se oligomeriza y forma el prepore. 5.- La toxina se une a los receptores de ALP y APN con alta afinidad. 6.- Se forma el poro y da la muerte del insecto.

ANTECEDENTES

En el laboratorio se ha demostrado que la protoxina Cry1Ac de *Bacillus thuringiensis* es un potente inmunógeno (Moreno-Fierros et al., 2000, Moreno-Fierros et al., 2002) y adyuvante mucosal (Moreno-Fierros et al., 2003, Vazquez-Padron et al., 1999) que comparada con otras proteínas de la misma familia Cry1 (Aa, Ab, Ac) y Cry3A, ha generado una mayor respuesta inmunológica (Guerrero and Moreno-Fierros, 2007, Guerrero et al., 2004). La inmunogenicidad por vía mucosa y sistémica de esta proteína Cry1Ac se ha evaluado utilizando diferentes rutas de inmunización (oral, intranasal, rectal, vaginal e intraperitoneal) con respuestas de anticuerpos específicos en diferentes sitios mucosos (intestino, pulmón, vagina) (Moreno-Fierros et al., 2000). Respecto a los efectos adyuvantes de la protoxina Cry1Ac se observó una respuesta de anticuerpos específicos hacia el antígeno de superficie de hepatitis B, péptidos de HIV (Esquivel-Perez and Moreno-Fierros, 2005) y polisacáridos de pneumococos (Moreno-Fierros et al., 2003). El efecto acarreador se reportó con el polisacárido capsular 6B y con un epítipo de la toxina diftérica (Guerrero y Moreno-Fierros, 2007). En el caso de la toxina, los estudios inmunogénicos aún se están realizando, sin embargo, se sabe que tienen la capacidad al igual que la protoxina, de unirse y activar monocitos y linfocitos T y B, aunque ha mostrado una mayor afinidad por los linfocitos B (tesis de licenciatura Ortega 2013 y Camargo 2013).

Por otro lado, resultados generados en nuestro grupo de trabajo sugieren la existencia en células de vertebrados de un posible receptor para las proteínas Cry1Ac.

La protoxina induce preferentemente la activación de macrófagos en cultivos primarios; mediante la expresión de moléculas coestimuladoras CD80, CD86 y citocinas proinflamatorias como IL6, MCP-1 y TNF α cuya producción es inhibida, utilizando inhibidores de la vía de señalización de las MAP cinasas, donde se ha observado que al menos P38 y ERK median la producción de las citocinas inducidas por el estímulo con la protoxina Cry1Ac (Moreno-Fierros et al., 2013). Otros resultados que apoyan la hipótesis de la presencia de un receptor son los ensayos de “blot” ligando realizados con extractos totales de células de bazo donde se identificaron proteínas de unión que reconocen la toxina y protoxina Cry1Ac. La unión de la toxina con sus ligandos a diferencia de la unión de la

protoxina parece depender de carbohidratos; ya que el reconocimiento de proteínas por la toxina es inhibido por N-acetil-galactosamina. Además por microscopía confocal se observó la unión tanto de la protoxina como la toxina Cry1Ac a la superficie de los macrófagos y linfocitos T y B (tesis de licenciatura Medina 2011).

Por otra parte, el único trabajo reportado hasta la actualidad que sugiere la presencia de posibles receptores en vertebrados de las proteínas Cry fue en el 2000 por Vázquez-Padrón, donde muestra la unión de la protoxina Cry1Ac a lisados de membrana de enterocitos de ratón donde por ensayos de “blot” ligando se revelan bandas de 102, 87, 62, 55, 51 y 39 kDa que sugieren la presencia de posibles receptores para estas proteínas, en este caso para la protoxina Cry1Ac (Vazquez-Padron et al., 2000).

Todos estos resultados en conjunto, sugieren la presencia de receptores para estas proteínas en células de bazo y enterocitos de ratón. Sin embargo, para facilitar el estudio de la identificación de los posibles receptores de la toxina y protoxina Cry1Ac, consideramos importante enfocarse a un solo tipo celular, en el que hayamos observado una unión significativa de estas proteínas y efectos directos como activación *in vitro* a tiempo corto, como es el caso de los macrófagos, además de considerar el posible mecanismo de acción como adyuvante de las proteínas Cry1Ac, mediante la activación de las APCs.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

Para definir la utilidad de las proteínas Cry1Ac como adyuvante vacunal es necesario identificar los posibles receptores de la protoxina y toxina Cry1Ac en células presentadoras de antígeno y así poder comprender las bases celulares de su mecanismo inmunopotenciador.

HIPÓTESIS

La protoxina y toxina Cry1Ac inducen activación en macrófagos por la presencia de receptores específicos para estas proteínas.

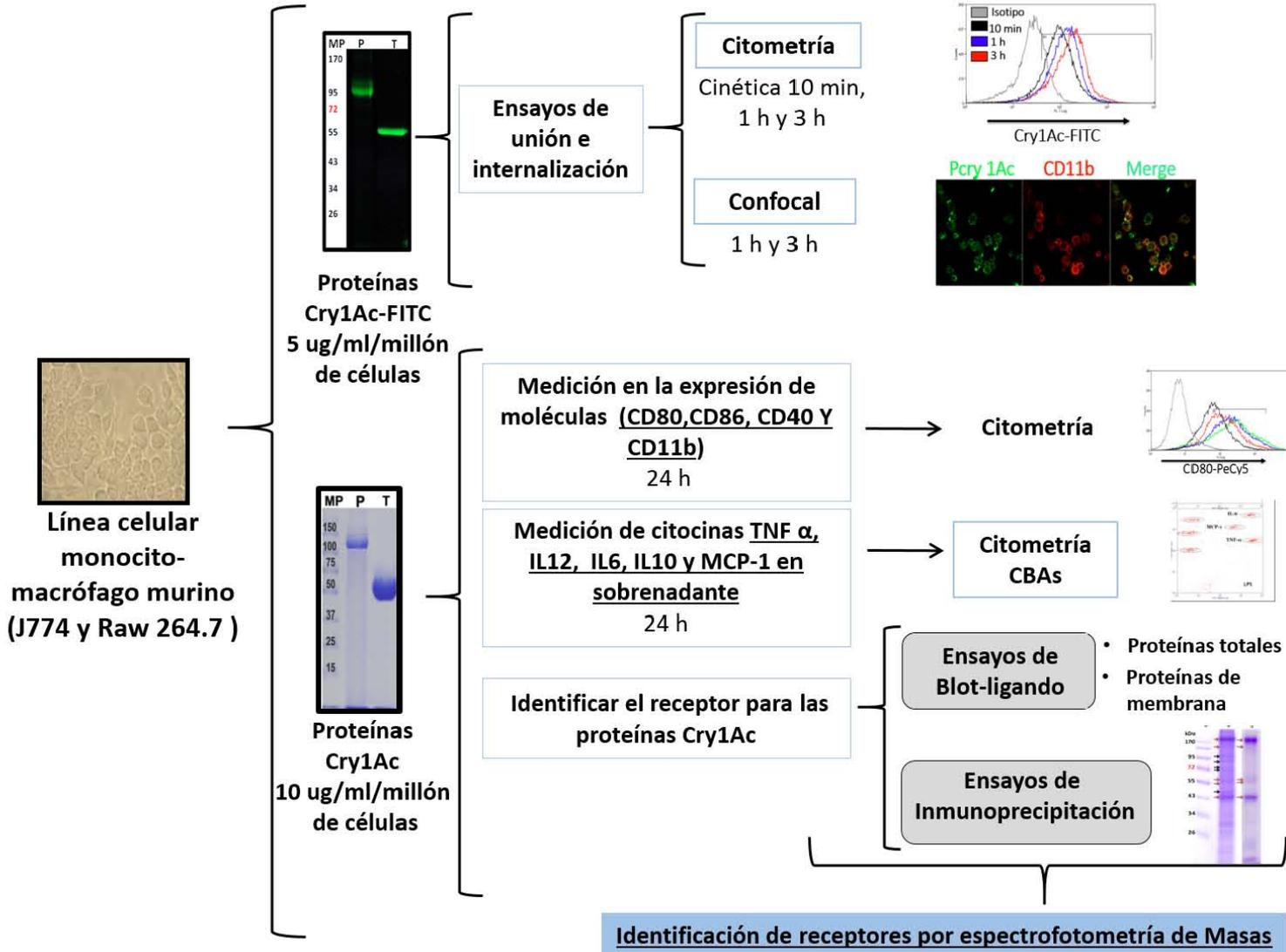
OBJETIVO GENERAL

Determinar los posibles receptores para la protoxina y toxina Cry1Ac en macrófagos murinos.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Determinar la capacidad de la protoxina y toxina Cry1Ac de unirse a la superficie de una línea celular de macrófagos murinos.
2. Determinar la capacidad de la protoxina y toxina Cry1Ac de activar una línea celular de macrófagos murinos (mediante la expresión de moléculas coestimuladoras y citocinas).
3. Identificar los posibles receptores para las proteínas Cry1Ac en una línea celular de macrófagos murinos.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivo celular.

Las células de monocito macrófago murino J774 donadas por el Dr. Edelmiro Santiago de la FES Zaragoza, UNAM, fueron cultivadas de forma rutinaria en medio ISCOVE (Invitrogen, GIBCO, Rockville, MD, EE.UU) suplementado con suero fetal bovino al 10% GIBCO (Invitrogen, GIBCO, Rockville, USA) y antibióticos (100U / ml de penicilina, estreptomina 100µg/ml) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA.) Las células se crecieron a 37°C en una atmosfera de 95% de aire, 5% CO² y 100% de humedad.

Purificación de las proteínas protoxina y toxina Cry1Ac.

La purificación de la protoxina y toxina Cry1Ac a partir de *E. coli* recombinante se hizo como se ha descrito previamente en (Vazquez-Padron et al., 1999). Después de haber lisado las bacterias y una serie de diferentes lavados se obtuvieron los cristales, los cuales fueron solubilizados en un amortiguador de carbonatos a un pH de 9.6 con ditioneitol (DTT) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) a 37°C por una hora. Los restos de endotoxina de LPS se eliminaron con una columna de polimixina Affi-Prep® Polymyxin Support (BIO-RAD, USA) posteriormente se verificó que la proteína estuviera libre de LPS con la prueba de detección semicuantitativa de la endotoxina E-TOXATE® (Limulus amoebocyte lysate) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Finalmente se determinó la concentración de la proteína por el método de Bradford y se corrió un gel para corroborar la limpieza y los pesos correctos de la protoxina Cry1Ac 130 kDa y la toxina Cry1Ac 65 kDa (Fig. 4a).

Identificación de la unión de Cry1Ac a macrófagos murinos de la línea celular.

Para los ensayos de unión de las proteínas Cry1Ac a la superficie de las líneas celulares J774 Y Raw 264.7 se incubaron 1×10^6 /ml células monocitos-macrófagos J774 y Raw 264.7 en cajas de 12 pozos, las cuales previamente fueron tratadas por 24 h con 5% de SFB (Invitrogen, GIBCO, Rockville, EUA) posteriormente se incubaron con medio al 10% de SFB (Invitrogen, GIBCO, Rockville, EUA) junto con las proteínas Cry1Ac-FITC a una concentración de $5 \mu\text{g}$ /millón de células con tiempos de incubación de 10 min, 1 h y 3 h. Las proteínas Cry1Ac-FITC fueron previamente conjugadas con el fluorocromo fluoresceína (FITC) siguiendo el protocolo establecido en el kit de conjugación (Thermo Scientific Rockford, IL USA) (Fig. 4b). Se cosecharon las células con “gendarme” después de la incubación y se lavaron con amortiguador de fosfatos salino con albúmina 0.05% (PBA), se fijaron con paraformaldehído (PFA) al 1% y analizaron por citometría de flujo con un citómetro BD Biosciences FACS calibur; para los ensayos de microscopía confocal, otra parte de las células se deshidrataron en alcoholes (70, 80, 90 y 100%) durante 3 minutos cada uno y montados en Entellan (Merck, Darmstadt, Alemania) para su posterior análisis mediante un microscopio confocal láser TCS/SP-2 (Leica, Wetzlar, Alemania). Las imágenes se muestran en proyecciones máximas de 5 secciones secuenciales ópticas que fueron escaneadas 20 veces cada una, con un grosor de 0.4 micras por intervalo y capturadas con el objetivo 63X con aceite de inmersión, en el eje z.

Internalización de la proteína Cry1Ac determinada por la colocalización de Cry1Ac con las vesículas endosomales Rab 5 y Rab 7.

Para determinar si la internación de las proteínas Cry1Ac se estaba llevando a cabo vía endosomal se sembraron 5×10^4 de células monocitos-macrófagos Raw264.7 en placas Labtek estériles (Thermo Scientific Rockford, IL USA) en medio con 10% de SFB (Invitrogen,

GIBCO, Rockville, USA). Los grupos que se consideraron fueron control, PCry1Ac, TCry1Ac. Las células se dejaron reposar por 12 h, siendo incubadas con 5 ug de las proteínas Cry1Ac-FITC a diferentes tiempos. Para los ensayos con los endosomas tempranos (Rab 5) fueron incubados 5 min con las proteínas Cry1Ac y para los endosomas tardíos (Rab 7) se realizó una cinética (10, 12, 14, 16, 30 y 1 h) para evaluar en qué tiempo se observaba una mayor colocalización con las proteínas Cry. Trascurrido este tiempo se lavaron las células con PBS y se fijaron con PFA al 4%. Se permeabilizó con un amortiguador a base de triton X100 al 0.1% en PBS y después se llevó a cabo la tinción intracelular con los anticuerpos anti Rab 5 y anti Rab 7 (Santa Cruz Biotechnology, CA, EE. UU.) seguidos de anticuerpos secundarios marcados con los fluorocromos Pe y Cy5 (Thermo Scientific Rockford, IL USA). Las muestras fueron montadas en Vectashield (Merck, Darmstadt, Alemania) y se analizaron mediante un microscopio confocal láser TCS/SP-2 (Leica, Wetzlar, Alemania). Las imágenes se muestran en proyecciones máximas de 5 secciones secuenciales, fueron escaneadas 20 veces cada una, con un grosor de 0.4 micras por intervalo y capturadas con el objetivo 63X con aceite de inmersión, en el eje z.

Determinación de la sobre expresión de moléculas coestimuladoras CD80 Y CD86.

Para determinar el efecto de activación de las proteínas Cry1Ac en los macrófagos de esta línea celular mediante la sobreexpresión de moléculas coestimuladoras se incubaron 1×10^6 /ml de células monocitos-macrófagos J774 y Raw 264.7 en cajas de 12 pozos. Distribuidos en cada uno de los siguientes grupos de tratamientos: control, PCry1Ac, TCry1Ac y LPS como control positivo (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Las células fueron ayunadas previamente al estímulo por 24 h, con 5% de SFB (Invitrogen, GIBCO, Rockville, USA), después de esto se incubaron con 1 ml de medio al 10% de SFB (Invitrogen, GIBCO, Rockville, USA) y las proteínas Cry1Ac en una concentración de 10 μ g y el LPS 1 ug por millón de células por 24 horas. Las células fueron cosechadas con “gendarme” y se realizó la tinción de superficie de macrófagos con anticuerpos anti-CD11b, CD40, CD80 y CD86 marcados con distintos fluorocromos (FITC, PE, Cy5-PE, Cy5 o APC) (eBioscience, San Diego,

CA, EE.UU.) por 30 min. Después de la incubación se lavaron con PBA, se fijaron con PFA al 1% y se analizaron por citometría de flujo en un citómetro BD Biosciences FACS Calibur.

Detección de la producción de citocinas.

Para determinar el efecto de activación de las proteínas Cry1Ac en los macrófagos de esta línea celular por medio de la sobreexpresión de citocinas proinflamatorias (TNF α , IL-12, IL-6 y MCP-1) se incubaron 1×10^6 /ml de células monocitos-macrófagos J774 y Raw 264.7 en cajas de 12 pozos. Las células se distribuyeron en cada uno de los siguientes tratamientos: control, Pcry1Ac, Tcry1Ac y LPS (control positivo). Las células fueron ayunadas por 24 h con 5% de SFB (Invitrogen, GIBCO, Rockville, USA), después fueron incubadas con 10 ug de proteínas Cry1Ac y 1 ug de LPS (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA.) en medio con 10% de SFB (Invitrogen, GIBCO, Rockville, USA) por 24 horas. Se obtuvieron los sobrenadantes y se evaluaron de acuerdo a las especificaciones técnicas del kit de detección de citocinas proinflamatorias de BD de (eBioscience San Diego, CA, EE.UU.). Se analizaron por citometría de flujo con un citómetro BD Biosciences FACS Calibur.

Obtención de lisados totales celulares.

Para la obtención de lisados totales se cosecharon 10 millones de células, se lavaron 5 veces con PBS para eliminar todas las proteínas contaminantes del SFB. Una vez concentrada la pastilla se le adicionó en una relación de 1:4 el amortiguador de lisis RIPA (ver anexos) en presencia de inhibidores de proteasas (Roche Traub Co, Basilea, Suiza). Las células fueron sonicadas con 3 ciclos de 10 seg en hielo. Se centrifugó a 10 000 rpm por 5 minutos y se recuperó solo el sobrenadante con la porción soluble de las proteínas. Se almacenó a -80°C. Se corrió un gel de SDS-page para verificar el patrón de lisado y asegurarnos de que no hubiera degradación.

Obtención de proteínas de membrana.

Las proteínas de membrana se obtuvieron mediante el kit de purificación de proteínas de superficie celular (Thermo Scientific Rockford, IL USA) cuyo principio se basa en la afinidad que tiene la biotina por las proteínas y a su vez la avidina por la biotina. De manera breve se puso a incubar la biotina con 1×10^8 células de monocito-macrófago murino libres de proteínas contaminantes de SFB, se lavaron y se lisaron las células con el amortiguador de lisis RIPA antes mencionado en presencia de inhibidores de proteasas con sus correspondientes ciclos de sonicación, después de este tiempo se centrifugó a 10,000 rpm/5 min para obtener las proteínas solubles, las cuales se pasaron por una columna con una matriz de agarosa-avidina, incubando por 1 h en movimiento a temperatura ambiente. Después de la incubación se centrifugó el filtrado y después de una serie de lavados del complejo de proteínas de membrana-biotina-avidina-agarosa, se eluyeron las proteínas de membrana en presencia de un amortiguador de carga con agentes reductores. Se almacenó a -80°C . Se corrió un gel de SDS-page para verificar el patrón de lisado y asegurarnos de que no estuvieran degradados.

Ensayos de “blot” ligando de lisados celulares totales y proteínas de membrana.

La identificación de los posibles receptores se realizó mediante ensayos de “blot” ligando en extractos de proteínas totales, proteínas de membrana y proteínas obtenidas de la inmunoprecipitación con células de monocito-macrófago. Los extractos fueron separados por electroforesis SDS-PAGE y transferidos a membranas de nitrocelulosa para realizar los ensayos de blot ligando. Una vez transferidos los extractos se pusieron a bloquear toda la noche a 4°C , con leche descremada al 6% para la protoxina y con albúmina sérica bovina (BSA) al 3% para la toxina; ya que se ha observado su afinidad por los carbohidratos. Se realizaron una serie de lavados con PBS-tween al 0.05% y se pusieron a interactuar las

proteínas Cry1Ac en una concentración 5 ug/ml de protoxina y toxina con los diferentes extractos por 2 h, después de una serie de lavados de 5 min se incubaron con el anticuerpo anti-Cry1Ac hecho en conejo por 2 h seguido de la proteína A-peroxidasa (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA). En los ensayos de blot ligando con las células J774 se reveló con el sustrato 4-chloro-1-naphthol (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA.) en presencia de agua oxigenada. Por su mayor sensibilidad para los ensayos con células Raw 264.7 se utilizó un anticuerpo secundario anti-conejo marcado con el fluorocromo Dye 800 que finalmente fue revelado con el escáner infrarrojo Odyssey (LICOR).

Identificación del receptor por ensayos de inmunoprecipitación.

La Identificación de los receptores por ensayos de inmunoprecipitación se realizó mediante el kit de inmunoprecipitación (Thermo Scientific Rockford, IL EUA) con ligeras modificaciones. De manera breve se incubaron 1×10^7 células vivas libres de SFB con la protoxina y la toxina Cry1Ac, en una concentración de 20 ug/millón de células por 1 h a 37°C, en este paso en los ensayos con las células Raw 264.7 las incubaciones con las proteínas Cry se realizaron a 4°C por 3 h. Se realizaron una serie de lavados para eliminar toda la proteína Cry1Ac libre, después se llevó a cabo el protocolo de lisado con el amortiguador de lisis (RIPA) previamente descrito en presencia de inhibidores de proteasas. Posteriormente se le adicionaron IgG purificadas anti-Cry1Ac para inmunoprecipitar el complejo (receptor-proteína Cry-anti-Cry) con perlas de agarosa unidas a proteína A. Después de una serie de lavados verificando la DO a 280 nm para asegurarnos de eliminar todas las proteínas contaminantes no relacionadas con el receptor, todo el complejo de receptor-proteínasCry1Ac-antiCry-proteínaA-sefarosa se hirvió con un amortiguador de carga en presencia de agentes reductores. A diferencia de las células J774 en este último paso los ensayos con las células Raw 264.7 se utilizó un amortiguador sin agentes reductores. Para ambos tipos celulares se recuperó solo la porción soluble y se

almacenó a -80°C . Se corrió un gel de SDS-page para separar mediante electroforesis las proteínas inmunoprecipitadas y se verificó por ensayo de “blot” ligando la unión de Cry1Ac.

Secuenciación del receptor.

Después de un consenso entre técnicas y repeticiones seriadas de ensayos de “blot” ligando se enviaron a espectrometría de masas las bandas inmunoprecipitadas para identificar los posibles receptores por análisis de espectrometría de masas y proteómica mediante el servicio del Instituto Nacional de Salud pública (INSP) de la Secretaría de Salud (SESA) para las células J774 y el servicio del Instituto Nacional de Medicina Genómica en la unidad de proteómica para las células Raw 264.7.

Se utilizó análisis de blast para establecer los candidatos a receptores encontrados y su homología en células de ratón.

Análisis estadístico.

Todos los datos fueron analizados mediante un análisis de varianza (ANOVA), seguido por el post-hoc de Dunnet, utilizando el software Graph Pad Prism 5. Los datos se expresan como media \pm el error estándar (SE). Las diferencias se consideran estadísticamente significativas a *p menor o igual 0.05 o 0.001.

RESULTADOS

Obtención de las proteínas Cry1Ac

Se obtuvo una producción de protoxina (P) y toxina (T) Cry1Ac de 130 y 65 kDa respectivamente. Después de su purificación se corrió un gel SDS-PAGE de acrilamida al 10% para corroborar sus pesos moleculares y pureza (Fig. 4a). Estas mismas proteínas Cry1Ac se conjugaron con el fluorocromo fluoresceína (FITC) para los posteriores ensayos de unión por microscopía y citometría (Fig. 4b).

Fig. 4

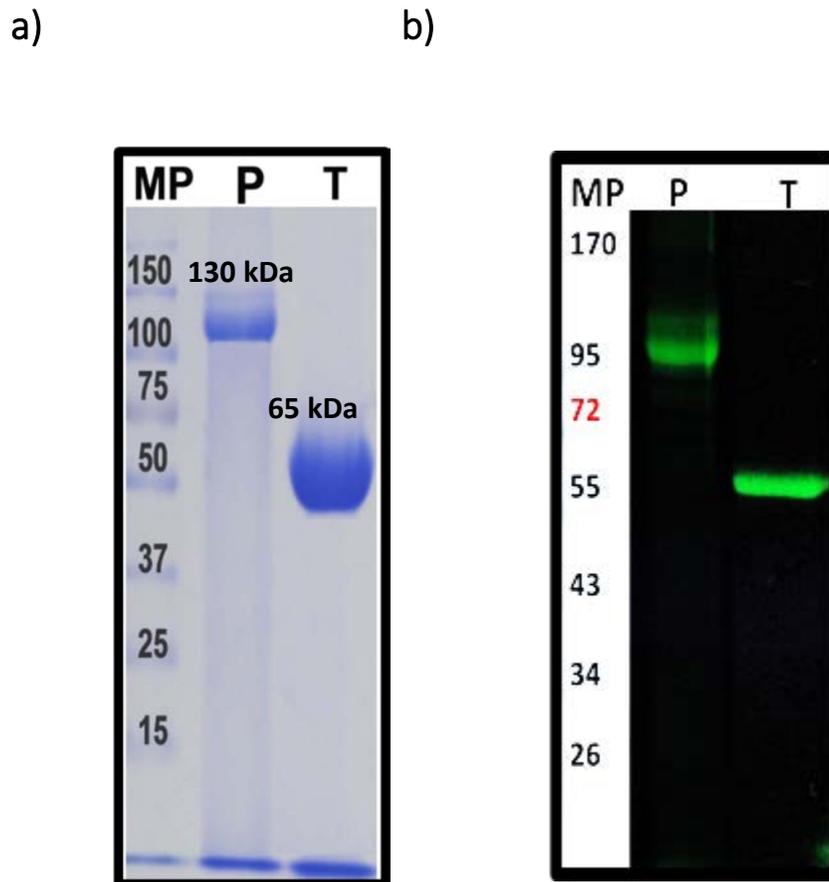


Figura 4. Gel SDS-page y conjugación de las proteínas Cry1Ac con FITC. a) Se muestra PCry1Ac (protoxina) de 130 kDa y TCry1Ac (toxina) de 65 kDa después de su purificación. MP marcador de peso molecular (a la izquierda). b) Se muestra la PCry1Ac de 130 kDa y TCry1Ac (toxina) de 65 kDa después de su conjugación con el fluorocromo fluoresceína (FITC). MP marcador de peso molecular (a la izquierda).

Unión de la protoxina y toxina Cry1Ac a macrófagos de la línea celular J774

Para corroborar que las proteínas Cry1Ac se unen a los macrófagos J774, se pusieron a interactuar las proteínas Cry conjugadas con FITC con esta línea celular y se observó que la unión de la protoxina, como de la toxina fue de manera uniforme desde tiempos tempranos (10 min) y que se incrementaba conforme pasaba el tiempo. También se observó al graficar la intensidad media de fluorescencia que la protoxina se unió en mayor proporción que la toxina a los macrófagos. Estos resultados nos sirvieron para determinar el tiempo promedio de unión para los posteriores ensayos de interacción. El tiempo intermedio fue de 1 hora (Fig. 5).

Fig. 5

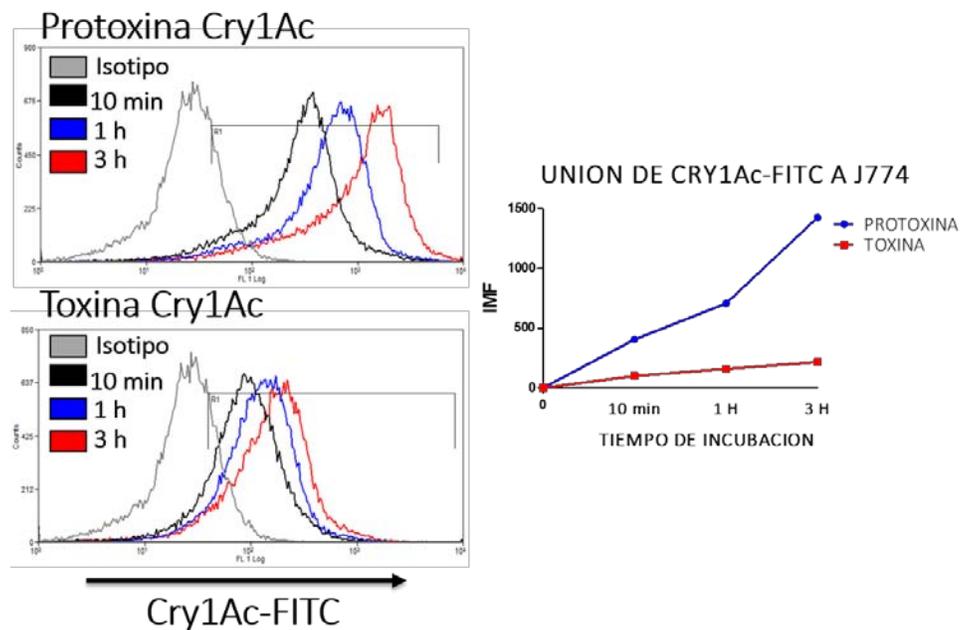


Figura 5. Unión temporal de la protoxina y toxina Cry1Ac a las células J774. En la gráfica se muestra la intensidad media de fluorescencia (IMF) del análisis por citometría de flujo de la unión de la protoxina y toxina Cry1Ac-FITC a las células monocito-macrófago J774 a los 10 min, 1h y 3h de incubación. El estímulo fue dado en una concentración de proteínas Cry1Ac-FITC de 10 µg/millón de células incubadas a 37°C en una atmosfera de CO₂. Se leyeron 30 mil eventos. A la izquierda se muestran histogramas representativos.

Esta unión también se observó por microscopía confocal, a la superficie celular de los monocitos-macrófagos J774. Observamos que la proteína Cry1Ac se unió en la membrana y también dentro de las células a diferencia del marcador de membrana utilizado, la integrina CD11b, lo que nos sugirió que quizás estaba siendo internalizada. Este fenómeno se observó desde 1 h y se acentuó a las 3 h. También se corroboró la mayor afinidad de unión por parte de la protoxina Cry1Ac en relación a la toxina Cry1Ac, como se observó previamente por citometría de flujo (Fig. 6).

Fig. 6

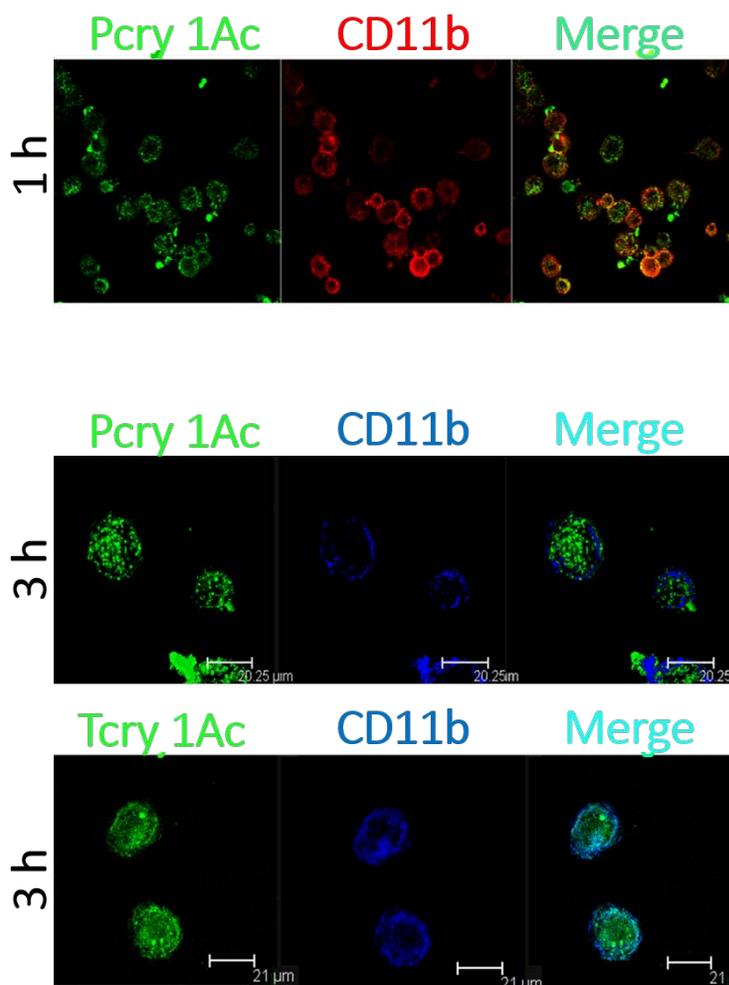


Figura 6. Unión de la protoxina y toxina Cry1Ac a monocitos- macrófagos J774. Este ensayo por microscopía confocal muestra la interacción de 1 y 3 h de incubación de las proteínas Cry1Ac- FITC por esta línea celular. Nótese que la unión

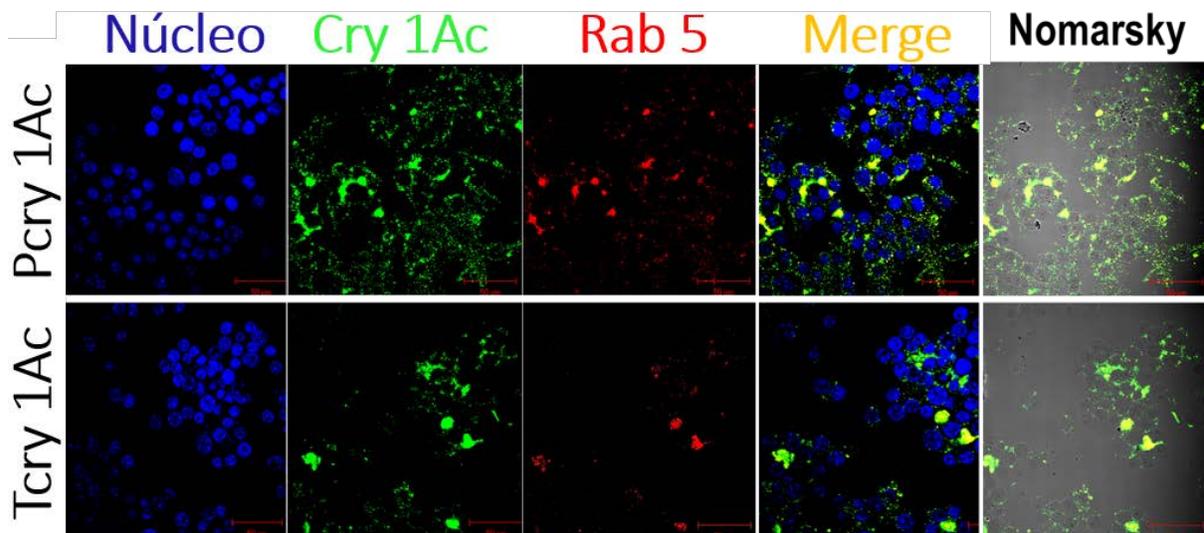
de las proteínas Cry1Ac se observa tanto en la superficie como en el interior de la célula a diferencia del marcador de superficie CD11b. Se muestran microfotografías representativas.

Internalización de la protoxina y toxina Cry1Ac a macrófagos de la línea celular J774

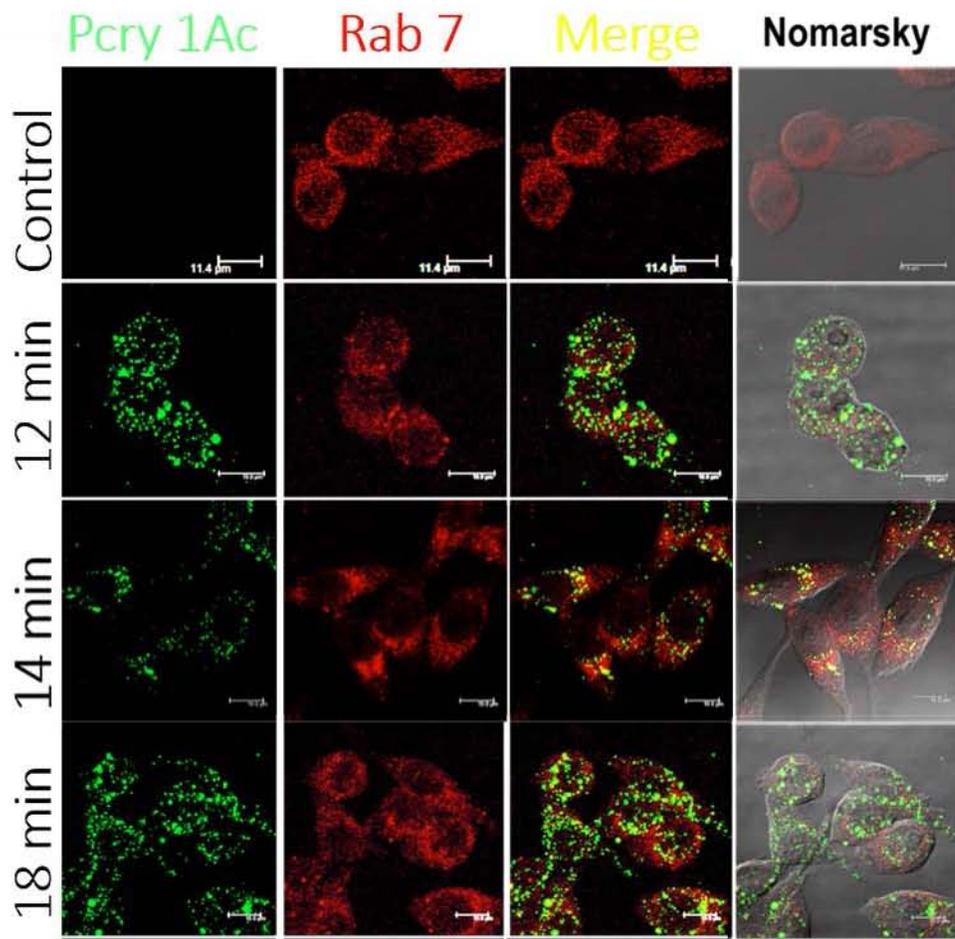
Para confirmar si las proteínas Cry1Ac estaban siendo internalizadas por los macrófagos como se sugiere en las microfotografías antes mostradas (figura 6), se realizó un análisis por microscopía confocal de la colocalización de estas proteínas Cry-FITC con proteínas de Rab 5 y Rab 7, GTPasas involucradas y específicas de la vía endocítica. Se observaron pocos sitios de colocalización con las proteínas Cry a los 10 min con Rab 5 (Fig. 7a). La mayor colocalización de Pcry1Ac con Rab 7 se detectó a los 14 min (Fig. 7b), mientras que la mayor colocalización de Tcry1Ac con Rab 7 ocurrió a los 12 min (Fig. 7c).

Fig. 7

a)



b)



c)

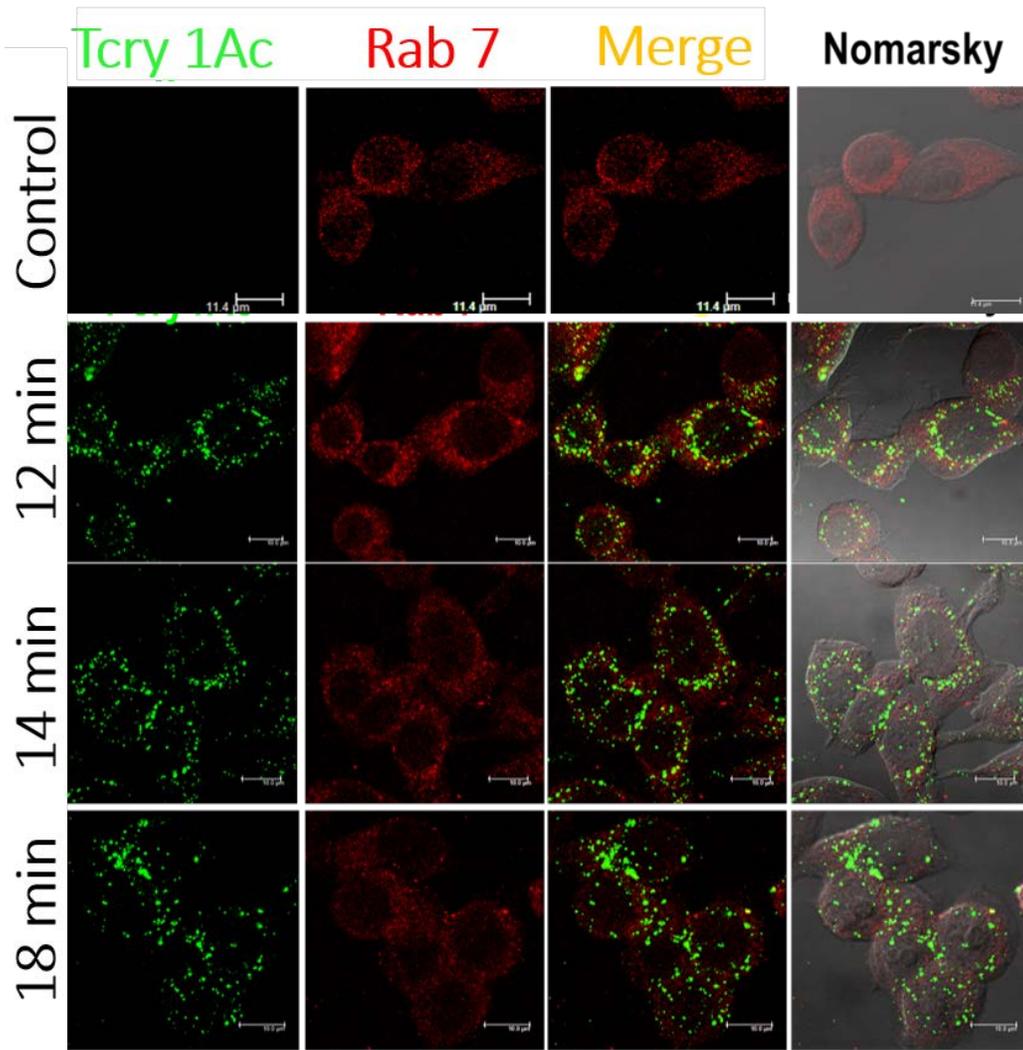


Figura 7. Análisis por microscopía confocal de la colocalización de la protoxina y toxina Cry1Ac-FITC con Rab 5 y Rab 7 en macrófagos J774. a) Este ensayo muestra la interacción de 10 min de incubación de las proteínas Cry1Ac-FITC con Rab 5 en esta línea celular. La colocalización de las proteínas Cry (verde) y las vesículas Rab 5 (rojo) se observa en (amarillo) en algunos sitios de las células en las imágenes sobrepuestas (merge). Se muestra una corta cinética desde tiempos tempranos de expresión de Rab 7 y su interacción con la protoxina (b) y la toxina Cry1Ac-FITC (c). En el caso de la Pcry1Ac b) la colocalización es mayor a los 14 min, aunque la marca no alcanza a desaparecer, mientras que para Tcry c) la colocalización es mayor a los 12 min, datos que nos sugieren que las proteínas pCry1Ac y tCry1Ac están siguiendo el camino convencional de la vía endocítica. A-C) muestran microfotografías representativas.

Evaluación de la sobre expresión de moléculas coestimuladoras CD80, CD86 y CD40 en la línea celular J774 por el estímulo con las proteínas protoxina y la toxina Cry1Ac

En un estudio previo de nuestro grupo de investigación se demostró que el estímulo *in vivo* con la protoxina Cry1Ac induce la sobreexpresión de moléculas coestimuladoras en células adherentes de diferentes órganos así, como *in vitro* en la línea de macrófagos Raw 264.7 (Moreno-Fierros et al., 2013). Se llevó a cabo un abordaje similar con los macrófagos de esta línea celular para evaluar la sobreexpresión de las moléculas (CD80 CD86, CD40) y de la integrina CD11b con estímulos de la Pcry y Tcry. Sin embargo, se encontró que la línea celular J774 presentaba una alta expresión basal de estas moléculas, lo que fue difícil observar una sobreexpresión significativa con el estímulo de nuestras proteínas Cry y el LPS, usado como control positivo de activación. Con el estímulo con la protoxina se observó un incremento significativo de 200 y 100 unidades de CD80 y CD86 respectivamente mientras que con la Tcry se observó solo un incremento de 80 unidades para CD86. En ninguno de los casos se observó un cambio en la expresión de CD40 ni CD11b, incluyendo al estimular con LPS (Fig. 8). Estos resultados nos sugirieron que era pertinente analizar estos parámetros en otra línea celular menos activada, que nos permitiera observar mejor el posible efecto de la protoxina y toxina Cry1Ac en la activación de macrófagos.

Fig. 8

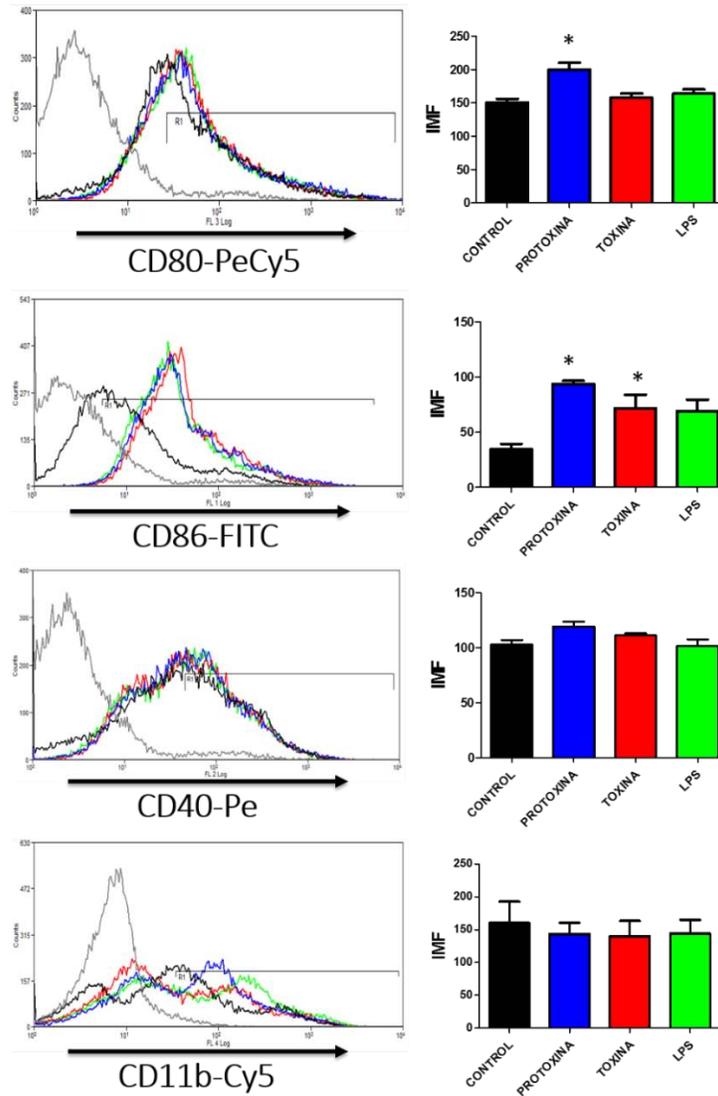


Figura 8. Efecto de la protoxina y toxina Cry1Ac en la expresión de moléculas coestimuladoras en células J774. Se muestra una alta expresión basal en los controles principalmente en CD80, CD40 y CD11b por ello solo se aprecia un ligero incremento no significativo por efecto del LPS usado como control positivo de activación. En el estímulo con la protoxina, se observó un incremento significativo en CD80 y CD86 y en la toxina solo se observó un cambio evidente con respecto a su control en la expresión de CD86. Este ensayo se llevó a cabo con 24 h de incubación, el estímulo fue dado en una concentración de proteínas Cry1Ac de 10 µg/millón de células incubadas a 37°C en una atmosfera de CO₂. Se tiñeron las células y se analizó por FACS. Se leyeron 30 mil eventos. Los datos se expresan en unidades de intensidad media de fluorescencia (IMF) de células positivas a cada molécula coestimuladora. Histogramas representativos de resultados promedio ± ES n=3. Los datos fueron analizados mediante un ANOVA de una vía seguida por la prueba de Dunnet.*p<0.05.

Unión de la protoxina y toxina Cry1Ac a monocito-macrófagos de la línea celular Raw 264.7

Como la activación con las proteínas Cry1Ac fue poco evidente en las células J774 por su elevada activación basal, se probó otra línea celular menos activada, la monocito-macrófago Raw 264.7 que nos permitió observar mejor los efectos de las proteínas Cry1Ac. Primero se corroboró la capacidad de unión de la protoxina y toxina Cry1Ac a esta nueva línea celular por citometría de flujo. Se encontró que la unión de ambas proteínas se dio desde los tiempos tempranos en las células Raw 264.7. También se observó que la protoxina tiene una mayor capacidad de unión hacia este tipo celular que la toxina (Fig. 9).

Fig. 9

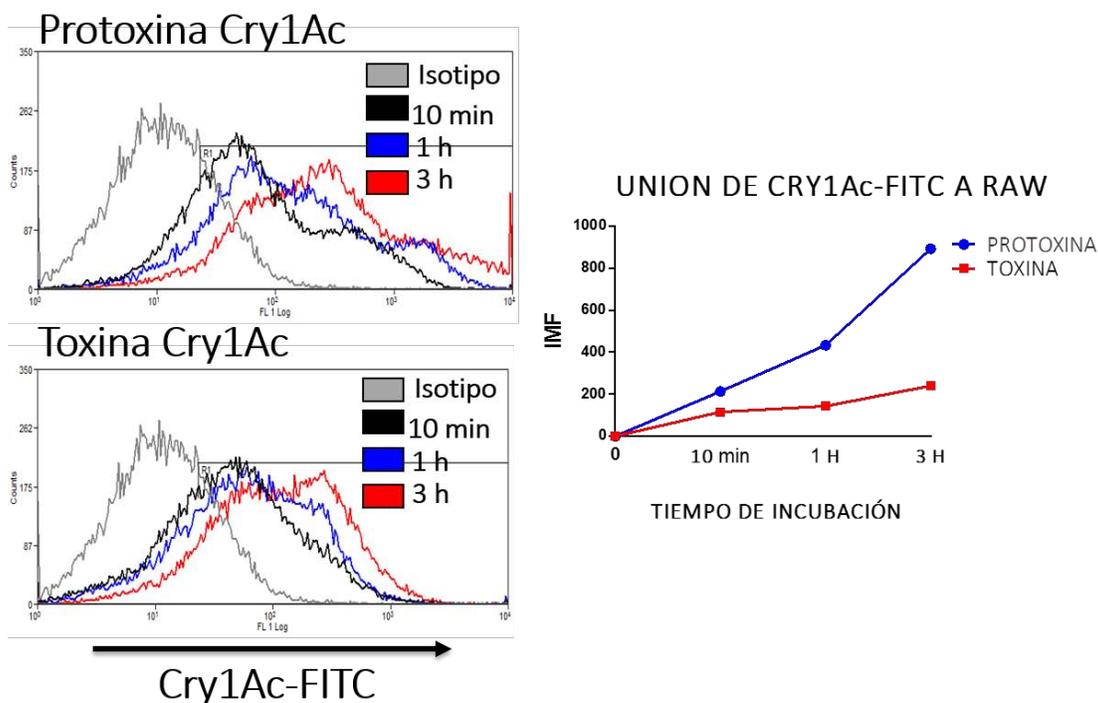


Figura 9. Unión temporal de protoxina y toxina Cry1Ac a la línea celular Raw 264.7. Se muestra la intensidad media de fluorescencia (IMF), resultado del análisis por citometría de flujo de la unión de la protoxina y toxina Cry1Ac-FITC a las células Raw 264.7 a diferentes tiempos de incubación (10 min, 1h y 3h). Se observa una mayor unión de la protoxina por este tipo celular. El estímulo fue dado a una concentración de proteínas Cry1Ac de 10 µg/millón de células incubadas a 37°C en una atmosfera de CO₂. Se leyeron 30 mil eventos.

Evaluación de la sobre expresión de moléculas coestimuladoras CD80, CD86 y CD40 en la línea celular Raw 264.7 con estímulo de la protoxina y toxina Cry1Ac

Como se mencionó anteriormente se probó el efecto de la estimulación con las proteínas Cry1Ac en esta línea celular Raw 264.7 debido a la alta activación basal de las J774. En la línea Raw 264.7 se observó una marcada activación con el estímulo de nuestras proteínas Cry, muy similar al efecto inducido por nuestro control positivo (LPS) en todas las moléculas coestimuladoras (CD80, CD86, CD40) incluyendo la integrina CD11b (Fig. 10)

En la figura 10 se aprecia como la protoxina indujo un incremento de más del doble que el control sin estímulo en la expresión de CD80 y CD11b. Para CD86 y CD40 el incremento fue menor pero estadísticamente significativo. En el caso con la toxina los resultados siguieron la misma tendencia que con la protoxina pero de una forma más discreta (Fig. 10).

Fig. 10

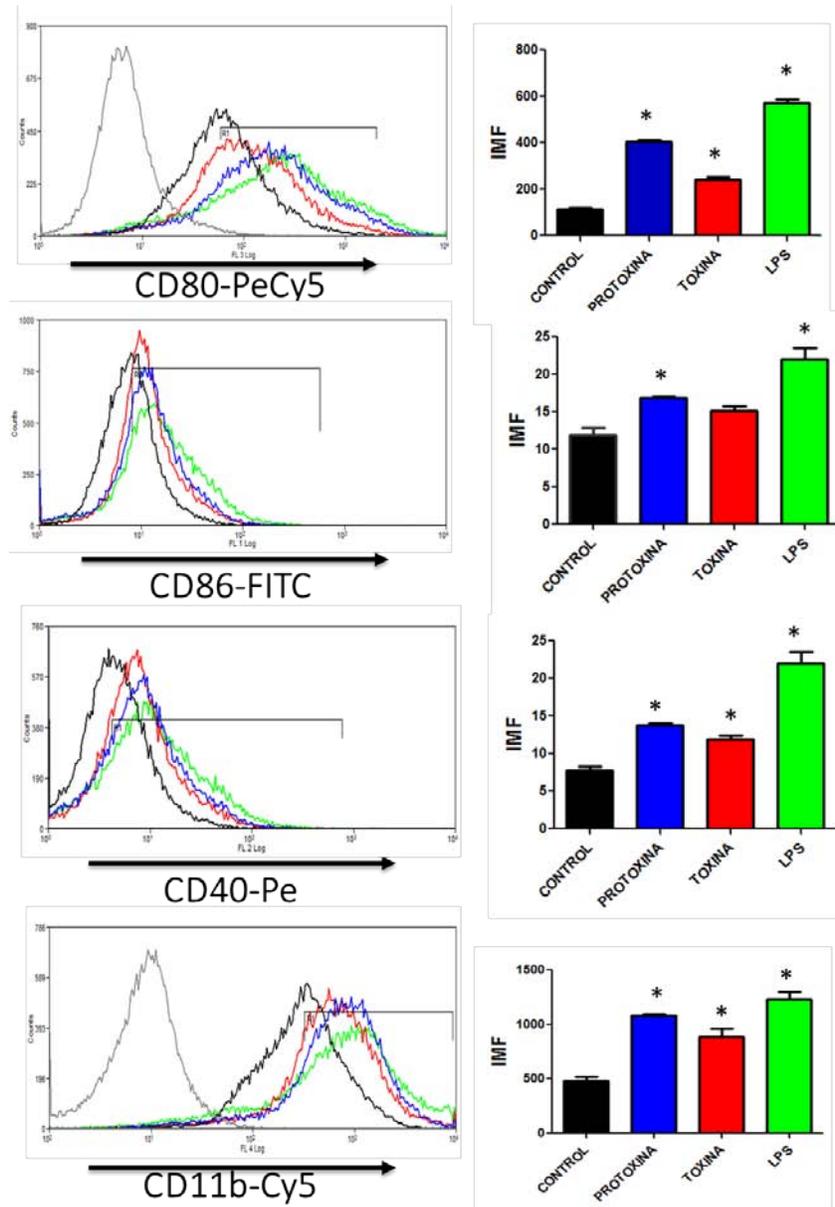


Figura 10. Efecto de la protoxina y toxina Cry1Ac en la expresión de moléculas coestimuladoras en células Raw 264.7. Se observa con el estímulo de la protoxina un incremento significativo en CD80, CD86, CD40 y CD11b, con la toxina los cambios se observaron más discretos sin dejar de ser estadísticamente significativos. La concentración del estímulo con las proteínas Cry1Ac fue de 10 $\mu\text{g}/\text{millón}$ de células incubadas a 37°C en una atmósfera de CO_2 . Se tiñeron las células y se analizó por FACS. Se leyeron 30 mil eventos. Los datos se expresan en unidades de intensidad media de fluorescencia (IMF) de células positivas a cada molécula coestimuladora. Histogramas representativos de resultados promedio \pm ES n=3. Los datos fueron analizados mediante un ANOVA de una vía seguida por la prueba de Dunnett. * $p < 0.05$.

Evaluación de la inducción de citocinas en la línea celular monocito-macrófago Raw 264.7 por estímulo con las proteínas protoxina y la toxina Cry1Ac

Otra manera de medir la activación de los macrófagos es con la producción de citocinas, por lo tanto también se evaluó la capacidad de las proteínas Cry1Ac de inducir la secreción de citocinas de perfil proinflamatorio principalmente (IL6, TNF α , IL12 y MCP-1). Los resultados indican que la protoxina indujo mayor producción que la toxina de las citocinas IL6, TNF α , IL12 y MCP-1. El nivel de inducción de citocinas provocado con protoxina, es muy similar al registrado en nuestro control positivo (LPS), aunque a diferencia de este la protoxina también indujo la expresión de la citocina reguladora IL-10, la cual no fue observada con el LPS ni la toxina. En el caso de la toxina (como se observó también en la sobreexpresión de moléculas coestimuladoras) la activación inducida en macrófagos fue más discreta (Fig. 11).

Fig. 11

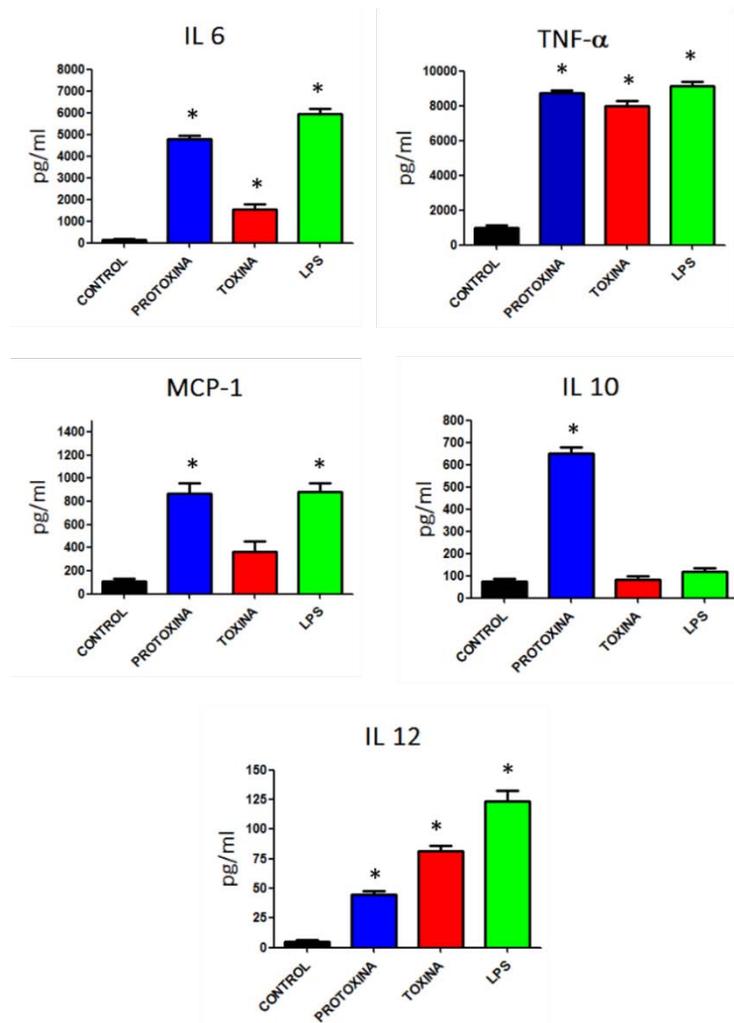


Figura 11. Efecto de la protoxina y toxina Cry1Ac en la expresión de citocinas en células Raw 264.7. Se observa una expresión de citocinas principalmente de perfil proinflamatorio con el estímulo de la Pcry1Ac a diferencia de la Tcry1Ac que su activación fue discreta. También se muestra la inducción de la citocina IL-10 que se relaciona con un efecto regulatorio inducida solo por la Pcry a diferencia del LPS y la Tcry. Este ensayo se llevó a cabo con 24 h de incubación, el estímulo fue dado en una concentración de proteínas Cry1Ac de 10 $\mu\text{g}/\text{millón}$ de células incubadas a 37°C en una atmosfera de CO₂. Las citocinas fueron evaluadas en el sobrenadante de cultivo celular con CBAs por citometría de flujo. Los datos muestran la concentración en unidades de pg/ml de cada citocina. Gráficos representativos de resultados promedio \pm ES n=3. Los datos fueron analizados mediante un ANOVA de una vía seguida por la prueba de Dunnet.*p<0.05.

Identificación de posibles receptores de proteínas Cry1Ac en macrófagos J774 por ensayos de “blot” ligando de proteínas totales

Para identificar el posible receptor se realizó ensayos de “blot” ligando de los lisados totales de la línea celular J774. Las membranas se incubaron con las proteínas Cry toxina y/o protoxina. Al revelar las tiras se observaron claramente bandas específicas con los pesos moleculares relativos de 66, 53, 37 kDa, muy similares entre ambas, a excepción de una banda que observamos en el blot ligando de la toxina con un peso molecular de 45 kDa (Fig. 12).

Fig. 12

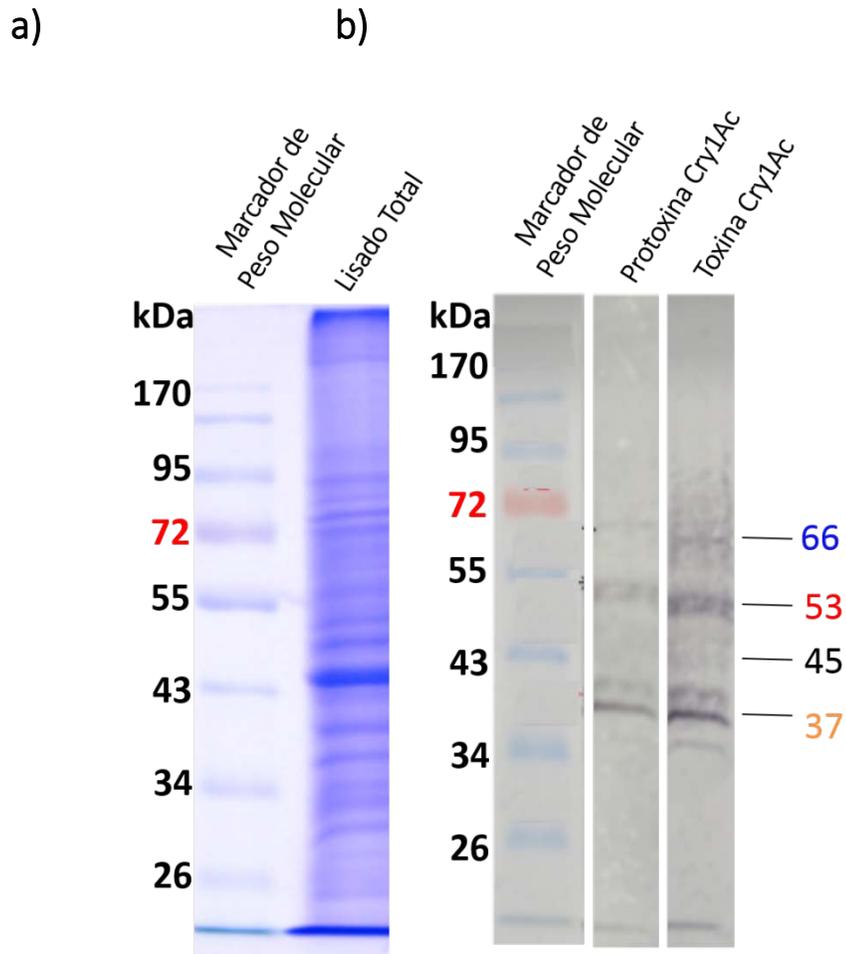


Figura 12. Identificación de posibles receptores para las proteínas Cry en ensayos de “blot” ligando en proteínas totales de células J774. En el panel a) se muestra el gel representativo de la obtención de las proteínas totales solubles de las células J774, con la banda de actina del lisado sin degradar. En el panel b) se muestra las tiras de PVDF reveladas con 4-chloro-1-naphthol con bandas producto de la unión de la protoxina y la toxina según sea el caso a polipéptidos con pesos moleculares aproximados de 66, 53, 37 y una de 45 kDa para el caso de la toxina. Para este ensayo se incubó con las proteínas Cry1Ac a una concentración de 5ug/ml. Gráficos representativos de tres experimentos independientes.

Identificación de posibles receptores de proteínas Cry1Ac en macrófagos J774 por ensayos de “blot” ligando de proteínas de membrana

También se realizó ensayos de “blot” ligando con proteínas de membrana, esto para comparar los patrones con los “blot” ligando de los lisados totales. De manera sorprendente con la protoxina solo se detectó una banda de peso molecular de 64 kDa, mientras que con la toxina se revelaron diferentes bandas con pesos de 69, 64, 60 y 42 kDa, (Fig. 13) pesos moleculares ligeramente diferentes a las bandas detectadas en el “blot” ligando de lisado total (66, 53, 37 y 45 kDa). (Fig. 12)

Fig. 13

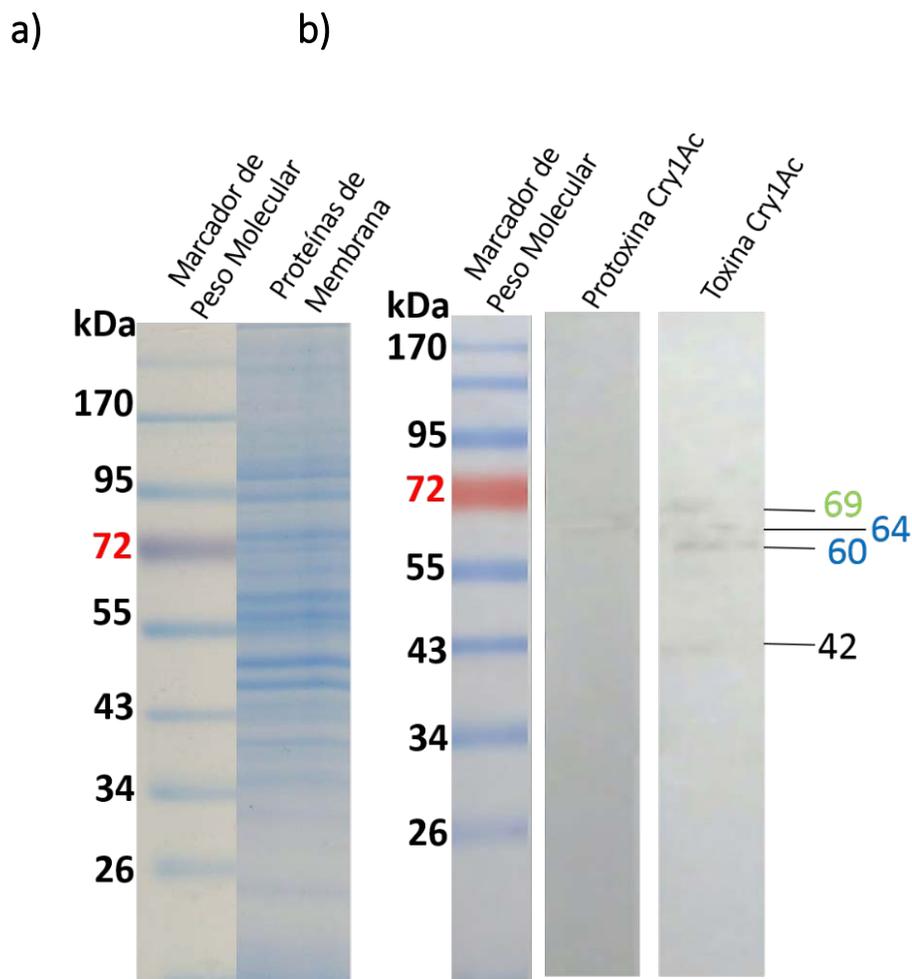


Figura 13. Identificación de posibles receptores para las proteínas Cry en ensayos de “blot” ligando de proteínas de membrana en células J774. En el panel a) se muestra el gel representativo de la obtención de las proteínas de membrana

solubles. En el panel b) se muestra las tiras de PVDF con la única banda revelada de la unión de protoxina (64 kDa) y para la toxina las bandas reveladas con los pesos aproximados de 69, 64, 60 y 42 kDa. Para este ensayo se incubó con las proteínas Cry1Ac a una concentración de 5 μ g/ml. Gráficos representativos de tres experimentos independientes.

Identificación de posibles receptores para las proteínas Cry1Ac en macrófagos J774 por ensayos de inmunoprecipitación y “blot” ligando de la inmunoprecipitación

Para identificar los receptores de una manera más eficiente se realizaron ensayos de inmunoprecipitación en los que se pusieron a interactuar las proteínas Cry1Ac con las células J774 vivas. Las proteínas inmunoprecipitadas se corrieron y se detectaron bandas de pesos moleculares relativos aproximados de 72, 67, 64, 59, 53, 49, 45 kDa para ambas proteínas Cry (Fig.14a). Paralelamente se corrieron inmunoprecipitaciones y se transfirieron a papel PVDF para realizar los ensayos de “blot” ligando. Al revelar los “blot” ligando de las inmunoprecipitaciones incubando con protoxina y toxina, se encontró de forma similar como ocurrió en los ensayos de “blot” ligando en las proteínas de membrana, que la protoxina solo se detectó una sola banda de peso molecular de 65 kDa, mientras que con la toxina se detectaron las bandas de 72, 65, 62, 59, 53 y 48 kDa pesos comparables con las observadas en el gel SDS-PAGE y con los de algunas de las proteínas detectadas en los ensayos de “blot” ligando de lisados de membranas. (Fig.13b) También se corrieron unos controles de “blot” ligando de toxina, protoxina Cry1Ac e IgG, para descartar las bandas que corresponden a las proteínas Cry usadas así como las bandas correspondientes a las cadenas pesadas y ligeras de la IgG que participaron en el mismo complejo de la inmunoprecipitación (Fig. 14c).

Fig. 14

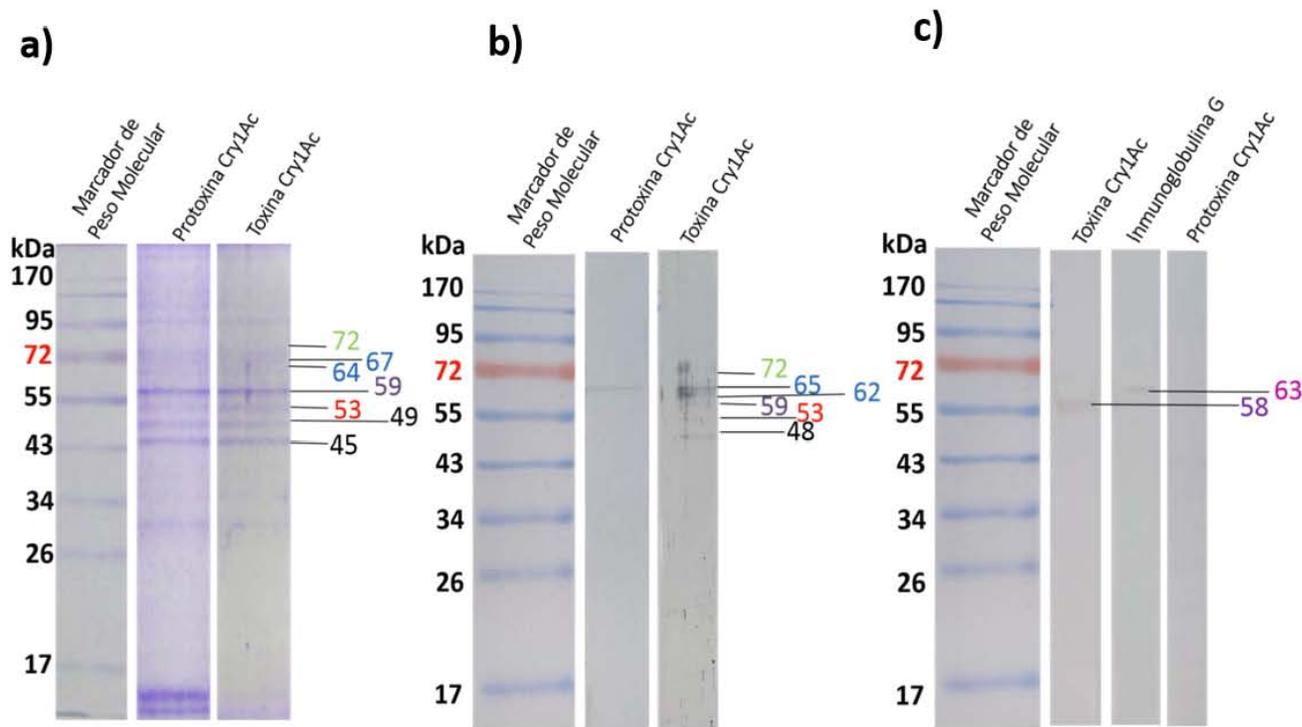


Figura 14. Identificación de posibles receptores para las proteínas Cry en ensayos de inmunoprecipitación y “blot” ligando de la inmunoprecipitación con células J774. En el panel a) se muestra el gel representativo de la inmunoprecipitación con el mismo patrón de bandas para ambas proteínas Cry con pesos moleculares de 72, 67, 64, 59, 53, 49 y 45 kDa aproximados que posteriormente se confirmaron por ensayos de “blot” ligando para la toxina ya que con la prottoxina solo se reveló una banda de un peso molecular de 65 kDa. En el panel C se muestran los controles que corrieron para descartar las bandas contaminantes de las mismas proteínas Cry representadas de color morado y las cadenas pesadas de las IgG se representaron de color rosa. Se señalan con este mismo color en el gel y el blot ligando. Para la prottoxina no fue necesario ya que no se observó ninguna banda de su mismo peso molecular (130 kDa). En este ensayo se incubó con las proteínas Cry1Ac a una concentración de 5 ug/ml. Gráficos representativos de tres experimentos independientes.

Comparación de los resultados obtenidos con los ensayos de “blot” ligando de las proteínas totales, proteínas de membrana e inmunoprecipitación de las células J774

Se comparó los diferentes resultados obtenidos de las bandas identificadas por toxina y protoxina en los distintos ensayos de “blot” ligando (lisados totales, membranas y proteínas inmunoprecipitadas). Se observó que el patrón de las bandas obtenidas principalmente de proteínas de membrana y la inmunoprecipitación fue similar. Se representaron con colores las bandas de pesos similares (azul pesos que oscilan entre 66 y 62 kDa, verde arriba de 69 kDa, rojo 53 kDa y negro de 48 a 42 kDa) aunque recordemos que los pesos registrados son relativos. (Fig. 15).

Fig. 15

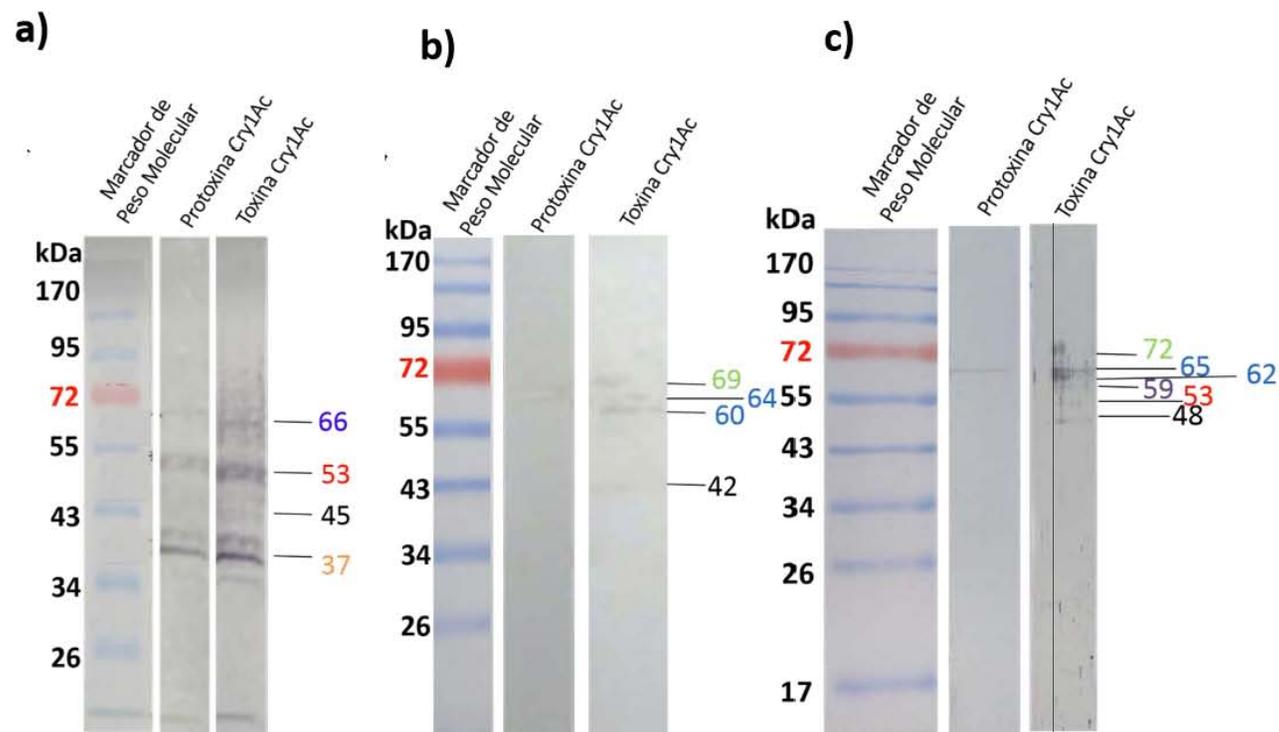


Figura 15. Comparación de pesos moleculares de los resultados obtenidos con los diferentes ensayos de blot ligando. En el panel a) se muestran las bandas correspondientes al blot ligando de las proteínas totales, en el panel b) son los resultados obtenidos de los ensayos con las proteínas de membrana y en el panel c) las bandas reveladas con los ensayos de inmunoprecipitación. Las bandas relacionadas se encuentran descritas del mismo color. Las bandas de mayor peso molecular entre 69 y 72 kDa se muestran en verde, en azul se muestran las que oscilan entre los pesos moleculares de 60-65 kDa que son donde caen la mayoría de los tres ensayos. Otro grupo de bandas de color rojo son las ubicadas en los 53 kDa y por último, el menor grupo de color negro que abarca desde 48 y 42 kDa. En el caso de la protoxina los resultados de los blot ligando de proteínas de membrana e inmunoprecipitación coinciden con la misma banda obtenida de 64 kDa. En el caso de la inmunoprecipitación de la toxina se marca de color morado la posible banda relacionada con la misma toxina. Gráficos r.

Resultados del primer análisis de proteómica y propuesta de receptores para las proteínas Cry1Ac en células J774

Considerando estos resultados se mandaron a espectroscopia de masas las bandas de proteínas obtenidas en los ensayos de inmunoprecipitación.

En el Instituto Nacional de Salud Pública nos enviaron los resultados producto de la secuenciación por huella peptídica que se resumen en la tabla 1. Solo se muestra las proteínas candidatos a receptores:

PROTEÍNAS CRY	Peso de la banda enviada	Proteína identificada	Peso de la proteína identificada	# Acceso	% Cobertura	# péptidos
Protoxina	45 kDa	EGF-Related protein SCUBE 1	111 kDa	AAG25939	6.1	4
Toxina	59.8 kDa	Tmprss 13 (secuencia parcial)	52 kDa	AAH42878	5.9	5

Tabla 1: Tabla de resumen con los resultados de proteómica con los candidatos a receptores para las proteínas Cry1Ac. Aquí se muestran los datos del análisis de proteómica, de los candidatos a receptores donde se especifica el peso molecular de la banda detectada, el nombre, su número de acceso, número de cobertura. Solo se muestra los primeros candidatos a receptor ya que son proteínas transmembranales capaces de inducir vías de señalización.

Identificación de posibles receptores para la protoxina Cry1Ac en ensayos de “blot” ligando de proteínas totales, de membrana y citoplasma con las células Raw 264.7.

También se hicieron ensayos de “blot” ligando con las proteínas totales, proteínas de membrana y de citoplasma de las células Raw 264.7 poniéndolas a interactuar con la Pcry1Ac para después poder comparar el patrón de bandas obtenidas con las células J774. Aquí se muestra el “blot” revelado con el escáner infrarrojo odyssey, donde observamos

un patrón de bandas en los lisados totales que se enriquece en las proteínas de membrana resaltando los pesos relativos de 72, 45 y 34 kDa. También se observa que este mismo patrón no coincide con las proteínas del citoplasma. (Fig. 16).

Fig. 16

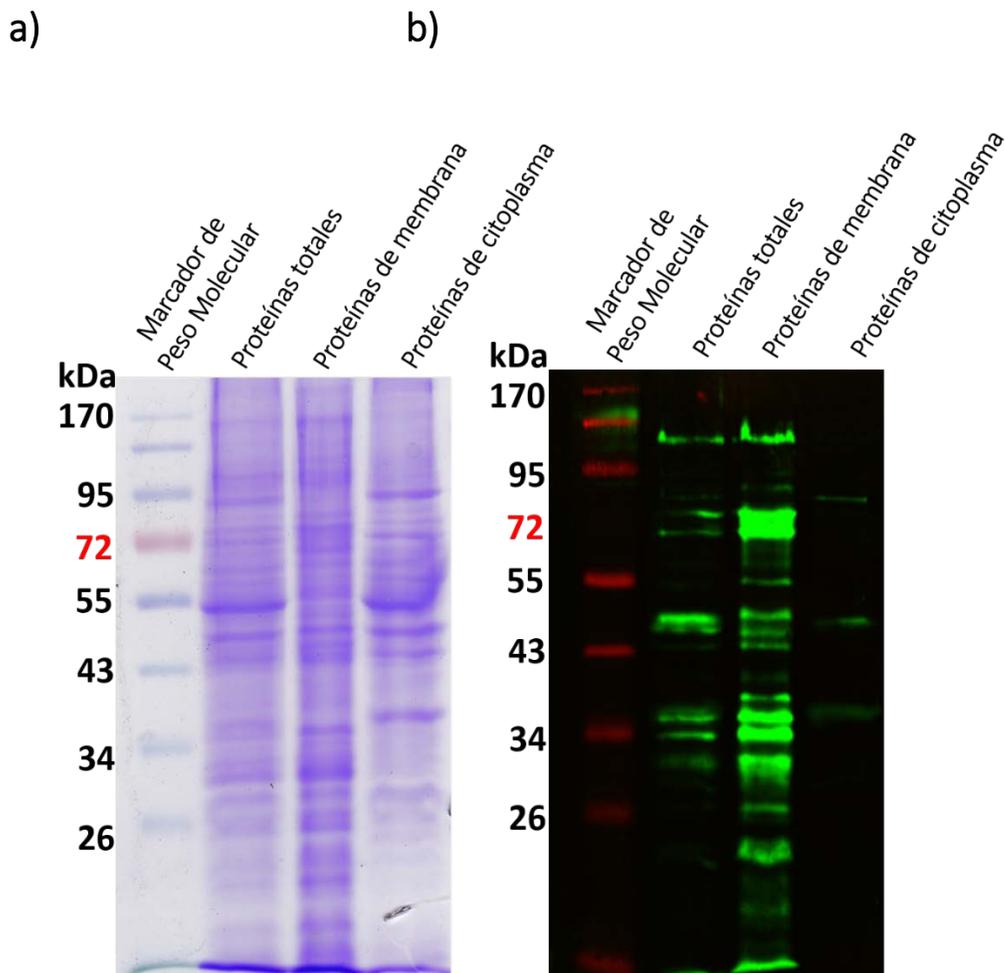


Figura 16. Identificación de posibles receptores para la protoxina Cry1Ac en ensayos de "blot" ligando de proteínas totales, proteínas de membrana y citoplasma con las células Raw 264.7. En el panel a) se muestra el gel representativo de los lisados mostrando que se encuentran sin degradar. En el panel b) se muestra el "blot" revelado por el escáner infrarrojo Odyssey. Las bandas que principalmente se revelan son las de pesos de 100, 72, 45, 34 kDa. Para este ensayo se incubó con las proteínas Cry1Ac en una concentración de 5ug/ml. Gráficos representativos de tres experimentos independientes.

Identificación de posibles receptores para la toxina Cry1Ac en ensayos de “blot” ligando de proteínas totales, de membrana y citoplasma con las células Raw 264.7.

Para la toxina Cry1Ac también se realizó este ensayo donde a diferencia de la protoxina el patrón de bandas reveladas fue mucho mayor, esto se puede relacionar que la toxina Cry1Ac tiene una alta afinidad por las proteínas glicosiladas. Se observa un patrón similar en las proteínas totales que se enriquece en las proteínas de membrana. Se observó que la toxina también tiene afinidad por las proteínas del citoplasma. (Fig. 17).

Fig. 17

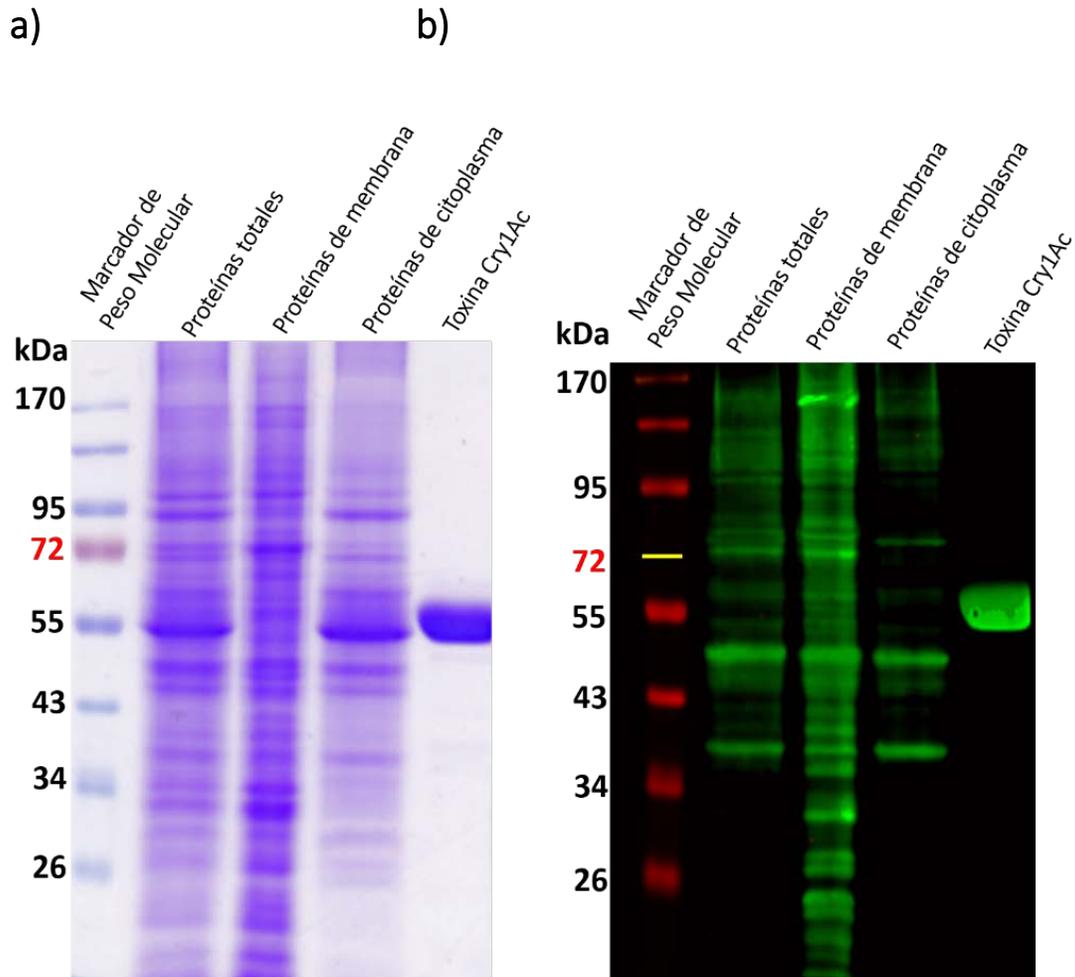


Figura 17. Identificación de posibles receptores para la toxina Cry1Ac por ensayos de “blot” ligado de proteínas totales, de membrana y citoplasma con las células Raw 264.7. En el panel a) se muestra el gel representativo de los lisados mostrando sin degradar. En el panel b) se muestra el “blot” revelado por el escáner infrarrojo Odyssey con su control de carga de Tcry1Ac. Las bandas que principalmente se revelan son de los pesos de 95, 72, 60 y 45 KDa. Para este ensayo se incubó con las proteínas Cry1Ac a una concentración de 5ug/ml. Gráficos representativos de tres experimentos independientes.

Identificación de posibles receptores para la protoxina Cry1Ac por ensayos de inmunoprecipitación con las células Raw 264.7.

Al igual que con las células J774 se realizaron ensayos de inmunoprecipitación con las células Raw 264.7 y se incluyó un control de inmunoprecipitación sin utilizar la Pcry1Ac para verificar si todo el patrón de bandas observadas eran las inmunoprecipitadas por la Pcry. Se identificó una serie de bandas inespecíficas las cuales se señalan con la flecha roja y se descartaron de nuestros posibles candidatos a receptores señaladas con las flechas negras 95, 72 y 45 kDa. A pesar de ello se mandaron todas las bandas señaladas en la inmunoprecipitación (flechas rojas y negras) a espectrometría de masas al Instituto Nacional de Medicina Genómica INMEGEN (Fig. 18).

Fig. 18

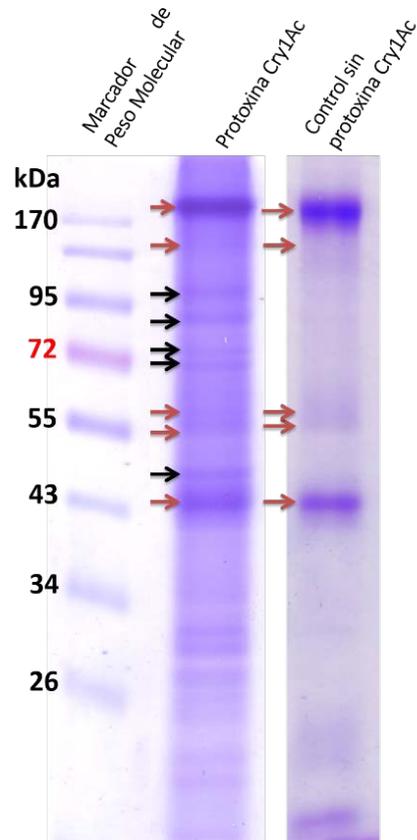


Figura 18. Identificación de posibles receptores para la protoxina Cry1Ac por ensayos de inmunoprecipitación con las células Raw 264.7. Se muestra el patrón de bandas obtenidas por la inmunoprecipitación con las células Raw 264.7 señalando las bandas propias del control (flechas rojas) y nuestros posibles candidatos (flechas negras). Para este ensayo se incubó con las proteínas Cry1Ac a una concentración de 5 ug/ml. Gráficos representativos de tres experimentos independientes.

Comparación entre las bandas obtenidas en la inmunoprecipitación con la protoxina y los ensayos de “blot” ligando en las células Raw 264.7.

Se compararon las bandas reveladas en los “blot” ligando de las proteínas totales, membrana y citoplasma con las inmunoprecipitaciones de la protoxina Cry1Ac y se corroboró la identificación de las bandas consideradas como posibles candidatos a receptores (72 y 45 kDa). (Fig. 19)

Fig. 19

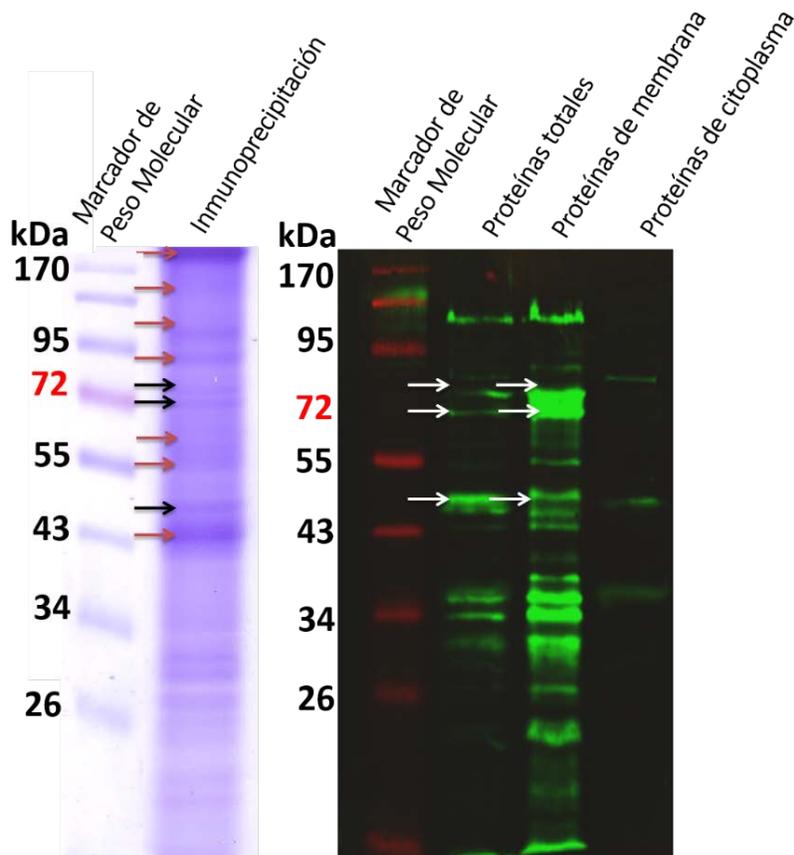


Figura 19. Comparación entre las bandas obtenidas en la inmunoprecipitación y los ensayos de “blot” ligando de las células Raw 264.7. Aquí se confirmó las bandas observadas en los “blot” ligando y las obtenidas en la inmunoprecipitación señaladas de color negro en la inmunoprecipitación y en blanco en los “blot” ligando.

Identificación de posibles receptores para la toxina Cry1Ac por ensayos de inmunoprecipitación con las células Raw 264.7.

En el caso de la inmunoprecipitación de la toxina con las células Raw 264.7 observamos un patrón de bandas diferentes al de protoxina, en este caso las bandas que observamos que no coinciden con el control (inmunoprecipitación con anticuerpo anti toxina sin TCry1Ac) son 4 de los siguientes pesos relativos, una mayor de 210, 95, 72 y 55 kDa (Fig. 20).

Fig. 20

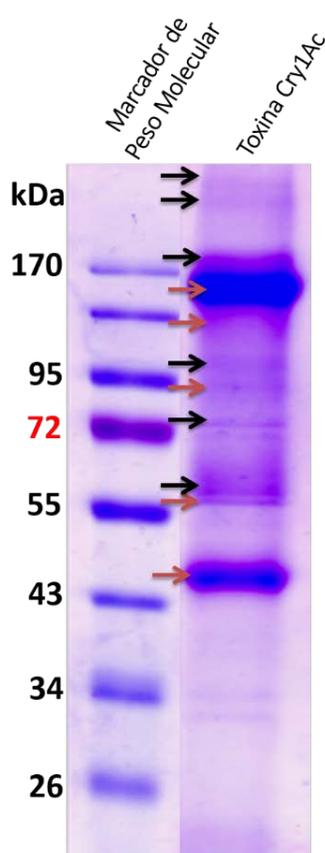


Figura 20. Identificación de posibles receptores para la toxina Cry1Ac por ensayos de inmunoprecipitación con las células Raw 264.7. Se muestra las bandas obtenidas en la inmunoprecipitación con las células Raw 264.7. En la figura se señalan las bandas propias del control (flechas rojas) y 4 bandas como posibles candidatos (flechas negras) 210, una de 95, 72 y 55 kDa. Para este ensayo se incubó con las proteínas Cry1Ac a una concentración de 5 µg/ml. Gráficos representativos de tres experimentos independientes.

Comparación entre las bandas obtenidas en la inmunoprecipitación y los ensayos de “blot” ligando de la toxina Cry1Ac en las células Raw 264.7.

Se comparó las bandas inmunoprecipitadas con la toxina y los ensayos de “blot” ligando y se observó que existen bandas con pesos moleculares que coinciden entre ambos ensayos. No se identificaron las bandas que se encuentran por arriba de los 170 kDa de la inmunoprecipitación en los ensayos de “blot” ligando (Fig. 21).

Fig. 21

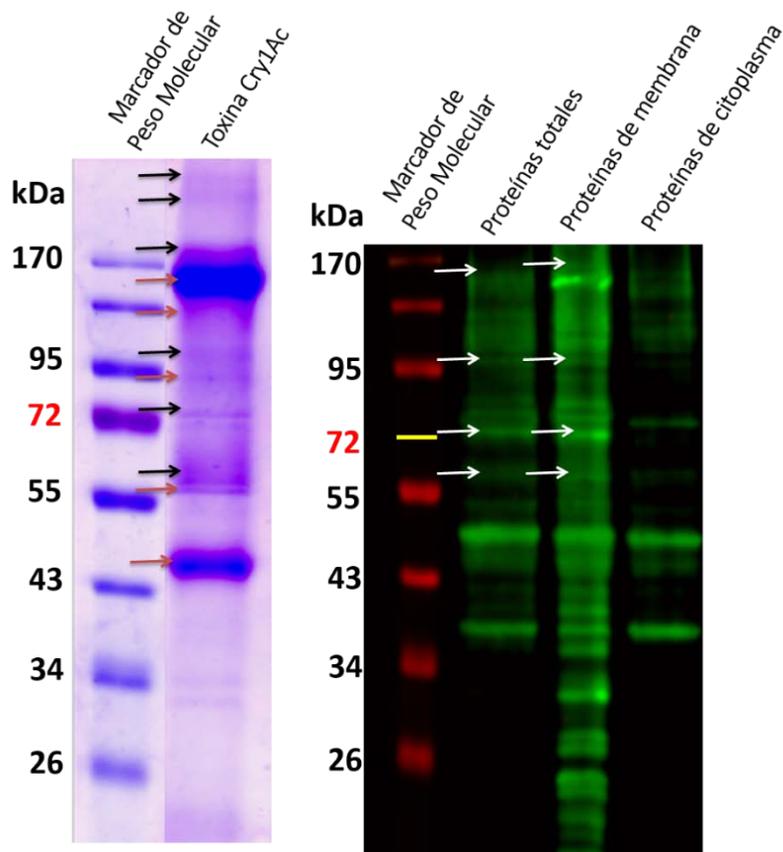


Figura 21. Comparación entre las bandas obtenidas en la inmunoprecipitación y los ensayos de “blot” ligando de la toxina Cry1Ac en las células Raw 264.7. Aquí se confirmaron las bandas observadas en los “blot” ligando con las obtenidas en la inmunoprecipitación (flechas negras) y en el “blot” ligando (flechas blancas).

Comparación entre los resultados del “blot” ligando de la PCry1Ac y la TCy1Ac.

También se comparó los resultados de los “blot” ligando de ambas proteínas Cry1Ac y confirmamos que igual que los resultados obtenidos con las células J774 el patrón de bandas no coinciden, lo que sugiere que quizás no sea el mismo receptor para la protoxina que para la toxina Cry1Ac (Fig. 22)

Fig. 22

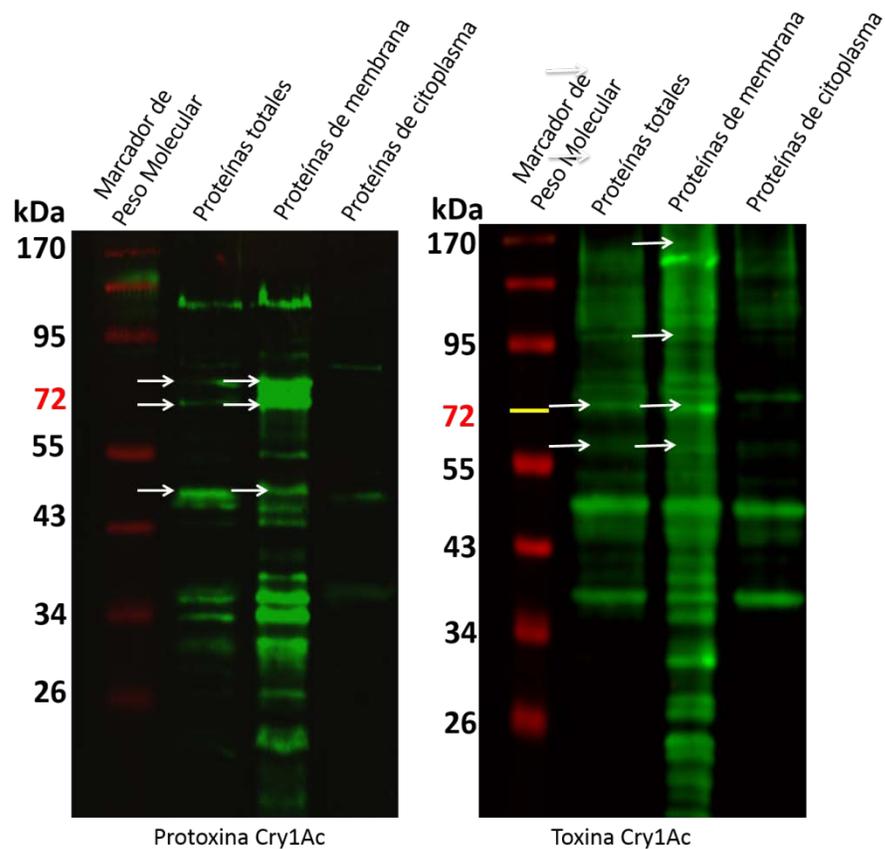


Figura 22. Comparación entre los resultados del “blot” ligando de la pcry 1Ac y la tcry1Ac. En blanco se señalan las bandas que se sugieren como posibles receptores para cada proteína Cry las cuales no coinciden a excepción de la banda de 72 kDa ,lo que sugiere receptores diferentes para ambas proteínas Cry.

Considerando los resultados se decidió mandar a identificación por masas las bandas de la inmunoprecipitación con la protoxina y la toxina Cry1Ac al Instituto Nacional de Medicina Genómica INMEGEN y los resultados fueron los siguientes.

Resultados del análisis de proteómica y propuesta de receptores para las proteínas Cry1Ac en las células Raw 264.7

Los candidatos más fuertes a receptor para la protoxina Cry1Ac según los resultados reportados en el análisis de masas y la literatura fueron: la α -enolasa de 48 kDa como primera opción aunque las proteínas de choque térmico (85 y 70 kDa) también se consideran. Para la toxina, la cadherina y la fosfatasa son nuestros primeros candidatos a receptores, ya que estos mismos receptores se han descrito en insectos para la tcry (Pardo-Lopez et al., 2013).

En el Instituto Nacional de Medicina Genómica en la unidad de proteómica nos enviaron los resultados producto de la identificación por espectrometría de masas-masas que se resumen en la tabla 2:

PROTEÍNAS CRY	Peso de la banda enviada	Proteína identificada	Peso de la proteína identificada	# Acceso	% Cobertura	# péptidos
Protoxina	85kDa	Heat shock 90	83.2 kDa	Q71LX8	20.6	3
Protoxina	70 kDa	Heat shock 70	70.8 kDa	Q71U34	35.6	7
Protoxina	48 kDa	α -enolasa	47.1 kDa	P17182	50	9
Toxina	210 kDa	Fostasa	211.4 kDa	A2A8L5	7.2	1
Toxina	60 kDa	Cadherina	316.9 kDa	A2AEE7	2.4	0

Tabla 2: Tabla de resumen con los resultados de proteómica de los candidatos a receptores para las proteínas Cry1Ac para las células Raw 264.7. Aquí se muestran los resultados resumidos solo de los candidatos a receptores arrojados por el análisis de proteómica, donde se especifica el peso molecular de la banda enviada, el peso molecular de la proteína

identificada, el número de acceso, nombre, número de cobertura y número de péptidos identificados. Nótese el número de péptidos identificados de la α -enolasa y las proteínas de choque térmico para la protoxina.

Como se mencionó anteriormente los resultados reportados de los candidatos a receptores de la toxina coinciden con los descritos en insectos. Se realizó un blast comparativo para saber qué porcentaje de homología existía, primero, entre el sitio de unión de la caderina de insectos que ya se encuentra bien caracterizado, con la caderina reportada de los macrófagos Raw 264.7 y nos arrojó un 60% de identidad que es bastante considerable (Fig. 23)

Sitio de unión de la cadherina de insectos vs sitio de unión de la cadherina de ratón

865NITIHITDTNN875

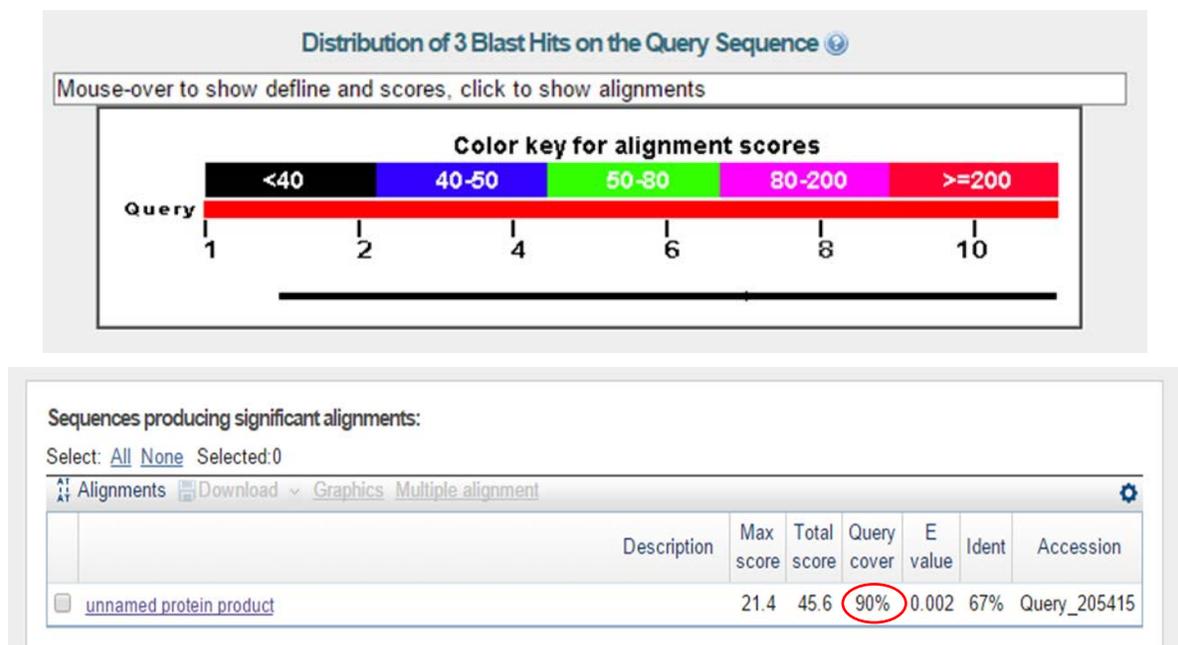


Figura 23. Blast donde se muestra el porcentaje de homología que existe entre el sitio de unión de la caderina de insectos con la caderina que nos identificaron por masas.

Este mismo ejercicio se realizó con la fosfatasa alcalina, el otro candidato a receptor reportado para la toxina. Aquí solo se comparó la proteína completa de la fosfatasa en insectos con la fosfatasa de ratón y se identificó un 39% de identidad, porcentaje bastante alto considerando la diferencia de especie (Fig. 24).

Fosfatasa de insecto vs fosfatasa de ratón



Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
	18.5	35.4	10%	2.5	39%	38243

Figura 24. Blast donde se muestra el 39% porcentaje de homología que existe entre la fosfatasa alcalina de insectos y la fosfatasa de los macrófagos Raw 264.7.

DISCUSIÓN

Los estudios previos para estas proteínas se han centrado en la caracterización del mecanismo de acción y la identificación de receptores en el insecto (Pardo-Lopez et al., 2013) y no consideran la existencia de receptores específicos para las proteínas Cry en células de mamífero debido a que los estudios de toxicidad sugieren su inocuidad para el ser humano (Mesnage et al., 2013). Por otro lado, los resultados de este trabajo evidencian la existencia en macrófagos de un posible receptor y/o receptores para la protoxina y la toxina Cry1Ac.

Con los resultados de este trabajo se sugiere que los receptores para la protoxina y la toxina Cry1Ac son diferentes. En los ensayos de unión, por citometría y microscopía confocal, se muestra una unión más evidente de la protoxina que de la toxina, efectos observados en ambas líneas celulares, aunque la unión fue mayor en las células J774, con una intensidad media de fluorescencia (IMF) de 500 unidades a los 10 minutos hasta las 1500 a las 3 h, esto con la protoxina, mientras que con la toxina a los 10 minutos su unión apenas llegó a las 100 unidades con un máximo a las 3 h de 250 unidades (Fig.5). Este mismo comportamiento también se observó con la línea celular Raw 264.7 (Fig.9). La diferencia de intensidad de unión entre ambas líneas celulares se asoció a la activación basal de las células J774, que fue una limitante que se nos presentó al evaluar la capacidad de las proteínas Cry de inducir la activación de macrófagos donde inclusive no se logró observar el efecto de nuestro control positivo (LPS), el cual es ampliamente usado como control de activación por su efecto proinflamatorio en macrófagos (Guha and Mackman, 2001).

En este trabajo también se demostró que tanto la protoxina como la toxina Cry1Ac tienen efectos de activación en macrófagos. Estos efectos contribuyen a explicar el posible mecanismo de acción de las proteínas Cry como adyuvante; ya que muchos adyuvantes ejercen su acción por su capacidad de activar células presentadoras de antígeno incrementando la expresión de moléculas coestimuladoras e induciendo la producción de citocinas (Lycke, 2012). Aquí se observó que en las células Raw 264.7 los efectos en la expresión de moléculas coestimuladoras siempre fueron más evidentes con estímulo con la protoxina a diferencia de la toxina aunque las dos tuvieron efectos estadísticamente significativos

(Fig.10). En el caso de las citocinas se observó un patrón de expresión diferente, al estimular con la protoxina y la toxina. Con la protoxina se obtuvo una alta expresión de IL-6, TNF- α , MCP-1 y un poco de IL-12, expresión muy similar al perfil inducido con nuestro control positivo (LPS) (Carroll et al.) a excepción de la IL-10 que solo se obtuvo con la Pcry1Ac. Tomando en cuenta que la IL-10 es una citocina regulatoria, esto nos sugiere que por efecto de la Pcry1Ac se induce un perfil de citocinas mixto, tanto proinflamatorio pero también regulatorio a diferencia del LPS, aunque se tendría que ampliar el panel de citocinas para poder asegurarlo. En el caso de la toxina mostró una actividad significativa en la expresión de algunas citocinas proinflamatorias IL-6, TNF- α , IL-12 y ausencia de MCP-1 y la IL-10, lo que nos indica que a pesar de ser dos proteínas que se consideran una precursora de la otra tienen diferentes efectos y posiblemente receptores diferentes (Fig.11).

Como ya se mencionó se demostró la capacidad de estas proteínas de unirse a la superficie celular, Sin embargo, por microscopía confocal se observó que no solo se unía a la membrana celular sino también dentro de la célula, lo que nos sugirió que la proteína tanto la protoxina como la toxina estaban siendo internalizadas. Para verificar si fue por efecto de la endocitosis se marcaron proteínas específicas de las vesículas endocíticas, Rab 5 y Rab 7 y se observó que las proteínas Cry colocalizaban con las vesículas endosomales demostrando su internalización mediante la vía endocítica (Fig.7). Como parte de un objetivo extra y que se encuentra dentro de las perspectivas de este trabajo es poder determinar si esta internalización es mediada por clatrina que es la forma más común de internalización mediada por un receptor y/o caveolina, datos que nos apoyarían aún más la presencia de un receptor (Zhu et al., 2011).

Todos estos resultados se consideran para que después de identificar al receptor podamos comprobar su función con el bloqueo de este y la inhibición de tales efectos. Otros efectos a considerar es la inducción de vías de señalización, tesis de doctorado actual de la alumna Marilu Torres que como datos preliminares muestran una participación de ERK, P38 y el factor NF κ B para la protoxina y JNK, P38 y el factor NF κ B para la toxina.

Por otra parte, dentro de los datos reportados en la literatura el único que sugiere la existencia de proteínas de unión para la protoxina Cry1Ac en la superficie intestinal de mamíferos es el trabajo de (Vazquez-Padron et al., 2000) en donde identificaron en vesículas de la superficie mucosal del intestino delgado de ratón, proteínas a las que se unía la protoxina en condiciones desnaturizantes por ensayos de “blot” ligando y sugieren seis polipéptidos de peso molecular de 102, 87, 62, 55, 51 y 39 kDa que pueden estar relacionados, con los efectos de captura y procesamiento de las proteínas Cry, por las células presentadoras de antígeno en la mucosa intestinal. En este trabajo, por diferentes metodologías y líneas celulares también identificamos ciertas bandas que podemos sugerir como receptores y relacionar con los efectos observados. En las células J774 en el “blot” ligando de proteínas totales se detectaron bandas ubicadas en los pesos aproximados de 66, 53 y 37 para la protoxina y para la toxina con mayor intensidad de 66, 53, 45 y 37 kDa (Fig.12). En los ensayos de “blot” ligando realizados en las proteínas de membrana, con la protoxina se reveló una sola banda de 64 kDa mientras que en la toxina se detectaron cuatro bandas de unión con pesos relativos de 69, 64, 60 y 42 kDa (Fig.13). Las diferencias encontradas entre ambos ensayos pueden deberse a que las proteínas reconocidas en el extracto de proteínas totales eran proteínas intracelulares que se descartaron con el ensayo en proteínas intracelulares, sin embargo, no tenemos suficiente evidencia para demostrarlo. También hay que recordar que las diferencias en peso registradas pueden deberse a la forma de calcular los pesos moleculares que solo nos dan un valor aproximado. En el caso de los ensayos de inmunoprecipitación realizados en esta misma línea celular (J774) el patrón de bandas fue muy similar entre la protoxina y la toxina solo que con la protoxina se revelaron con mayor intensidad bandas con pesos moleculares relativos de 72, 67, 64, 59, 53, 49 y 45 kDa (Fig.14a). Para mejorar este resultado es necesario incluir un control de inmunoprecipitación con proteína A únicamente para descartar las bandas inespecíficas que puedan estar inmunoprecipitándose por el anticuerpo. Aunque cabe señalar que en ensayos de “blot” simple los anticuerpos usados fueron bastante específicos. También se realizó ensayos de “blot” ligando con las proteínas de la inmunoprecipitación para corroborar que las bandas que se precipitaron pudieran seguir siendo reconocidas por

las proteínas Cry. Aunque no necesariamente se tenían que reconocer ya que al correrlas en SDS PAGE y transferirlas cambian su conformación nativa de los sitios de reconocimiento o generan nuevos sitios de interacción influyendo las condiciones de corrida como el uso de buffer de carga con agente reductor como sucedió en estos ensayos. Considerando todos estos factores, solo se detectó una banda con la protoxina de 65 kDa mientras que con la toxina detectamos bandas de pesos relativos de 72, 65, 62, 59, 53 y 48 kDa que coincidieron con las obtenidas en los ensayos de inmunoprecipitación (Fig.14b).

Como se mencionó en los resultados aunque existen una relación entre las bandas obtenidas de los ensayos de “blot” ligando de proteínas totales, membrana e inmunoprecipitación, solo se consideraron las bandas obtenidas en la inmunoprecipitación para mandar a secuenciar al Instituto de Salud Pública de Cuernavaca Morelos (Fig.14a).

El análisis mediante espectrometría de masas nos identificó en la banda de 52 kDa un primer candidato a receptor para la Tcry1Ac, la proteína Tmprss 13 la cual, es una proteína transmembranal.

La proteína **Tmprss** es una proteína transmembranal, que se encuentra en diversos tejidos de ratón y se le han asociado diversas funciones celulares, como hidrolasa y peptidasa aunque, no se encuentra bien caracterizada (Madsen et al., 2014). Cuenta con un dominio receptor scavenger rico en cisteínas (SRCR), descrito ampliamente en la generación de respuestas inmunes ante estímulos diversos en macrófagos, pero la función más común descrita, es actuar como receptores que sirven para mediar, la fagocitosis directa de patógenos no opzonizados en macrófagos y células dendríticas (Areschoug et al., 2008). Además, también están involucrados en la producción de citocinas proinflamatorias por parte de los macrófagos como IL-6, IL-1 y GM-CSF (Van den Heuvel et al., 1999), al igual que lo observado por (Polfliet et al., 2006) en macrófagos de rata tras el entrecruzamiento con un anticuerpo activador del receptor tipo scavenger, se observó la inducción de mediadores proinflamatorios, incluyendo NO, IL-1b, IL-6 y TNF- α . Estos efectos concuerdan con los observados en este trabajo y la inducción de citocinas proinflamatorias por la Tcry1Ac (IL-6, TNF- α , IL-12) (Fig.11).

Con relación a la Pcry1Ac la banda de 43 kDa, fue la que nos sugirió el posible receptor. Esta proteína se identificó como **SCUBE 1** que es una proteína de membrana la cual consiste en 9 dominios repetidos parecidos a EGF (factor de crecimiento epidermal) y una secuencia de péptido señal en el N-terminal así como dominios de unión a Calcio, una región espaciadora glicosilada, motivos repetidos ricos en cisteína y un dominio CUB en el C terminal. Se ha caracterizado en varias líneas celulares como osteoblastos, hueso, neuronas, células de riñón y próstata así como otras células de la sangre como plaquetas y células con características de unión (Tu et al., 2008). Sin embargo, los estudios en cuanto a esta proteína se encuentran limitados y la señalización únicamente se ha observado en neuronas por inducción de la vía de las MAPK (Grimmond et al., 2001). Por otro lado, existe también una familia de proteínas caracterizadas por tener dominios de tipo factor de crecimiento epidermal de forma transmembranal caracterizada por tener siete pases transmembranales EGF-TM7. Esta familia cuenta con dominios con uniones a Ca⁺⁺ y se encuentran glicosiladas. Se expresan ampliamente en macrófagos maduros y en ratón se conocen como **F4/80** con un peso de 160 KDa y en humano como Emr1, moléculas ampliamente involucradas en procesos de inflamación. Estas proteínas cuentan del lado de su amino terminal con los 7 dominios seguidos de EGF-like con un peso de 40 kDa. Mientras que el lado de su carboxilo terminal demuestran secuencias homologas de miembros de proteínas de la superfamilia TM7, como los receptores acoplados de proteínas G (McKnight and Gordon, 1996). En base a estos resultados se sugiere que quizás no se precipitó como tal la proteína completa de SCUBE 1 sino solo el dominio de tipo factor de crecimiento epidermal con un peso de 40 kDa y que coincide con el peso de la banda enviada (43 kDa).

Con relación a los ensayos realizados de “blot” ligando en las células Raw 264.7, el patrón de bandas que se mostró, tanto para la protoxina como para la toxina, fue diferente a las obtenidas con las células J774, de hecho mostró un patrón con un número mayor de bandas, esto puede deberse a la forma de revelarse que fue diferente; ya que con las células J774 se utilizó el reactivo 4-cloro-nafhtol, que se sabe es menos sensible en comparación con otros métodos. En este caso, los “blot” ligando realizados con las células

Raw 264.7 se revelaron con anticuerpos infrarrojos en el escáner Odyssey, el cual es un método más sensible y específico.

Para la protoxina las bandas que se revelaron en los lisados totales fueron de 72, 70 y 48 kDa aproximadamente que posteriormente se enriquecieron en los ensayos con las proteínas de membrana principalmente las bandas de 72 kDa. También para este ensayo como control se consideraron las proteínas de citoplasma donde no se reveló casi nada, sugiriéndonos que la Pcry1Ac tiene poca afinidad por las proteínas intracelulares (Fig. 16). Para la toxina los resultados no fueron tan claros como con la protoxina sin embargo, las bandas que podemos resaltar son de los pesos moleculares de 170, 95, 72 y 60 kDa aproximadamente que fueron comparados posteriormente con los resultados obtenidos en la inmunoprecipitación (Fig.17).

En los resultados que obtuvimos de la inmunoprecipitación con las células Raw 264.7, también se incluyó un control de inmunoprecipitación sin proteína Cry, que nos dio un patrón de bandas inespecíficas, las cuales se descartaron después en la inmunoprecipitación con las proteínas Cry. Para el caso de la protoxina, descartando las bandas inespecíficas, se obtuvieron tres posibles candidatos a receptores con pesos aproximados de 72, 70 y 48 kDa (Fig. 18). Cabe señalar que la banda predominante de 160 kDa es la IgG sin reducir, al igual que la banda de 43 kDa que por la espectrometría sabemos que se trató de la cadena pesada de la IgG ya que la IgG se redujo, separándose en sus dos cadenas pesadas y ligeras (heavy, light).

Descartando las bandas inespecíficas para la toxina las bandas que se obtuvieron fueron de 58, 72, 98, 170, 225 y 245 kDa aproximadamente, sin embargo, como se mencionó anteriormente todas las bandas mostradas en la Fig. 16 y 17 (flecha roja y negra) se mandaron a espectrometría de masas. Para la protoxina los resultados de la banda de 48 kDa nos dio un buen candidato, la **α -enolasa 1** [ENO1]) que es una proteína multifuncional que primero se asoció solo como un componente de la glucólisis. ENO1 se expresa en el citosol pero también en la superficie celular y se ha descrito dentro de sus funciones como un receptor de unión a plasminógeno (Kim et al., 2015, Bae et al., 2015). Se ha identificado su

presencia en células hematopoyéticas como neutrófilos, linfocitos y monocitos que al activarse en presencia de estímulos inflamatorios como LPS sobre expresan una mayor cantidad de ENO1(Cho et al., 2015). Esto se ha observado en monocitos sanguíneos humanos y células monocíticas U937, con una rápida translocación de ENO1 a la superficie celular desde el citosol (Wygrecka et al., 2009). También se ha observado la producción de mediadores inflamatorios tales como TNF- α , IL-1 α / β , IFN- γ y PGE2 a través de las vías de p38 de las MAPK y NF- κ B cuando se estimulan monocitos y macrófagos humanos con anticuerpos específicos contra ENO1 (Bae et al., 2012). Estos resultados coinciden con los observados en un trabajo previo del laboratorio con la protoxina Cry donde se puso como estímulo en cultivos primarios de monocitos de ratón donde se observó la producción de citocinas pro inflamatoria, efecto que se suprimió en presencia del inhibidor de p38 de las MAPK(Moreno-Fierros et al., 2013)

Para el caso de las bandas de 70 kDa se identificaron las proteínas de choque térmico que también pueden funcionar como posibles receptores sin embargo, no existen muchas evidencias en la literatura que las relacionen con los macrófagos pero aun así no se descartan.

Para las proteínas identificadas que se relacionan con los receptores descritos en insectos (Pardo-Lopez et al., 2013). La **cadherina** es una proteína caracterizada por sus 7 pases transmembranales y se encuentra implicada en procesos de adhesión e interacciones receptor-ligando. Su peso conocido es de 260 kDa, sin embargo, nosotros detectamos solo un fragmento de 60 kDa ya que es difícil obtener la proteína completa. También se detectó que esta cadherina en mamíferos tiene un 60% de homología con el sitio de unión en insectos ya descrito (datos calculados con un blast como se observa en la Fig.23).

Por otro lado, también para la toxina una de las bandas con valor por arriba del peso molecular de 210 kDa resultó darnos una **fosfatasa alcalina**, candidato que nos llamó la atención ya que dentro de los descritos en insectos también se encuentra esta fosfatasa (Pardo-Lopez et al., 2013). Esta proteína tiene residuos con N-acetil-galactosamina, lo que se relaciona con algunos resultados obtenidos en el laboratorio donde se realizaron ensayos de blot ligando de competencia con N-acetil-galactosidasa y se inhibió la unión de la

tcry1Ac, lo que nos apoyaría con la identificación de este posible receptor. También se realizó un blast de la proteína total del insecto con la encontrada en estos resultados y mostró una homología de 38% (datos calculados con un blast como se observa en la Fig.24).

Aunque los receptores para la toxina deriven de un ancestro común no significa que tengan el mismo efecto en células del insecto que con las células de mamífero ya que recordemos que en el insecto forma poros en la membrana y muerte celular, mientras que en los mamíferos no se ha observado este efecto, incluso por ensayos hechos en el laboratorio con altas concentraciones de Cry1Ac no se ha demostrado que son tóxicas, lo que sugiere que quizás las proteínas Cry se unan de la misma manera y con el mismo tipo de receptores pero no se forme el oligómero como tal en las células de mamífero que permita la formación del poro y muerte celular, paso descrito en el mecanismo de acción caracterizado en insectos (Pardo-Lopez et al., 2013).

Los resultados utilizando las células J774 y Raw 264.7 a pesar de ser macrófagos de la misma especie y del mismo haplotipo celular, no son comparables, influyendo el estado de activación de las células y algunas variantes metodológicas, como la utilización de agente reductor al momento de desacoplar el complejo a las perlas de sefarosa en la inmunoprecipitación, que seguramente favoreció que posibles receptores se redujeran y no fueran identificados en su composición seminata. Otra variante fue que, los primeros ensayos realizados con las células J774, se incubaron a 37°C por una hora, sin embargo, considerando la posibilidad de que las proteínas Cry se estaba endocitando, se modificó este paso en los ensayos con las células Raw incubando a 4° por dos horas, retardando el proceso de endocitosis. Cabe señalar que estos ensayos se realizaron por triplicado con sus respectivas modificaciones.

En resumen, nuestros resultados indican que la toxina y la protoxina Cry1Ac son reconocidas por receptores, los cuales son los responsables de la activación de macrófagos así como sus efectos adyuvantes e inmunogénicos. No se descarta la presencia de más

proteínas de unión así como uno o más receptores implicados en el reconocimiento para las proteínas Cry1Ac.

CONCLUSIONES

- La protoxina y la toxina Cry1Ac además de unirse a la superficie celular de macrófagos J774 y Raw 264.7 son internalizadas por medio de la vía endocítica.
- Las proteínas Cry protoxina y toxina tiene la capacidad de activar macrófagos murinos de la línea celular Raw 264.7 mediante la sobre expresión de moléculas coestimuladoras CD80, CD86, CD40 y la integrina CD11b así como inducir la sobre expresión de citocinas proinflamatorias IL-6, TNF α , MCP-1, IL-12 y para el caso de protoxina también de la citocina regulatoria IL-10.
- La protoxina y la toxina se unen a proteínas específicas en la superficie celular de los macrófagos Raw 264.7 y J774, unión que puede ser responsable de los efectos observados como activación, internalización, inducción de vías de señalización y en el caso de la Pcry1Ac su efecto adyuvante.

PERSPECTIVAS

Dentro de las perspectivas principales se encuentra verificar si los candidatos a receptores son responsables de los efectos observados en las células de monocito macrófago 264.7 y J774 relacionados con la unión, activación y encendido de las vías de señalización. Esto por medio del bloqueo con anticuerpos específicos para cada receptor y posteriormente tratar de interferir su gen de expresión.

Otras de las perspectivas de este trabajo es determinar la ruta endocítica que lleva la protoxina y la toxina cuando es internalizada, si es dependiente de clatrina y/o caveolina y si su destino es llegar al aparato de Golgi o el lisosoma para posteriormente ser degradada.

ANEXOS

Buffer de lisis RIPA

Tris HCl 50 mM, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, Tritón 100X 1%

Tris HCl	0.78 g
NaCl	0.87 g
EDTA	0.037 g
Tritón 100x	1 mL
Agua Mq	99 mL

BIBLIOGRAFIA

- ARESCOUG, T., WALDEMARSSON, J. & GORDON, S. 2008. Evasion of macrophage scavenger receptor A-mediated recognition by pathogenic streptococci. *Eur J Immunol*, 38, 3068-79.
- BAE, H. J., BAE, S., PARK, C., HAN, S., KIM, J., KIM, L. N., KIM, K., SONG, S. H., PARK, W. & KWON, S. 2015. Biomimetics: biomimetic microfingerprints for anti-counterfeiting strategies (adv. Mater. 12/2015). *Adv Mater*, 27, 2123.
- BAE, S., KIM, H., LEE, N., WON, C., KIM, H. R., HWANG, Y. I., SONG, Y. W., KANG, J. S. & LEE, W. J. 2012. alpha-Enolase expressed on the surfaces of monocytes and macrophages induces robust synovial inflammation in rheumatoid arthritis. *J Immunol*, 189, 365-72.
- BRAVO, A., GOMEZ, I., CONDE, J., MUNOZ-GARAY, C., SANCHEZ, J., MIRANDA, R., ZHUANG, M., GILL, S. S. & SOBERON, M. 2004. Oligomerization triggers binding of a Bacillus thuringiensis Cry1Ab pore-forming toxin to aminopeptidase N receptor leading to insertion into membrane microdomains. *Biochim Biophys Acta*, 1667, 38-46.
- CARROLL, J. F., CHIAPA, A. L., RODRIQUEZ, M., PHELPS, D. R., CARDARELLI, K. M., VISHWANATHA, J. K., BAE, S. & CARDARELLI, R. 2008. Visceral fat, waist circumference, and BMI: impact of race/ethnicity. *Obesity (Silver Spring)*, 16, 600-7.
- CID, M., PEDERSEN, H. L., KANEKO, S., COUTINHO, P. M., HENRISSAT, B., WILLATS, W. G. & BORASTON, A. B. 2010. Recognition of the helical structure of beta-1,4-galactan by a new family of carbohydrate-binding modules. *J Biol Chem*, 285, 35999-6009.
- CRICKMORE, N., ZEIGLER, D. R., FEITELSON, J., SCHNEPF, E., VAN RIE, J., LERECLUS, D., BAUM, J. & DEAN, D. H. 1998. Revision of the nomenclature for the Bacillus thuringiensis pesticidal crystal proteins. *Microbiol Mol Biol Rev*, 62, 807-13.
- CHEN, K., WEI, X. Z., ZHU, X. D., BAI, Y. S., CHEN, Y., WANG, C. F., CHEN, Z. Q. & LI, M. 2013. Whole-blood gene expression profiling in ankylosing spondylitis identifies novel candidate genes that may contribute to the inflammatory and tissue-destructive disease aspects. *Cell Immunol*, 286, 59-64.
- CHEN, W., PATEL, G. B., YAN, H. & ZHANG, J. 2010. Recent advances in the development of novel mucosal adjuvants and antigen delivery systems. *Hum Vaccin*, 6.
- CHO, J. Y., BAE, S. H., KIM, H. K., LEE, M. L., CHOI, Y. S., JIN, B. R., LEE, H. J., JEONG, H. Y., LEE, Y. G. & MOON, J. H. 2015. New Quinolinone Alkaloids from Chestnut (*Castanea crenata* Sieb) Honey. *J Agric Food Chem*, 63, 3587-92.
- DE MAAGD, R. A., BRAVO, A., BERRY, C., CRICKMORE, N. & SCHNEPF, H. E. 2003. Structure, diversity, and evolution of protein toxins from spore-forming entomopathogenic bacteria. *Annu Rev Genet*, 37, 409-33.
- DE MAAGD, R. A., BRAVO, A. & CRICKMORE, N. 2001. How Bacillus thuringiensis has evolved specific toxins to colonize the insect world. *Trends Genet*, 17, 193-9.
- DUTHIE, M. S., WINDISH, H. P., FOX, C. B. & REED, S. G. 2011. Use of defined TLR ligands as adjuvants within human vaccines. *Immunol Rev*, 239, 178-96.
- EHSES, S., RASCHKE, I., MANCUSO, G., BERNACCHIA, A., GEIMER, S., TONDERA, D., MARTINO, J. C., WESTERMANN, B., RUGARLI, E. I. & LANGER, T. 2009. Regulation of OPA1 processing and mitochondrial fusion by m-AAA protease isoenzymes and OMA1. *J Cell Biol*, 187, 1023-36.
- ESQUIVEL-PEREZ, R. & MORENO-FIERROS, L. 2005. Mucosal and systemic adjuvant effects of cholera toxin and Cry1Ac protoxin on the specific antibody response to HIV-1 C4/V3

- peptides are different and depend on the antigen co-administered. *Viral Immunol*, 18, 695-708.
- EVDOKIMOV, A. G., MOSHIRI, F., STURMAN, E. J., RYDEL, T. J., ZHENG, M., SEALE, J. W. & FRANKLIN, S. 2014. Structure of the full-length insecticidal protein Cry1Ac reveals intriguing details of toxin packaging into in vivo formed crystals. *Protein Sci*, 23, 1491-7.
- FUJKUYAMA, Y., TOKUHARA, D., KATAOKA, K., GILBERT, R. S., MCGHEE, J. R., YUKI, Y., KIYONO, H. & FUJIHASHI, K. 2012. Novel vaccine development strategies for inducing mucosal immunity. *Expert Rev Vaccines*, 11, 367-79.
- GOMEZ, I., PARDO-LOPEZ, L., MUNOZ-GARAY, C., FERNANDEZ, L. E., PEREZ, C., SANCHEZ, J., SOBERON, M. & BRAVO, A. 2007. Role of receptor interaction in the mode of action of insecticidal Cry and Cyt toxins produced by *Bacillus thuringiensis*. *Peptides*, 28, 169-73.
- GRIMMOND, S., LARDER, R., VAN HATEREN, N., SIGGERS, P., MORSE, S., HACKER, T., ARKELL, R. & GREENFIELD, A. 2001. Expression of a novel mammalian epidermal growth factor-related gene during mouse neural development. *Mech Dev*, 102, 209-11.
- GUERRERO, G. G., DEAN, D. H. & MORENO-FIERROS, L. 2004. Structural implication of the induced immune response by *Bacillus thuringiensis* Cry proteins: role of the N-terminal region. *Mol Immunol*, 41, 1177-83.
- GUERRERO, G. G. & MORENO-FIERROS, L. 2007. Carrier potential properties of *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxins for a diphtheria toxin epitope. *Scand J Immunol*, 66, 610-8.
- GUHA, M. & MACKMAN, N. 2001. LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cell Signal*, 13, 85-94.
- GUY, B. 2007. The perfect mix: recent progress in adjuvant research. *Nat Rev Microbiol*, 5, 505-17.
- HOLMGREN, J. & CZERKINSKY, C. 2005. Mucosal immunity and vaccines. *Nat Med*, 11, S45-53.
- HOLMGREN, J., CZERKINSKY, C., ERIKSSON, K. & MHARANDI, A. 2003. Mucosal immunisation and adjuvants: a brief overview of recent advances and challenges. *Vaccine*, 21 Suppl 2, S89-95.
- HU, S. P., ZHOU, Y., ZHANG, L., ZHU, X. D., LI, L., LUO, L. J., LIU, G. L. & ZHOU, Q. M. 2009. Correlation and quantitative trait loci analyses of total chlorophyll content and photosynthetic rate of rice (*Oryza sativa*) under water stress and well-watered conditions. *J Integr Plant Biol*, 51, 879-88.
- JIMENEZ-JUAREZ, N., MUNOZ-GARAY, C., GOMEZ, I., GILL, S. S., SOBERON, M. & BRAVO, A. 2008. The pre-pore from *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin is necessary to induce insect death in *Manduca sexta*. *Peptides*, 29, 318-23.
- KIM, S., BAE, S. M., SEO, J., CHA, K., PIAO, M., KIM, S. J., SON, H. N., PARK, R. W., LEE, B. H. & KIM, I. S. 2015. Advantages of the Phosphatidylserine-Recognizing Peptide PSP1 for Molecular Imaging of Tumor Apoptosis Compared with Annexin V. *PLoS One*, 10, e0121171.
- LAVELLE, E. C. 2005. Generation of improved mucosal vaccines by induction of innate immunity. *Cell Mol Life Sci*, 62, 2750-70.
- LAWSON, L. B., NORTON, E. B. & CLEMENTS, J. D. 2011. Defending the mucosa: adjuvant and carrier formulations for mucosal immunity. *Curr Opin Immunol*, 23, 414-20.
- LYCKE, N. 2012. Recent progress in mucosal vaccine development: potential and limitations. *Nat Rev Immunol*, 12, 592-605.
- MADSEN, D. H., SZABO, R., MOLINOLO, A. A. & BUGGE, T. H. 2014. Tmprss13 deficiency impairs stratum corneum formation and epidermal barrier acquisition. *Biochem J*, 461, 487-95.
- MARCIANI, D. J. 2003. Vaccine adjuvants: role and mechanisms of action in vaccine immunogenicity. *Drug Discov Today*, 8, 934-43.
- MCKNIGHT, A. J. & GORDON, S. 1996. EGF-TM7: a novel subfamily of seven-transmembrane-region leukocyte cell-surface molecules. *Immunol Today*, 17, 283-7.

- MESNAGE, R., CLAIR, E., GRESS, S., THEN, C., SZEKACS, A. & SERALINI, G. E. 2013. Cytotoxicity on human cells of Cry1Ab and Cry1Ac Bt insecticidal toxins alone or with a glyphosate-based herbicide. *J Appl Toxicol*, 33, 695-9.
- MORENO-FIERROS, L., GARCIA-HERNANDEZ, A. L., ILHUICATZI-ALVARADO, D., RIVERA-SANTIAGO, L., TORRES-MARTINEZ, M., RUBIO-INFANTE, N. & LEGORRETA-HERRERA, M. 2013. Cry1Ac protoxin from *Bacillus thuringiensis* promotes macrophage activation by upregulating CD80 and CD86 and by inducing IL-6, MCP-1 and TNF-alpha cytokines. *Int Immunopharmacol*, 17, 1051-66.
- MORENO-FIERROS, L., GARCIA, N., GUTIERREZ, R., LOPEZ-REVILLA, R. & VAZQUEZ-PADRON, R. I. 2000. Intranasal, rectal and intraperitoneal immunization with protoxin Cry1Ac from *Bacillus thuringiensis* induces compartmentalized serum, intestinal, vaginal and pulmonary immune responses in Balb/c mice. *Microbes Infect*, 2, 885-90.
- MORENO-FIERROS, L., PEREZ-ORDONEZ, I. & PALOMAR-MORALES, M. 2002. Slight influence of the estrous cycle stage on the mucosal and systemic specific antibody response induced after vaginal and intraperitoneal immunization with protoxin Cry1Ac from *Bacillus thuringiensis* in mice. *Life Sci*, 71, 2667-80.
- MORENO-FIERROS, L., RUIZ-MEDINA, E. J., ESQUIVEL, R., LOPEZ-REVILLA, R. & PINA-CRUZ, S. 2003. Intranasal Cry1Ac protoxin is an effective mucosal and systemic carrier and adjuvant of *Streptococcus pneumoniae* polysaccharides in mice. *Scand J Immunol*, 57, 45-55.
- NAMJOU, B., SESTAK, A. L., ARMSTRONG, D. L., ZIDOVETZKI, R., KELLY, J. A., JACOB, N., CIOBANU, V., KAUFMAN, K. M., OJWANG, J. O., ZIEGLER, J., QUISMORIO, F. P., JR., REIFF, A., MYONES, B. L., GUTHRIDGE, J. M., NATH, S. K., BRUNER, G. R., MEHRIAN-SHAI, R., SILVERMAN, E., KLEIN-GITELMAN, M., MCCURDY, D., WAGNER-WEINER, L., NOCTON, J. J., PUTTERMAN, C., BAE, S. C., KIM, Y. J., PETRI, M., REVEILLE, J. D., VYSE, T. J., GILKESON, G. S., KAMEN, D. L., ALARCON-RIQUELME, M. E., GAFFNEY, P. M., MOSER, K. L., MERRILL, J. T., SCOFIELD, R. H., JAMES, J. A., LANGEFELD, C. D., HARLEY, J. B. & JACOB, C. O. 2009. High-density genotyping of STAT4 reveals multiple haplotypic associations with systemic lupus erythematosus in different racial groups. *Arthritis Rheum*, 60, 1085-95.
- NEUTRA, M. R. & KOZLOWSKI, P. A. 2006. Mucosal vaccines: the promise and the challenge. *Nat Rev Immunol*, 6, 148-58.
- PARDO-LOPEZ, L., SOBERON, M. & BRAVO, A. 2013. *Bacillus thuringiensis* insecticidal three-domain Cry toxins: mode of action, insect resistance and consequences for crop protection. *FEMS Microbiol Rev*, 37, 3-22.
- POLFLIET, M. M., FABRIEK, B. O., DANIELS, W. P., DIJKSTRA, C. D. & VAN DEN BERG, T. K. 2006. The rat macrophage scavenger receptor CD163: expression, regulation and role in inflammatory mediator production. *Immunobiology*, 211, 419-25.
- RHEE, J. H., LEE, S. E. & KIM, S. Y. 2012. Mucosal vaccine adjuvants update. *Clin Exp Vaccine Res*, 1, 50-63.
- ROJAS-HERNANDEZ, S., RODRIGUEZ-MONROY, M. A., LOPEZ-REVILLA, R., RESENDIZ-ALBOR, A. A. & MORENO-FIERROS, L. 2004. Intranasal coadministration of the Cry1Ac protoxin with amoebal lysates increases protection against *Naegleria fowleri* meningoencephalitis. *Infect Immun*, 72, 4368-75.
- SCHIJNS, V. E. 2001. Induction and direction of immune responses by vaccine adjuvants. *Crit Rev Immunol*, 21, 75-85.
- SCHNEPF, E., CRICKMORE, N., VAN RIE, J., LERECLUS, D., BAUM, J., FEITELSON, J., ZEIGLER, D. R. & DEAN, D. H. 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol Mol Biol Rev*, 62, 775-806.

- SHAO, Q., ZHANG, F. B., ZHU, X. D., DU, Y. & TIAN, Y. 2013. [Intermittent androgen deprivation for aggressive prostate cancer: 8 years of clinical experience]. *Zhonghua Nan Ke Xue*, 19, 44-8.
- TU, C. F., YAN, Y. T., WU, S. Y., DJOKO, B., TSAI, M. T., CHENG, C. J. & YANG, R. B. 2008. Domain and functional analysis of a novel platelet-endothelial cell surface protein, SCUBE1. *J Biol Chem*, 283, 12478-88.
- VAN DEN HEUVEL, M. M., TENSEN, C. P., VAN AS, J. H., VAN DEN BERG, T. K., FLUITSMA, D. M., DIJKSTRA, C. D., DOPP, E. A., DROSTE, A., VAN GAALEN, F. A., SORG, C., HOGGER, P. & BEELEN, R. H. 1999. Regulation of CD 163 on human macrophages: cross-linking of CD163 induces signaling and activation. *J Leukoc Biol*, 66, 858-66.
- VAZQUEZ-PADRON, R. I., GONZALES-CABRERA, J., GARCIA-TOVAR, C., NERI-BAZAN, L., LOPEZ-REVILLA, R., HERNANDEZ, M., MORENO-FIERRO, L. & DE LA RIVA, G. A. 2000. Cry1Ac protoxin from *Bacillus thuringiensis* sp. kurstaki HD73 binds to surface proteins in the mouse small intestine. *Biochem Biophys Res Commun*, 271, 54-8.
- VAZQUEZ-PADRON, R. I., MORENO-FIERROS, L., NERI-BAZAN, L., DE LA RIVA, G. A. & LOPEZ-REVILLA, R. 1999. Intragastric and intraperitoneal administration of Cry1Ac protoxin from *Bacillus thuringiensis* induces systemic and mucosal antibody responses in mice. *Life Sci*, 64, 1897-912.
- WYGRECKA, M., MARSH, L. M., MORTY, R. E., HENNEKE, I., GUENTHER, A., LOHMEYER, J., MARKART, P. & PREISSNER, K. T. 2009. Enolase-1 promotes plasminogen-mediated recruitment of monocytes to the acutely inflamed lung. *Blood*, 113, 5588-98.
- ZHANG, K. Z., ZHANG, Q. B., ZHANG, Q. B., SUN, H. C., AO, J. Y., CHAI, Z. T., ZHU, X. D., LU, L., ZHANG, Y. Y., BU, Y., KONG, L. Q. & TANG, Z. Y. 2014. Arsenic trioxide induces differentiation of CD133+ hepatocellular carcinoma cells and prolongs posthepatectomy survival by targeting GLI1 expression in a mouse model. *J Hematol Oncol*, 7, 28.
- ZHANG, Q. B., SUN, H. C., ZHANG, K. Z., JIA, Q. A., BU, Y., WANG, M., CHAI, Z. T., ZHANG, Q. B., WANG, W. Q., KONG, L. Q., ZHU, X. D., LU, L., WU, W. Z., WANG, L. & TANG, Z. Y. 2013. Suppression of natural killer cells by sorafenib contributes to prometastatic effects in hepatocellular carcinoma. *PLoS One*, 8, e55945.
- ZHOU, F., LIU, P. P., YING, G. Y., ZHU, X. D., SHEN, H. & CHEN, G. 2013a. Effects of thioredoxin-1 on neurogenesis after brain ischemia/reperfusion injury. *CNS Neurosci Ther*, 19, 204-5.
- ZHOU, Z. R., ZHU, X. D., ZHAO, W., QU, S., SU, F., HUANG, S. T., MA, J. L. & LI, X. Y. 2013b. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 regulates the mechanism of irradiation-induced CNE-2 human nasopharyngeal carcinoma cell autophagy and inhibition of autophagy contributes to the radiation sensitization of CNE-2 cells. *Oncol Rep*, 29, 2498-506.
- ZHU, X. D., WANG, Y. J., SUN, R. J. & ZHOU, D. M. 2013. Photocatalytic degradation of tetracycline in aqueous solution by nanosized TiO₂. *Chemosphere*, 92, 925-32.
- ZHU, X. D., ZHUANG, Y., BEN, J. J., QIAN, L. L., HUANG, H. P., BAI, H., SHA, J. H., HE, Z. G. & CHEN, Q. 2011. Caveolae-dependent endocytosis is required for class A macrophage scavenger receptor-mediated apoptosis in macrophages. *J Biol Chem*, 286, 8231-9.