



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**CARACTERIZACIÓN DE LOS EFECTOS INDUCIDOS POR LA TOXINA CRY1AC
EN MACRÓFAGOS: ACTIVACIÓN Y VÍAS DE SEÑALIZACIÓN**

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Doctor en Ciencias**

PRESENTA:

M. en C. Marilu Torres Martínez

TUTOR PRINCIPAL

**Dra. Leticia Moreno Fierros
FES Iztacala**

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

**Dra. María Gloria Soldevila Melgarejo
Instituto de Investigaciones Biomédicas**

**Dr. Armando Isibasi Araujo
División de Inmunología CMSXXI IMSS**

Ciudad Universitaria, Ciudad de México. Octubre, 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Esta tesis se realizó bajo la dirección de la Dra. Leticia Moreno Fierros en el laboratorio 9 de “Inmunología de Mucosas” de la Unidad de Investigación en Biomedicina (UBIMED).

AGRADECIMIENTOS

Al Doctorado en Ciencias Bioquímica de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), por permitirme hacer este proyecto bajo su programa. Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por otorgarme la beca número 209662 para la realización de mis estudios de Doctorado.

Al Programa de Apoyo a los Estudios del Posgrado (PAEP) por el financiamiento recibido para la participación en Congresos.

Este proyecto se realizó gracias a los siguientes apoyos recibidos por:

SEP CONACYT proyecto CB177612

UNAM PAPIIT proyecto IN219416

Proyecto PAPCA 2016-No.28 de la UNAM

A la Doctora Leticia Moreno Fierros por su contribución a mi formación académica, por su paciencia y apoyo brindado durante estos años. Muchas gracias Dra. Moreno!!.

A los integrantes de mi Comité Tutorial la Dra. María Gloria Soldevila Melgarejo y el Dr. Armando Isibasis Araujo por su asesoría y sugerencias brindadas

Se le reconoce la asesoría técnica de la Biol. Damaris Ilhuicatzí Alvarado, del laboratorio de “Inmunología de Mucosas” de la Unidad de Investigación en Biomedicina. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. UNAM.

Se le reconoce la asesoría técnica de la Dra. Ana Lilia García Hernández. Laboratorio de Investigación Odontológica. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. UNAM.

Se le reconoce la asesoría técnica de la Biol. Nallely Cabrera, del departamento de “Bioquímica y Biología Estructural” del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El jurado de examen de grado estuvo constituido por:

Presidente: Dra. Gladis del Carmen Fragoso González. Instituto de Investigaciones Biomédicas. UNAM.

Vocal: Dr. Luis Arturo Baiza Gutman. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. UNAM.

Vocal: Dra. Clara Inés Espitia Pinzón. Instituto de Investigaciones Biomédicas. UNAM

Vocal: Dr. Fernando Roger Esquivel Guadarrama. Facultad de Medicina. Universidad Autónoma de Morelos.

Secretario: Dra. Liliana Pardo López. Instituto de Biotecnología. UNAM

Dedicado:

♥ A mis hijos que son el motor y luz de mi vida ♥

¡Los amo!

Para mi familia que agradezco con todo el corazón:

♥ **A mi esposo porque sin su apoyo no hubiera podido llegar al final de este viaje.**

♥ **Papi y mami por su amor incondicional, comprensión, por enseñarme sobre la perseverancia y disciplina, porque soy por ustedes.**

♥ **Mi hermana por tu apoyo incondicional siempre, por estar conmigo en la buenas y las malas.**

Agradecimientos a:

Dra. Leticia Moreno muchas gracias!!, por haberme aceptado en su laboratorio, por su asesoría, por su paciencia y comprensión, por enseñarme a disfrutar de la ciencia e investigación.

Dra. María Gloria Soldevila Melgarejo y el Dr. Armando Isibasis Araujo por su asesoría, por sus aportaciones que han sido enriquecedoras en este trabajo.

Dr. Luis Arturo Baiza, por todos sus consejos y críticas que fueron cruciales y muy importantes para mí. Muchas gracias Dr.!

Dra. Ana Lilia García, por sus consejos y apoyo tan acertados y oportunos que fueron decisivos para llegar hasta aquí.

Dr. Ruy Pérez Montfort porque usted es el inicio de este final.

Agradecimientos al Dr. Maximiliano Ibarra, Dr. Alfredo Torres, Dra. Marina Macias, Dra. María Magdalena Aguirre por sus observaciones.

A mis compañeros de laboratorio con quienes compartí gritos!!, alegrías y tristeza en especial a Nesssssss!! que me falta algo cuando no vas, a Damaris, Karlita, Itzhelina, Rober, Erne, Toño, Angel y David.

A Tere, por sus muy buenas sugerencias, y facilitarnos el trabajo.

Agradezco de manera especial a Leticia García y a Adelina del posgrado de Ciencias Bioquímica por su eficacia y disposición siempre. A Rosa Lilia de la Rocha y Julio Ignacio Palacios, por todo el apoyo brindado en cada trámite.

A mis amigas de siempre Yara, Yami, Kendra e Iva, que siempre están a mi lado. A Lisi, Zeyda y Mara, otro reto finalizado que me da mucha alegría compartir con ustedes.

A Javier que eres el responsable o “culpable” de este proyecto de vida. Gracias por tu amabilidad, ayuda y apoyo incondicional. Gracias amigote!!

Grethel y Nico porque cuando les platique de empezar el posgrado me alentaron y confiaron en mí, por sus muy buenos consejos. Los quiero.

Almilla, por tu ayuda siempre, tu disposición y tus sugerencias. GRACIAS!!

Nallely, Itzhel y Angeliquita saben que sin ustedes no estuviera escribiendo estas letras. No tengo palabras para agradecerles. Las admiro, las quiero y estoy tan orgullosa de ustedes. Por su tiempo, disponibilidad, generosidad y cariño. Estoy muy agradecida de tenerlas en mi vida, me hacen mejor persona.

A la UNAM por permitirme hacer lo que me gusta, por hacerme crecer académicamente y permitirme vivir experiencias tan enriquecedoras.

A México, por las oportunidades que siempre me ha ofrecido, por su hospitalidad y cariño con la que aún me recibe. GRACIAS MÉXICO!!

INDICE:

Abreviaturas	3
Resumen	4
Abstract	5
1. Introducción.....	6
1.1 Vacunas de mucosas.....	6
1.1.1 Adyuvantes.....	7
1.1.2 Adyuvantes de mucosas	9
1.2 Proteínas Cry de <i>Bacillus thuringiensis</i>.....	9
1.2.1. <i>Bacillus thuringiensis</i>	9
1.2.1 Proteínas Cry	11
1.3 Células presentadoras de antígenos.....	14
1.4 Macrófagos.....	14
1.4.1 Activación de macrófagos.....	15
1.4.1.1 Moléculas coestimuladoras	18
1.4.1.2 Citocinas proinflamatorias	21
1.4.1.3 Nitritos.....	23
1.4.1.4 Vía de señalización de las MAPKs	25
1.4.1.5 Vía de señalización del factor de transcripción NF- κ B.....	28
2. Antecedentes	31
3. Hipótesis	36
4. Objetivos	36
4.1 Objetivo general	36
4.2 Objetivo específicos	36
5. Materiales y métodos	37
5.1 Obtención de tCry1Ac recombinante.....	37
5.2 Obtención macrófagos de bazo.	37
5.3 Línea celular de macrófagos RAW 264.7.....	38
5.4. Curva de concentración de Cry1Ac.....	38
5.5 Determinación de la expresión de CD80, CD86 por citometría de flujo.....	38
5.6 Determinación de citocinas.....	39
5.7 Determinación de nitritos	39
5.8 Condiciones de cultivo para el análisis por Western blot.....	40
5.9 Determinación de la activación de las MAPKs por Western blot.....	41
5.10 Pretratamiento de las células RAW 264.7 con inhibidores de las MAPKs	41
5.11 Determinación de NF- κ B en el núcleo por Western blot utilizando el sistema "ODYSSEY"	42

5.12 Ensayos de fluorescencia para la detección de NF- κ B.....	43
5.13 Análisis estadístico.....	43
6. Resultados	44
6.1 La tCry1Ac induce sobreexpresión de las moléculas coestimuladoras CD80 y CD86 en macrófagos de cultivo primario.	44
6.2 La tCry1Ac induce la secreción de citocinas proinflamatorias IL-6, TNF- α en macrófagos de cultivo primario	45
6.3 La tCry1Ac induce la expresión de moléculas coestimuladoras CD80 y CD86 en la línea celular de macrófagos RAW 264.7.....	46
6.4 La tCry1Ac induce la secreción de citocinas proinflamatorias IL-6, TNF- α y MCP-1 y aumenta la producción de nitritos en los macrófagos RAW 264.7.	48
6.5 La tCry1Ac induce la fosforilación de las MAPKs p38, JNK y ERK1/2.	49
6.6 La sobreexpresión de CD80 inducida por la tCryAc en las células RAW 264.7 disminuye por el inhibidor de p38.....	50
6.7 La sobreproducción de IL-6, TNF- α en macrófagos RAW 264.7 es inhibida al utilizar el inhibidor específico de la MAPK p38.	51
6.8 La tCry1Ac induce las translocación nuclear de las subunidades p65 y p50 de NF- κ B.....	52
7. Discusión	54
8. Conclusiones	60
9. Perspectivas.....	61
10. Referencias bibliográficas.....	62
11. Artículo publicado	71

Abreviaturas

Bt: *Bacillus thuringiensis*

Cy5: Cianina 5

DMEM: Medio esencial mínimo de Dulbecco

Escherichia coli: E. coli

ERK1/2: Cinasa regulada por señal extra celular 1/2

UE: Unidades de endotoxina

FACS: Selección de células activadas por fluorescencia

FITC: Isotiocianato de fluoresceína

GM: Genéticamente modificado

HEPES: Ácido 4-(2-hidroxietil) piperazin-1-iletanosulfónico

ICOS-L: Ligando coestimulador inducible de células T

IMF: Intensidad media de fluorescencia

IPTG: Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido

JNK: Cinasa c-Jun N-terminal

LPS: Lipopolisacárido

MAPKs: Proteínas cinasas activadas por mitógenos

MCP-1: Proteína quimio-atrayente de monocitos 1

MEK1/2: Proteína cinasa de ERK1/2

NF- κ B: Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas

NO: Óxido Nítrico

p: Fosforilado

p38: Proteína cinasa activada por estrés

PBS: Amortiguador salino de fosfatos

PE: Ficoeritrina

PE-Cy5: Ficoeritrina-Cianina 5.1

PMSF: Fluoruro de fenilmetilsulfonilo

PVDF: Difluoruro de polivinilideno

RPMI: Medio Roswell Park Memorial Institute

SDS-PAGE: Geles de poliacrilamida con SDS

SDS: Dodecil sulfato sódico

SFB: Suero fetal bovino

TBS-T: Amortiguador salino de Tris y Tween 20

Resumen

La protoxina Cry1Ac (pCry1Ac) de *Bacillus thuringiensis* es un potente inmunogeno y adyuvante de mucosas, que incrementa la respuesta de anticuerpos específicos en mucosas después de ser administrada por diferentes rutas de inmunización. Parte del mecanismo por el cual la pCry1Ac ejerce sus efectos inmunogénicos es activando células presentadoras de antígenos como los macrófagos, a través de la expresión de moléculas coestimuladoras y la producción de citocinas. Cuando la pCry1Ac se procesa proteolíticamente con tripsina pierde aproximadamente 500 residuos de aminoácidos de su extremo C-terminal y unos 40 residuos en su extremo N-terminal generándose la toxina. En estudios previos se ha mostrado que la toxina Cry1Ac (tCry1Ac) también es inmunogénica tanto a nivel sistémico como de mucosas y que la mitad N-terminal de la pCry1Ac (toxina) juega un papel muy importante en sus propiedades inmunogénicas. En este estudio, examinamos si la tCry1Ac era capaz de inducir la activación de macrófagos y exploramos las vías de señalización que pueden mediar este efecto. Observamos que tCry1Ac indujo activación de macrófagos de cultivo primario y de la línea celular RAW 264.7, ya que provocó un incremento en la expresión de las moléculas coestimuladoras CD80, CD86 e ICOS-L y un aumento en la producción de óxido nítrico (NO), la proteína quimio-atrayente de monocitos 1 (MCP-1) y la citocinas proinflamatorias TNF- α e IL-6. Al analizar el efecto de la tCry1Ac en las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPKs) ERK1/2, JNK y p38 y el factor de transcripción nuclear-kappa B (NF- κ B) en las células RAW 264.7, encontramos que la tCry1Ac indujo la fosforilación de las tres MAPKs y promovió la translocación nuclear del heterodímero p50 y p65 de NF- κ B. Observamos que p38 y ERK1/2 median los efectos inducidos por tCry1Ac ya que no se indujo la sobreexpresión de CD80 y la sobreproducción de la citocinas IL-6 y TNF- α provocada por tCry1Ac al pre-tratar las células con el inhibidor de la MAPK-p38 (SB203580), mientras que al pre-tratar las células con el inhibidor de las MAPKs MEK1/2-ERK1/2 (PD98059) y luego estimularlas con tCry1Ac se observó un incremento de la expresión de ICOS-L y disminución de la secreción de MCP-1, sugiriendo que ERK1/2 participa contraregulando la expresión de ICOS-L y la producción de MCP-1. Estos datos indican que tCry1Ac induce la activación de macrófagos y que este efecto es mediado a través de las vías de las MAPKs y NF- κ B. Aunque se observa que tCry1Ac como pCry1Ac son capaces de activar los macrófagos a través de la sobreexpresión de moléculas coestimuladoras y producción de citocinas, existen diferencias en la intensidad y cinética de los efectos de activación.

Abstract

The Cry1Ac protoxin of *Bacillus thuringiensis* is a potent immunogen and mucosal adjuvant, increasing the response of specific antibodies in different mucosal sites (intestine, lung and vagina) after being administered by different routes of immunization (oral, intranasal, rectal, vaginal and intraperitoneal). Part of the mechanism by which it exerts its immunogenic effects is through activating antigen-presenting cells such as macrophages through the expression of costimulatory molecules and production of cytokines. When the protoxin is proteolytically processed it loses its C-terminal half and about 20 amino acid residues from its N-terminal part generating the toxin. Previous studies shown that the Cry1Ac toxin is also immunogenic at both the mucosal and systemic levels and that the N-terminal part (toxin) of the protoxin plays a very important role in the immunological response generated by the protoxin. Herein, we examined whether the Cry1Ac toxin promotes macrophage activation and explored the signaling pathways that may mediate this effect. Treatment of primary and RAW 264.7 macrophages with the Cry1Ac toxin resulted in upregulation of the costimulatory molecules CD80, CD86 and ICOS-L and enhanced production of nitric oxide, the chemokine MCP-1 and the proinflammatory cytokines TNF- α and IL-6. Remarkably, the Cry1Ac toxin induced phosphorylation of the mitogen-activated protein kinases (MAPKs) ERK1/2, JNK and p38 and promoted nuclear translocation of nuclear factor-kappa B (NF- κ B) p50 and p65. p38 and ERK1/2 MAPKs were involved in this effect, as indicated by the Cry1Ac-induced upregulation of CD80 and IL-6 and TNF- α abrogation by the p38 MAPK inhibitor SB203580. Furthermore, treatment the MEK1/2 kinase inhibitor PD98059 blocked increases in MCP-1 secretion and augmented tCry1Ac-induced ICOS-L upregulation. These data demonstrate the capacity of the Cry1Ac toxin to induce macrophage activation via the MAPK and NF- κ B pathways.

1. Introducción

1.1 Vacunas de mucosas

El cuerpo humano está protegido de los agentes infecciosos, del estrés ambiental y de lesiones en los tejidos debido a células y moléculas efectoras que constituyen el sistema inmune. Cuando un organismo con un sistema inmune innato funcional se encuentra con estímulos nocivos, la respuesta inmune se inicia en cuestión de minutos. Se desencadena la activación de distintos tipos celulares y mecanismos inmunes diseñados para detectar y eliminar al agente nocivo, así como reparar los tejidos dañados y restablecer la homeostasis

La vacunación es una de las estrategias de salud más exitosas que se han implementado en la prevención de enfermedades y por tanto la mortalidad por enfermedades infecciosas en el mundo entero. La base de la vacunación es la inducción de la respuesta inmune, capaz de proveer protección contra las infecciones (Lycke, 2012).

Las vacunas que inducen respuesta inmunológica en mucosas en comparación con las vacunas sistémicas pueden inducir una respuesta inmune protectora en los sitios donde invaden los microorganismos, principalmente el tracto respiratorio, gastrointestinal y genitourinario, provocando una respuesta inmune celular y humoral tanto a nivel sistémico como de mucosas. En contraste, la vacunación vía subcutánea e intramuscular inducen una pobre respuesta inmune protectora a nivel de mucosas. Asimismo, las vacunas de mucosas ofrecen otras ventajas como es el bajo costo, la fácil administración lo que las hace prácticas para la vacunación masiva, además de ser más segura porque se evitan los riesgos asociados al uso de agujas hipodérmicas. Las vacunas administradas por vía oral no requieren una purificación extensa, ya que el intestino presenta un alto rango de tolerancia inducido por los antígenos provenientes de los alimentos y/o de la microbiota intestinal, mientras que las vacunas inyectadas vía parenteral, por ejemplo, tienen niveles de endotoxina inaceptables ya que pasan directamente al torrente sanguíneo (Guy, 2007; Lawson *et al.*, 2011; Lycke, 2012).

Los antígenos administrados por mucosas son en general poco inmunogénicos y tienden a inducir tolerancia ya que el huésped se esfuerza por mantener la homeostasis de la mucosa. Es por esto que muchos candidatos para vacunas en mucosas, que han demostrado ser eficaces en modelos

animales, han fracasado con frecuencia en los ensayos clínicos. A pesar del éxito de la vacuna atenuada de uso oral contra la poliomelitis utilizada hace más de 50 años, actualmente sólo existen unas pocas vacunas de mucosas comercialmente disponibles, como son: las vacunas vivas atenuadas contra el virus de la influenza, rotavirus y *Salmonella enterica* subesp. *enterica* serovar *Typhi* (el agente causal de la fiebre tifoidea), las dos vacunas orales contra *Vibrio cholerae*: la viva atenuada y la no viva de células completas. Desafortunadamente, la estabilidad de las vacunas vivas atenuadas sigue siendo un problema por sus posibles reacciones adversas, mientras que las células enteras no vivas y los antígenos purificados son por lo general poco inmunogénicos.

Así que, dentro de las estrategias actuales para desarrollar vacunas mucosales efectivas se encuentra la búsqueda de formas de administración de antígenos para activar el sistema inmune de mucosas y el descubrimiento de adyuvantes de mucosas que sean seguros, no tóxicos y que provean inmunidad (Kweon, 2014; Lycke, 2012; Pasquale *et al.*, 2015).

1.1.1 Adyuvantes

Un adyuvante es un componente en una vacuna que puede potenciar o modular la respuesta inmune hacia el antígeno con el cual se coadministra, aumentando la amplitud y la durabilidad de la respuesta. Las propiedades ideales de un buen adyuvante son, no ser tóxico en un amplio rango de dosis, estimular fuertemente la inmunidad humoral y/o celular, proveer una buena memoria inmunológica, no inducir autoinmunidad ni hipersensibilidad, no ser mutagénico, carcinogénico o teratógeno, no ser pirogénico y ser estable en un amplio rango de tiempo de almacenamiento, temperatura y pH.

Con el uso de los adyuvantes se puede reducir la cantidad de antígeno contenido en las dosis de vacunas individuales, ya que una mejora en la calidad de la respuesta inmune puede significar menor dosis de la vacuna para lograr inmunidad. La combinación en la reducción de la dosis y el ahorro de antígeno pueden tener importantes implicaciones para mejorar el suministro global de vacunas. Los adyuvantes también pueden mejorar las respuestas inmunitarias en poblaciones donde las respuestas a las vacunas son típicamente reducidas, tales como los lactantes, los ancianos e individuos inmunocomprometidos (Pasquale *et al.*, 2015).

Los adyuvantes pueden actuar por varias vías del sistema inmune que no son excluyentes unas de otras, con el objetivo de crear una efectiva interacción entre la inmunidad innata y adaptativa, logrando aumentar la respuesta inmune adaptativa y así una memoria inmunológica efectiva, por lo tanto muchas acciones se realizan sobre las células presentadoras de antígenos (APC) (Guy, 2007; Rhee *et al.*, 2012) (figura 1).

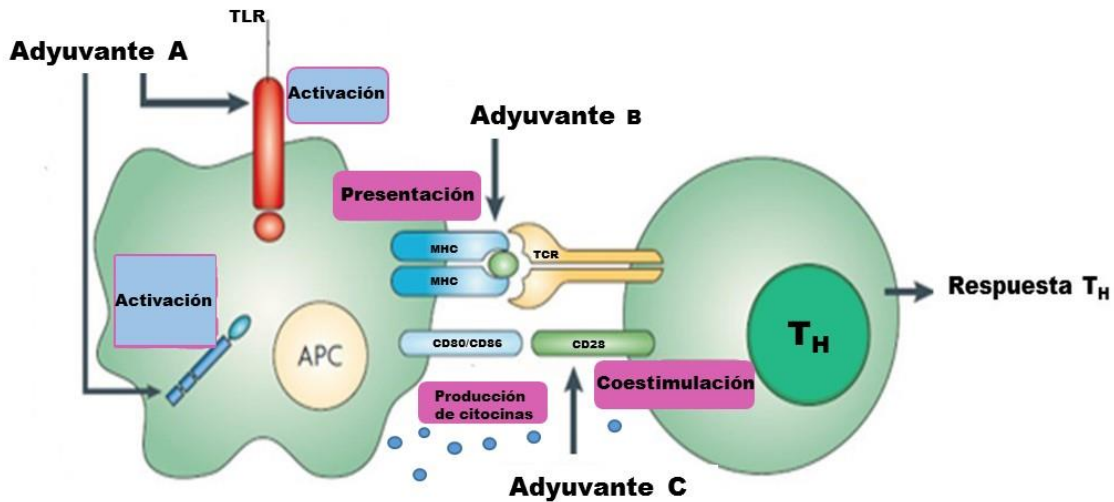


Figura 1. Sitios de acción de un adyuvante en células presentadoras de antígenos. Para que una célula presentadora de antígeno (APC) active una célula T colaboradora (T_H) y por ende induzca una respuesta inmune adaptativa, es necesario tres señales principalmente: La presentación del antígeno a través de las moléculas de histocompatibilidad (MHC), la inducción de señales de coestimulación y la producción de citocinas por parte de las APCs. Los adyuvantes pueden actuar sobre una o la combinación de las tres señales. Ya sea, siendo agonista de receptores de las APCs, activándolas y favoreciendo el reconocimiento del antígeno, la producción de moléculas coestimuladoras y la producción de citocinas (Adyuvante A); Favoreciendo directamente la eficiente presentación del antígeno a los linfocitos T (Adyuvante B) o incrementando la producción de moléculas coestimuladoras y la producción de citocinas (Adyuvante C). Modificado y recuperado de (Guy, 2007).

Los adyuvantes pueden afectar la migración, maduración, presentación del antígeno y la expresión de moléculas coestimuladoras por parte de las células presentadoras de antígenos (APCs) y estos eventos a su vez mejoran la respuesta de las células B y T hacia el antígeno. Al afectar la señal de iniciación al sistema inmune innato, la elección de adyuvante puede dirigir el tipo de respuesta inmune adaptativa al antígeno administrado (Pasquale *et al.*, 2015), algunos promueven preferencialmente la respuesta TH1 y otros los TH2, otros potencian la expresión de MHC I o MHC II dirigiendo la respuesta hacia células TCD8⁺ o TCD4⁺ respectivamente. Otros adyuvantes pueden actuar directamente sobre las células TCD4⁺ o TCD8⁺ induciendo su proliferación y/o la conversión en células de memoria (Rhee *et al.*, 2012).

1.1.2 Adyuvantes de mucosas

Aunque existe una gran variedad de adyuvantes, no todos promueven una respuesta inmune a nivel de mucosas, de hecho las formulaciones de aluminio que es el adyuvante más usado en las vacunas aplicadas a los seres humano que se encuentran en el mercado, es un inductor pobre de la inmunidad en mucosas. Dentro de los adyuvantes de mucosas con mayor potencial se encuentran las enterotoxinas bacterianas, los ligandos de TLR e inmunoestimulantes no dependientes de TLR y nuevas pequeñas moléculas que pueden ser derivadas de bacterias y hongos, o citocinas recombinantes (Lawson *et al.*, 2011).

En vista de que varias de las estrategias que se han desarrollado para aumentar la respuesta del sistema inmune en mucosas, implican procedimientos laboriosos y costosos, y algunos de ellos presentan riesgo de toxicidad, es necesario la búsqueda y desarrollo de adyuvantes en mucosas que sean efectivos, seguros y de bajos costos de producción.

Las proteínas Cry1Ac de *Bacillus thuringiensis* (Bt), pudieran ser utilizadas como una estrategia para incrementar la eficacia de las vacunas como inmunomodulador a nivel mucosal; ya que presentan alta resistencia a proteólisis, son estables en pH alcalino, se han reportado que no son tóxicas en vertebrados y sus costos de producción son bajos (Hofte and Whiteley, 1989; McClintock JT, Schaffer CR, 1995).

1.2 Proteínas Cry de *Bacillus thuringiensis*

1.2.1. *Bacillus thuringiensis*

Bt es una bacteria aeróbica gram-positiva que produce proteínas con propiedades insecticidas como cuerpos de inclusión cristalinos en la etapa de crecimiento durante la fase de esporulación, conocidas como proteínas Cry y Cyt. Los cuerpos paraesporales producidos por la Bt contienen muchas proteínas, con actividades distintas y pueden actuar de una manera sinérgica. Además de las proteínas Cry y Cyt, Bt posee factores de virulencia, incluyendo alfa-exotoxinas, beta-exotoxinas, quitinasas, proteína insecticida vegetativa (VIP), flagelina, enterotoxinas, hemolisinas, fosfolipasas y proteínas de la cubierta de la spora bacteriana que también contribuyen a la patogenicidad de Bt (Feitelson *et al.*, 1992).

Bt fue descrito por primera vez por Shigetane Ishiwatari, en Japón, en 1901, cuando lo asoció como un agente causal que debilitaba a los gusanos de seda (*Bombyx mori*). Luego fue investigado por Ernest Berliner, en Alemania en 1911, cuando observó que un lote de polilla mediterránea de la harina (*Ephestia kuehniella*), proveniente de la ciudad de Turingia en Alemania, estaba infectado con este patógeno, de ahí la denominación de origen (Bacillus and Fern, 1940; Bravo *et al.*, 2013). En los años 30, en Francia, se comienza a utilizar un producto comercial a base de las esporas de Bt para controlar la plaga llamada gusano barrenador europeo del maíz y en los años 50 se pone de manifiesto que el cristal que se halla en el interior de la célula es el responsable de la actividad tóxica en contra de los insectos.

La bacteria se puede encontrar en el suelo, granos o polvos de productos almacenados, restos de hojas y coníferas, superficie de las plantas y en el interior los cadáveres de insectos. Esta bacteria tiene más de 58 serotipos, los cuales se clasifican según sus antígenos flagelares. Todas las subespecies en conjunto son eficaces contra un amplio espectro de insectos y nematodos; sin embargo, cada cepa de Bt produce una toxina única que es eficaz contra un grupo específico de insectos, por eso los productos comerciales de Bt han sido ampliamente utilizados para el control de plagas en cultivos y contra mosquitos que son vectores de enfermedades humanas como Dengue y Malaria (Bravo *et al.*, 2011).

Las formulaciones agrícolas que contienen Bt usadas contra insectos se han aplicado en forma de pulverización y generalmente están compuestos por una mezcla de esporas secas y las proteínas cristalinas que se aplican en áreas como las hojas y las raíces, donde se alimentan los insectos (Chattopadhyay *et al.*, 2004). También se han utilizado en forma de polvos humectables, líquidos concentrados, cebos, polvos, y anillos de liberación prolongada. Pero el modo de aplicación transgénico de Bt, en el cual se expresa la toxina o modificados de la toxina Cry, ha demostrado ser más eficaz que la forma de pulverización (Chattopadhyay *et al.*, 2016).

Las proteínas Cry son producidas como protoxinas cristalinas en los cuerpos parasporales de la bacteria del suelo Bt. El mecanismo por el cual las proteínas Cry ejercen su acción insecticida ha sido ampliamente estudiado (Adang *et al.*, 2014; Gill *et al.*, 1992; Pardo-López *et al.*, 2013; Tabashnik *et al.*, 2015; Zavala *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2006). Después que las pCry cristalinas son ingeridas por las larvas de insectos susceptibles, los cristales son solubilizados y procesados

proteolíticamente por las proteasas del intestino medio del insecto, perdiendo la mitad C-terminal de la proteína, generando así la toxina activa (tCry). Para matar a su insecto blanco, la toxina activada se inserta en la membrana de las células apicales del intestino medio del insecto, lo cual conduce a la formación de un poro que permite el paso de iones y agua, provocando un desbalance osmótico y finalmente la lisis celular, que lleva a la muerte del insecto (Bravo *et al.*, 2004; Knowles and Ellar, 1987; Pacheco *et al.*, 2009; Pigott and Ellar, 2007; Tabashnik *et al.*, 2015).

Dentro de las proteínas de unión para las toxinas Cry1 que se han identificado en los insectos lepidópteros, están el receptor tipo cadherina (CADR), N- aminopeptidasa (APN) ancladas a glicosilfosfatidilinositol (GPI), fosfatasa alcalina anclada a GPI (ALP), un glicoconjugado de 270 kDa y una proteína llamada P252 de 250 kDa (Pardo-López *et al.*, 2013; Pigott and Ellar, 2007; Soberón *et al.*, 2009).

Recientemente se ha documentado que también la protoxina Cry interactúa con el intestino medio de los insectos susceptibles, igualmente formando poros en la membrana conduciendo a la muerte del insecto (Bravo *et al.*, 2011; Soberón *et al.*, 2016; Zavala *et al.*, 2011).

1.2.1 Proteínas Cry

La protoxina Cry es una proteína de un peso de 130 kDa que después de ser procesada proteolíticamente pierde aproximadamente 600 residuos de su extremo C-terminal y entre unos 20 y 50 residuos de su extremo N-terminal generando la toxina activa de 60 kDa (De Maagd *et al.*, 2001).

Hasta la fecha se han identificado más de 700 secuencias de genes de tCry, que se distribuyen en al menos 70 grupos que se clasifican en base a la homología de su secuencia de aminoácidos. Las toxinas que pertenecen a cada grupo comparten entre un 40-45% de identidad en su secuencia de aminoácidos y se representan con un número arábigo (Cry1, Cry2....Cry70). En cada grupo las toxinas que comparten un 70% de identidad se agrupan asignándole una segunda letra en mayúscula (Cry1A, Cry1B, etc), y una letra minúscula aquellas que presentan entre un 70% a 95% de identidad en su secuencia de aminoácidos (Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, etc) (Crickmore *et al.*, 1998).

La tCry pertenece a la familia de las toxinas Cry de 3 dominios, de los cuales se han resuelto por cristalografía al menos 7 estructuras, incluyendo Cry1Aa, Cry1Ac, Cry2Aa, Cry3Aa, Cry3Ba, Cry4Aa, Cry4Ba y Cry8E (Derbyshire *et al.*, 2001; Pardo-López *et al.*, 2013).

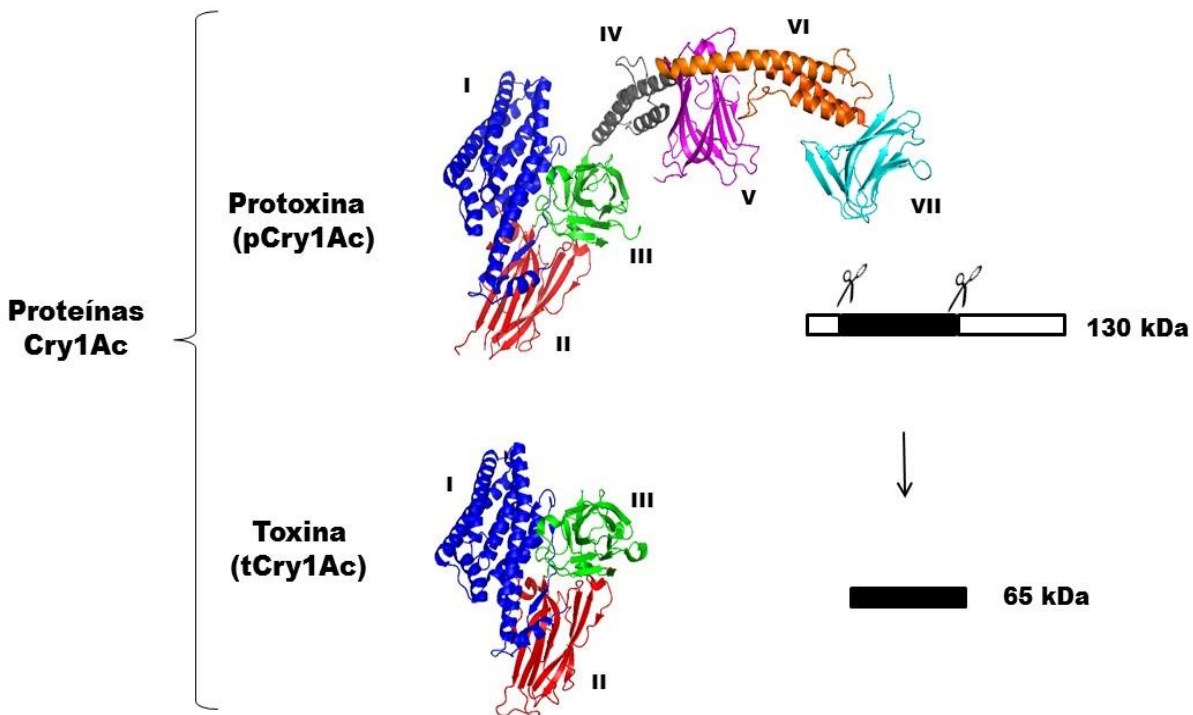


Figura 2. Estructura obtenida por difracción de rayos x de la protoxina y toxina Cry1Ac donde se muestran en números romanos los 7 y 3 dominios que componen la protoxina y toxina respectivamente. Dominio I, IV y VI: α -hélices, dominio II: prisma beta de tres hojas β antiparalelas, dominio III: sándwich β , dominio V y VII: barril beta tipo rollo. La figura fue realizada con las coordenadas depositadas en el PDB para protoxina, con código 4ARX, utilizando el programa PyMOL. La tCry1Ac con peso aproximado de 65 kDa se genera luego que la protoxina de un peso de 130 kDa es procesada proteolíticamente.

Este grupo muestra una estructura tridimensional muy similar a pesar que comparte aproximadamente un 20% de identidad entre sus secuencias. Están compuestas por tres dominios (I, II y III). El dominio I, está compuesto por un haz de siete α -hélices, seis de las cuales rodean a la hélice 5 y este dominio está implicado en la inserción de la membrana, oligomerización de la toxina y la formación del poro lítico durante su mecanismo de acción que ejerce sobre los insectos. El dominio II, compuesto por un prisma beta de tres hojas β antiparalelas alrededor de un núcleo hidrofóbico con algunas regiones de asas expuestas, este dominio es menos conservado en su

secuencia de aminoácidos y está involucrado en el reconocimiento del receptor. El dominio III, es un sándwich β , compuesto por dos hojas β antiparalelas. Tanto el dominio II como el dominio III están implicados en la especificidad al insecto por las interacciones específicas que se dan con las diferentes proteínas del intestino del insecto (Derbyshire *et al.*, 2001) (figura 2).

Recientemente se difractó la estructura cristalográfica de la pCry1Ac y muestra que en su región N-terminal mantiene una estructura similar a lo dominios I, II y III que presenta la tCry1Ac, y en la región C-terminal, que es eliminada durante el procesamiento proteolítico, muestra 4 dominios. Los dominios IV y VI son alfa-hélices y los dominios V y VII tienen una conformación de barril beta tipo rollo (Evdokimov *et al.*, 2014) (figura 2).

A pesar que las proteínas Cry de Bt son unos de los insecticidas más usado para el control de insectos, que constituye aproximadamente el 2% de los insecticidas en el mercado y se expresa en plantas transgénicas de consumo humano, los efectos biológicos que pueden ejercer en células de mamíferos han sido poco explorados, y aunque se han llegado considerar inocuas en humanos, algunos estudios han mostrado que puede interactuar con células de mamíferos (Mesnage *et al.*, 2013; Rubio-Infante and Moreno-Fierros, 2016). Se ha observado que pCry1Ac se une *in situ* al epitelio intestinal de ratones e induce hiperpolarización transitoria del tejido mucoso (Vázquez-Padrón *et al.*, 2000) . En otro estudio, en el que se evaluó los efectos de las toxinas Cry1Ab y Cry1Ac de Bt en la línea celular proveniente de células de riñón de embrión humano 293; se observó que Cry1Ab indujo muerte celular a una concentración de 100 ppm (0.1 mg/mL), a diferencias de Cry1Ac que no se observó efecto sobre esta línea celular. Sin embargo al usar ambas toxinas de manera combinada se observó una reducción de la activación de las caspasas 3/7 inducida por el insecticida Roundup (Mesnage *et al.*, 2013).

Por otro lado, nuestro grupo de investigación ha reportado que las proteínas Cry son capaces de interactuar con tipos celulares relevantes en la respuesta inmunológica. Encontramos que la pCry1Ac es un potente inmunógeno y adyuvante de vacunas de mucosas y que unos de los mecanismos por el cual ejerce su efecto inmunoestimulador es induciendo la activación de APCs como los macrófagos, a través de la expresión de moléculas coestimuladoras CD80 y CD86 e induciendo la producción de citocinas proinflamatorias TNF- α , Il-6 y MCP-1 (Moreno-Fierros *et al.*, 2013).

1.3 Células presentadoras de antígenos

Las células dendríticas, macrófagos, células de Langerhans y células B, son conocidas como APCs profesionales, ya que presentan a las células T péptidos antigénicos a través del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) (figura 1) (Blum *et al.*, 2013).

Para la activación de los linfocitos T, es necesario que las APC además de la presentación del antígeno procesado a través del MHC, proporcionen una segunda señal coestimuladora a través de la expresión en su superficie de moléculas coestimuladoras principalmente de la familia B7, B7-1(CD80) / B7-2(CD86) (Ceeraz *et al.*, 2013; Chen and Flies, 2013; Podojil and Miller, 2013), y la producción de citocinas (Carreno and Collins, 2002), ya que sin estas 2 señales los linfocitos no son funcionales, entrando en un estado conocido como anergia (South and Zealand, 1999).

1.4 Macrófagos

Los macrófagos son células fagocíticas mononucleares y son parte de las células efectoras que actúan como una primera línea de defensa contra los microorganismos. Se encuentran estratégicamente localizadas en todos los tejidos del cuerpo y juegan un papel crítico en el sistema inmune innato e inicio de la inmunidad adquirida actuando como APC, también participa en la remodelación de tejido y el mantenimiento de la homeostasis (reparación tisular, angiogénesis, eliminación de debris y células apoptóticas).

Anteriormente se pensaba que todos los macrófagos residentes de tejidos se originaban de las células madre hematopoyéticas localizadas en la médula ósea y que después de varias etapas de diferenciación los precursores de macrófagos eran liberados al torrente sanguíneo como monocitos, migrando a través de este y extravasando el endotelio, donde se diferenciarían a macrófagos. Sin embargo, recientemente se ha descrito que los monocitos no son precursores directos para la mayoría de los macrófagos residentes del tejido en el estado basal. Varios macrófagos residentes en tejidos se establecen antes de nacer el individuo y se mantienen hasta la edad adulta y persisten por proliferación local (ejemplo, microglia cerebral, las células de Kupffer del hígado, macrófagos cardíacos y otros macrófagos que residen en los pulmones, el bazo, la médula ósea, y la cavidad peritoneal). Su generación y mantenimiento son por lo tanto independiente de la hematopoyesis en curso. Sólo unas pocas poblaciones de macrófagos de tejido se derivan de monocitos en estado

basal, como los macrófagos en el intestino y en la zona marginal esplénica. Más bien, los monocitos que se infiltran en los tejidos durante la inflamación dan lugar a macrófagos “inflamatorios” (Pittet *et al.*, 2015).

Los macrófagos son abundantes en cada órgano del cuerpo, cada población en los tejidos tienen diferentes fisiología y función en respuesta a las señales microambientales que le rodean, como las citocinas y los metabolitos locales del tejido, que son importante para la regulación, mantenimiento y la especialización funcional del tipo de macrófago. Tanto los macrófagos residentes del tejido, como los macrófagos reclutados contribuyen a mantener la homeostasis (Lavin *et al.*, 2016).

1.4.1 Activación de macrófagos

Los macrófagos son células heterogéneas y versátiles que sufren cambios fenotípicos y funcionales en respuesta a las señales del microambiente. Se caracterizan por la expresión de receptores que reconocen señales inflamatorias que no se producen en los tejidos sanos, como son los receptores de manosa (CD206), receptores tipo Scavenger, receptores de opsonina, que juegan un papel importante en el proceso de unión y fagocitosis de patógenos, mientras que los receptor de reconocimiento de patrones (PRRs), tales como los receptores tipo Toll (TLR), receptores tipo RIG-1 (RLRs), receptores de lectinas tipo C (CLR) o receptores tipo NOD (NLRs) identifican componentes microbianos invariantes sobre la superficie de los patógenos, denominado patrones asociados a patógenos moleculares (PAMPs) y también reconocen moléculas liberadas por células necróticas e inducen una respuesta inflamatoria “estéril” (Gordon and Pl, 2014; Juhas *et al.*, 2015).

Los estímulos a través de los PRRs movilizan un programa de señalización al núcleo e inicia la activación de mecanismos de transcripción que alteran la expresión de genes para producir "macrófagos activados" que están mejor dotados para eliminar la causa de su influjo y restaurar la homeostasis (Hume, 2015; Juhas *et al.*, 2015).

Dentro de las cascadas de señalización mejor caracterizadas están las mediadas por los TLRs que inducen la expresión de genes relacionados con la activación inflamatoria dentro de ellas: la del factor de transcripción NF- κ B, las MAPKs y el factor regulador de interferón (IRF), resultando en la producción de un gran número de moléculas efectoras y mediadores asociados

con respuestas antimicrobianas (como la expresión de moléculas coestimuladoras) e inmunorreguladoras los cuales pueden estar implicados en eliminación directa del patógeno (como los péptidos antimicrobianos y la producción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno) y otros que inducen una respuesta pro-inflamatoria, como es la producción de citocinas y quimiocinas que juegan un papel importante en la inducción de la inmunidad adaptativa y promueven el reclutamiento de células inmunes. (Billack, 2006; Hume, 2015; Ivashkiv, 2011; Javadov *et al.*, 2014).

Aunque se han definido principalmente dos subpoblaciones de macrófagos dependiendo de su estado de activación: los macrófagos clásicamente activados/inflamatorios (M1) y los macrófagos alternativamente activados/regenerativos (M2) (Hume, 2015), debido al aumento del número de ligandos inmunológicos, receptores de reconocimientos, citocinas, programas de señalización y genéticos que son los que controlan todos los aspectos de la activación de las células y definen sus funciones, varios autores plantean que los macrófagos no forman un subconjunto estable, sino que responden a una combinación de factores presentes en los tejidos. Así que sugieren una revisión de este modelo de polarización de los macrófagos M1/M2, ya que es demasiado bipolar cuando existen muchos estímulos que se combinan para determinar el fenotipo de los macrófagos (Hume, 2015; Martinez and Gordon, 2014; Zanin *et al.*, 2012)(Zanin *et al.*, 2012). Plantean que los niveles de activación de una población de macrófagos es como la rueda de la fortuna donde los extremos de polarización de la función de los macrófagos pudieran definirse como los macrófagos polarizados como M1 y M2 sin embargo en el medio existe una mezcla de macrófagos, que pueden coexistir en determinados momentos en diferentes estados (Hume, 2015).

Macrófagos clásicamente activados

El fenotipo M1 (pro-inflamatorio) surgen como resultado de la activación clásica producida por patógenos bacterianos. Por ejemplo, a través de la estimulación de receptores TLR inducida por ligandos bacterianos como el LPS y algunas citocinas, principalmente interferón gamma (IFN- γ). Muestran una mayor capacidad para eliminar las infecciones causadas por bacterias, virus u hongos, así como células tumorales. También se caracterizan por una alta expresión de moléculas coestimuladoras CD80/86 y MHC II, que apunta a su capacidad para presentar antígenos a los linfocitos T. Dentro de los mediadores que participan en la polarización hacia macrófagos M1,

dependiente de TLR, se encuentran los factores de transcripción NF- κ B , proteína activadora 1 (AP-1), factor de secuencia de purina 1 (PU.1), CCAAT/potenciador de unión de la proteína α (C/EBP- α), transductor de señal y activador de la transcripción 1 (STAT1), así como el factor regulador de interferón 5 (IRF5) (Hume, 2015; Juhas *et al.*, 2015; Martinez and Gordon, 2014).

Los macrófagos del fenotipo M1 están estrechamente relacionados con la polarización TH1 y TH17 de la respuesta inmune y se caracterizan por la alta capacidad de producir citocinas proinflamatorias tales como TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-23, quimiocinas (CCL5, CCL8, CXCL2 y CXCL4) y la producción de NO a través de la síntesis inducida de iNOS (Hume, 2015; Juhas *et al.*, 2015; Martinez and Gordon, 2014).

Macrófagos activados de manera alternativa

Los macrófagos del fenotipo M2 se caracterizan por una alta expresión de marcadores de fagocitosis CD206 y/o CD163, cuya expresión es dependiente de IL-10. Juegan un papel importante en la regulación de la respuesta inmune a los parásitos y en las reacciones alérgicas. Además, participan en la remodelación tisular, la angiogénesis y pueden tener una influencia en la progresión tumoral. También tienen propiedades anti-inflamatorias y la capacidad de inducir la respuesta inmune TH2 y la producción linfocitos T reguladores (Juhas *et al.*, 2015)

En este proceso de activación a macrófagos M2 están involucradas citocinas tales como IL-4, IL-10, IL-13 e IL-33 y producen IL-10, TGF- β y el antagonista del receptor IL-1 (IL-1RA). A diferencia de macrófagos M1, los M2 no muestran propiedades citotóxicas (Martinez and Gordon, 2014). Los Factores de transcripción que promueven la activación de macrófagos M2 incluyen el factor regulador de interferón 4 (IRF4), proteína de unión al “enhancer” CCAAT beta (CCAAT / EBP- β), el factor 4 similar a Krüppel (KLF4), el factor de transcripción STAT6 y el receptor activado por receptores activados de proliferador de peroxisomas (PPAR) (Juhas *et al.*, 2015).

En la literatura se han descrito 3 subpoblaciones de macrófagos M2: Los M2a / Macrófagos de “cicatrización de herida” inducidos por IL-4 y/o IL-13; M2b, desarrollados por ligandos de TLRs con complejos inmunoestimulantes; M2c, cuando se exponen a un estímulo anti-inflamatorio tal como los glucocorticoides, la IL-10 o TGF- β (Martinez and Gordon, 2014).

1.4.1.1 Moléculas coestimuladoras

Los macrófagos, las DC y las células B activan las células del sistema inmune adquirido actuando como APCs, presentando péptidos antigénicos a través del MHC y proporcionando una segunda señal coestimuladora a través de la expresión en su superficie de moléculas coestimuladoras dentro de ellas las más estudiadas se encuentran la familia B7: B7-1(CD80)/ B7-2(CD86), que inducen una regulación positiva e interactúan con el co-receptor CD28 expresada en la superficie de la célula TCD4⁺ y TCD8⁺ (Chen and Flies, 2013; Mueller, 2000; Paterson *et al.*, 2009; South and Zealand, 1999) (figura 1).

Se conoce un segundo receptor para CD80 y CD86 en las células T, el antígeno-4 asociado a linfocito T citotóxico (CTLA-4 o CD152), que regula negativamente a las células T después de activadas (Chen and Flies, 2013; Podojil and Miller, 2013). La coestimulación es un potente modulador de la síntesis de proteínas, el metabolismo, la progresión del ciclo celular, la apoptosis y la diferenciación en las células T (Podojil and Miller, 2013). Sin embargo la regulación negativa funciona para limitar, terminar y /o atenuar las respuestas de células T, las cuales parecen ser especialmente importante para regular la tolerancia de células T y la autoinmunidad (Greenwald *et al.*, 2005).

CD80 y CD86, son miembros de la familia de los supergenes de la inmunoglobulina y son codificados por genes separados (Hathcock *et al.*, 1994). Ambas moléculas se unen a los receptores, CD28 y CTLA-4 con distintas cinética de expresión y afinidad. CD28 se expresa constitutivamente en la superficie de las células T, al ser activado por su acoplamiento con CD80 o CD86. La APC proporciona una potente señal coestimuladora a las células T que resulta en la inducción de la transcripción IL-2, la expresión de CD25, y la entrada en el ciclo celular, además promueve la producción de citocinas para iniciar la diferenciación y la expansión clonal de las células T, así como también optimiza las respuestas de las células T previamente activadas (Carreno and Collins, 2002).

En estudios *in vitro*, se observó que las células T de ratón y humanas productoras de IL-2, no se activaron sin la coestimulación de las B7, aun con la presentación del péptido antigénico por parte de las APC. Estas células T son llamadas anérgicas, porque son incapaces de producir IL-2

al re-exponerse a la coestimulación por las APC y el antígeno. Sin embargo, el estado de anergia pudo ser revertida mediante la provisión de IL-2 exógeno (Chen and Flies, 2013).

Por otra parte, CTLA-4 no se encuentra expresado en las células T en reposo y es inducida después de la activación de células T atenuando la respuesta de las células T. Cuando se expresa CTLA-4, la expresión de CD28 es inhibida posteriormente por endocitosis (Chen and Flies, 2013), se inhibe la síntesis de IL-2 y la progresión a través del ciclo celular y termina respuestas de células T. CTLA-4 presenta mayor afinidad de receptor por CD80 y CD86 que CD28. La intensidad y cinética expresión de CD80 y CD86 es modulada por el estado de activación de la APC (Sharpe and Freeman, 2002).

CD86 se expresa constitutivamente en monocitos/macrófagos y DC en reposo *in vitro* y es sobreexpresado rápidamente después de la activación. Por el contrario, CD80 muestra muy poca expresión constitutiva y es sobreexpresada más tarde que CD86. Se han encontrado muchos factores que regulan la expresión de CD80 y CD86, incluyendo mitógenos, ligando de MHC clase II, ligando de CD40, y una variedad de citocinas. Curiosamente, IFN- γ se ha demostrado que aumentar la expresión CD86 y disminuye la expresión de CD80 en células de Langerhans (LC) y en los macrófagos peritoneales. Por lo tanto, la expresión de CD80 y CD86 se pueden regular de forma independiente por el mismo estímulo (Greenwald *et al.*, 2005).

A pesar que las moléculas CD80 y CD86 son conocidas por sus funciones coestimuladoras de células T, se sabe que pueden tener otras funciones sobre el sistema inmune. Al interactuar con CD28 participa en el desarrollo y mantenimiento de las células T reguladoras TCD4⁺ CD25⁺ y su papel en células T también puede contribuir a la regulación por disminución de la respuesta inmune. Además estudios recientes indican que B7 puede transmitir señales supresoras en DC, seguida de su interacción con CTLA-4 (Greenwald *et al.*, 2005).

En los últimos años se han identificados nuevos miembros de la familia B7, como son el ligando ICOS-L (B7h, B7-H2, B7RP-1, LICOS, GL50, y CD275), PD-L1 (B7-H1), PD-L2 (B7-DC), B7-H3, y B7-H4 (B7x / B7-S1) que se expresan en células APC, así como en las células dentro de los órganos no linfoides, proporcionando nuevos medios para la regulación de la activación de células T y la tolerancia en los tejidos periféricos.

ICOS-L se identificó como un homólogo de la familia B7, y se expresa constitutivamente en células B, DC y los macrófagos. Se ha observado que se expresa también en un subconjunto de células TCD3⁺, células endoteliales y algunas células epiteliales en respuesta a las señales inflamatorias. ICOS-L, es el ligando de ICOS, una moléculas que no se expresa en las células T sin estimular, pero se induce rápidamente en las después del acoplamiento del TCR con el péptido antigénico en las células T activadas (Ceeraz *et al.*, 2013; Sharpe and Freeman, 2002).

CD28 e ICOS actúan sinérgicamente para promover la activación de las respuestas efectoras de las células T, la activación celular, la diferenciación y las respuestas de las células B dependientes de células T.

El mecanismo por el cual las APCs inducen la expresión de las moléculas coestimuladoras ha sido muy poco estudiado. A pesar que se ha descrito que la señalización a través de NF-κB y las MAPKs es importante en la activación de los macrófagos estimulados con LPS, estas vías son insuficientes para inducir la sobreexpresión de las moléculas coestimuladoras en macrófagos y células dendríticas. En un artículo publicado por Hoebe, *et al*, 2003, mostraron que los interferones tipo I (IFN-I) son cruciales para la sobreexpresión de moléculas coestimuladoras CD80, CD86 y CD40, después que la células fueran estimuladas con LPS y dsRNA, dos adyuvantes ligando de TLR4 y TLR3 respectivamente (Hoebe *et al.*, 2003).

Los autores trabajaron con ratones que expresaban una versión dominante negativa de TRIF y ratones deficientes de TLR3, MyD88 y del receptor para los interferones tipo I (IFN-IR). Mostraron que la vía de señalización LPS→TLR4→TRIF→IRF→IFN-I, a través de un efecto paracrino o autocrino de IRF-I en su receptor era crítica para la inducción de la expresión de las moléculas coestimuladoras CD80 y CD86. Sugiriendo que la vía dependiente de MyD88 inducida por el LPS a través de TLR4, contribuye a la adyuvancia promoviendo una rápida activación de NF-κB y producción de citocinas proinflamatorias. Y la vía independiente de MyD88, media la inducción de NF-κB con una cinética más lenta e induce la expresión de genes que induce la producción de IFN y moléculas coestimuladoras. (Hoebe *et al.*, 2003; Lien and Golenbock, 2003).

1.4.1.2 Citocinas proinflamatorias

Los macrófagos y linfocitos son los principales productores de citocinas, aunque también se ha descrito que pueden ser producidas por leucocitos polimorfonucleares (PMN), células endoteliales y epiteliales, adipocitos y tejido conectivo.

Las citocinas y quimiocinas son proteínas de bajo peso molecular que median la comunicación intercelular principalmente del sistema inmune. Cada proteína se une a un receptor específico de la superficie celular para generar una cascada de señalización que afecta la función de las células. Ellas orquestan una variedad de procesos que van desde la regulación de la inflamación local y sistémica a la proliferación celular, el metabolismo, la quimiotaxis, la reparación de tejidos y organizan la siguiente fase de defensa del hospedero (Duque and Descoteaux, 2014).

Las citocinas son esenciales para la función de los macrófagos, median el desencadenamiento de una respuesta inmune efectiva, unen la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa e influencia el microambiente del macrófago, lo que define el subtipo de macrófagos en inflamatorio o antiinflamatorio.

Cuando un macrófago es activado por un antígeno inflamatorio, secretan citocinas denominadas citocinas proinflamatorias como la IL-1 β , IL-6, IL-12, TNF- α , y la quimiocina CXCL8 (antes conocida como IL-8), y aunque los monocitos y los macrófagos son su principal fuente, también son producidas por linfocitos activados, células endoteliales y fibroblastos. Otras citocinas suprimen la actividad inflamatoria y son llamadas citocinas anti-inflamatorias como la IL-4, IL-10, IL-13 que junto al factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) suprimen la producción de IL-1 y TNF- α lo que permite regular la intensidad del efecto antiinflamatorio (Dinarello, 2000; Duque and Descoteaux, 2014).

TNF- α :

El factor de necrosis tumoral es una glicoproteína de 185 aminoácidos que fue descrita inicialmente por su habilidad de inducir necrosis en ciertos tumores. Es estimulada en la fase aguda de la respuesta inmune y una de las primeras citocinas liberadas en respuesta a un patógeno siendo capaz de ejercer su efecto en muchos órganos. En el hipotálamo, el TNF estimula la secreción de la hormona de liberación de corticotropina, suprime el apetito e induce la fiebre. TNF induce la vasodilatación y aumento de la permeabilidad vascular, lo cual es propicio para la infiltración de linfocitos, monocitos y neutrófilos. Junto con IL-17, induce la expresión de quimiocinas CXCL1, MCP-1 y CCL5 que incrementa la migración de neutrófilos y también puede aumentar la expresión de moléculas de adhesión celular que facilitan la diapédesis (Duque and Descoteaux, 2014).

IL-6:

La IL-6 es una proteína glicosilada de 21–28 kDa que tiene funciones proinflamatorias y antiinflamatorias que afecta varios procesos de la inmunidad, reparación de tejido y metabolismo. Promueve la diferenciación de las células B a células plasmáticas, activa las células T citotóxicas y regula la homeostasis ósea. Al igual que TNF- α e IL-1 β es un pirógeno endógeno que promueve la fiebre y la producción de proteínas de fase aguda de hígado (Duque and Descoteaux, 2014).

El complejo receptor de IL-6 que media las actividades biológicas, consiste en la IL-6 unida a su receptor IL-6R (también designado CD126 o gp80) y dos moléculas de gp130 (CD130) que conduce a la transducción de señal de IL-6, que incluye la activación de JAK/STAT, ERK, y la cascada de señalización de PI3K (Scheller *et al.*, 2011).

Quimiocina MCP-1:

Las quimiocinas (citocinas quimiotácticas) son pequeñas proteínas de unión a heparina que constituyen una gran familia de péptidos (60-100 aminoácidos) estructuralmente relacionados con las citocinas, cuya función principal es regular el tráfico celular. Las células que expresan los receptores para la quimiocina migran de manera dirigida a lo largo del gradiente de ligando químico conocido como el gradiente de quimiocinas. Esto permite que las células se muevan hacia altas concentraciones locales de quimiocinas (Deshmane *et al.*, 2009).

Las quimiocinas también se agrupan en dos subfamilias funcionales: quimiocinas inflamatorias y homeostáticas. Las quimiocinas inflamatorias controlan el reclutamiento de leucocitos en el sitio de inflamación y tejido dañado, mientras que las quimiocinas homeostáticas cumplen funciones de mantenimiento tales como la navegación leucocitos hacia y dentro de los órganos linfoides secundarios, así como en la médula ósea y el timo durante la hematopoyesis.

La proteína-1 quimioatrayente de monocitos (MCP-1 / CCL2) es un miembro de la familia de quimiocinas C-C, y un factor quimiotáctico potente para monocitos. En humanos se compone de 76 aminoácidos y es 13 kDa de tamaño. Es producida principalmente por monocitos/macrófagos, sin embargo la produce también otros tipos celulares, como las células endoteliales, fibroblastos, células epiteliales, del músculo liso, mesangiales, astrocitos, y células microgliales.

MCP-1 recluta y dirige el movimiento de leucocitos, además es importante en la respuesta inmune antiviral. En la circulación periférica y en los tejidos, regula la migración de células asesinas naturales (NK) y la infiltración de monocitos y linfocitos T de memoria. Además varias evidencias indican que MCP-1 participa en inmunidad de células T, ya que la expresión de MCP-1 se asocia con el desarrollo de una respuesta polarizada hacia TH2 y un aumento en la secreción de IL-4 por las células T (Deshmane *et al.*, 2009).

1.4.1.3 Nitritos

El NO es un gas simple liberado por la conversión del aminoácido L-arginina en L-citrulina, por acción de la enzima óxido nítrico sintetasa (NOS). Además de la L-arginina como sustrato, se requiere de la presencia de calmodulina (CaM) y de 4 cofactores: flavin mononucleótido (FMN), flavin adenina dinucleótido (FAD), tetrahidrobloptenina (TBH) y de nicotinamida adenina dinucleotidofosfato (NADPH). Puede ser metabolizado a otras especies reactivas de nitrógeno río abajo, mientras que la citrulina puede ser reutilizada para una eficiente síntesis de NO a través del ciclo de citrulina-NO. Los productos finales del NO "*in vivo*" son: nitrito (NO₂) y nitrato (NO₃), así que el mejor índice de NO total es la suma de ambos productos, debido a que la proporción relativa de cada uno de ellos dentro de una misma muestra resulta variable y la relación de nitrito/nitrato puede ser medida a través de sistemas colorimétricos.

Es un importante mediador citotóxico proinflamatorio que defiende el huésped frente a varios patógenos mediante la inactivación y la destrucción de agentes infecciosos, juega un papel importante en numerosos procesos del sistema inmune, además de otros procesos biológicos como son la relajación muscular y la regulación de la presión arterial por vasodilatación, también está implicado en la función renal, la neurotransmisión, la respiración, la función gastrointestinal y cicatrización de heridas (Hematológicas, 1998).

El NO se genera enzimáticamente por la mayoría de las células del cuerpo. Aunque es una característica propia de las células del sistema inmune, también se genera en otras células que participan en las reacciones inmunes (tales como células endoteliales, células epiteliales, células musculares lisas vasculares, fibroblastos, queratinocitos, condrocitos, hepatocitos, células mesangiales y células de Schwann) (Bogdan, 2001).

Se han descrito tres isoformas de la familia de la enzima NOS: NOS inducible o tipo II (iNOS), la NOS endotelial o tipo III (eNOS), y NOS neuronal (nNOS) o tipo I. (Higham *et al.*, 2010). Todas las isoformas conocidas de NOS se saben que operan en el sistema inmune. Sin embargo la nNOS y eNOS son constitutiva y dependientes de calcio y se expresan principalmente en las neuronas y las células endoteliales respectivamente. La iNOS es independiente de calcio y es inducible en diferentes tipos celulares principalmente macrófagos, hepatocitos, neutrófilos, músculo liso, endotelio en respuesta a diferentes estímulos inmunológicos tales como: los ligandos de TLR y citocinas inflamatorias, incluyendo IFN- γ . (Hematológicas, 1998; Macmicking *et al.*, 1997).

Dependiendo de la citocina o estímulo microbiano y el tipo de células, diferentes vías de señalización río arriba están involucrados en la expresión de iNOS, por ejemplo, JAK1, JAK2 y tirosina cinasa TYK2; proteína cinasa serina/treonina proto-oncogen RAF-1; las MAPKs p38, ERK1/2 y JNK; la proteína cinasa C (PKC); proteínas fosfatasas 1 (PPP1C) y proteínas fosfatasas (PP2A) o inhibir: por ejemplo, foinositol 3-cinasas (PI3K) y proteínas tirosin fosfatasas. NO por sí mismo ejerce un efecto bifásico sobre la transcripción de iNOS, pues a bajas concentraciones (por ejemplo, en el inicio de la estimulación de macrófagos por citocinas) activa el factor de transcripción NF- κ B e induce la expresión de iNOS (retroalimentación positiva). Las

concentraciones altas tienen el efecto contrario, lo que puede ayudar a prevenir la sobreproducción NO (Bogdan, 2001).

1.4.1.4 Vía de señalización de las MAPKs

Los macrófagos son mediadores cruciales de la respuesta inflamatoria y expresan varias PRRs, y aunque los mecanismos de señalización asociados a estos receptores varían, muchos PRRs activan tanto las MAPKs y el factor de transcripción NF- κ B, que son cruciales para la generación de respuestas inmunes (Rao, 2001).

Las MAPKs son una familia altamente conservada de proteínas cinasas serina/treonina y tienen diferentes efectos en la traducción inducida por la estimulación fisiológica de los PRRs, asegurando una correcta respuesta a través de la fosforilación de una gama de sustratos río abajo, que incluyen factores de transcripción, proteínas del citoesqueleto y otras proteínas de señalización que son componentes claves en procesos como proliferación, diferenciación, motilidad, respuesta al estrés, apoptosis y supervivencia, que aseguran una mejora en la inmunidad antimicrobiana e inicia la respuesta inmune innata.

Las MAPKs convencionales incluyen la cinasa regulada por la señal extracelular 1 y 2 (ERK1/2 o p44/42), las cinasas N-terminales 1-3 (JNK1-3)/cinasas activadas por estrés c-Jun (SAPK1A, 1B, 1C), las isoformas p38 (p38 α , β , γ y δ) y ERK5 y todas ellas han sido ampliamente estudiado en el contexto de la inmunidad innata (Arthur & Ley, 2013a). Las MAPKs atípicas menos estudiadas incluyen la cinasa tipo Nemo (NLK), ERK3/4 y ERK7/8.

Cada cascada es iniciada por señales extracelulares específica que conduce a la activación de una MAPK cinasa cinasa (MAP3K, MAPKKK), que son normalmente activadas por interacciones con una pequeña GTPasa y/o fosforilación por proteína cinasas río abajo de receptores de la superficie celular. La MAPKKK fosforila y activa directamente a una MAPK cinasa (MAP2K, MAPKK), que a su vez activa la MAPK por fosforilación dual de un tripéptido conservado Thr-X-Tyr (donde X representa cualquier aminoácido). Una vez activada, la MAPK fosforila diversos sustratos en el citosol y/o el núcleo para lograr cambios en la función de las proteínas y la expresión genética que ejecutan la respuesta biológica (Morrison *et al.*, 2014; Peti and Page, 2013) (figura 3).

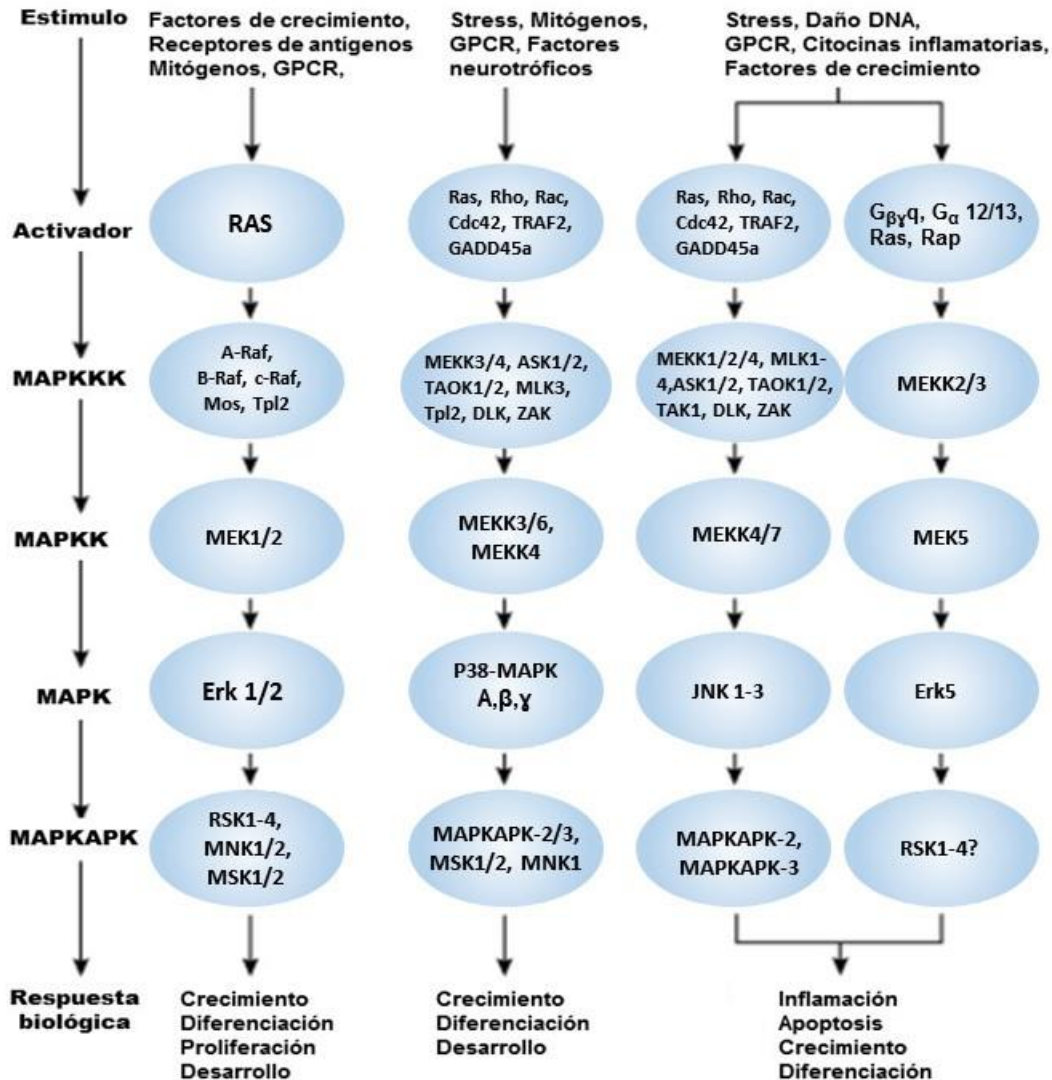


Figura 3. Diagrama de las vías de las MAPKs. Las MAPKs son una familia altamente conservada de proteínas cinasas serina / treonina. Las MAPKKKs son activadas por una gran variedad de estímulos extracelulares que incluyen mitógenos, citocinas, factores de crecimiento y estrés ambientales a través de mecanismos dependientes e independientes de receptores. Las MAPKKK luego fosforilan y activan una MAPK cinasa río abajo, las MAPKK, que a su vez fosforila y activa las MAPKs. La activación de MAPKs conduce a la fosforilación y activación de las proteínas MAPKAPKs. Estas MAPKAPKs funcionan para amplificar la señal y mediar la amplia gama de procesos biológicos regulados por las diferentes MAPK. Figura modificada y recuperada de <https://www.cellsignal.com/common/content/content.jsp?id=science-pathways-mapk>.

Para todos los módulos de MAPKs, se han identificado proteínas de andamiajes que contribuyen a la señalización MAPK mediante el aumento de la concentración local de los componentes de la vía, proporcionando la localización de los sitios celulares específicos para los sustratos y la regulación espacio-temporal de la activación de la cascada. Dentro de las proteínas de andamiaje implicadas en la cascada de señalización de las MAPKs incluyen KSR y MP1 para

el módulo de ERK; JIP1, JIP2, JIP3, JIP4 para JNK; y JIP2, JIP4, y OSM para p38 (Morrison *et al.*, 2014).

Los miembros de la familia ERK poseen un motivo de activación TEY y se puede subdividir en dos grupos: las ERKs clásicas, que son ERK1 y ERK2 y las ERKs más grandes, ERK5, que contienen una secuencia más extendida en su extremo C-terminal.

ERK1 y ERK 2 son activados principalmente por factores de crecimiento y mitógenos que inducen el crecimiento y la diferenciación celular y son regulados por receptores de la superficie celular, tales como receptores de tirosina cinasas (RTK), receptores acoplados a proteína G (GPCR), también conocidos como receptores de siete dominios transmembranales (7TM), integrinas, así como las pequeñas GTPasas Ras y RAP. Las MAPKK para ERK1 y ERK2 son MEK1 y MEK2 y éstas a su vez son activadas por las MAPKKK que incluyen a los miembros de la familia Raf, Mos, y TPL2 (Morrison, 2012; Morrison *et al.*, 2014).

En cuanto al resto de las MAPKs se sabe menos acerca de su regulación y función fisiológica. Se ha descrito que ERK5 es activado por MKK5, que a su vez es activado por MEKK2 o MEKK3. Se ha sugerido que la cinasa activada por p21¹ (PAK1) funciona río arriba de ERK3 y ERK4, mientras ERK7 (también conocido como ERK8 en los seres humanos) se activa a sí misma después de oligomerizarse.

Los miembros de la familia JNK tienen tres isoformas (JNK1, JNK2 y JNK3) que contiene un motivo de activación constituido por TPY, y son activadas por MKK4 y MKK7 y estas cinasas son activadas a su vez por MEKK1 y MEKK4 (MAPKKs), y MLK2 MLK3, ASK1, TAK1, y TPL2 (MAPKKK). La cascada señalización de JNK frecuentemente involucra a la familia de GTPasas Rho, Cdc42 y Rac. JNK juega un importante papel en la apoptosis, inflamación, producción de citocinas, metabolismo y responde a tensiones del medio ambiente (radiación, calor, estrés oxidativo ionizante, y daño en el ADN), citocinas inflamatorias, así como factores de crecimiento (Morrison *et al.*, 2014).

Los miembros de la familia p38 comprenden cuatro isoformas (p38 α , p38 β , y p38 γ p38 δ), poseen un motivo de activación TGY que se activan por MKK3 y MKK6 (MAPKKs), que son activadas por MLK2 MLK3 y MEKK, TAK1, y TAO1 y TAO2. Al igual que los módulos de JNK,

p38 se activan fuertemente por señales de estrés ambiental y citocinas inflamatorias. La activación de p38 contribuye a la inflamación, apoptosis, la diferenciación celular y la regulación del ciclo celular y dentro de los sustratos más importante rio abajo en su señalización se encuentra las cinasas MK2/3, PRAK, MSK1 y MSK2, así como diversos factores de transcripción .

Existen varias cinasas que se activan rio abajo de las MAPKs, que incluyen la proteína cinasa S6 ribosomal (RSK), la cinasa activada por mitógeno y estrés (MSK), la cinasa que interacciona con las MAPKs (MNK) y la proteína quinasa activada por MAPK (MAPKAPK). Algunas de estas cinasas también regulan la expresión de genes a través de la fosforilación de histonas y proteínas reguladoras de la transcripción (Arthur and Ley, 2013).

1.4.1.5 Vía de señalización del factor de transcripción NF- κ B

NF- κ B es un complejo proteico que controla la transcripción del ADN. Es un mediador crítico de la activación de los macrófagos y las respuestas inflamatorias, que se encuentra en la mayoría de tipos de células animales y está implicado en la respuesta celular frente a estímulos como el estrés, citocinas radiación ultravioleta, y antígenos bacterianos o virales (Juhas *et al.*, 2015). Juega un papel clave en la regulación de la respuesta inmune celular ya que pertenece a la categoría de los factores de transcripción primarios de “acción rápida”, ya que están presentes en las células en un estado inactivo y que no requieren una nueva síntesis de proteínas para ser activados. (Ahmed *et al.*, 2015) .

La cascada de señalización de NF- κ B consiste básicamente en moléculas receptoras y adaptadores de la señalización del receptor proximal; el complejo de IKK; proteínas I κ B; y dímeros de NF- κ B (Hayden and Ghosh, 2008) (figura 4).

La familia NF- κ B de factores de transcripción se compone de cinco miembros, p50, p52, p65 (RelA), c-Rel, y RelB, codificada por NFKB1, NFKB2, RELA, REL, y RELB, respectivamente, que comparten homología estructural en sus extremos N-terminal conocido como dominio de homología Rel (RHD) responsable de la unión al ADN y la formación de homo y/o heterodímeros estables. Sin embargo, el dominio de activación de la transcripción (TAD) necesario para la regulación positiva de la expresión de genes solo está presente en p65, c-Rel, y RelB y no

está presentes en p50 y p52 por lo que estos pueden reprimir la transcripción a no ser que se encuentren asociado con miembros de la familia NF- κ B que contiene TAD o unidos a otras proteínas capaces del reclutamiento del coactivador. La unión constitutiva de homodímeros de p50 o p52 a sitios kappa B en los promotores de NF- κ B pudieran actuar como un verificador transactivador de NF- κ B hasta que sea desplazado por dímeros transcripcionalmente competente de NF- κ B (Hayden and Ghosh, 2008).

La señalización de NF- κ B está estrechamente controlada por proteínas inhibitoras que contienen repeticiones de anquirina, las I κ Bs (I κ B α , I κ B β y I κ B ϵ) o los precursores de p50 y p52, llamados p105 y p100, respectivamente.

En células inactivas, el factor NF- κ B (más abundantemente formado por el heterodímero p50/p65) se encuentra en el citoplasma como un precursor inactivo que forma un complejo con una de las tres proteínas inhibitoras I κ B o las proteínas precursoras p100 y p105. La activación de NF- κ B se inicia con la disociación de NF- κ B de las proteínas I κ B, mediada tanto por la fosforilación, ubiquitinación y degradación proteasomal de las I κ B inducida por el complejo I κ B cinasa (IKK), o por escisión proteolítica inducida del dominio repetición de anquirina de p105 y p100 (Ahmed *et al.*, 2015; Hayden *et al.*, 2006).

Con la degradación de I κ B, el dímero de NF- κ B es libre de entrar en el núcleo donde se une a secuencias dianas en las regiones promotoras y activar la expresión de los genes específicos que tienen cerca sitios de unión de ADN para NF- κ B. La activación de estos genes por NF- κ B entonces induce una respuesta fisiológica, como por ejemplo, una respuesta inflamatoria o inmune, una respuesta de supervivencia celular o de proliferación celular (Modo and Colonial, 2011; Tergaonkar, 2006). El complejo IKK está formado por un heterodímero de las subunidades catalíticas de cinasas IKK α /IKK1 e IKK β /IKK2 y por una proteína reguladora llamada NEMO (modulador esencial NF- κ B) /IKK γ (Oeckinghaus *et al.*, 2011).

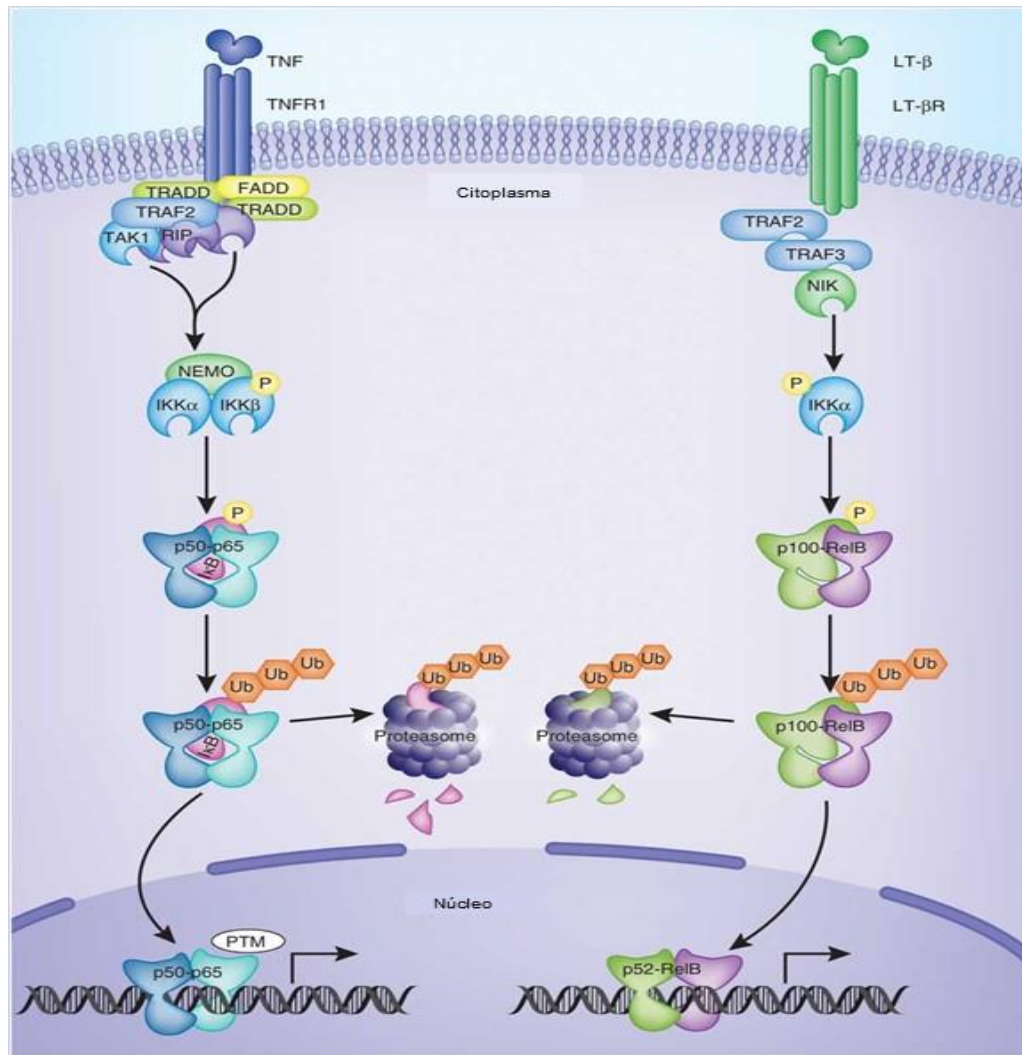


Figura 4. Vías canónicas y no canónicas de la activación de NF-κB. En condiciones de homeostasis, los dímeros de NF-κB se encuentran en el citoplasma unidos a las proteínas inhibitorias IκB. Después de un estímulo, las proteínas IκBs son fosforiladas, marcadas por ubiquitinación y degradadas, liberando a los dímeros de NF-κB que pueden translocarse al núcleo. En la vía canónica (A), IκBα es fosforilada de una manera dependiente de IKKβ y NEMO, lo que da como resultado la translocación nuclear de principalmente heterodímeros que contienen p50/p65. La vía no canónica (B), implica la fosforilación mediada por IKKα a p100 asociada con RelB, lo que conduce al procesamiento parcial de p100 y la generación de complejos p52-RelB que son transcripcionalmente activos. Figura recuperada de Nature Immunology (2011)doi:10.1038/ni.2065. http://www.nature.com/ni/journal/v12/n8/fig_tab/ni.2065_F1.html.

A diferencia de la vía canónica, que depende de la activación y degradación de IκB mediada por NEMO-IKK para la translocación nuclear del complejo de p50/RelA (p65), la ruta no canónica de NF-κB se inicia por la activación del complejo p52/RelB. En la vía no canónica, depende del procesamiento de p100 a p52 mediado por la cinasa inductora de NF-κB (NIK). La activación de

NIK sobre el ligando del receptor induce la fosforilación y el posterior procesamiento proteosomal de la proteína precursora de NF- κ B2 de p100 a subunidad p52 madura a través de una vía IKK1/IKKa dependiente. Entonces la p52 dimeriza con RelB para aparecer como RelB: p52 nuclear con actividad de unión al ADN para regular una clase distinta de genes. La vía no canónica es activada por un subconjunto de miembros de la super familia de TNFR, mientras que la vía canónica es activado por una gama más amplia y la superposición de los receptores (Hayden and Ghosh, 2008).

NF- κ B responde a una amplia variedad de estímulos en todos los tipos de celulares. Muchos productos bacterianos así como la estimulación de una gran variedad de receptores de la superficie celular inducen la activación de NF- κ B, así como también cambios rápidos en la expresión génica. Debido a la amplia gama de contribuciones de NF- κ B, las células crearon mecanismos reguladores selectivos para asegurar la activación de sólo un subconjunto de genes en respuesta a un estímulo definido. Aunque la activación de NF- κ B se inicia por su translocación nuclear inducible y la unión a los motivos de ADN correspondientes, un número de diferentes eventos de regulación están involucrados para diferencial la activación de los genes diana. Como son la regulación diferencial de ubiquitinación, la formación de diferentes homo y heterodímeros dentro de los cinco miembros de la familia NF- κ B, las modificaciones post-traduccionales como la fosforilación y la acetilación de las proteínas NF- κ B, la cinética y duración de la activación de la función de transcripción NF- κ B, alteraciones epigenéticas de cromatinas, entre otros (Ahmed *et al.*, 2015).

Se ha descrito en la literatura factores de transcripción que cooperan con NF- κ B para la transcripción de genes específicos. Por ejemplo, la formación del complejo NF- κ B /AP-1 conduce a la activación de ambos factores de transcripción (Oeckinghaus *et al.*, 2011).

2. Antecedentes

La mayoría de los agentes infecciosos penetran al organismo a través de las superficies de mucosas gastrointestinales, respiratorias y genitourinarias, por lo que se requiere desarrollar estrategias de vacunación que induzcan respuestas inmunes protectoras en los sitios mucosos donde invaden los patógenos (Lawson *et al.*, 2011). Los enfoques actuales para desarrollar vacunas de mucosas efectivas y/o inmunoterapias están dirigidas a encontrar formas más eficientes de

administración de antígenos al sistema inmune de mucosas y hacia la búsqueda de adyuvantes que sean seguro y que provean inmunidad. (Lycke, 2012; Pavot *et al.*, 2012).

Dentro los adyuvantes de mucosas más estudiados a nivel experimental se encuentran la toxina del cólera (CT) y la termolábil de *Escherichia coli* (TL) (Clements *et al.*, 1988; Lycke, 2005), sin embargo se ha observado que estas presentan riesgos de toxicidad (George-chandy *et al.*, 2001; Holmgren and Czerkinsky, 2005; Neutra and Kozlowski, 2006). Aunque, para reducir su toxicidad, se han desarrollado mutantes no tóxicas de CT y TL que mantienen parcialmente la adyuvancia (Connell, 2007; Lycke, 2005; Yamamoto *et al.*, 2000). Sin embargo existe preocupación acerca de la seguridad de la aplicación intranasal de estas mutantes no tóxicas, así como de las subunidades B de ambas enterotóxicas, ya que estas proteínas mantienen su capacidad de unirse a su receptor el gangliósido GM1 (Connell, 2007), lo cual podría facilitar que las vacunas se dirigieran a los tejidos neuronales (van Ginkel *et al.*, 2000). Incluso una vacuna de aplicación nasal contra la influenza que se administraba en humanos con una baja dosis de TL fue retirada del mercado porque provocaba parálisis facial (Eriksson *et al.*, 2003).

En la búsqueda de adyuvantes alternativos y considerando que las proteínas Cry se han reportado como no tóxicas en vertebrados (Hofte *et al.*, 1989; McClintock JT, Schaffer CR, 1995), nuestro grupo se propuso estudiar las propiedades inmunológicas de las proteínas Cry1Ac, y demostró que la pCry1Ac de Bt es un potente inmunógeno tanto a nivel sistémico como de mucosas (Moreno-Fierros *et al.*, 2000; Moreno-Fierros *et al.*, 2002; Vazquez-Padron *et al.*, 1999) y un adyuvante de mucosas (Esquivel-Perez and Moreno-Fierros, 2005; Vázquez *et al.*, 1999), que aumenta la inmunogenicidad a nivel de mucosas y a nivel sistémico, después de ser administrado por diferentes rutas de inmunización (vía oral, intranasal, rectal, vaginal, e intraperitoneal) y analizar las respuestas en diferentes sitios de mucosas (intestinos, pulmón, vagina) (Leticia Moreno-Fierros *et al.*, 2000). También se observó que como adyuvante puede incrementar la protección en contra de cuatro modelos murinos de infecciones como meningoencefalitis amebiana (Rojas-Hernández *et al.*, 2004), malaria (Legorreta-Herrera *et al.*, 2010), cisticercosis (Ibarra-Moreno *et al.*, 2014) y brucelosis (Gonzalez-Gonzalez *et al.*, 2015). Lo que sugiere que esta proteína puede ser utilizada como una estrategia para incrementar la eficacia de las vacunas como inmunomodulador a nivel de mucosas.

El mecanismo por el cual las proteínas Cry ejercen su actividad bioinsecticida ha sido ampliamente caracterizado. Se ha documentado que tanto la protoxina como la toxina Cry interactúan con el intestino medio de los insectos susceptibles, formando poros en la membrana, conduciendo a la muerte del insecto a través de un desequilibrio osmótico (Bravo *et al.*, 2011; Soberón *et al.*, 2016; Zavala *et al.*, 2011). Sin embargo los efectos biológicos que pueden ejercer sobre células de mamíferos han sido muy poco estudiados (Mesnage *et al.*, 2013; Moreno-Fierros *et al.*, 2013b; Rubio-Infante and Moreno-Fierros, 2016).

Caracterizando las propiedades inmunomoduladoras de la pCry1Ac y en virtud de que varios adyuvantes de origen microbiano ejercen parte de su actividad a través de la expresión de moléculas coestimuladoras y la producción de citocinas por parte de células presentadoras de antígeno (Lavelle, 2005; Williams *et al.*, 1999), se evaluó si la pCry1Ac era capaz de activar los macrófagos e inducir estos efectos. Se demostró que pCry1Ac es capaz de activar macrófagos murinos de cultivos primarios y de la línea celular RAW 264.7 en ensayo *in vivo* e *in vitro*, induciendo la expresión de moléculas coestimuladoras como CD80 y CD86 y la sobreproducción de citocinas proinflamatorias IL-6, TNF- α y la quimiocina MCP-1. Se observó que al administrar pCry1Ac por vía intranasal e intraperitoneal en ratones BALB/c, se induce una respuesta de activación en macrófagos de diferentes sitios sistémicos y mucosos como peritoneo, bazo, nódulos linfáticos mesentéricos, o en pulmón y lavados traqueoalveolares. Así mismo, los ensayos *in vitro* con células adherentes obtenidas de diferentes mucosas, mostraron que esta proteína era capaz de inducir la expresión de moléculas coestimuladoras CD80 y CD86 e inducir la producción de citocinas proinflamatorias TNF- α , Il-6 y MCP-1, obteniendo en varios casos efectos comparables a los obtenidos con el lipopolisacárido (LPS). Mediante el uso de inhibidores de MAPKs se sugirió la participación de las vías de las MAPKs ERK1/2 y p38 en la sobreexpresión de las moléculas coestimuladoras y la producción de citocinas inducidas por pCry1Ac (Moreno-Fierros *et al.*, 2013).

Conociendo que la toxina Cry se genera a partir del procesamiento proteolítico de la protoxina y como una estrategia para determinar que implicación tendría la mitad N-terminal de la estructura de la pCry1Ac (que corresponde a la estructura y secuencia de la tCry1Ac), en las propiedades inmunológicas de la proteína se estudiaron comparativamente los efectos inmunogénicos de las diferentes familias de protoxinas y toxinas Cry: Cry1 (Aa, Ab y 1Ac) y la

proteína Cry3A. Se observó que las tCry1A fueron capaces de incrementar la respuesta de anticuerpos tanto en el suero como en el intestino delgado, el intestino grueso y en los lavados traqueo-pulmonales después de administrarse vía intraperitoneal e intranasal, es decir que la tCry1Ac también es inmunogénica como la pCry1Ac, tanto a nivel sistémico como mucosal. Se observó, que después de realizar ensayos de inhibición de la reactividad de anticuerpos anti protoxina por competencia con toxina Cry, se encontró que gran parte de los anticuerpos que se generaban hacia la pCry1Ac iban dirigidos a la región de la toxina. Lo que sugería que la región que corresponde a la tCry1Ac en la pCry1Ac, es importante en los efectos inmunológicos inducidos por la pCry1Ac (Guerrero *et al.*, 2004).

Para continuar caracterizando el mecanismo inmunomodulador de la pCry1Ac, y conociendo la importancia que juega la toxina en las propiedades inmunológicas de la protoxina, consideramos importante determinar si la tCry1Ac ejercía un efecto directo en las células del sistema inmune y llevar a cabo estudios dirigidos para comprender cuales son las bases celulares que favorecen tales efectos. Así que en este proyecto nos propusimos determinar si la tCry1Ac también era capaz de inducir la activación de macrófagos a través de los mismos mecanismos que habíamos observado con la pCry1Ac.

Por lo tanto, en este trabajo primero determinamos si tCry1Ac era capaz de inducir la activación de macrófagos, mediante la expresión de moléculas coestimuladoras (CD80 y CD86), e inducir la producción de citocinas inflamatorias en macrófagos murinos de cultivo primario, así como de la línea celular RAW 264.7. Como un parámetro adicional de activación se analizó la producción de nitrito en las células RAW 264.7 estimuladas con tCry1Ac.

Varios estudios han descrito el papel de las vías de NF- κ B y las MAPKs, como mediadores crítico de la activación de los macrófagos y las respuestas inflamatorias (Hayden *et al.*, 2006). Para contribuir a dilucidar las vías de transducción de señales activadas por tCry1Ac, se evaluó la participación de las MAPKs sobre los efectos inducidos por tCry1Ac, así que se analizó por Western blot las formas fosforiladas de las cinasas ERK1/2, JNK y p38 y las translocación al núcleo del heterodímero p50 y p65 en macrófagos de la línea celular RAW 264.7 estimulados con tCry1Ac o LPS (utilizado como control positivo de la activación de macrófagos).

A continuación, para determinar si la activación inducida por toxina fue mediada a través de las vías de MAPK, las células RAW 264.7 se pre-trataron con inhibidores de MEK1/2-ERK1/2, JNK y p38 (PD98059, SP600125 y SB203580, respectivamente, y después se analizó la expresión de las moléculas coestimuladoras y la producción de citocinas proinflamatorias.

Las células dendríticas se les reconocen como las APCs por excelencia, sin embargo los estudios reportados por nuestro laboratorio sobre los efectos que ejerce la pCry1Ac en APCs, fueron realizados en macrófagos. En vista que uno de los objetivos del presente proyecto era determinar si la tCry1Ac era capaz de inducir la activación de APCs de manera similar como lo hace la pCry1Ac, en el presente trabajo se decidió trabajar con macrófagos, para poder establecer una comparación entre ambas proteínas.

3. Hipótesis

La toxina Cry1Ac de Bt induce la activación de macrófagos murinos que resulta en la expresión moléculas coestimuladoras, la producción de citocinas y la activación de la vía de las MAPKs y el factor de transcripción NF- κ B.

4. Objetivos

4.1 Objetivo general

- Determinar si la tCry1Ac induce la activación de macrófagos e identificar las vías de señalización que pueden estar participando.

4.2 Objetivos específicos

- Determinar si la tCry1Ac induce la activación de macrófagos de cultivo primario y de la línea celular RAW 264.7.

- Determinar si la tCry1Ac induce la activación de las MAPKs (ERK1/2, p38 y JNK) y el factor de transcripción NF- κ B en macrófagos RAW 264.7.

-Evaluar si las MAPKs median los efectos inducidos por la tCry1Ac en los macrófagos RAW 264.7.

5. Materiales y métodos

5.1 Obtención de tCry1Ac recombinante.

La pCry1Ac recombinante fue purificada a partir de cultivos de *Escherichia coli* (*E. coli*) JM103 (pOS9300). La cepa recombinante se hizo crecer en medio de cultivo Luria Bertani (LB) con 50 µg/mL de Ampicilina. La producción de Cry1Ac se indujo con 1 mM Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG). Una vez inducida y sobreexpresada la proteína, las células se cosecharon por centrifugación y resuspendieron en amortiguador TE (50 mM Tris-HCl-50 mM EDTA) pH 8 y posteriormente se sonicaron (Fisher Sonic Dismembrator Model 300) 3 veces por 5 min en hielo; los cuerpos de inclusión fueron recuperados por centrifugación a 10,000 g por 10 min; y la pastilla fue lavada 2 veces con amortiguador TE, 2 veces con 0.5 M de NaCl, una vez con 0.5 M de NaCl-1% Tritón X-100, una vez 0.5 M de NaCl, y una vez con agua destilada fría. El botón obtenido (pCry1Ac) fue solubilizado en amortiguador de carbonatos, pH, 9.6 con 10 mM DTT, a 37°C durante 1 hora y posteriormente activado con tripsina (1:20 w/w) durante 1 h a 37°C (Burton *et al.*, 1999). El material no solubilizado fue separado por centrifugación a 10,000 g durante 10 min, y tCry1Ac fue almacenada a 4°C, posteriormente fue examinada en gel de poliacrilamida al 10% con SDS. Una vez obtenida la tCry1Ac se elimina los restos de endotoxina al pasar la proteína por una columna de Polimixina (Affi-Prep® Polymyxin Matriz BIO-RAD 156-0010). Se verificó la ausencia restos de endotoxina con el kit de detección de endotoxina “E-TOXATE” (*Limulus amoebocyte lysate*) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) encontrándose niveles por debajo de 0.1 UE/mL. La concentración de la proteína fue determinada por el método de Bradford.

5.2 Obtención macrófagos de bazo.

Se obtuvieron células mononucleares de bazo de ratón BALB/c hembras de 6 a 8 semanas de edad. Los ratones fueron sacrificados con éter, posteriormente se le extrajo el bazo y se disgregó con una tela de organza estéril, la suspensión de células se filtró con 8 mL de RPMI-1640 suplementado con 5% de suero fetal bovino (SFB). Posteriormente los eritrocitos se lisaron con un amortiguador de lisis y se lavaron las células con medio RPMI-1640 suplementado con 10% de SFB, 2 mM L-Glutamina, 20 mM HEPES, 5 mM 2-β-mercaptoetanol, 1% aminoácidos no

esenciales y antibiótico (100 U/mL de ampicilina, 100 µg/mL de estreptomicina). Se cultivaron durante 2 horas a 37°C y 5% CO₂ en placas de cultivo de 6 pozos para permitir que los macrófagos se adhieran.

Las células adherentes fueron recuperadas y lavadas con medio RPMI-1640 suplementado con SFB al 10%. Se verificó por citometría de flujo que fueran positivas a marcadores de macrófagos como F4/80 y CD11b.

5.3 Línea celular de macrófagos RAW 264.7.

Los macrófagos de la línea celular RAW 264.7 (Mouse leukaemic monocyte macrophage cell line) se hicieron crecer en medio DMEM (Medio Esencial Mínimo de Dulbecco), suplementado con 10% SFB y antibióticos (100 U/mL de ampicilina, 100 µg/mL de estreptomicina), a 37°C en una atmósfera humidificada de 5% CO₂.

5.4. Curva de concentración de Cry1Ac

Para determinar la concentración a la cual la tCry1Ac es capaz de inducir la expresión de las moléculas coestimuladoras CD80 y CD86, 1×10^6 de células adherentes de bazo enriquecidas de macrófagos fueron cultivadas en medio RPMI-1640 suplementados con 10% de SFB en placas de 12 pozos y estimuladas con concentraciones de 0.5, 2.5, 5, 10 y 20 µg/mL de tCry1Ac o 3 µg/mL de LPS en 1 mL de medio RPMI durante 24 horas. Los macrófagos de la línea celular RAW 264.7 fueron cultivados a una concentración de 1×10^6 células en 1 mL de DEMEN suplementado con 10% de SFB y estimulados con concentraciones de 2.5, 5, 10 y 20 µg/mL de tCry1Ac o 3 µg/mL de LPS durante 24 horas. Luego fueron despegadas con un raspador (scrapers) y lavadas para posteriormente teñirlas.

5.5 Determinación de la expresión de CD80, CD86 por citometría de flujo.

La suspensión de células adherentes de bazo y los macrófagos RAW 264.7 fueron recuperados por centrifugación a 377 g durante 5 minutos a 4°C. Antes de teñirlas, para evitar la unión no específica de inmunoglobulinas, las células fueron incubadas con 1 µg/mL de CD16/32 (FcγII/III_R) en 0.5% albumina-amortiguador fosfato salino (PBS). Posteriormente las células

fueron teñidas con un anticuerpo monoclonal marcado con un fluorocromos (CD86-FITC, CD80-PECy5, ICOS-L-PE) e incubadas en la oscuridad durante 30 minutos. Las células fueron lavadas con 0.5% albumina-PBS y fijadas con 400 μ L de 1% paraformaldehido-PBS. Las intensidades de fluorescencia (IMF) fueron analizadas usando un Citómetro “FACS Calibur” (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) y BD Cell Quest Pro v.5.1.1 software leyendo 30000 eventos. Las IMF de las células marcadas con los anticuerpos monoclonales específicos, fueron calculadas y comparadas con las células no estimuladas sin teñir. Los datos obtenidos del Citómetro de flujo fueron analizados con el programa FlowJo 7.6.

5.6 Determinación de citocinas.

Los sobrenadantes de las células sin tratar y estimuladas con 20 μ g/mL tCry1Ac o 3 μ g/mL LPS fueron recuperados. Los niveles, TNF- α , MCP-1 e IL-6, IFN- γ , e IL-10 se calcularon utilizando el Kit “Cytometric Bead Array Mouse Inflammation”, siguiendo el protocolo y las instrucciones para la determinación de citocinas recomendada por el fabricante, excepto que la curva estándar se empezó una concentración de 0.625 pg/mL para poder determinar concentraciones inferiores a la curva recomendada por el fabricante. Las IMF fueron determinadas utilizando el Citómetro “FACS Calibur” y el software CB BDA.

5.7 Determinación de nitritos

La producción óxido nitroso por los macrófagos se determinó por la acumulación de nitrito en el medio y fue calculado a través del kit “Nitrate/Nitrite Colorimetric Assay” basado en la reacción de Griess, siguiendo las instrucciones del fabricante. Se recuperaron los sobrenadantes de 1×10^6 de células RAW 264.7 no tratadas y las estimuladas con 20 μ g/mL de tCry1Ac o 3 μ g/mL de LPS en 1 mL de medio DMEM sin rojo de fenol. El medio se mezcló con un volumen igual de reactivo de Griess. Las concentraciones de nitrito se determinaron por comparación de soluciones estándar de nitrito de sodio preparado en medio de cultivo celular incluido en el kit y leído a densidad óptica de 550.

5.8 Condiciones de cultivo para el análisis por Western blot

Unos de los objetivos de nuestro trabajo era caracterizar la participación de las MAPKs y el factor de transcripción NF- κ B en los macrófagos estimulados con la tCry1Ac, con este fin decidimos trabajar con la línea celular RAW 264.7 que ha sido ampliamente utilizada en estudios para la determinación de vías de señalización inducidas en macrófagos. Además de las ventajas que implica trabajar con una línea celular como es el manejo de un cultivo homogéneo, con morfología y composición uniformes, obtener con facilidad un número elevado de réplicas idéntica y el control preciso del medio ambiente, esta línea presenta el mismo haplotipo de los ratones BALB/c que es el modelo que nosotros hemos utilizado y reportado en estudios anteriores para la determinación de los efectos de las proteínas Cry en células de mamíferos.

Las MAPKs son enzimas que responden al estrés físico y químico, participan en el control de la supervivencia y adaptación de las células y están implicadas en procesos de crecimiento, diferenciación y apoptosis. ERK1/2 se han relacionado preferentemente con procesos de proliferación y diferenciación, y JNK y p38 se han relacionado más con respuestas a estrés como inflamación y apoptosis.

Para el mantenimiento y supervivencia de los macrófagos, las células RAW 264.7 se cultivaron de forma rutinaria en DMEM suplementado con 10% FBS. Sin embargo para determinar la influencia de la concentración de SFB en el medio y la activación de las MAPKs, las células se incubaron durante 12 horas con medio DMEM con concentraciones de 0, 2.5, 5 y 10% de SFB y luego se determinaron las formas fosforiladas de las MAPKs (p-ERK1/2, p-JNK y p-p38) por Western Blot. Observamos una relación directa entre la concentración de SFB y la fosforilación de las MAPKs sin cambio aparente en el fenotipo de las células donde las células cultivadas sin SFB, la activación basal de ERK1/2 era mínima sin embargo la fosforilación basal de p38 se encontraba constitutivamente activa. Así que durante nuestros ensayos para determinar si tCry1Ac inducía la activación de MAPK, se ayunaron las células durante aproximadamente 12 horas del estímulo con 5% de FBS durante 12 horas.

5.9 Determinación de la activación de las MAPKs por Western blot

Dado que el proceso de la fosforilación de las MAPKs puede ser transitorio se realizó un curso temporal donde 3×10^6 células de macrófagos RAW 264.7 se cultivaron en 1 mL de medio DMEM suplementado con 5% de FBS y se estimularon con 20 $\mu\text{g/mL}$ de tCry1Ac o 3 $\mu\text{g/mL}$ de LPS durante 5, 15, 30 y 60 minutos. Las células se recuperaron con un raspador y se lavaron una vez con PBS frío, a continuación se resuspendieron en un buffer de lisis compuesto por 50mM HEPES pH 7.0, 250mM NaCl, 5mM EDTA, 0.1% Nonidet P-40, 1mM PMSF, 0.5mM DTT, 5mM fluoruro de sodio y 0.5mM ortovanadato de sodio, aprotinina (5 $\mu\text{g/mL}$) y leupeptina (5 $\mu\text{g/mL}$), se incubaron 30 minutos a 4°C, se centrifugaron a 377 g durante 5 minutos. El sobrenadante se recuperó y se almacenó inmediatamente a -70°C hasta su análisis. La concentración de proteína se determinó por el método de Lowry modificado (Lowry *et al.*, 1951). Los extractos de células fue separado en un gel de poliacrilamida al 10% (40 μg -60 μg de proteína por carril) y transferido a una membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF). La membrana se bloqueó con una solución de leche al 5% toda la noche a 4°C y posteriormente se incubó con anticuerpos policlonal de cabra anti-ratón de las MAPKs p38, p-p38, ERK1/2 y p-ERK1/2, JNK y p-JNK todos de Cell Signalling en una dilución 1: 1000 en Tween 20/TBS (TBS-T) toda la noche a 4°C. Se lavaron las membranas con TBS-T y se incubaron con un anticuerpo secundario de proteína A peroxidada. Las bandas fueron reveladas usando WesternSure™ ECL Substrate de LI-COR Biosciences, y detectadas LI-COR C-DiGit Chemiluminescence Western Blot Scanner. El análisis de la intensidad de las bandas fue cuantificado por densitometría utilizando el software para el “C-DiGit Blot Scanner”.

5.10 Pretratamiento de las células RAW 264.7 con inhibidores de las MAPKs

Para determinar si la activación de los macrófagos inducida por tCry1Ac a través de la expresión de CD80, CD86 e ICOS-L o la producción de las citocinas proinflamatorias TNF- α , IL-6 y la quimiocina MCP-1 fue mediada a través de una vía de las MAPKs, 1×10^6 de macrófagos RAW 264.7 se pre-trataron durante 60 minutos con inhibidores específicos de las MAPK: 10 μM de PD98059 (inhibidor específico para MEK1/2-ERK1/2), 5 μM de SP600125 (inhibidor de JNK) y 10 μM de SB203580 (inhibidor de p38). Posteriormente se trataron con 20 $\mu\text{g/mL}$ de tCry1Ac o 3 $\mu\text{g/mL}$ de LPS en 1 mL de medio DMEM y se cultivaron durante 24 horas a 37°C en una

atmosfera humidificada de 5% CO₂. Las células se cosecharon y se tiñeron para el análisis por citometría de flujo, y los sobrenadantes se recuperaron para el análisis de citocinas.

5.11 Determinación de NF-κB en el núcleo por Western blot utilizando el sistema "ODYSSEY"

Para determinar si la tCryAc induce la activación de NF-κB y por ende su translocación al núcleo, 3x10⁶ células RAW 264.7 se cultivaron en placas de 6 pozos en medio DMEM suplementado con 5% de FBS, luego se estimularon con 20 μg/mL de tCry1Ac o 3 μg/mL de LPS durante 1 hora; culminado este tiempo las células se lavaron con PBS y se recuperaron con 1 mL de PBS frío con un raspador, para luego ser cosechadas por centrifugación a 377 g, 10 minutos.

Los extractos nucleares se obtuvieron al re-suspender las células en un buffer hipotónico (10 mM HEPES, pH 7.9, 1.5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 0.2 mM PMSF, 0.5 mM DTT, 10 mg/mL aprotinina) y se incubaron por 15 minutos. Se lisaron adicionando 0.1% Nonidet P-40 y se agitaron en vortex durante 10 segundos. Los núcleos se obtuvieron luego de centrifugar la muestra a 1677 g por 1 minuto y se re-suspendieron en un buffer hipertónico compuesto por 20 mM HEPES, pH 7.9, 25% glicerol, 400 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM EDTA, 0.5 mM DTT, 1mM NaF, 1mM ortovanadato de sodio. Ambos lisados de citoplasma y núcleo se guardaron inmediatamente a -70°C hasta su posterior análisis.

Los lisados de núcleo y citoplasma de las células no tratadas y tratadas con 20 μg/mL de tCry1Ac, se separaron por electroforesis en un gel de poliacrilamida al 10% y transfirieron a una membrana de PVDF. La membrana se bloqueó con una solución de leche al 5% toda la noche a 4°C. Luego se incubó durante 2 horas con el anticuerpo primario (anti-actina, anti- histona 4, o anti anti-p50 y anti-p65 NF-κB) en una dilución 1:1000. Las transferencias se lavaron 4 veces con TBS-T y se incubaron con IgG anti-conejo marcado con IRDye 800CW (verde) a una dilución 1:20,000 e IgG anti-cabra marcado con Cy5 (rojo) en una dilución 1:5000, como anticuerpos secundarios. Las membranas se lavaron con PBS y las proteínas se analizaron mediante "Sistema Odyssey Infrared Imaging" (LI-COR, Lincoln, NE) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

5.12 Ensayos de fluorescencia para la detección de NF-κB.

Un total de 5×10^4 células RAW 264.7 fueron tratadas con $20 \mu\text{g/mL}$ de tCry1Ac o $3 \mu\text{g/mL}$ de LPS en $200 \mu\text{L}$ DMEM suplementado con 10% SFB en laminillas Lab-Tek de 8 pozos y se incubaron durante 1 hora a 37°C , a continuación, los macrófagos se lavaron con PBS y se fijaron con paraformaldehído al 4% en PBS durante 25 minutos. Las células se lavaron con PBS y se permeabilizaron con 0.1% Triton X-100 en PBS durante 15 minutos a temperatura ambiente. Las células se lavaron nuevamente y bloquearon con albumina al 1% durante 20 minutos. Las subunidades de NF-κB se visualizaron por incubación con un anticuerpo primario específico contra p50 o p65 durante 1 hora, luego se incubaron con un anticuerpo secundario marcado con Cy5 durante 1 hora a temperatura ambiente. El ADN nuclear se tiñó con TO-PRO 3. Al final se lavaron las células, se dejaron secar, los portaobjetos se montaron en Vectashield, cubierto con un cubreobjetos de vidrio, y se examinó bajo un microscopio Confocal Leica TCS/SP2 con 63x de objetivos.

5.13 Análisis estadístico

El análisis estadístico de los niveles de citocinas, moléculas coestimuladoras y análisis de densitometría se realizó con el programa GraphPad Prism (GraphPad versión 5.03, San Diego, California, EE.UU). Las diferencias significativas entre los grupos fueron analizadas por la prueba U de Mann Whitney o la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis con una corrección *post hoc* con la prueba de comparaciones múltiples de Dunn. Los valores de $p < 0,05$ fue considerado significativo.

6. Resultados

6.1 La tCry1Ac induce sobreexpresión de las moléculas coestimuladoras CD80 y CD86 en macrófagos de cultivo primario.

Para evaluar si la tCry1Ac era capaz de activar macrófagos a través de expresión de moléculas coestimuladoras, las células adherentes de bazo enriquecidas de macrófagos fueron estimuladas a concentraciones de 0.5, 2.5, 5, 10 y 20 $\mu\text{g/mL}$ de tCry1Ac o 3 $\mu\text{g/mL}$ de LPS en 1×10^6 células en 1 mL de medio. Después de 24 horas de incubación las células fueron despegadas y se determinó la expresión de las moléculas coestimuladoras CD80 y CD86.

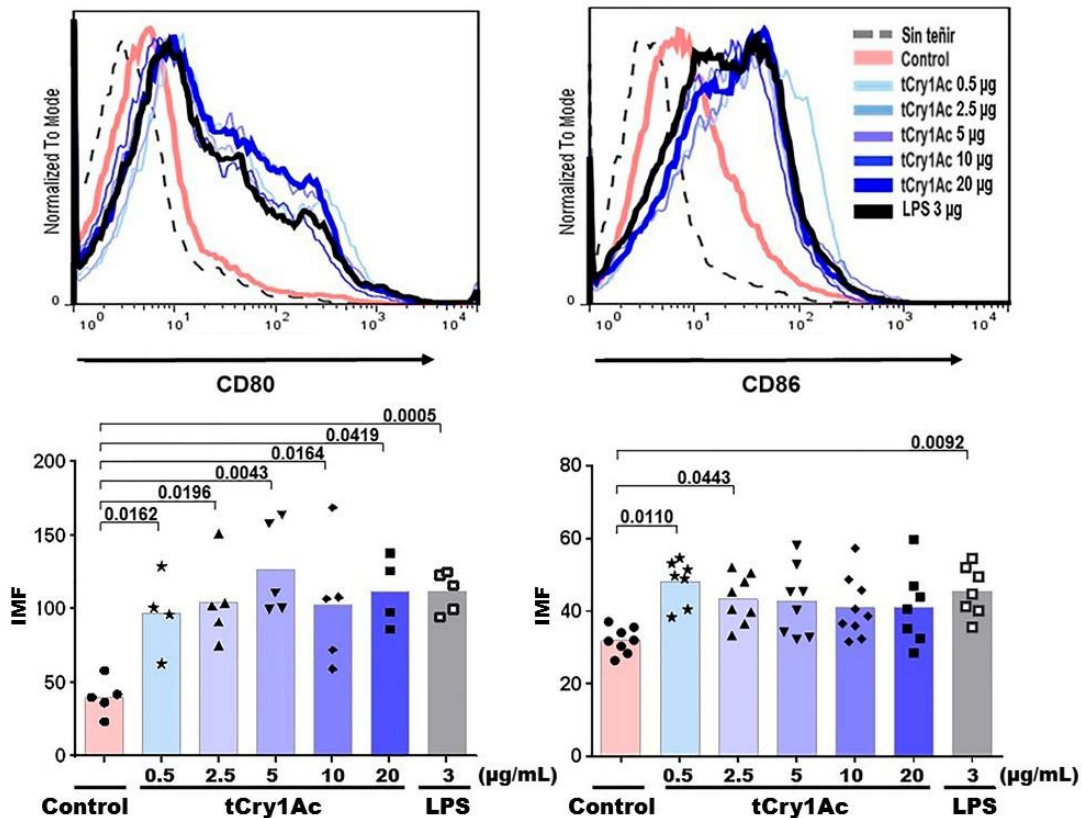


Figura 5. Efectos de la tCry1Ac y LPS sobre la expresión de las moléculas coestimuladoras CD80 y CD86 en células adherentes de bazo. Se cultivaron 1×10^6 células/mL con 0,5, 2,5, 5, 10 y 20 $\mu\text{g/mL}$ de tCry1Ac (barras azules) o 3 $\mu\text{g/mL}$ de LPS (barra gris) durante 24 horas. Las células se recuperaron y fueron teñidas con anticuerpos CD80-PECy5 y CD86-FITC para su análisis por FACS. Se muestran los histogramas representativos de la expresión de CD80 y CD86 habiendo escogido previamente la población CD11b⁺ (pertenecientes a la población de macrófagos). Los gráficos de barras representan los media de los valores de las intensidades media de fluorescencia (IMF) de experimentos independientes, * $p < 0.05$ contra el grupo control. Los datos se analizaron mediante una prueba no paramétrica (U de Mann Whitney).

Observamos que la tCry1Ac induce la sobreexpresión de CD80 y CD86 desde concentraciones de 0.5 µg/mL (0.87×10^{-8} M) en células adherentes de bazo enriquecidas de macrófagos y los valores de intensidad media de fluorescencia fueron similares a los obtenidos cuando las células fueron estimuladas con LPS. Así mismo, tCry1Ac como el LPS inducen mayor sobreexpresión de CD80 que de CD86, alcanzando valores promedio de IMF cercanos a 100. Por otro lado, observamos diferencias estadísticamente significativas en la sobreexpresión de CD80 inducidas en todas las concentraciones evaluadas de tCry1Ac, a diferencias de la expresión de CD86 que no se observa diferencias significantivas en células tratadas con dosis superiores a 5 µg/mL (8.73×10^{-8} M), a pesar que los valores de intensidad media se mantuvieron similares a los alcanzados con LPS (figura 5).

6.2 La tCry1Ac induce la secreción de citocinas proinflamatorias IL-6, TNF- α en macrófagos de cultivo primario

Se determinó si la tCry1Ac inducía la producción de citocinas proinflamatorias IL-6 y TNF- α en los sobrenadantes de cultivos de macrófagos de bazo que fueron tratados o no tratados con la tCry1Ac o LPS durante 24 horas. Tanto tCry1Ac como LPS indujeron significativamente la secreción de TNF- α y IL-6, en comparación con las células control no estimuladas ($p < 0.05$) (figura 6). Lo que indica junto con la capacidad de la tCry1Ac de inducir la expresión de las moléculas coestimuladoras CD80 y CD86, que la tCry1Ac es capaz de inducir la activación de macrófagos de cultivo primario.

También se evaluó la concentración de la quimiocina MCP-1, IFN- γ , IIL-10 y nitritos en sobrenadantes de las células de cultivo primario sin tratar y tratada con tCry1Ac, sin embargo en el caso de MCP-1 no se observaron cambios significativos en las concentraciones de estas moléculas entre las células estimuladas con respecto a las no tratadas y en el caso de IFN- γ , IIL-10 y nitritos, no se encontraron concentraciones medibles de estas citocinas en los sobrenadantes de las células (Datos no mostrados).

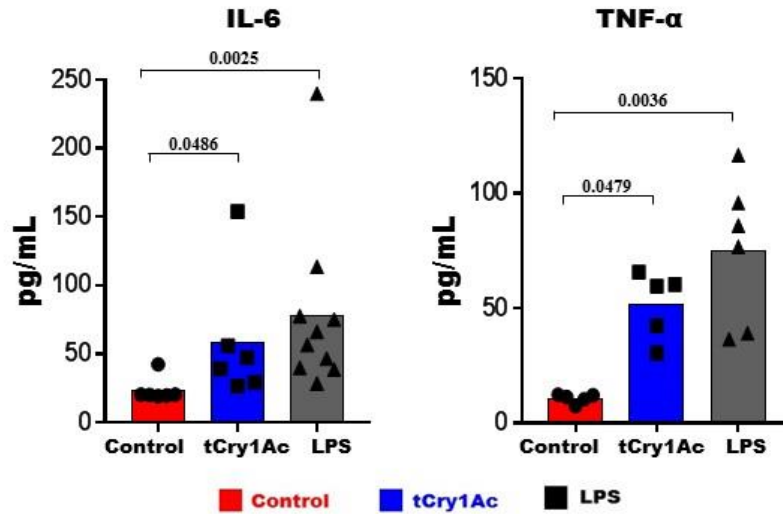


Figura 6. Efectos de la tCry1Ac en la producción de citocinas pro-inflamatorias IL-6 y TNF- α en macrófagos de bazo. Se determinaron los niveles de citocinas IL-6 y TNF- α en los sobrenadantes de los macrófagos de bazo no tratados (control) y estimulados durante 24 horas con tCry1Ac (5 μ g/mL) o LPS (3 μ g/mL). Los niveles de citocinas pro-inflamatorias fueron evaluados por citometría de flujo utilizando un kit de Biobeads BD. Las gráficas barras muestran la media de los valores de la concentración de citocinas expresada en pg/mL de experimentos independientes, *p < 0.05 con respecto al control. Los datos fueron analizados por una prueba no paramétrica ANOVA de una vía (Kruskal-Wallis) seguido por el test post hoc de Dunn.

6.3 La tCry1Ac induce la expresión de moléculas coestimuladoras CD80 y CD86 en la línea celular de macrófagos RAW 264.7

Para determinar que vías de señalización podían estar participando en los efectos inducidos por la tCry1Ac en la activación de macrófagos, se decidió trabajar con la línea celular de macrófagos RAW 264.7, sin embargo antes se requería determinar si la tCry activaba los macrófagos de esta línea celular ejerciendo los mismos efectos que se había observado que inducían en los macrófagos de cultivo primario. Primero se necesitó determinar las concentraciones de tCry1Ac necesaria para inducir la expresión de las moléculas coestimuladoras y la producción de citocinas proinflamatorias. Así que las células RAW 264.7 fueron estimuladas con diferentes concentraciones (2.5, 5, 10 y 20 μ g/mL) de tCry1Ac o 3 μ g/mL de LPS en 1×10^6 células/mL de DMEM. Después de 24 horas de incubación, las células se centrifugaron a 377 g durante 5 minutos y se tiñeron con anticuerpos específicos marcados con diferentes fluorocromos (anti CD80-Cy5, anti CD86-FITC y ICOS-L-PE) y se analizaron por citometría de flujo (figura 7).

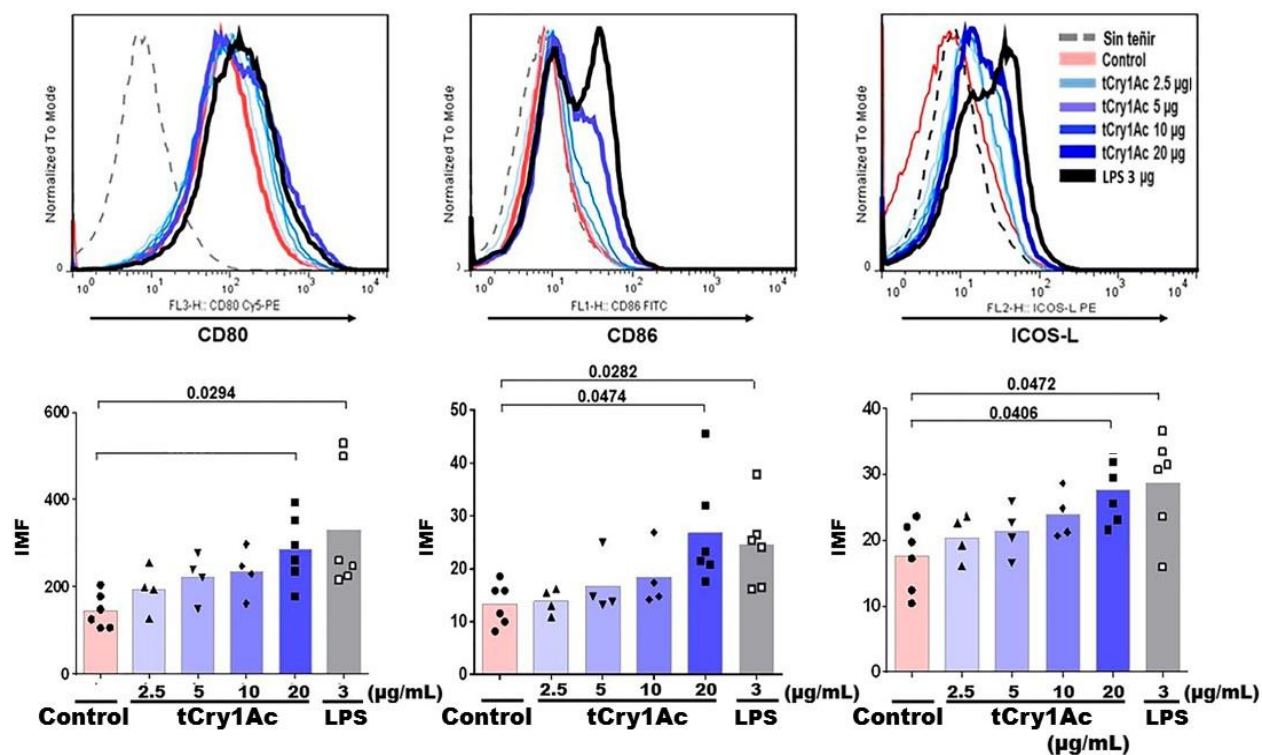


Figura 7. Efectos de la tCry1Ac y LPS en la expresión de las moléculas coestimuladoras CD80, CD86 y ICOS-L en células de la línea RAW 264.7. Las células (1.0×10^6 células/mL) se estimularon con diferentes dosis de tCry1Ac (2,5, 5, 10 y 20 $\mu\text{g/mL}$; barras azules) o 3 $\mu\text{g/mL}$ LPS (barra gris) durante 24 horas. Posteriormente se recuperaron y se tñieron para su análisis por FACS. Se muestran los histogramas representativos de la expresión de CD80, CD86 y ICOS-L. Los gráficos de barras representan la media de los valores de las intensidades media de fluorescencia (IMF) de experimentos independientes, * $p < 0.05$ contra el grupo control. Los datos se analizaron mediante una prueba no paramétrica (U de Mann Whitney).

La tCry1Ac también es capaz de activar las células RAW 264.7, ya que indujo un incremento sobre la superficie de las células de las moléculas CD80, CD86 y ICOS-L. A pesar que se observa una tendencia a aumentar la expresión de las moléculas coestimuladoras dependiente de la dosis desde que se estimula las células con 5 μg de tCry1Ac, se necesita una mayor concentración de tCry1Ac (20 $\mu\text{g/mL}$) para lograr una diferencia estadísticamente significativa sobre el control no estimulado (figura 7). La necesidad de esta concentración más alta necesaria para inducir la activación de los macrófagos RAW 264.7 puede ser por la elevada tasa de crecimiento y estrés que las líneas celulares normalmente sufren durante el cultivo. También observamos que en condiciones basales, la expresión de CD80 era considerablemente mayor en las células RAW 264.7 (IMF = 150) que en los macrófagos de cultivo primario (IMF = 40), lo que

sugiere que CD80 se encuentra constitutivamente expresada en la línea celular de RAW 264.7, como se ha reportado anteriormente (Moreno-Fierros *et al.*, 2013).

En vista de estos resultados, entonces decidimos realizar nuestros siguientes ensayos en células RAW 264.7 estimulando a las células con una concentración de 20 $\mu\text{g/mL}$ (34.9×10^{-8} M) de tCry1Ac, que es la concentración que provocó una activación significativa en la expresión de las moléculas coestimuladoras.

A pesar que se ha reportado que la pCry1Ac es capaz de inducir la expresión de moléculas coestimuladoras en células de cultivo primario de bazo y de la línea celular de macrófagos RAW 265.7 desde concentraciones de 5 $\mu\text{g/mL}$ (3.97×10^{-8} moles/L) (Moreno-Fierros *et al.*, 2013a), es necesario hacer estos experimentos en conjunto ambas proteínas (tCry1Ac y pCry1Ac) para establecer una comparación más real entre ellas.

6.4 La tCry1Ac induce la secreción de citocinas proinflamatorias IL-6, TNF- α y MCP-1 y aumenta la producción de nitritos en los macrófagos RAW 264.7.

Se determinó la producción de citocinas proinflamatorias y nitritos de los sobrenadantes de los cultivos de células RAW 264.7 tratadas y no tratadas con la tCry1Ac o LPS durante 24 horas.

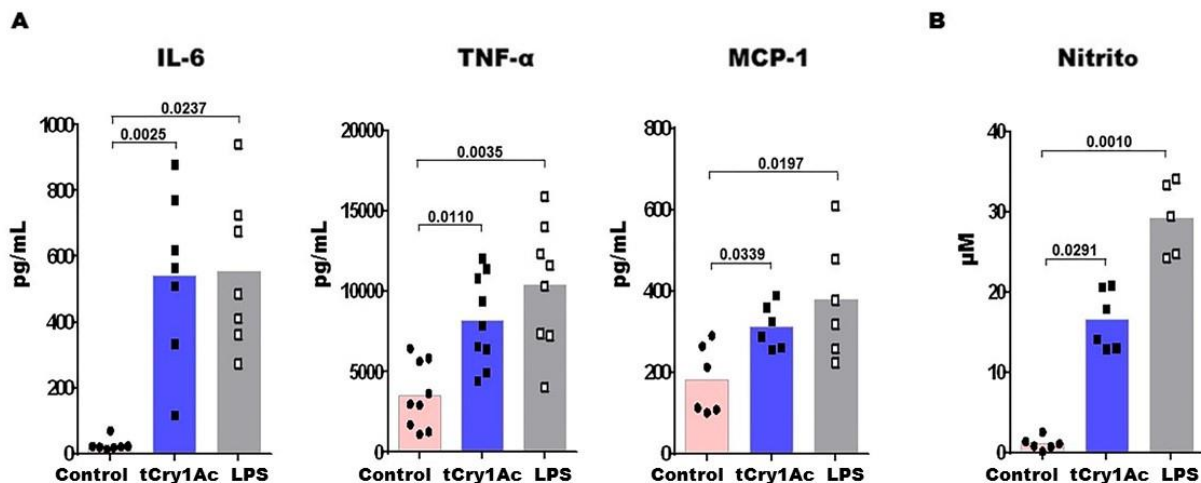


Figura 8. Efectos de la tCry1Ac en la producción de citocinas pro-inflamatorias y nitritos en células RAW 264.7. Se determinaron los niveles de citocinas IL-6, TNF- α y MCP-1 (A) y nitritos (B) en los sobrenadantes de los macrófagos RAW 264.7 no tratados (control) y estimulados durante 24 horas con tCry1Ac (20 $\mu\text{g/mL}$) o LPS (3 $\mu\text{g/mL}$). Los niveles de citocinas pro-inflamatorias fueron evaluados por citometría de flujo utilizando un kit de Biobeads BD, y los nitritos se midieron usando un ensayo de Griess. Las gráficas barras muestran la media de la concentración en pg/mL de experimentos independientes, * $p < 0.05$ con respecto al control. Los datos fueron analizados por una prueba no paramétrica, ANOVA de una vía (Kruskal-Wallis) seguido por el test post hoc de Dunn.

Ambos, la tCry1Ac y el LPS indujeron significativamente la secreción de TNF- α , IL-6 y MCP-1 y la producción de NO, en comparación con las células control no estimuladas ($p < 0,05$) (figura 8), que apoya aún más la capacidad de la tCry1Ac para activar macrófagos.

6.5 La tCry1Ac induce la fosforilación de las MAPKs p38, JNK y ERK1/2.

Para determinar si las MAPKs ERK1/2, JNK y p38 estaban involucradas en la activación de macrófagos inducidos por la tCry1Ac, las células RAW 264.7 se lisaron después de 5, 15, 30 y 60 minutos de estimuladas con 20 $\mu\text{g/mL}$ de tCry1Ac o 3 $\mu\text{g/mL}$ de LPS, posteriormente los lisados se analizaron por Western blot.

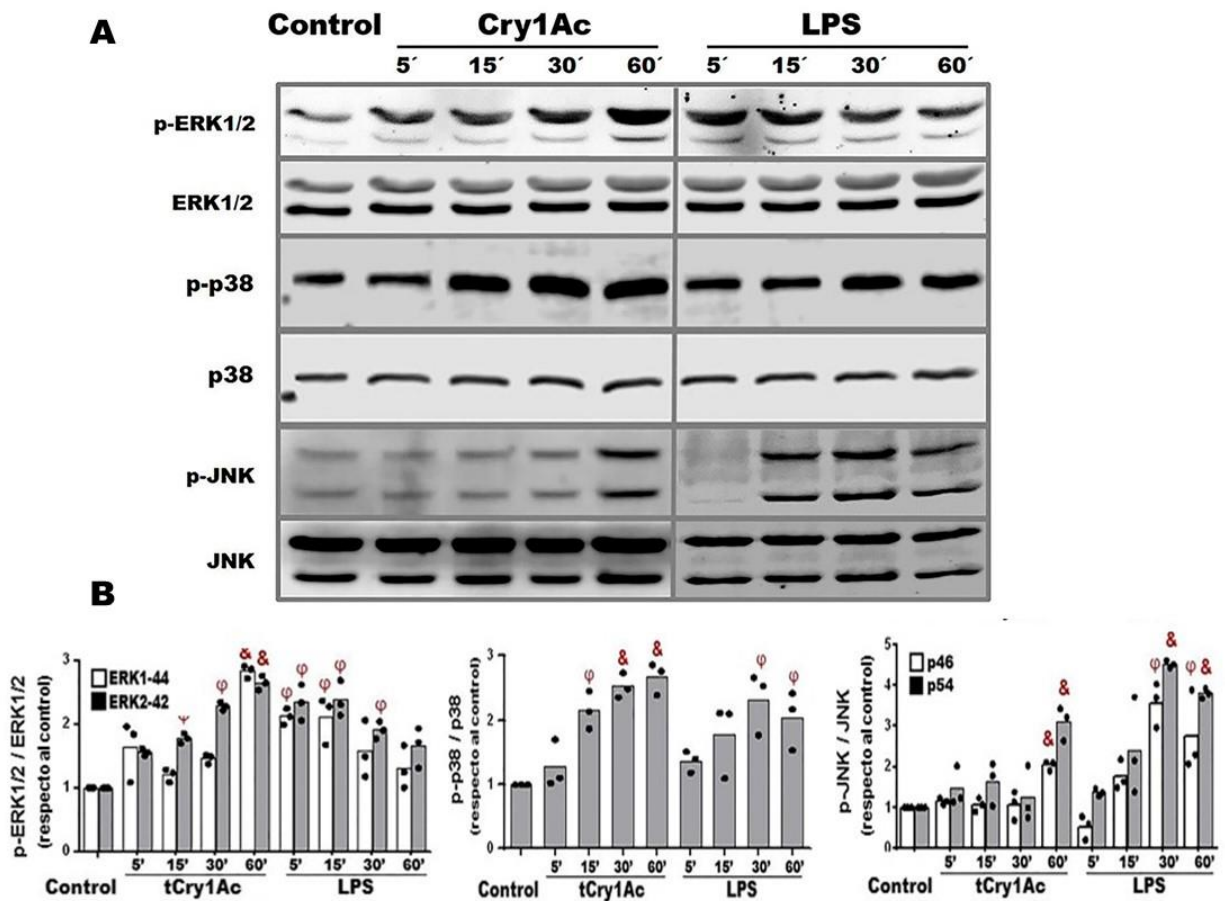


Figura 9. La tCry1Ac induce la fosforilación de las MAPKs ERK1/2, p38 y JNK. A) Western blot representativo de lisados de células RAW 264.7 sin tratar y tratadas con 20 $\mu\text{g/mL}$ de tCry1Ac o 3 $\mu\text{g/mL}$ LPS en medio DMEM durante 5, 15, 30 y 60 minutos. Los niveles de ERK1 / 2, p38, y JNK fosforilados (p) se detectaron usando anticuerpos específicos para p-ERK1/2 y ERK1/2, p-p38 y p38, y p-JNK y JNK. B). Las gráficas de barra muestran la cuantificación por densitométrica de las bandas de Western de tres experimentos independientes y se expresan como la media de la proporción de los valores fosforilados /no fosforilados con respecto al control, * $p < 0.05$, y $\&$ $p < 0.01$. Los datos se analizaron mediante una prueba no paramétrica (U de Mann Whitney).

Como se muestra en la figura 9, tanto la tCry1Ac como el LPS inducen la fosforilación de ERK1/2 fosforilación. Sin embargo, el tiempo en que promueven la activación es distinto, por ejemplo en el caso de la tCry1Ac, la activación aumenta con el tiempo y alcanza un máximo después de 1 hora del estímulo, mientras que en el caso de LPS, después de los primeros 5 minutos de la activación se inicia un descenso lentamente de la fosforilación de ERK1/2. Del mismo modo, tCry1Ac y LPS inducen un aumento en la fosforilación de p38, pero la tCry1Ac induce la fosforilación de p38 más rápido (15 min) que el LPS (30 min), de igual manera el tiempo en que se observa la activación de JNK inducida por la tCry1Ac y el LPS es notablemente diferente, ya que la activación de JNK inducida por la tCry1Ac tardó casi una hora, pero en el caso de LPS, ocurre dentro de los 15 minutos.

La tCry1Ac como el LPS, inducen la fosforilación de las cinasas ERK1/2, p38 y JNK, lo que sugiere que estas MAPKs están involucrados en los procesos de activación inducidas por ambas moléculas en macrófagos RAW 264.7.

6.6 La sobreexpresión de CD80 inducida por la tCryAc en las células RAW 264.7 disminuye por el inhibidor de p38.

Con el fin de determinar si las vías de las MAPKs participaban en la expresión de las moléculas coestimuladoras CD80, CD86 y ICOS-L inducidas por las tCry1Ac, se evaluó la expresión de estas moléculas coestimuladoras cuando las células fueron estimuladas con tCry1Ac o LPS en presencia de los inhibidores de MAPKs: MEK1/2-ERK1/2 (PD-098059), JNK (SP600125) y p38 (SB203580). Como se muestra en la figura 10, la sobreexpresión de CD80 inducida por la tCry1Ac y LPS, disminuyó con el inhibidor de p38 (SB203580), mientras que al pre-tratar las células con el inhibidor de MEK1/2-ERK1/2 se observó un incremento en la sobreexpresión de ICOS-L. Por lo tanto, de manera similar a LPS, tCry1Ac induce la expresión de CD80 principalmente a través de la vía MAPK p38 en las células RAW 264.7. Este resultado también nos sugiere que la activación de JNK y ERK1/2 inducida por tCry1Ac no ocurre río arriba de la activación inducida hacia p38, que puede ser de manera paralela o río abajo de esta vía y que su contribución a la sobre la expresión de CD80 es muy poco en comparación con la que proviene de la vía de p38. A diferencia de la sobreexpresión de CD80, la sobreexpresión de CD86 inducida por tCry1Ac o el LPS no fueron afectados por los inhibidores de las MAPKs utilizados.

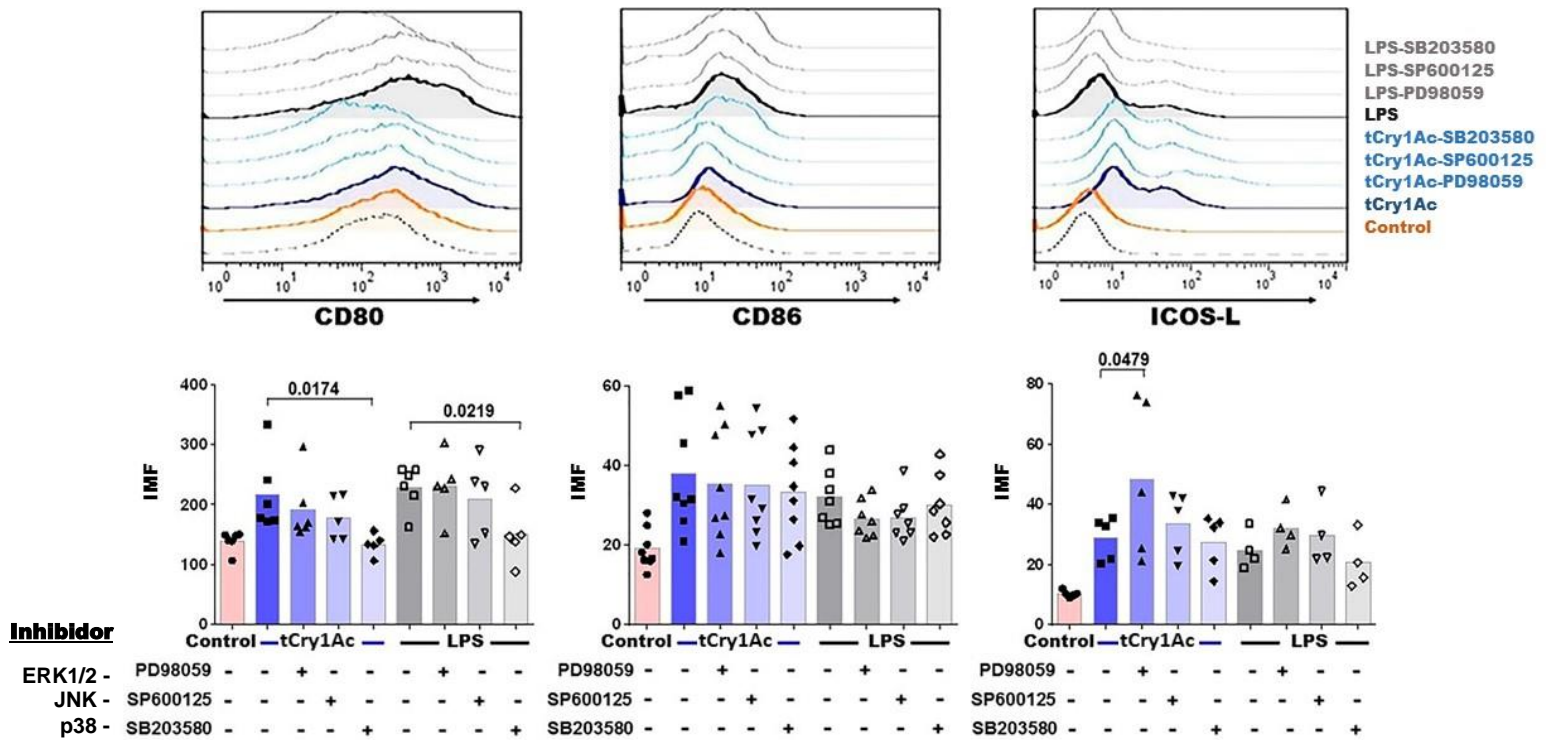


Figura. 10. Efectos de los inhibidores específicos de las MAPKs ERK1/2, p38 y JNK en la sobreespresión de la moléculas coestimuladoras CD80 y CD86 e ICOS-L inducidas por tCry1Ac o LPS en los macrófagos RAW 264.7. Las células se dejaron sin tratar (-) o se trataron previamente (+) durante 1 hora con inhibidores de MEK1/2-ERK1/2 (PD098059), JNK (SP600125) y p38 (SB203580), posteriormente se estimularon con la tCry1Ac (20 µg/mL/1×10⁶ células /mL) o LPS (3 µg/mL/1×10⁶ células/mL) y se cultivaron durante 24 horas a 37°C. Se muestran los histogramas representativos de FACS de CD80, CD86 y ICOS-L. Las gráficas de barra muestran la media de las intensidades medias de fluorescencia (IMF) de la población total de experimentos independientes. *p <0.05 con respecto al control. Los datos fueron analizados por una prueba no paramétrica, ANOVA de una vía (Kruskal-Wallis) seguido por el test post hoc de Dunn.

6.7 La sobreproducción de IL-6, TNF-α en macrófagos RAW 264.7 es inhibida al utilizar el inhibidor específico de la MAPK p38.

Para determinar si el aumento en la producción de citocinas proinflamatorias inducidas por la tCry1Ac estaba mediada por la vía de las MAPKs, los sobrenadantes de las células RAW 264.7 que fueron pre-tratadas durante una hora con inhibidores de las MAPKs: MEK1/2-ERK1/2 (PD-098059), JNK (SP600125 y p38 (SB203580) y luego estimuladas con la tCry1Ac o LPS durante 24 horas fueron recolectados. Posteriormente se determinó la concentración de las citocinas proinflamatorias de IL-6, TNF-α y la quimiocina MCP-1 y se comparó con las células estimuladas con tCry1Ac sin el uso de inhibidores.

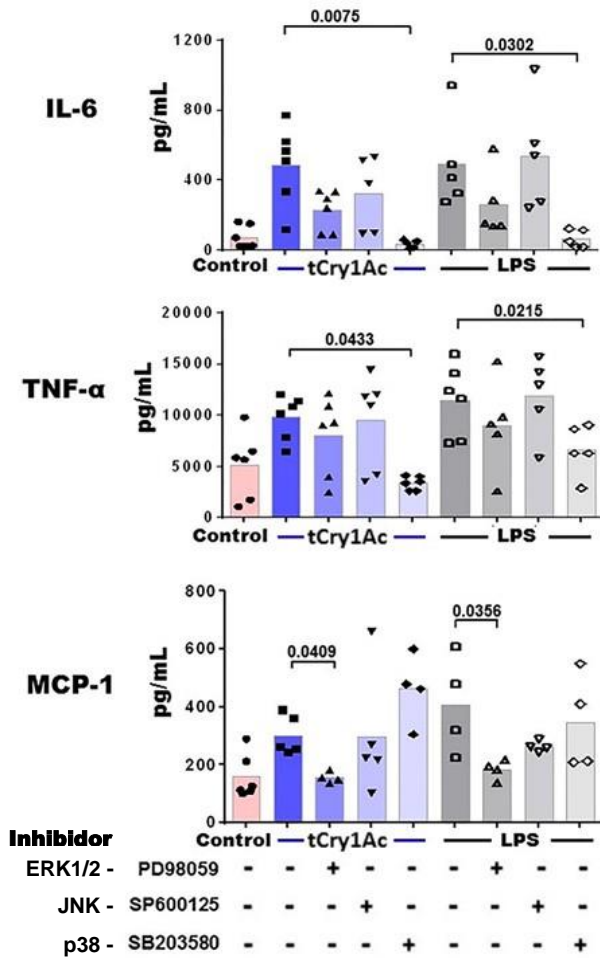


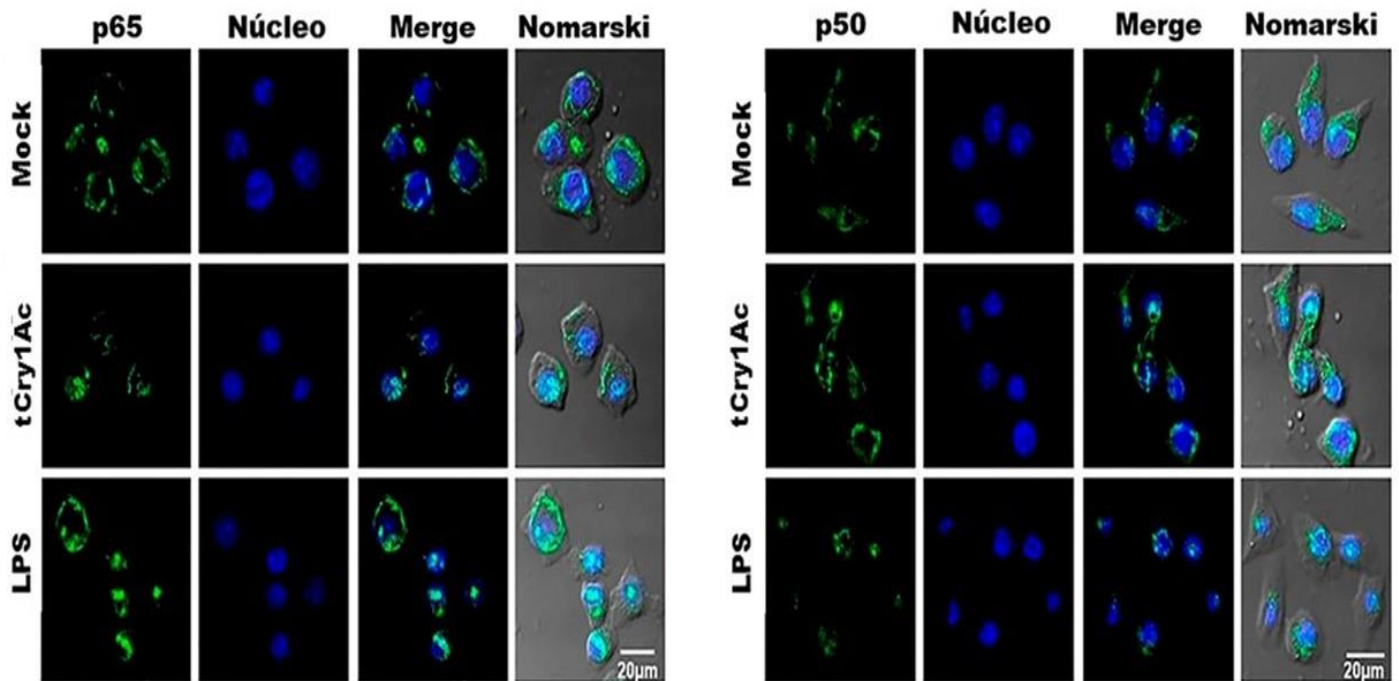
Figura 11. tCry1Ac media la producción de las citocinas pro-inflamatorias TNF- α y la IL-6 a través de la vía de la MAPK p38 y la producción de MCP-1 a través de la vía de la MAPK ERK1/2 en macrófagos RAW 264.7. Las células se dejaron sin tratar (control) o pre-trataron durante 1 hora con los inhibidores de las MAPKs: MEK1/2-ERK1/2 (10 M PD98059), JNK (5 M SP600125) y p38 (10 M SB203580). Las células se estimularon posteriormente con tCry1Ac (20 μ g/1 \times 10⁶ células/mL) o LPS (3 μ g/1 \times 10⁶ /mL) y se cultivaron durante 24 horas a 37°C. Se recuperaron los sobrenadantes, y se evaluaron los niveles de citocinas proinflamatorias utilizando el kit “CBA Mouse Inflammation”. Las gráficas de barra muestran la media de los niveles de citocinas en el sobrenadante de la población total expresados en pg/mL de experimentos independientes. *p <0.05 con respecto a las células estimuladas con tCry o LPS sin ser pre-tratadas con el inhibidor. Los datos fueron analizados por una prueba no paramétrica, ANOVA de una vía (Kruskal-Wallis) seguido por el test post hoc de Dunn.

Nuestros resultados sugieren que la producción de IL-6, MCP-1 y TNF- α inducidos por tCry1Ac fue diferente manera por la vía de las MAPKs. La producción de IL-6 y TNF- α inducida por la tCry1Ac o el LPS se redujo principalmente por el inhibidor de p38, lo que indica que esta vía media la sobreproducción de IL-6 y TNF- α inducida por tCry1Ac (figura 11).

Las células pre-tratadas con el inhibidor de MEK1/2-ERK1/2 disminuyó la sobre producción de MCP-1 inducida por tCry1Ac y el LPS, lo que indica que la vía de la MAPK ERK1/2 está implicada en la producción de MCP-1 en macrófagos estimulados con la tCry1Ac y LPS.

6.8 La tCry1Ac induce la translocación nuclear de las subunidades p65 y p50 de NF- κ B

El factor de transcripción NF- κ B se localiza de manera basal en el citoplasma formado por un complejo proteico de manera más abundante por el heterodímero p50 y p65 y la proteína



B

Figura 12. La tCry1Ac promueve la translocación nuclear de NF-κB en los macrófagos RAW 264.7. A) Las células se trataron con 20 μg/mL de tCry1Ac o 3 μg/mL de LPS y se cultivaron durante 1 hora a 37°C, se separó las fracciones nucleares y citosólicas. Se realizó un inmunoblot con anticuerpos específicos anti-p50 y anti p65; los anticuerpos anti-actina y anti-histonas se utilizaron como controles internos para las fracciones citoplasmáticas y nucleares, respectivamente. Se muestra un Western blot para las fracciones nucleares y citoplasmáticas, respectivamente y un gráfico de barra donde se muestra el análisis densitométrico del Western blot de NF-κB p50 y p65. Los valores fueron normalizados a histona 4 (H4) o actina de las fracciones nucleares y citoplasmáticas, respectivamente. B) tCry1Ac promueve la translocación nuclear de NF-κB en las células RAW 264.7 observado por un ensayo de fluorescencia. Los macrófagos se dejaron sin tratar o se trataron con tCry1Ac o LPS (5×10^5 células/200 μL) durante 1 hora. tCry1Ac se tiñó con fluoresceína (verde), y el ADN nuclear se tiñó con TO-PRO 3 (azul). Las diapositivas fueron observadas por microscopía confocal. Barra de escala: 20 μm.

7. Discusión

Las proteínas Cry1Ac se han utilizado ampliamente como biopesticidas (Sansinenea, 2012), y se expresan como toxinas truncadas y/o modificadas en plantas transgénicas para el consumo humano y animal. Sin embargo, sus efectos en los mamíferos no ha sido completamente evaluado, y la mayoría de los estudios se han centrado principalmente en evaluar la seguridad y la toxicidad de la proteína (Rubio-Infante and Moreno-Fierros, 2016) .

Previamente, nuestro grupo de investigación reportó que la pCry1Ac es un potente inmunógeno y adyuvante de vacunas de mucosas y que unos de los mecanismos por la cual ejercer

su efecto inmunoestimulador es a través de la activación de macrófagos. Se observó que era capaz de inducir la expresión de moléculas coestimuladoras CD80 y CD86 e inducir la producción de citocinas proinflamatorias TNF- α , IL-6 y MCP-1 después de administrar la pCry1Ac por vía intranasal e intraperitoneal en ratones BALB/c y evaluar la respuesta en diferentes sitios de mucosas (Moreno-Fierros *et al.*, 2013).

Al determinar las coordenadas cristalográficas de la pCry1Ac (Evdokimov *et al.*, 2014), se observó que presentan 7 dominios en su estructura, de los cuales los dominios I, II y III coinciden con los tres dominios estructurales que conforman a la tCry1Ac, es decir, que la tCry1Ac constituye la mitad de la región N-terminal en la secuencia y estructura de la pCry1Ac (figura 13). En un estudio previo, se observó que la mitad N-terminal de pCry1A era importante en las propiedades inmunogénicas de la proteína, ya que la mayoría de los anticuerpos inducidos en suero en ratones inmunizados con pCry1Ac estaban dirigidos hacia la región de la toxina (Guerrero *et al.*, 2004), lo que sugiere que la toxina es importante en la capacidad de la protoxina de activar macrófagos. En este trabajo, se muestra por primera vez que la tCry1Ac también es capaz de activar los macrófagos a través de inducir la sobreexpresión de las moléculas coestimuladoras CD80 y CD86, la sobreproducción de citocinas proinflamatorias TNF- α , IL-6, la quimiocina MCP-1 y la producción del NO.

Aunque tanto tCry1Ac como pCry1Ac son capaces de activar los macrófagos, se observan diferencias en los efectos por los cuales llevan a cabo la activación. En primera instancia, aunque observamos que con 0.5 $\mu\text{g/mL}$ la tCry1Ac induce la expresión de CD80 en cultivo primario se necesita una concentración de 20 $\mu\text{g/mL}$ (34.9×10^{-8} moles/L) para inducir la expresión de las moléculas coestimuladoras en macrófagos RAW 264.7, lo que representa 9 veces más la concentración molar mínima que se ha reportado que necesita la pCry1Ac para inducir la activación de los macrófagos RAW 264.7 que es de 3.97×10^{-8} moles/L (5 $\mu\text{g/mL}$). Al ser la pCry1Ac una proteína de mayor tamaño (con aproximadamente 507 residuos de más que la tCry1Ac), se podría pensar que esta proteína contiene en su estructura mayor cantidad de epítopes necesario para inducir una respuesta y por lo tanto se necesitaría menor concentración de esta proteína con respecto a la tCry1Ac para inducir la activación de macrófagos y posiblemente para ejercer su acción adyuvante. Aunque sería necesario validarlo a través de los ensayos correspondientes, de la misma manera que

sería interesante determinar en qué parte de las estructuras de las proteínas Cry se encuentran los epítopes inmunogénicos y protectores.

En un trabajo previo de nuestro grupo, se sugirió la participación de la vía de las MAPKs en la sobreexpresión de las moléculas coestimuladoras y producción de citocinas proinflamatorias inducidas por la pCry1Ac en macrófagos de la línea celular RAW 264.7, ya que se observó una inhibición parcial de los efectos inducidos por la pCry1Ac después de haber pre-tratado las células con los inhibidores de las MAPKs MEK1/2- ERK1/2 y p38 (Moreno-Fierros *et al.*, 2013b). Sin embargo, no se evaluó si la pCry1Ac inducía la fosforilación de las MAPKs por Western blot, como se ha realizado en el presente estudio con la tCry1Ac, donde se demostró que la estimulación de las células RAW 264.7 con tCry1Ac indujo la fosforilación de las cinasas ERK1/2, p38 y JNK y promovió la translocación nuclear de las subunidades p50 y p65 de NF- κ B. Además nuestros datos indican también la participación de las vías de MAPK en la activación de macrófagos de la línea celular RAW 264.7 al utilizar inhibidores específicos de esta vía.

Observamos que p38 y ERK1/2 son las cinasas que median principalmente los efectos inducidos por tCry1Ac en macrófagos RAW 264.7 al pre-tratar las células con los inhibidores específicos de las MAPKS, donde la sobreexpresión de CD80 y la producción de citocinas IL-6 y TNF- α fueron reducidas significativamente por el inhibidor de p38 (SB203580), mientras que el inhibidor de MEK1/2-ERK1/2 aumentó la sobreexpresión de ICOS-L y la producción de MCP-1. Sin embargo las tres MAPKs ERK1/2, JNK y p38 median los efectos inducidos por pCry1Ac en macrófagos, donde ERK1/2 media la sobreexpresión de CD80, CD86 y producción de MCP-1, JNK media la sobreproducción de TNF- α y MCP-1 y p38 participa en la sobreexpresión de CD86 y la producción de las citocinas proinflamatorias IL-6, TNF- α y la quimiocina MCP-1 (Tabla 1). Lo que nos indica, que a pesar que la tCry1Ac es importante como parte de la estructura de pCry1Ac en su mecanismo inmunogénico, la mitad C-terminal de la pCry1Ac (Dominios IV, V, VI, VII) o la proteína total de pCry1Ac es importante en su mecanismo inmunoestimulador.

Al comparar la magnitud de los efectos de activación inducidos por tCry1Ac con el LPS (una molécula que ha sido ampliamente caracterizada por su habilidad de activar los macrófagos, e inducir las vías de las MAPKs y el factor de transcripción NF- κ B) (Rao, 2001; Tada *et al.*, 2013), observamos que la tCry1Ac induce la sobreexpresión de CD80 y CD86 y la producción de citocinas

proinflamatorias en los macrófagos a niveles similares a los alcanzados con el LPS. Sin embargo, cuando comparamos la fosforilación ERK1/2, p38 y JNK inducidas por LPS o tCry1Ac, observamos que muestran diferentes tiempos de activación y magnitud en la respuesta, lo que sugiere que estas moléculas pueden estar actuando por diferentes mecanismos de activación (figura 9).

Nuestros resultados que muestran la participación de las MAPKs y NF- κ B en los efectos relacionados con la activación de macrófagos inducida por tCry1Ac, coinciden con lo ya descrito, en que diversos efectos inducidos durante la activación de los macrófagos están mediados por las vías MAPKs y NF- κ B (Arthur and Ley, 2013; Jeffrey *et al.*, 2007) y además que las vías de MAPK activan las subunidades p50/p65 de NF- κ B (Guha and Mackman, 2001); el cual es necesario para la transcripción de muchas citocinas proinflamatorias como TNF- α , IL-1, IL-6, y IL-8 (Blackwell and Christman, 1997; Dinarello, 2000).

Los mecanismos moleculares que regulan la expresión de las moléculas coestimuladoras CD80 y CD86 no han sido completamente caracterizados. Aunque se sabe que la vía de IRF3 y la producción de los IFN-I son cruciales para la sobreexpresión de moléculas coestimuladoras CD80, CD86 y CD40, en células estimuladas con LPS; varios estudios describen la participación de la vía de las MAPKs en la expresión de las moléculas coestimuladoras al utilizar inhibidores específicos de esta vía (Nakahara *et al.*, 2006). Por ejemplo, que la expresión de CD80 inducida por LPS es mediada a través de JNK en células monocíticas (Lim *et al.*, 2005), y que JNK y p38 están implicadas en la expresión de CD80 y CD86 inducida por LPS en DCs humanas (Nakahara *et al.*, 2004). Además, se ha establecido claramente que la vía p38 de las MAPKs regula la producción de citocinas proinflamatorias tales como IL-1 β , TNF- α e IL-6 (Adams *et al.*, 2001; Ashwell, 2006; Clark, 2009). Sin embargo, nuestros resultados sugieren que p38 está implicado principalmente en la sobreexpresión de CD80 y la producción de IL-6 y TNF- α en los macrófagos estimulados con tCry1Ac y el LPS.

Aunque en este trabajo se sugiere que la activación de las MAPKs inducidas por tCry1Ac está relacionada con la respuesta inflamatoria en macrófagos, es sabido que las cinasas ERK1/2, JNK y p38 son enzimas que también modulan varios eventos celulares, responden a stress físico

y químicos y están involucradas en otros procesos celulares como crecimiento, diferenciación, inflamación y la apoptosis (Arthur and Ley, 2013; Plotnikov *et al.*, 2011).

Por otro lado, también se ha descrito que las toxinas Cry induce la activación de la MAPK en otros sistemas, como los insectos, como un mecanismo de defensa y resistencia hacia las proteínas Cry (Cancino-Rodezno *et al.*, 2013; Canton *et al.*, 2015; Guo *et al.*, 2015; Qiu *et al.*, 2017). En un estudio *in vivo* se observó que las toxinas Cry1Ab y Cry11Aa induce la fosforilación de la MAPK p38 en las células del intestino medio de *Manduca sexta* y *Aedes aegypti*, respectivamente, y el silenciamiento del gen de p38 provocó que ambas especies de insecto se hicieran más sensible a la acción de la toxina Cry, lo que sugería que esta vía estaba involucrada en la defensa de los insectos contra las toxinas Cry (Cancino-Rodezno *et al.*, 2013).

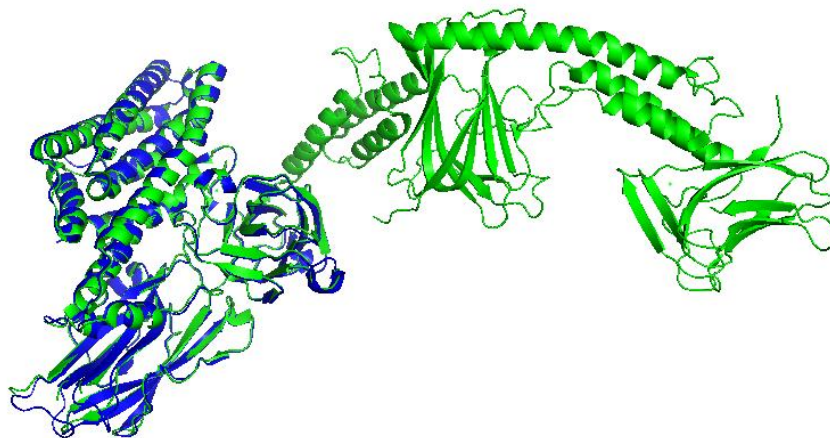


Figura 13. Superposición de las estructuras de la pCry1Ac (verde) y la tCry1Ac (azul). La figura fue realizada con las coordenadas cristalográficas depositadas en el PDB para pCry1Ac, con código 4W8J y para tCry1Ac, con código 4ARX, utilizando el programa PyMOL.

Tabla 1. Comparación de los efectos inducidos por pCry1c y tCry1Ac en macrófagos RAW 264.7

	tCry1Ac	pCry1Ac
Moléculas coestimuladoras	20 µg	5 µg
Efecto de los inhibidores de las MAPKs en la expresión de las moléculas coestimuladoras	CD80 (p38)	CD80 (ERK1/2) CD86 (ERK1/2, p38)
Efecto de inhibidores de las MAPKs en la producción de citocinas proinflamatorias	IL-6 (p38) TNF-α (p38) MCP-1 (ERK1/2)	IL-6 (p38) TNF-α (p38, JNK) MCP-1 (ERK1/2, p38, JNK)

La pCry1Ac es capaz de inducir la activación de macrófagos a una concentración de 5 µg/mL, sin embargo la tCry1Ac necesita una concentración de 20 µg/mL para inducir la expresión de las moléculas estimuladoras en macrófagos RAW 264.7. Las MAPKs ERK1/2, JNK y p38 median los efectos inducidos por pCry1Ac en macrófagos RAW 264.7, sin embargo la cinasa JNK no parece participar en la expresión de las moléculas coestimuladoras ni la producción de citocinas inducidos por tCry1Ac.

8. Conclusiones

La tCry1Ac induce la activación de macrófagos murinos de bazo y de la línea celular RAW 264.7 resultando en la sobreexpresión de moléculas coestimuladoras CD80 y CD86, la producción de nitritos, las citocinas proinflamatorias IL-6, TNF- α y la quimiocina MCP-1; y estos efectos son mediados por la vía de las MAPKS ERK1/2 y p38.

La tCry1Ac induce los mismos efectos que la pCry1Ac como resultado de la activación de macrófagos, sin embargo existen diferencias en la concentración de proteínas necesaria y las vías de señalización que median estos efectos (figura 14).

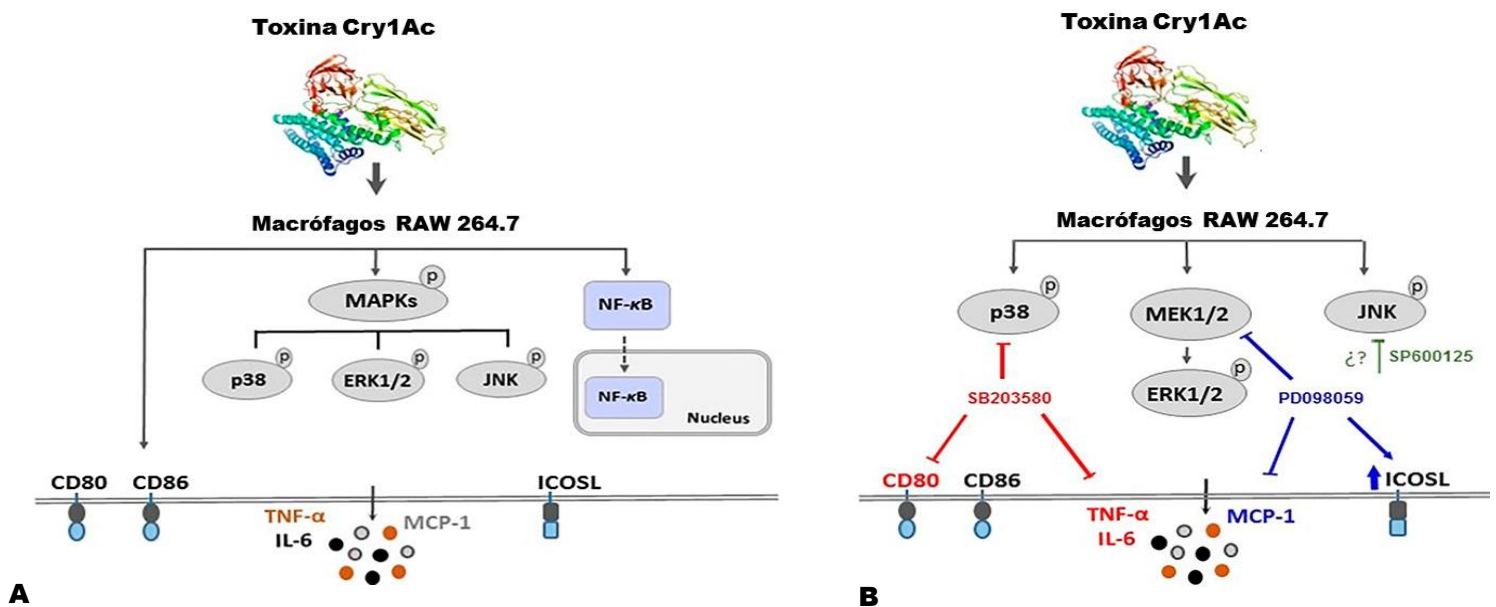


Figura 14. Efectos de tCry1Ac en macrófagos RAW 264.7. (A). La tCry1Ac induce la activación de los macrófagos que resulta en la sobreexpresión de moléculas coestimuladoras CD80, CD86 e ICOS-L, la producción de nitritos, la citocinas proinflamatorias IL-6, TNF- α y la quimiocinas MCP-1, además activa la vía de las MAPKS e induce la translocación al núcleo de NF- κ B en macrófagos RAW 264.7. (B) Las MAPKS ERK1/2 y p38 median los efectos inducidos por la tCry1Ac en macrófagos RAW 264.7 ya que al pre-tratar las células con el inhibidor de p38 (SB203580) disminuye la sobreexpresión de CD80 y la producción de las citocinas TNF- α e IL-6 inducidas por tCryAc, y al pre-tratarlas con el inhibidor de MEK1/2-ERK1/2 aumenta la sobreexpresión de ICOS-L y disminuye la producción de MCP-1. Sin embargo JNK no parece mediar en los efectos inducidos por tCry1Ac analizados en este proyecto.

9. Perspectivas

Nuestros resultados indican la capacidad de tCry1Ac para activar los macrófagos a través de las vías de MAPKs y el factor de transcripción NF- κ B, lo que contribuye a la comprensión de las bases moleculares por la cual llevan a cabo sus efectos inmunoestimuladores. Sin embargo, nuestros resultados también instan la necesidad de una evaluación más profunda a través de estudios adicionales, para determinar si la tCry1Ac induce la activación de vías de señalización en otros tipos celulares como la mucosa intestinal, considerando que las proteínas Cry se expresan actualmente en cultivos genéticamente modificados (GM) como el maíz y la berenjena, que se utilizan para consumo humano (McClintock JT, Schaffer CR, 1995; Rubio-Infante and Moreno-Fierros, 2016).

Así mismo, es importante tener en cuenta que en este estudio se utilizó una tCry1Ac purificada, por lo que no se puede asumir que los efectos observados de activación serán similares a los inducidos por las proteínas expresadas en GM en las que las toxinas están truncadas o modificada; por lo tanto, los efectos de cada una de estas proteínas modificadas deben ser evaluados en los mamíferos y los organismos no diana, ya que como resultados de estas modificaciones, las propiedades inmunológicas de Cry1Ac también pueden modificarse (Rubio-Infante and Moreno-Fierros, 2016).

Aunque en nuestro trabajo nos enfocamos en el papel de las MAPKs y NF- κ B como parte de la caracterización de las vías de señalización, no descartamos evaluar otras rutas que se han descrito que participan en la producción de citocinas proinflamatorias, como es la vía de JAK/STAT (Murray, 2007; Schindler *et al.*, 2007) y las asociadas a los receptores tipo NOD (NLRs). También las relacionadas a la expresión de moléculas coestimuladoras, lo que sería muy interesante ya que han sido menos estudiadas, como es la vía dependiente de TRIF, asociadas a los TLRs (Hoebe *et al.*, 2003; Lien and Golenbock, 2003). Igualmente sería interesante ver la participación de otras moléculas relacionada con la regulación como las fosfatasa MKP. Por otra parte, aún se necesitan estudios futuros para determinar cómo está proteína es reconocida por las células de mamíferos, así como realizar una exploración más amplia del perfil de citocinas inducidas.

10. Referencias bibliográficas

- Adams, J.L., Badger, A.M., Kumar, S., Lee, J.C., 2001. p38 MAP kinase: molecular target for the inhibition of pro-inflammatory cytokines. *Progress in medicinal chemistry* 38, 1–60.
- Adang, M.J., Crickmore, N., Jurat-Fuentes, J.L., 2014. Diversity of *Bacillus thuringiensis* Crystal Toxins and Mechanism of Action, *Advances in Insect Physiology*. doi:10.1016/B978-0-12-800197-4.00002-6
- Ahmed, A.U., Williams, B.R.G., Hannigan, G.E., 2015. Insight into Selectivity and Diversity 3087–3111. doi:10.3390/biom5043087
- Arthur, J.S.C., Ley, S.C., 2013. Mitogen-activated protein kinases in innate immunity. *Nat Rev Immunol* 13, 679–692. doi:10.1038/nri3495
- Ashwell, J.D., 2006. The many paths to p38 mitogen-activated protein kinase activation in the immune system. *Nature reviews. Immunology* 6, 532–540. doi:10.1038/nri1865
- Bacillus, D., Fern, O., 1940. *Tecnologías de producción de Bacillus thuringiensis* 110–115.
- Billack, B., 2006. Macrophage activation: Role of Toll-like receptors, nitric oxide, and nuclear factor kappa B. *American Journal of Pharmaceutical Education* 70. doi:10.5688/aj7005102
- Blackwell, T.S., Christman, J.W., 1997. The role of nuclear factor-kappa B in cytokine gene regulation. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 17, 3–9.
- Blum, J.S., Wearsch, P.A., Cresswell, P., 2013. Pathways of antigen processing. *Annual review of immunology* 31, 443–73. doi:10.1146/annurev-immunol-032712-095910
- Bogdan, C., 2001. Nitric oxide and the immune response. *Nat Immunol* 2, 907–916. doi:10.1038/ni1001-907
- Bravo, A., Gómez, I., Conde, J., Muñoz-Garay, C., Sánchez, J., Miranda, R., Zhuang, M., Gill, S.S., Soberón, M., 2004. Oligomerization triggers binding of a *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab pore-forming toxin to aminopeptidase N receptor leading to insertion into membrane microdomains. *Biochimica et biophysica acta* 1667, 38–46. doi:10.1016/j.bbamem.2004.08.013
- Bravo, A., Gómez, I., Porta, H., García-Gómez, B.I., Rodríguez-Almazan, C., Pardo, L., Soberón, M., 2013. Evolution of *Bacillus thuringiensis* Cry toxins insecticidal activity: Evolution of Bt toxins. *Microbial Biotechnology* 6. doi:10.1111/j.1751-7915.2012.00342.x
- Bravo, A., Likitvivanavong, S., Gill, S.S., Soberón, M., 2011. *Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 41, 423–431. doi:10.1016/j.ibmb.2011.02.006
- Burton, S.L., Ellar, D.J., Li, J., Derbyshire, D.J., 1999. N-acetylgalactosamine on the putative insect receptor aminopeptidase N is recognised by a site on the domain III lectin-like fold of a *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxin. *Journal of molecular biology* 287, 1011–22. doi:10.1006/jmbi.1999.2649
- Cancino-Rodezno, A., Alexander, C., Villaseñor, R., Pacheco, S., Porta, H., Pauchet, Y., Soberón, M., Gill, S.S., Bravo, A., 2013. Corrigendum to “The mitogen-activated protein kinase p38 is involved in insect defense against Cry toxins from *Bacillus thuringiensis*” [*Insect Biochem.*

- Mol. Biol. 40 (1) (2010) 58-63]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 43, 898. doi:10.1016/j.ibmb.2013.05.004
- Canton, P.E., Cancino-Rodezno, A., Gill, S.S., Soberón, M., Bravo, A., 2015. Transcriptional cellular responses in midgut tissue of *Aedes aegypti* larvae following intoxication with Cry11Aa toxin from *Bacillus thuringiensis*. *BMC genomics* 16, 1042. doi:10.1186/s12864-015-2240-7
- Carreno, B.M., Collins, M., 2002. The B7 family of ligands and its receptors: new pathways for costimulation and inhibition of immune responses. *Annual review of immunology* 20, 29–53. doi:10.1146/annurev.immunol.20.091101.091806
- Ceeraz, S., Nowak, E.C., Noelle, R.J., 2013. B7 family checkpoint regulators in immune regulation and disease. *Trends in Immunology* 34, 556–563. doi:10.1016/j.it.2013.07.003
- Chattopadhyay, A., Bhatnagar, N.B., Bhatnagar, R., 2016. Critical Reviews in Microbiology Bacterial Insecticidal Toxins Bacterial Insecticidal Toxins. *Bacterial Insecticidal Toxins Critical Reviews in Microbiology Critical Reviews in Microbiology* 7828, 33–5433. doi:10.1080/10408410490270712
- Chattopadhyay, A., Bhatnagar, N.B., Bhatnagar, R., 2004. Bacterial Insecticidal Toxins. *Critical Reviews in Microbiology* 30, 33–54. doi:10.1080/10408410490270712
- Chen, L., Flies, D.B., 2013. Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nature reviews. Immunology* 13, 227–42. doi:10.1038/nri3405
- Clark, A.R., 2009. The p38 MARK pathway mediates both antiinflammatory and proinflammatory process: comment on the article by Damjanov and the editorial by Genovese. *Arthritis & Rheumatism* 60, 3513–3514. doi:10.1002/art.24919
- Clements, J.D., Hartzog, N.M., Lyon, F.L., 1988. Adjuvant activity of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin and effect on the induction of oral tolerance in mice to unrelated protein antigens. *Vaccine* 6, 269–277.
- Connell, T.D., 2007. Cholera toxin, LT-I, LT-IIa and LT-IIb: the critical role of ganglioside binding in immunomodulation by type I and type II heat-labile enterotoxins. *Expert review of vaccines* 6, 821–834. doi:10.1586/14760584.6.5.821
- 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. *Microbiology and molecular biology reviews* : MMBR 62, 807–13.
- De Maagd, R. a., Bravo, A., Crickmore, N., 2001. How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. *Trends in Genetics* 17, 193–199. doi:10.1016/S0168-9525(01)02237-5
- Derbyshire, D.J., Ellar, D.J., Li, J., 2001. Crystallization of the *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac and its complex with the receptor ligand N-acetyl-D-galactosamine. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography* 57, 1938–1944. doi:10.1107/S090744490101040X
- Deshmane, S.L., Kremlev, S., Amini, S., Sawaya, B.E., 2009. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. *Journal of interferon & cytokine research* 29, 313–326.
- Dinarello, C. a., 2000. Proinflammatory cytokines. *Chest* 118, 503–508.

doi:10.1378/chest.118.2.503

- Duque, G.A., Descoteaux, A., 2014. Macrophage cytokines: involvement in immunity and infectious diseases 5, 1–12. doi:10.3389/fimmu.2014.00491
- Eriksson, K., Fredriksson, M., Nordström, I., Holmgren, J., 2003. Cholera toxin and its B subunit promote dendritic cell vaccination with different influences on Th1 and Th2 development. *Infection and Immunity* 71, 1740–1747. doi:10.1128/IAI.71.4.1740-1747.2003
- 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 immunology* 18, 695–708. doi:10.1089/vim.2005.18.695
- 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 Science* 23, 1491–1497. doi:10.1002/pro.2536
- Feitelson, J.S., Payne, J., Kim, L., 1992. *Bacillus thuringiensis: Insects and Beyond*. *Nat Biotech* 10, 271–275.
- George-chandy, A., Eriksson, K., Lebens, M., Nordström, I., Schön, E., Holmgren, J., 2001. Cholera Toxin B Subunit as a Carrier Molecule Promotes Antigen Presentation and Increases CD40 and CD86 Expression on Antigen-Presenting Cells Cholera Toxin B Subunit as a Carrier Molecule Promotes Antigen Presentation and Increases CD40 and CD86 Expressi. *Infection and immunity* 69, 5716–5725. doi:10.1128/IAI.69.9.5716
- Gill, S.S., Cowles, E.A., Pietrantonio, P. V, 1992. The Mode of Action of *Bacillus Thuringiensis* Endotoxins. *Annual Review of Entomology* 37, 615–634. doi:10.1146/annurev.en.37.010192.003151
- Gonzalez-Gonzalez, E., Garcia-Hernandez, A.L., Flores-Mejia, R., Lopez-Santiago, R., Moreno-Fierros, L., 2015. The protoxin Cry1Ac of *Bacillus thuringiensis* improves the protection conferred by intranasal immunization with *Brucella abortus* RB51 in a mouse model. *Veterinary microbiology* 175, 382–388. doi:10.1016/j.vetmic.2014.11.021
- Gordon, S., Pl, A., 2014. Macrophage heterogeneity in tissues : phenotypic diversity and functions 36–55.
- Greenwald, R.J., Freeman, G.J., Sharpe, A.H., 2005. The B7 family revisited. *Annual review of immunology* 23, 515–548. doi:10.1146/annurev.immunol.23.021704.115611
- 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. *Molecular immunology* 41, 1177–83. doi:10.1016/j.molimm.2004.06.026
- Guha, M., Mackman, N., 2001. LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cellular signalling* 13, 85–94. doi:10.1016/S0898-6568(00)00149-2
- Guo, Z., Kang, S., Chen, D., Wu, Q., Wang, S., Xie, W., Zhu, X., Baxter, S.W., Zhou, X., Jurat-Fuentes, J.L., Zhang, Y., 2015. MAPK Signaling Pathway Alters Expression of Midgut ALP and ABCC Genes and Causes Resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac Toxin in Diamondback Moth, *PLoS Genetics*. doi:10.1371/journal.pgen.1005124

- Guy, B., 2007. The perfect mix: recent progress in adjuvant research. *Nature reviews. Microbiology* 5, 505–517. doi:10.1038/nrmicro1681
- Hathcock, B.K.S., Laszlo, G., Pucillo, S.C., Linsley, P., Hodes, R.J., Hathcock, K.S., Laszlo, G., Pucillo, C., Linsley, P., Hodes, R.J., Hathcock, B.K.S., Laszlo, G., Pucillo, S.C., Linsley, P., Hodes, R.J., 1994. Comparative analysis of B7-1 and B7-2 costimulatory ligands: expression and function. *The Journal of experimental medicine* 180, 631–640. doi:10.1084/jem.180.2.631
- Hayden, M.S., Ghosh, S., 2008. Shared Principles in NF- κ B Signaling. *Cell* 132, 344–362. doi:10.1016/j.cell.2008.01.020
- Hayden, M.S., West, A.P., Ghosh, S., 2006. NF-kappaB and the immune response. *Oncogene* 25, 6758–80. doi:10.1038/sj.onc.1209943
- Hematológicas, F.C.Y., 1998. Óxido nítrico. i 2, 45–53.
- Higham, E.M., Shen, C.-H., Wittrup, K.D., Chen, J., 2010. Cutting edge: delay and reversal of T cell tolerance by intratumoral injection of antigen-loaded dendritic cells in an autochthonous tumor model. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 184, 5954–8. doi:10.4049/jimmunol.1000265
- Hoebe, K., Janssen, E.M., Kim, S.O., Alexopoulou, L., Flavell, R.A., Han, J., Beutler, B., Ucm, T.L., 2003. Upregulation of costimulatory molecules induced by lipopolysaccharide and double-stranded RNA occurs by Trif-dependent and Trif-independent pathways. *Nature immunology* 4, 1223–1229. doi:10.1038/ni1010
- Hofte, H., Whiteley, H.R., 1989. Insecticidal Crystal Proteins of *Bacillus thuringiensis* 53, 242–255.
- Hofte, H., Whiteley, H.R., Hofte 'and, H., Whiteley, H.R., 1989. Insecticidal Crystal Proteins of *Bacillus thuringiensis*. *MICROBIOLOGICAL REVIEWS* 53, 242–255.
- Holmgren, J., Czerkinsky, C., 2005. Mucosal immunity and vaccines. *Nature medicine* 11, S45–53. doi:10.1038/nm1213
- Hume, D.A., 2015. The many alternative faces of macrophage activation 6, 1–10. doi:10.3389/fimmu.2015.00370
- Ibarra-Moreno, S., García-Hernández, a. L., Moreno-Fierros, L., 2014a. Coadministration of protoxin Cry1Ac from *Bacillus thuringiensis* with metacestode extract confers protective immunity to murine cysticercosis. *Parasite immunology* 36, 266–70. doi:10.1111/pim.12103
- Ibarra-Moreno, S., García-Hernández, a. L., Moreno-Fierros, L., 2014b. Coadministration of protoxin Cry1Ac from *Bacillus thuringiensis* with metacestode extract confers protective immunity to murine cysticercosis. *Parasite immunology* 36, 266–70. doi:10.1111/pim.12103
- Ivashkiv, L.B., 2011. Inflammatory signaling in macrophages: Transitions from acute to tolerant and alternative activation states. *European Journal of Immunology* 41, 2477–2481. doi:10.1002/eji.201141783
- Javadov, S., Jang, S., Agostini, B., 2014. Crosstalk between mitogen-activated protein kinases and mitochondria in cardiac diseases: Therapeutic perspectives. *Pharmacology and Therapeutics*. doi:10.1016/j.pharmthera.2014.05.013

- Jeffrey, K.L., Camps, M., Rommel, C., Mackay, C.R., 2007. Targeting dual-specificity phosphatases: manipulating MAP kinase signalling and immune responses. *Nature reviews. Drug discovery* 6, 391–403. doi:10.1038/nrd2289
- Juhas, U., Ryba-stanisławowska, M., Szargiej, P., Myśliwska, J., 2015. Different pathways of macrophage activation and polarization Ścieżki aktywacji i polaryzacji makrofagów 496–502.
- Knowles, B., Ellar, D., 1987. Colloid-osmotic lysis is a general feature of the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins with different insect specificity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 924, 509–518. doi:10.1016/0304-4165(87)90167-X
- Kweon, M.-N., 2014. Recent progress in mucosal immunology and vaccine development. *Experimental & molecular medicine* 46, e86. doi:10.1038/emm.2014.2
- Lavelle, E.C., 2005. Generation of improved mucosal vaccines by induction of innate immunity. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 62, 2750–70. doi:10.1007/s00018-005-5290-1
- Lavin, Y., Mortha, A., Rahman, A., Merad, M., City, N.Y., 2016. peripheral tissues 15, 731–744. doi:10.1038/nri3920.Regulation
- Lawson, L.B., Norton, E.B., Clements, J.D., 2011. Defending the mucosa: Adjuvant and carrier formulations for mucosal immunity. *Current Opinion in Immunology* 23, 414–420. doi:10.1016/j.coi.2011.03.009
- Legorreta-Herrera, M., Meza, R.O., Moreno-Fierros, L., 2010. Pretreatment with Cry1Ac protoxin modulates the immune response, and increases the survival of *Plasmodium*-infected CBA/Ca mice. *Journal of biomedicine & biotechnology* 2010, 198921. doi:10.1155/2010/198921
- Lien, E., Golenbock, D.T., 2003. Adjuvants and their signaling pathways: beyond TLRs. *Nature immunology* 4, 1162–1164. doi:10.1038/ni1203-1162
- Lim, W., Gee, K., Mishra, S., Kumar, A., 2005. Regulation of B7.1 costimulatory molecule is mediated by the IFN regulatory factor-7 through the activation of JNK in lipopolysaccharide-stimulated human monocytic cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 175, 5690–700. doi:10.4049/jimmunol.175.9.5690
- Lycke, N., 2012. Recent progress in mucosal vaccine development: potential and limitations. *Nature Reviews Immunology* 12, 592–605. doi:10.1038/nri3251
- Lycke, N., 2005. Targeted vaccine adjuvants based on modified cholera toxin. *Current molecular medicine* 5, 591–597.
- Macmicking, J., Xie, Q., Nathan, C., 1997. NITRIC OXIDE AND MACROPHAGE FUNCTION.
- Martinez, F.O., Gordon, S., 2014. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation : time for reassessment 13, 1–13. doi:10.12703/P6-13
- McClintock JT, Schaffer CR, S.R., 1995. A comparative review of the mammalian toxicity of *Bacillus thuringiensis*- based pesticides. *Pesticide Science* 45, 95–105.
- Mesnage, R., Clair, E., Gress, S., Then, C., Székács, a., Séralini, G.E., 2013. Cytotoxicity on human cells of Cry1Ab and Cry1Ac Bt insecticidal toxins alone or with a glyphosate-based herbicide. *Journal of Applied Toxicology* 33, 695–699. doi:10.1002/jat.2712
- Modo, X. El, Colonial, D.V., 2011. This information is current as of February 2008. *American*

Archaeology. doi:10.4049/jimmunol.1101118

- Moreno-Fierros, L., García-Hernández, A.L., Ilhuicatzí-Alvarado, D., Rivera-Santiago, L., Torres-Martínez, 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- α cytokines. *International Immunopharmacology* 17, 1051–1066. doi:10.1016/j.intimp.2013.10.005
- 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 and infection / Institut Pasteur* 2, 885–890.
- Moreno-Fierros, L., Pérez-Ordóñez, 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 sciences* 71, 2667–80.
- Morrison, D.K., 2012. MAP kinase pathways. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 4. doi:10.1101/cshperspect.a011254
- Morrison, D.K., Wrana, J.L., Sassone-corsi, P., Morrison, D.K., Thorner, J., Hunter, T., Cantley, L.C., Kennedy, M.B., Rhind, N., Russell, P., Ward, P.S., Thompson, C.B., Morrison, D.K., 2014. MAP Kinase Pathways. doi:10.1101/cshperspect.a011254
- Mueller, D.L., 2000. T cells: A proliferation of costimulatory molecules. *Current Biology* 10, 227–230. doi:10.1016/S0960-9822(00)00400-0
- Murray, P.J., 2007. The JAK-STAT signaling pathway: input and output integration. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 178, 2623–9.
- Nakahara, T., Moroi, Y., Uchi, H., Furue, M., 2006. Differential role of MAPK signaling in human dendritic cell maturation and Th1 / Th2 engagement 1–11. doi:10.1016/j.jdermsci.2005.11.004
- Nakahara, T., Uchi, H., Urabe, K., Chen, Q., Furue, M., Moroi, Y., 2004. Role of c-Jun N-terminal kinase on lipopolysaccharide induced maturation of human monocyte-derived dendritic cells. *International Immunology* 16, 1701–1709. doi:10.1093/intimm/dxh171
- Neutra, M.R., Kozlowski, P. a, 2006. Mucosal vaccines: the promise and the challenge. *Nature reviews. Immunology* 6, 148–158. doi:10.1038/nri1777
- Oeckinghaus, A., Hayden, M.S., Ghosh, S., 2011. Crosstalk in NF- κ B signaling pathways 12. doi:10.1038/ni.2065
- Pacheco, S., Gómez, I., Arenas, I., Saab-Rincon, G., Rodríguez-Almazán, C., Gill, S.S., Bravo, A., Soberón, M., 2009. Domain II loop 3 of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin is involved in a “ping pong” binding mechanism with *Manduca sexta* aminopeptidase-N and cadherin receptors. *The Journal of biological chemistry* 284, 32750–7. doi:10.1074/jbc.M109.024968
- Pardo-López, L., Soberón, M., Bravo, A., 2013. *Bacillus thuringiensis* insecticidal three-domain Cry toxins: mode of action, insect resistance and consequences for crop protection. *FEMS Microbiology Reviews* 37, 3–22. doi:10.1111/j.1574-6976.2012.00341.x

- Pasquale, A. Di, Preiss, S., Fleming, A., 2015. Vaccine Adjuvants : from 1920 to 2015 and Beyond 320–343. doi:10.3390/vaccines3020320
- Paterson, A.M., Vanguri, V.K., Sharpe, A.H., 2009. SnapShot: B7/CD28 Costimulation. *Cell* 137, 28–29. doi:10.1016/j.cell.2009.05.015
- Pavot, V., Rochereau, N., Genin, C., Verrier, B., Paul, S., 2012. New insights in mucosal vaccine development. *Vaccine* 30, 142–154. doi:10.1016/j.vaccine.2011.11.003
- Peti, W., Page, R., 2013. Molecular basis of MAP kinase regulation. *Protein science : a publication of the Protein Society* 22, 1698–710. doi:10.1002/pro.2374
- Pigott, C.R., Ellar, D.J., 2007. Role of Receptors in *Bacillus thuringiensis* Crystal Toxin Activity. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 71, 255–281. doi:10.1128/MMBR.00034-06
- Pittet, M.J., Nahrendorf, M., Swirski, F.K., 2015. NIH Public Access 1319, 1–18. doi:10.1111/nyas.12393.The
- Plotnikov, A., Zehorai, E., Procaccia, S., Seger, R., 2011. The MAPK cascades: Signaling components, nuclear roles and mechanisms of nuclear translocation. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* 1813, 1619–1633. doi:10.1016/j.bbamcr.2010.12.012
- Podojil, J.R., Miller, S.D., 2013. NIH Public Access 27, 1–13. doi:10.1007/s40259-012-0001-6.Targeting
- Qiu, L., Fan, J., Liu, L., Zhang, B., Wang, X., Lei, C., Lin, Y., Ma, W., 2017. Knockdown of the MAPK p38 pathway increases the susceptibility of *Chilo suppressalis* larvae to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ca toxin. *Scientific Reports* 7, 6–13. doi:10.1038/srep43964
- Rao, K.M.K., 2001. MAP kinase activation in macrophages. *Journal of Leukocyte Biology* 69, 3–10.
- Rhee, J.H., Lee, S.E., Kim, S.Y., 2012. Mucosal vaccine adjuvants update. *Clinical and Experimental Vaccine Research* 1, 50. doi:10.7774/cevr.2012.1.1.50
- Rojas-Hernández, S., Rodríguez-Monroy, M. a., López-Revilla, R., Reséndiz-Albor, A. a., Moreno-Fierros, L., Rojas-Hernandez, S., Rodriguez-Monroy, M.A., Lopez-Revilla, R., Resendiz-Albor, A.A., Moreno-Fierros, L., Rojas-Hernández, S., Rodríguez-Monroy, M. a., López-Revilla, R., Reséndiz-Albor, A. a., Moreno-Fierros, L., 2004. Intranasal coadministration of the Cry1Ac protoxin with amoebal lysates increases protection against *Naegleria fowleri* meningoencephalitis. *Infection and immunity* 72, 4368–75. doi:10.1128/IAI.72.8.4368-4375.2004
- Rubio-Infante, N., Moreno-Fierros, L., 2016. An overview of the safety and biological effects of *Bacillus thuringiensis* Cry toxins in mammals. *Journal of applied toxicology : JAT* 36, 630–48. doi:10.1002/jat.3252
- Sansinenea, E., 2012. *Bacillus thuringiensis* Biotechnology. doi:10.1007/978-94-007-3021-2
- Scheller, J., Chalaris, A., Schmidt-arras, D., Rose-john, S., 2011. *Biochimica et Biophysica Acta* The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6 1813, 878–888. doi:10.1016/j.bbamcr.2011.01.034
- Schindler, C., Levy, D.E., Decker, T., 2007. JAK-STAT Signaling : From Interferons to Cytokines

* 282, 20059–20063. doi:10.1074/jbc.R700016200

- Sharpe, A.H., Freeman, G.J., 2002. The B7-CD28 superfamily. *Nature reviews. Immunology* 2, 116–126. doi:10.1038/nri727
- Soberón, M., Gill, S.S., Bravo, A., 2009. Signaling versus punching hole: How do *Bacillus thuringiensis* toxins kill insect midgut cells? *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 66, 1337–49. doi:10.1007/s00018-008-8330-9
- Soberón, M., Monnerat, R., Bravo, A., Soberón, M., Bravo, @bullet A, Monnerat, R., 2016. Mode of Action of Cry Toxins from *Bacillus thuringiensis* and Resistance Mechanisms. doi:10.1007/978-94-007-6725-6_28-1
- South, W., Zealand, N., 1999. The role of B7 costimulation in T-cell immunity 304–311.
- Tabashnik, B.E., Zhang, M., Fabrick, J. a., Wu, Y., Gao, M., Huang, F., Wei, J., Zhang, J., Yelich, A., Unnithan, G.C., Bravo, A., Soberón, M., Carrière, Y., Li, X., 2015. Dual mode of action of Bt proteins: protoxin efficacy against resistant insects. *Scientific Reports* 5, 15107. doi:10.1038/srep15107
- Tada, R., Koide, Y., Yamamuro, M., Hidaka, A., Nagao, K., Negishi, Y., Aramaki, Y., 2013. Maleylated-BSA induces TNF- α production through the ERK and NF- κ B signaling pathways in murine. *Open Journal of Immunology* 3, 184–189.
- Tergaonkar, V., 2006. NF- κ B pathway: A good signaling paradigm and therapeutic target. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 38, 1647–1653. doi:10.1016/j.biocel.2006.03.023
- van Ginkel, F.W., Jackson, R.J., Yuki, Y., McGhee, J.R., 2000. Cutting edge: the mucosal adjuvant cholera toxin redirects vaccine proteins into olfactory tissues. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 165, 4778–82. doi:10.4049/jimmunol.165.9.4778
- Vázquez-Padrón, R.I., González-Cabrera, J., García-Tovar, C., Neri-Bazan, L., López-Revilla, R., Hernández, 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. *Biochemical and biophysical research communications* 271, 54–8. doi:10.1006/bbrc.2000.2584
- 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 sciences* 64, 1897–1912.
- Vázquez, R.I., Moreno-Fierros, L., Neri-Bazán, L., De La Riva, G. a., López-Revilla, R., 1999. *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac protoxin is a potent systemic and mucosal adjuvant. *Scandinavian Journal of Immunology* 49, 578–584. doi:10.1046/j.1365-3083.1999.00534.x
- Williams, N.A., Hirst, T.R., Nashar, T.O., 1999. Immune modulation by the cholera-like enterotoxins: from adjuvant to therapeutic. *Immunology today* 20, 95–101.
- Yamamoto, M., Kiyono, H., Kweon, M.N., Yamamoto, S., Fujihashi, K., Kurazono, H., Imaoka, K., Bluethmann, H., Takahashi, I., Takeda, Y., Azuma, M., McGhee, J.R., 2000. Enterotoxin adjuvants have direct effects on T cells and antigen-presenting cells that result in either interleukin-4-dependent or -independent immune responses. *J Infect Dis* 182, 180–190.

doi:JID991480 [pii] 10.1086/315694

- Zanin, R.F., Braganhol, E., Bergamin, L.S., Campesato, L.F.I., Filho, A.Z., Moreira, J.C.F., Morrone, F.B., Sévigny, J., Schetinger, M.R.C., de Souza Wyse, A.T., Battastini, A.M.O., 2012. Differential macrophage activation alters the expression profile of NTPDase and Ecto-5'-nucleotidase. *PLoS ONE* 7. doi:10.1371/journal.pone.0031205
- Zavala, L.E., Pardo-López, L., Cantón, P.E., Gómez, I., Soberón, M., Bravo, A., 2011. Domains II and III of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin remain exposed to the solvent after insertion of part of domain I into the membrane. *The Journal of biological chemistry* 286, 19109–17. doi:10.1074/jbc.M110.202994
- Zhang, X., Candas, M., Griko, N.B., Taussig, R., Bulla, L.A., 2006. A mechanism of cell death involving an adenylyl cyclase/PKA signaling pathway is induced by the Cry1Ab toxin of *Bacillus thuringiensis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103, 9897–9902. doi:10.1073/PNAS.0604017103

Artículo publicado



Contents lists available at ScienceDirect

The International Journal of Biochemistry & Cell Biology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/biociel

Cry1Ac toxin induces macrophage activation via ERK1/2, JNK and p38 mitogen-activated protein kinases



Marilu Torres-Martínez, Néstor Rubio-Infante, Ana Lilia García-Hernández, Raúl Nava-Acosta, Damaris Ilhuicatzí-Alvarado, Leticia Moreno-Fierros*

Laboratorio de Inmunidad en Mucosas, Unidad de Biomedicina, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, Avenida de los Barrios 1, Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla 54090, Estado de México, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 13 January 2016
Received in revised form 15 June 2016
Accepted 29 June 2016
Available online 6 July 2016

Keywords:

Bacillus thuringiensis
Cry1Ac toxin
Macrophage activation
MAPK pathways

ABSTRACT

The Cry1Ac toxin from *Bacillus thuringiensis* is used commercially as a bio-insecticide and is expressed in transgenic plants that are used for human and animal consumption. Although it was originally considered innocuous for mammals, the Cry1Ac toxin is not inert and has the ability to induce mucosal and systemic immunogenicity. Herein, we examined whether the Cry1Ac toxin promotes macrophage activation and explored the signalling pathways that may mediate this effect. Treatment of primary and RAW264.7 macrophages with the Cry1Ac toxin resulted in upregulation of the costimulatory molecules CD80, CD86 and ICOS-L and enhanced production of nitric oxide, the chemokine MCP-1 and the proinflammatory cytokines TNF- α and IL-6. Remarkably, the Cry1Ac toxin induced phosphorylation of the mitogen-activated protein kinases (MAPKs) ERK1/2, JNK and p38 and promoted nuclear translocation of nuclear factor-kappa B (NF- κ B) p50 and p65. p38 and ERK1/2 MAPKs were involved in this effect, as indicated by the Cry1Ac-induced upregulation of CD80 and IL-6 and TNF- α abrogation by the p38 MAPK inhibitor SB203580. Furthermore, treatment with the MEK1/2 kinase inhibitor PD98059 blocked increases in MCP-1 secretion and augmented Cry1Ac-induced ICOS-L upregulation. These data demonstrate the capacity of the Cry1Ac toxin to induce macrophage activation via the MAPK and NF- κ B pathways.

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Cry proteins are produced as crystalline inactive protoxins in parasporal bodies by the *Bacillus thuringiensis* (Bt) soil bacterium. Upon ingestion by susceptible insect larvae, the crystals are solubilized in the midgut and proteolytically processed by trypsin, generating the active Cry toxin. The Bt bacterium, spores, protoxins, toxins or Bt transgenic plants have been used commercially as bioinsecticides (Sansinenea, 2012). There are some spray products that contain the crystal protoxin, whereas in genetically modified (GM) plants, the Cry proteins are expressed in soluble form as toxins or modified Cry toxins, for example in maize, tomato, soybean, eggplant and rice.

Despite being regarded as innocuous to mammals, the Bt Cry1Ac toxin does interact with mammalian cells (Mesnage et al., 2013; Rubio-Infante and Moreno-Fierros, 2016). Cry1Ac protoxin is a potent immunogen (Moreno-Fierros et al., 2002, 2000; Vazquez-

Padron et al., 1999), a mucosal adjuvant (Esquivel-Pérez and Moreno-Fierros, 2005; Vázquez et al., 1999) and can even function as a vaccine carrier (Moreno-Fierros et al., 2003). As an adjuvant, it enhanced protection in four murine infection models, specifically amoebic meningoencephalitis (Rojas-Hernández et al., 2004), malaria (Legorreta-Herrera et al., 2010), cysticercosis (Ibarra-Moreno et al., 2014) and brucellosis (González-González et al., 2015). When Cry1Ac protoxin was administered intranasally and intraperitoneally to mice, it increased the expression of the costimulatory molecules CD80 and CD86, the chemokine MCP-1, and the proinflammatory cytokines TNF- α and IL-6 in adherent cells from different mucosal sites. Interestingly, in several cases, the effects of Cry1Ac protoxin were comparable to those obtained with lipopolysaccharide (LPS) (Moreno-Fierros et al., 2013). In toxin form, Cry1Ac has also been reported to be a good systemic and mucosal immunogen (Guerrero et al., 2004), but other than this, nothing is known about its effects on the immune system.

The mechanism by which Cry proteins exert their insecticidal activity in target insects has been extensively characterized. Indeed, it has been documented that activated Cry toxin interacts with the midgut epithelium of susceptible insects to form pores in the mem-

* Corresponding author.
E-mail addresses: lemofi@unam.mx, draleticiamorenofierros@yahoo.com (L. Moreno-Fierros).

brane that lead to the killing of specific insect targets via osmotic shock (Bravo et al., 2011; Zavala et al., 2011). In contrast, the direct biological effects of Cry proteins in mammalian cells have been rarely explored, but it has been argued that Cry1Ab and Cry1Ac do not appear to be inert in human fibroblasts and exert certain combinatory actions (Mesnage et al., 2013).

In view of the described immunogenic properties of Cry1Ac and knowing that it is expressed in the form of a toxin in transgenic plants for human consumption (Rubio-Infante and Moreno-Fierros, 2016), we considered it important to determine if Cry1Ac exerts direct effects in immune system cells and to perform studies aimed at understanding the cellular bases of such effects.

Therefore, in this work, we first determined whether Cry1Ac toxin was able to induce macrophage activation; thus, the upregulation of costimulatory molecules (CD80 and CD86), and the production of inflammatory cytokines were evaluated by flow cytometry in primary murine macrophages as well as in RAW264.7 cells. Next, to elucidate the signal transduction pathways activated by this toxin, we analysed by Western blot the phosphorylated forms of the extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2), c-Jun N-terminal kinase (JNK) and mitogen-activated protein kinase (p38) in RAW264.7 cells stimulated with Cry1Ac toxin or LPS (used as a positive control of macrophage activation). We selected RAW264.7 cells because they exhibited Cry1Ac-induced activation and because this cell line has been widely used to characterize MAPK pathways after stimulation with other toxins or to evaluate novel anti-inflammatory compounds (Cho et al., 2011; Schnitzler et al., 2007). Thereafter, to determine whether the toxin-induced activation was mediated through MAPK pathways, we pretreated RAW264.7 cells with signalling inhibitors of Mitogen-activated protein kinase 1/2 (MEK1/2)-ERK1/2, JNK and p38 (PD98059, SP600125 and SB203580, respectively) and then analysed costimulatory molecules and cytokines.

As an additional activation parameter, we examined nitrite production in RAW264.7 cells stimulated with Cry1Ac toxin. Finally, given that several studies have reported the activation of NF- κ B triggered by MAPKs as a critical mediator of macrophage activation and inflammatory responses (Hayden et al., 2006), and as our findings showed the participation of MAPKs in the Cry1Ac-induced activation of macrophage RAW264.7 cells, we also examined whether Cry1Ac toxin induced nuclear translocation of the p50 and p65 subunits.

Our results show the capacity of Cry1Ac toxin to induce macrophage activation by provoking the upregulation of costimulatory molecules B7.1 (CD80) and B7.2 (CD86) and promoting proinflammatory cytokine production in RAW264.7 macrophages, and we demonstrated that these effects are mediated via the activation of MAPKs (ERK1/2, JNK and p38) and NF- κ B pathways.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Foetal bovine serum (FBS) and L-glutamine, 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES), 2- β -mercaptoethanol, and essential amino acids were obtained from GIBCO Life Technologies (Grand Island, NY, USA). CD16/32 (Fc γ II/IIIr), CD86- Fluorescein isothiocyanate (FITC), CD80 Phycoerythrin-Cyanin 5.1 (PE-Cy5), Inducible T-cell co-stimulator ligand- Phycoerythrin (ICOS-L-PE), F4/80, CD11c and CD11c-Cyanine 5 (Cy5) fluorochrome-labelled monoclonal antibodies and a Cytometric Bead Array (CBA) Mouse Inflammation Kit were obtained from BD Biosciences (San José CA, USA). A Nitrate/Nitrite Colorimetric Assay Kit was purchased from Cayman Chemical Company, (Michigan, USA). Rabbit anti-non-phosphorylated or

phosphorylated (p-) ERK1/2, p38, JNK and p65 NF- κ B antibodies were obtained from Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA). Actin, histone 4 or p50 NF- κ B antibodies were obtained from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). Horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies were from Thermo Scientific Pierce (Rockford, IL.61105 USA). Secondary antibody anti-rabbit IgG labelled with IRDye800 was purchased from LiCor Biosciences (LiCor, Lincoln, NE, USA), and anti-goat IgG-Cy5 from Jackson ImmunoResearch (West Grove, PE, USA), polymyxin B resin (Affi-Prep Polymyxin Resin) was obtained from Bio-Rad (Hercules, CA, USA). Vectashield was purchased from Vector Laboratories (Burlingame, CA, USA). Enhanced chemiluminescence was obtained from Amersham Life Sciences (Buckinghamshire, UK). Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI-1640) medium, Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), LPS (E. coli, serotype 0111:B4), an "E-TOXATE" Kit, penicillin, streptomycin, PD98059, SP600125, SB203580, Nonidet P-40, aprotinin, leupeptin, phenylmethylsulfonyl fluoride, dithiothreitol, Tween 20 and all other chemicals were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

2.2. Recombinant Cry1Ac toxin protein

Recombinant Cry1Ac protoxin was purified from IPTG-induced E. coli JM103 (Pos900) cultures as previously described (Rojas-Hernández et al., 2004). Protoxin was solubilized, and toxin activation with trypsin was carried out as previously described (Guerrero et al., 2004). Cry1Ac toxin purity was analysed by sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and Coomassie blue staining. Endotoxin contamination in the purified Cry1Ac toxin was tested using the "E-TOXATE" kit following the manufacturer's instructions, and levels were found to be below 0.1 EU/mL. The purified proteins were passed through a polymyxin column to remove any possible endotoxin remnants.

2.3. Animals

The BALB/c female mice used in this study were 6–8 weeks old. These mice were housed in filter-top cages and were provided with sterile food (2019 Teklad Global 19% Protein Extruded Rodent Diet; Harlan Laboratories Inc. Indianapolis, IN) and water ad libitum at the FES Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México animal house facility in accordance with institutional and national official guidelines, NOM-062-ZOO-199, for the use and care of laboratory animals.

2.4. Spleen macrophages

Mononuclear cells were obtained from the spleens of Balb/c mice. Subsequently, non-adherent cells were obtained as described previously (Moreno-Fierros et al., 2013; Zhang et al., 2008). The splenocytes were cultured with RPMI-1640 medium supplemented with 10% FBS, 2 mM L-glutamine, 20 mM HEPES, 5 mM 2- β -mercaptoethanol, 1% essential amino acids and antibiotics (100 U/mL ampicillin, 100 μ g/mL streptomycin) for 2 h at 37 °C and 5% CO₂ in 6-well culture plates to allow macrophages to adhere. The adherent cells were recovered with a cell scraper.

2.5. Macrophage RAW264.7

The RAW264.7 macrophage cell line (monocyte chemoattractant leukaemic mouse macrophage cell line) was grown in DMEM medium supplemented with 10% FBS and antibiotics (100 U/mL ampicillin, 100 μ g/mL streptomycin) at 37 °C with 5% CO₂.

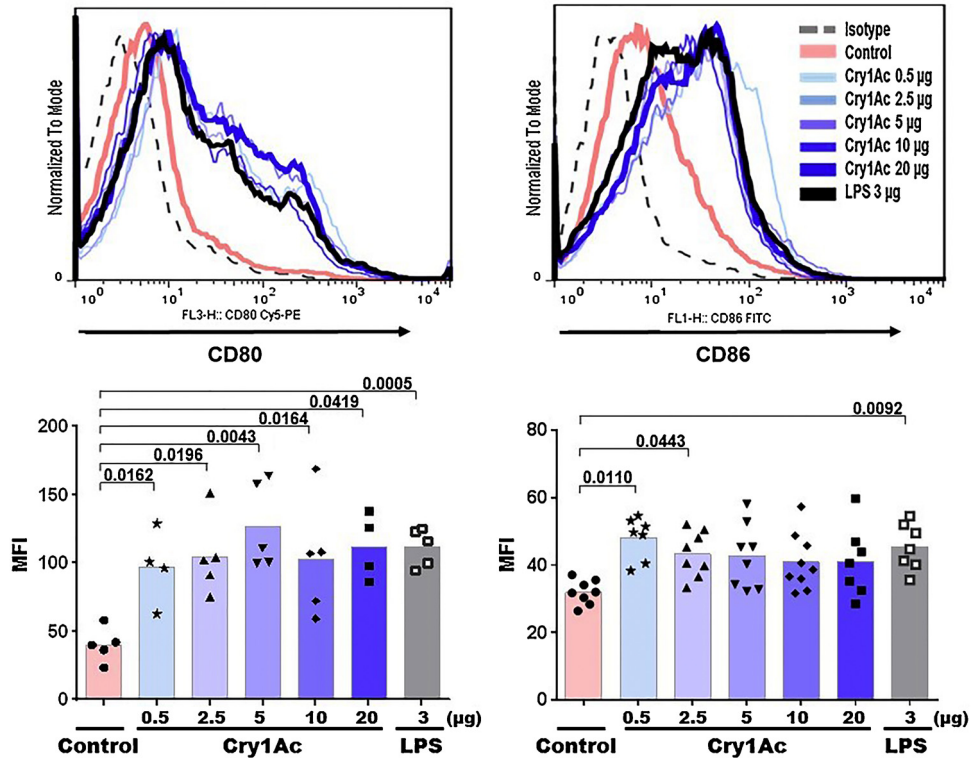


Fig. 1. Effects of Cry1Ac toxin and LPS on the expression of the costimulatory molecules CD80 and CD86 in adherent spleen cells. Cells were cultured with 0.5, 2.5, 5, 10 and 20 μg of Cry1Ac toxin (blue bars) or 3 μg of LPS (black bar) at 1×10^6 cells/mL for 24 h. Cells were harvested and stained for a flow cytometry analysis as described in the Materials and Methods section. Representative FACS histograms for CD80 and CD86 within the macrophage gate are shown. Data shown in scatter dot plots are the individual data points; and bar graphs represent the mean values, expressed as the mean fluorescence intensities (MFI) of independent experiments. Numbers indicate p values of groups showing significant differences versus the control group, as assessed by a non-parametric Mann Whitney U test (for interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

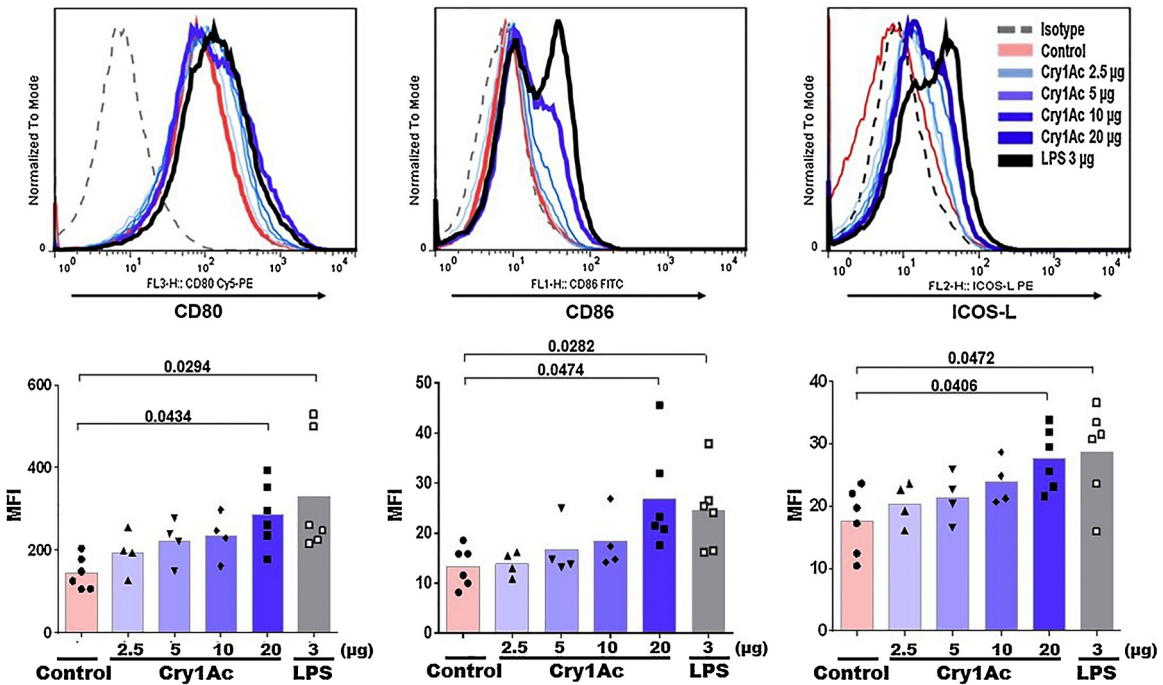


Fig. 2. Effects of Cry1Ac toxin and LPS stimulation of RAW264.7 cells on the expression of CD80, CD86 and ICOS-L. Cells were cultured for 24 h with different doses of Cry1Ac (2.5, 5, 10 and 20 μg ; blue bars) or LPS (3 μg) per 1.0×10^6 cells/mL. Cells were harvested and stained for a flow cytometry analysis as described in the Materials and Methods section. Representative histograms for CD80, CD86 and ICOS-L are shown. Data shown in scatter dot plots are the individual data points from independent experiments, graph bars are expressed as the mean values of mean fluorescence intensities (MFI) of the entire population. Inserted numbers indicate the p values of groups showing significant differences versus the control group, as assessed by a non-parametric Mann Whitney U test (for interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

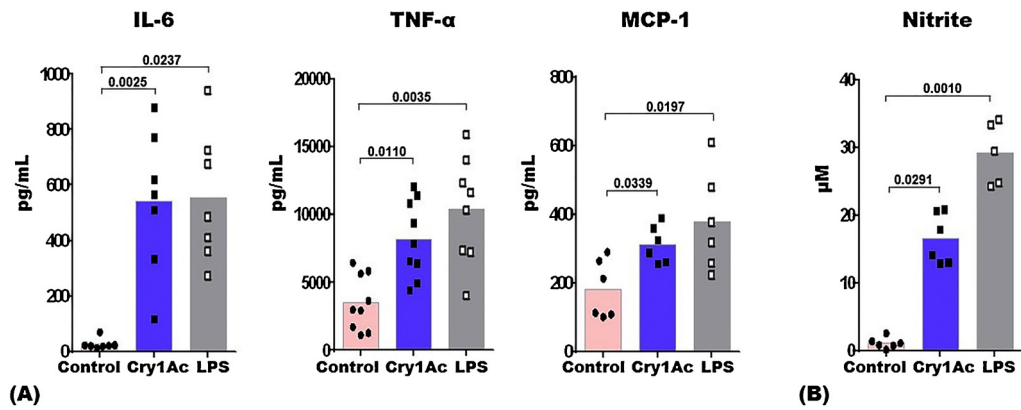


Fig. 3. The effects of Cry1Ac toxin on the production of cytokines and nitrites in RAW264.7 cells. The cytokines IL-6, TNF- α and MCP-1 (A) and nitrites (B) were detected in supernatants of RAW264.7 macrophages stimulated with Cry1Ac toxin (20 μ g/mL) or LPS (3 μ g/mL) for 24 h, as described in the Materials and Methods. Proinflammatory cytokine levels were assessed by flow cytometry using a BD biobeads kit, and nitrites were measured using a Griess assay. At least five independent experiments were performed, data are presented as scatter dot plots of individual data and bars graphs show the mean values. Significant differences ($p < 0.05$) were assessed by a non-parametric one-way ANOVA (Kruskal–Wallis) followed by Dunn's post hoc test. Numbers indicate significant p values versus the control group.

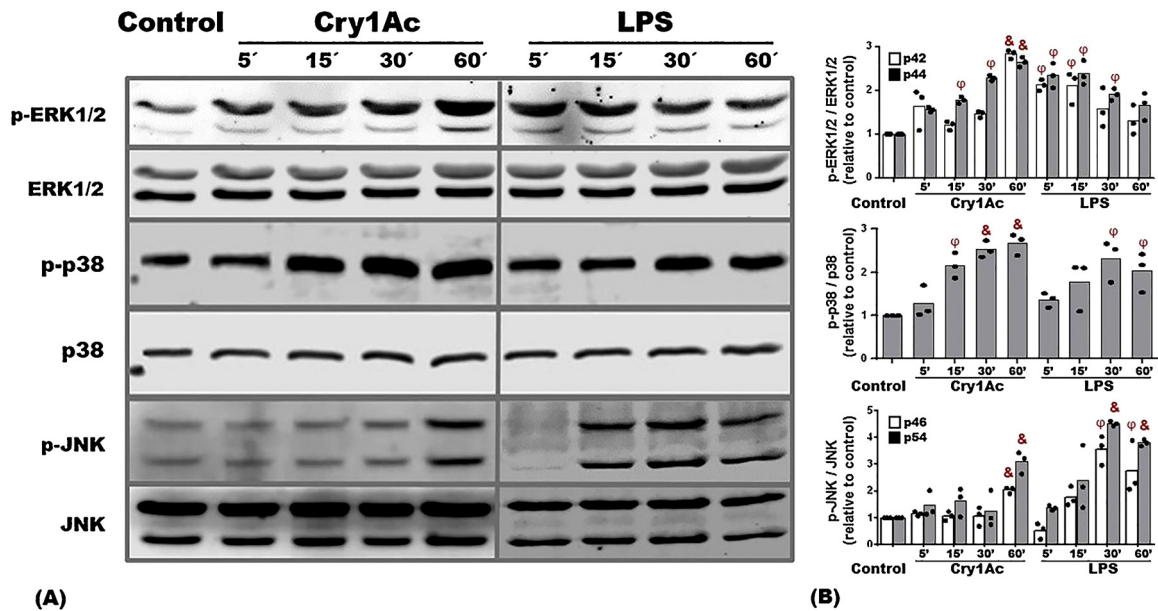


Fig. 4. Cry1Ac toxin induces ERK1/2, p38 and JNK phosphorylation. A Western blot analysis of cell lysates of RAW264.7 cells treated with Cry1Ac toxin (20 μ g/mL) or LPS (3 μ g/mL) or left untreated for 5, 15, 30 and 60 min in DMEM medium. Cell extracts were prepared as described in the Materials and Methods, and levels of phosphorylated (p) ERK1/2, p38, and JNK MAP kinases were detected by Western blot using specific antibodies for p-ERK1/2 and ERK1/2, p-p38 and p38, and p-JNK and JNK MAP kinases. An immunoblot representative of three separate experiments is shown (A). The scatter plots show the densitometric quantification of Western blot bands of three independent experiments. The data are expressed as ratios of phosphorylated/unphosphorylated values relative to the control (B). Data shown in graph bars are the mean values. ϕ $p < 0.05$, $\&$ $p < 0.01$ versus the control group assessed by a non-parametric Mann Whitney U test.

2.6. Evaluation of distinct Cry1Ac toxin doses on macrophage activation

To determine the concentration at which the Cry1Ac toxin was able to induce the upregulation of costimulatory molecules CD80 and CD86 in adherent macrophage-enriched spleen cells or in RAW264.7 cells, cells were cultured at a density of 1×10^6 cells/mL in supplemented RPMI-1640 or DMEM medium, respectively, in 12-well plates and stimulated with different amounts (0.5, 2.5, 5, 10 and 20 μ g) of Cry1Ac toxin or 3 μ g of LPS in 1 mL of medium for 24 h. After incubation, the adherent cells were harvested and washed once with medium, and the expression of costimulatory molecules CD80 and CD86 was evaluated by flow cytometry.

2.7. Flow cytometry

Adherent spleen cells and RAW264.7 macrophages (1×10^6 cells/mL) were harvested by centrifugation at 400g for 5 min at 4°C, and the pellets were suspended and stained as described previously (Rodríguez-Monroy et al., 2007). Non-specific binding was prevented with CD16/32 as described (Moreno-Fierros et al., 2013). The cells were then incubated in the dark for 30 min at room temperature with 20 μ L of the following properly diluted monoclonal antibodies: CD86-FITC, CD80-PE-Cy5 and ICOS-L-PE. The cells were washed with 0.5% Bovine serum albumin/Phosphate-buffered saline (BSA/PBS) and suspended in 0.4 mL of 1% paraformaldehyde in PBS. The fluorescence intensities were analysed using a FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) and BD Cell Quest Pro-software V.5.1.1, reading 30,000 events. The average fluorescence intensity of the labelled cells with specific monoclonal

antibodies was calculated and compared with the appropriate isotype control antibody. The data obtained from flow cytometry were analysed with FlowJo 7.6 software.

2.8. Cytokine measurements

The supernatants of the untreated cells and cells stimulated with 20 µg/mL toxin or 3 µg/mL LPS were recovered. The levels of TNF-α, MCP-1 (CCL2) and IL-6 were measured using the CBA Mouse Inflammation Kit according to the manufacturer's instructions with the following modifications: all steps were performed in microtubes, and we started the standard curve at a concentration of 0.625 pg/mL to determine concentrations below the curve recommended by the manufacturer. Fluorescence intensities were measured using a FACSCalibur cytometer and CB BDA software.

2.9. Nitrite assay

Macrophage nitrite production was determined by measuring the accumulation of nitrite in the medium with a Nitrate/Nitrite Colorimetric Assay Kit based on the Griess reaction, following the manufacturer's instructions. The supernatants of untreated 1×10^6 RAW264.7 cells and cells stimulated with 20 µg of toxin and 3 µg of LPS in 1 mL of DMEM medium without phenol red were recovered. The medium was mixed with an equal volume of Griess reagent. Nitrite concentrations were determined by comparison with standard solutions of sodium nitrite at OD550 prepared in cell culture medium supplied in the kit.

2.10. Pretreatment of RAW264.7 cells with inhibitors of MAPKs

To examine whether Cry1Ac-induced macrophage activation (upregulated expression of CD80, CD86 and ICOS-L) or production of proinflammatory cytokines (TNF-α, IL-6 and MCP-1) was mediated through MAPK pathways, we pre-treated the RAW264.7 macrophages with specific signalling inhibitors: 10 µM PD98059 (MEK1/2-ERK1/2-specific inhibitor), 5 µM SP600125 (JNK-inhibitor) and 10 µM SB203580 (inhibitor of p38) for 60 min (Cho et al., 2011). Cells were subsequently treated with Cry1Ac toxin (20 µg/ 1×10^6 cells/mL of DMEM) or LPS (3 µg/ 1×10^6 cells/mL of DMEM) and were cultivated for 24 h at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. The cells were harvested and stained for a flow cytometry analysis, and the supernatants were recovered for cytokine analysis.

2.11. Culture conditions for western blot analysis

MAPK assays were performed with RAW264.7 macrophages because this allowed us to work with a homogeneous population of cells. The RAW264.7 cells were routinely cultured in DMEM supplemented with 10% FBS. To determine if Cry1Ac toxin induced MAPK activation, we serum-fasted the cells before stimulation with 5% FBS for 12 h because we observed that the amount of FBS in the medium correlated with the basal activation of ERK1/2, as this MAPK is involved in proliferation and differentiation processes. We elected to use 5% FBS because in cells cultured without FBS (total serum starving), basal ERK1/2 activation was minimal and phosphorylated p38 was constitutively active (data not shown).

2.12. Western blot analysis to evaluate MAPK activation

Given that the MAPK phosphorylation process can be transient, a kinetics assay was performed in which 3×10^6 RAW264.7 macrophage cells were cultivated in 1 mL of DMEM supplemented with 5% FBS and stimulated with 20 µg/mL Cry1Ac toxin or 3 µg/mL LPS for 5, 15, 30 and 60 min. The cells were recovered with a scraper

and washed once with PBS, then were lysed as described previously (Cho et al., 2011). The supernatant was collected and immediately stored at -70 °C until the analysis. The protein concentration was determined using the modified Lowry method (Lowry et al., 1951). The cell extracts (40–60 µg of protein/lane) were separated by SDS-PAGE (10%) and transferred onto polyvinylidene difluoride membranes. After blocking (5% skim milk), the membranes were probed with specific primary antibodies (polyclonal goat anti-mouse p38 kinase, p-p38 kinase, ERK1/2, p-ERK1/2, JNK kinases and p-JNK kinase) at a 1:1000 dilution followed by incubation with a secondary antibody conjugated to horseradish peroxidase. The bands were revealed using ECLTM Substrate Western Sure (LI-COR Biosciences) and detected using a LI-COR C-digit Chemiluminescence Western Blot Scanner. The intensity of bands was quantified by densitometry using C-Digit Blot Scanner software.

2.13. Western blot to detect NF-κB in the nucleus using the ODYSSEY infrared imaging system

RAW264.7 cells were cultured in 6-well plates (3×10^6 cells/mL) in supplemented DMEM medium with 5% FBS and then stimulated with 20 µg/mL Cry1Ac toxin or 3 µg/mL LPS for 1, 1.30 and 2 h; cells were then washed once with PBS, recovered with a scraper in 1 mL of cold PBS, and pelleted by centrifugation. Nuclear extracts were prepared as described previously (Choi et al., 2008). Both cytoplasm and nuclear lysates were immediately stored at -70 °C until the analysis. Lysates were electroblotted onto a polyvinylidene difluoride membrane following separation on a 10% SDS-polyacrylamide gel. Then, the Western blot analysis was performed employing a conventional procedure using primary antibodies (anti-actin, anti-histone 4, anti-p50 NF-κB or anti-p65 NF-κB) at a 1:1000 dilution. Blots were washed 4 times with Tris-buffered saline/Tween 20 (TBS-T) and incubated with anti-rabbit IgG labelled with IRDye 800CW (green) at a 1:20000 dilution and anti-goat IgG labelled with Cy5 (red) at a 1:5000 dilution as secondary antibodies. The membranes were washed with PBS, and proteins were analysed using an Odyssey Infrared Imaging System (LI-COR, Lincoln, NE) according to the manufacturer's instructions.

2.14. Fluorescence assays for NF-κB detection

A total of 5×10^4 RAW264.7 cells/200 µL of DMEM supplemented with 10% FBS plated on Lab-Tek slides were treated with 20 µg/mL Cry1Ac toxin and 3 µg/mL LPS and incubated for 1 h at 37 °C. Macrophages were then washed with PBS and fixed with 4% paraformaldehyde in PBS for 25 min. The cells were washed with PBS and permeabilized with 0.1% Triton X-100 in PBS for 15 min at room temperature.

The NF-κB subunits were visualized by incubation with a specific anti-p50 or p65 primary antibody for 1 h followed by incubation with a Cy5-labelled secondary antibody for 1 h at room temperature. Nuclear DNA was stained with TO-PRO 3. Slides were mounted with Vectashield, covered with a glass coverslip, and examined under a Leica TCS/SP2 confocal microscope with a 63X objective.

2.15. Statistical analysis

A statistical analysis of cytokine levels, costimulatory molecules and densitometry analysis was performed with the PRISM computer program (GraphPad 5.03, San Diego, CA, USA). Significant differences between groups were tested by a one-way non-parametric analysis of variance (Kruskal–Wallis followed by Dunn post-hoc test) or the Mann Whitney U test. A p value <0.05 was considered significant.

3. Results

3.1. Cry1Ac toxin induces the expression of costimulatory molecules CD80 and CD86 on primary cultured macrophages and RAW264.7 macrophages

Cry1Ac toxin at a dose of 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ upregulated CD80 and CD86 in *in vitro*-stimulated macrophages and adherent macrophage-enriched spleen cells. The mean values of the fluorescence intensities were similar to those attained when cells were stimulated with LPS. Although there were no statistically significant differences in the expression of CD86 between cells treated with Cry1Ac toxin doses higher than 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and untreated controls, the average values still remained close to those obtained with LPS (Fig. 1).

Cry1Ac toxin was also able to activate RAW264.7 cells and induced an increase in the surface expression of CD80, CD86 and ICOS-L. However, it took a higher concentration of Cry1Ac toxin (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) to achieve a statistically significant difference over the unstimulated control, even though a dose-dependent trend was evident (Fig. 2). The need for a higher dose to induce RAW264.7 activation may be explained by the constant growth and stress that cell lines normally suffer during culture. Indeed, under basal conditions, the expression of CD80 was considerably higher in RAW264.7 cells (MFI = 150) than in primary macrophages (MFI = 40). To further study the effects of Cry1Ac toxin on the secretion of pro-inflammatory cytokines and to determine whether MAPK pathways were involved in Cry1Ac-induced macrophage activation, we decided to use RAW264.7 cells to obtain a homogeneous cellular population, and in addition we decided to use a concentration of 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Cry1Ac toxin, which elicited significant activation.

3.2. Cry1Ac-induced production of IL-6, TNF- α and MCP-1 and the increased production of nitrites in RAW264.7 macrophages

The secretion of proinflammatory cytokines and nitrite production was tested in the supernatants of RAW264.7 cells treated with Cry1Ac toxin or LPS or left untreated for 24 h. Both Cry1Ac toxin and LPS significantly induced the secretion of TNF- α , IL-6 and MCP-1 as well as nitric oxide production compared to control unstimulated cells ($p < 0.05$) (Fig. 3), which further supports the ability of Cry1Ac toxin to activate macrophages.

3.3. Cry1Ac toxin induces phosphorylation of the MAPKs p38, JNK and ERK1/2

To determine if the MAPKs ERK1/2, JNK and p38 are involved in Cry1Ac-induced macrophage activation, RAW264.7 cells stimulated with 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Cry1Ac toxin or 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS were collected at different time points, and their lysates were analysed by Western blot.

As shown in Fig. 4, both Cry1Ac toxin and LPS induce ERK1/2 phosphorylation. However, in the case of Cry1Ac toxin, activation increases over time and reaches a maximum after 1 h, whereas in the case of LPS, activation started to slowly decline after the first 5 min. Likewise, Cry1Ac toxin and LPS trigger p38 phosphorylation, but activation occurs more rapidly with Cry1Ac toxin (15 min) than with LPS (30 min). The kinetics of JNK activation induced by Cry1Ac toxin and LPS are strikingly different. It required almost an hour to achieve JNK activation with Cry1Ac toxin, but in the case of LPS, activation occurred within 15 min. Thus, the activation of MAPKs induced upon incubation with LPS or Cry1Ac exhibits distinct kinetics. The Cry1Ac-induced activation of ERK1/2, p38 and JNK kinases

suggests that these MAPKs are involved in the activation processes induced by Cry1Ac toxin in RAW264.7 macrophages.

3.4. Cry1Ac toxin induces nuclear translocation of p65 and p50 NF- κ B

To determine whether the NF- κ B signalling pathway was involved in Cry1Ac-induced macrophage activation, we examined the nuclear translocation of the p50 and p65 subunits via Western blot detection of nuclear and cytoplasmic protein fractions from stimulated and non-stimulated RAW264.7 cells. Our results indicated that, comparable to LPS, stimulation with Cry1Ac toxin also promotes the nuclear translocation of NF- κ B p65 (Fig. 5A).

We also observed by confocal microscopy (Fig. 5B) the presence of p50 and p65 subunits in the nuclei of cells stimulated with either Cry1Ac toxin or LPS; in contrast, scant labelling was detected in the nuclei of the untreated control. These results indicate that transcription factor NF- κ B is involved in the effects of Cry1Ac toxin-induced activation on macrophages. However, LPS induces the nuclear translocation of p65 with different kinetics compared to those induced by Cry1Ac toxin, as a decrease in the levels of p50 and p65 in the nuclei were observed after 1.30 h of stimulation, possibly due to regulatory effects as has been previously reported (Kwon et al., 2015; Tada et al., 2013).

3.5. Cry1Ac-induced upregulation of CD80 on RAW264.7 cells is inhibited by the p38 inhibitor

To determine whether MAPK pathways were involved in the Cry1Ac-induced upregulation of CD80, CD86 and ICOS-L, we evaluated the expression of these costimulatory molecules when cells were stimulated with Cry1Ac toxin or LPS in the presence of the MAPK inhibitors against MEK1/2-ERK1/2 (PD-098059), JNK (SP600125) and p38 (SB203580).

As shown in Fig. 6, the overexpression of CD80 that was induced by both Cry1Ac toxin and LPS was blocked by the p38 inhibitor (SB203580), whereas the JNK and MEK1/2-ERK1/2 inhibitors exerted no significant effects. Thus, similar to LPS, Cry1Ac toxin induces the expression of CD80 mainly via the MAPK p38 pathway in RAW264.7 cells. This result also suggests that the observed activation of JNK and ERK1/2 does not occur upstream of p38 but rather in parallel or downstream of this pathway, and the contribution of JNK and ERK1/2 to CD80 up-regulation is very low compared to the contribution of the p38 pathway. In contrast to the upregulation of CD80, the higher levels of CD86 obtained with Cry1Ac toxin and LPS stimulation were not affected by any of the MAPK inhibitors used.

3.6. Cry1Ac-induced production of IL-6, TNF- α and MCP-1 in RAW264.7 macrophages are primarily inhibited by the p38 inhibitor

To determine if the increased production of proinflammatory cytokines induced by Cry1Ac toxin was mediated by MAPK pathways, TNF- α , IL-6 and MCP-1 contents were evaluated in the supernatants of RAW264.7 cells that were treated with Cry1Ac toxin or LPS along with MAPK inhibitors against MEK1/2-ERK1/2 (PD-098059), JNK (SP600125) and p38 (SB203580) and compared to proinflammatory cytokine contents of cells stimulated with Cry1Ac in the absence of inhibitors.

Our results suggested that the production of IL-6, MCP-1 and TNF- α was differentially mediated through distinct MAPK pathways. The production of IL-6 and TNF- α upon Cry1Ac toxin or LPS treatment was primarily inhibited by the p38 inhibitor because the levels of these cytokines decreased significantly in its presence, which indicates that this pathway mediates the Cry1Ac-induced

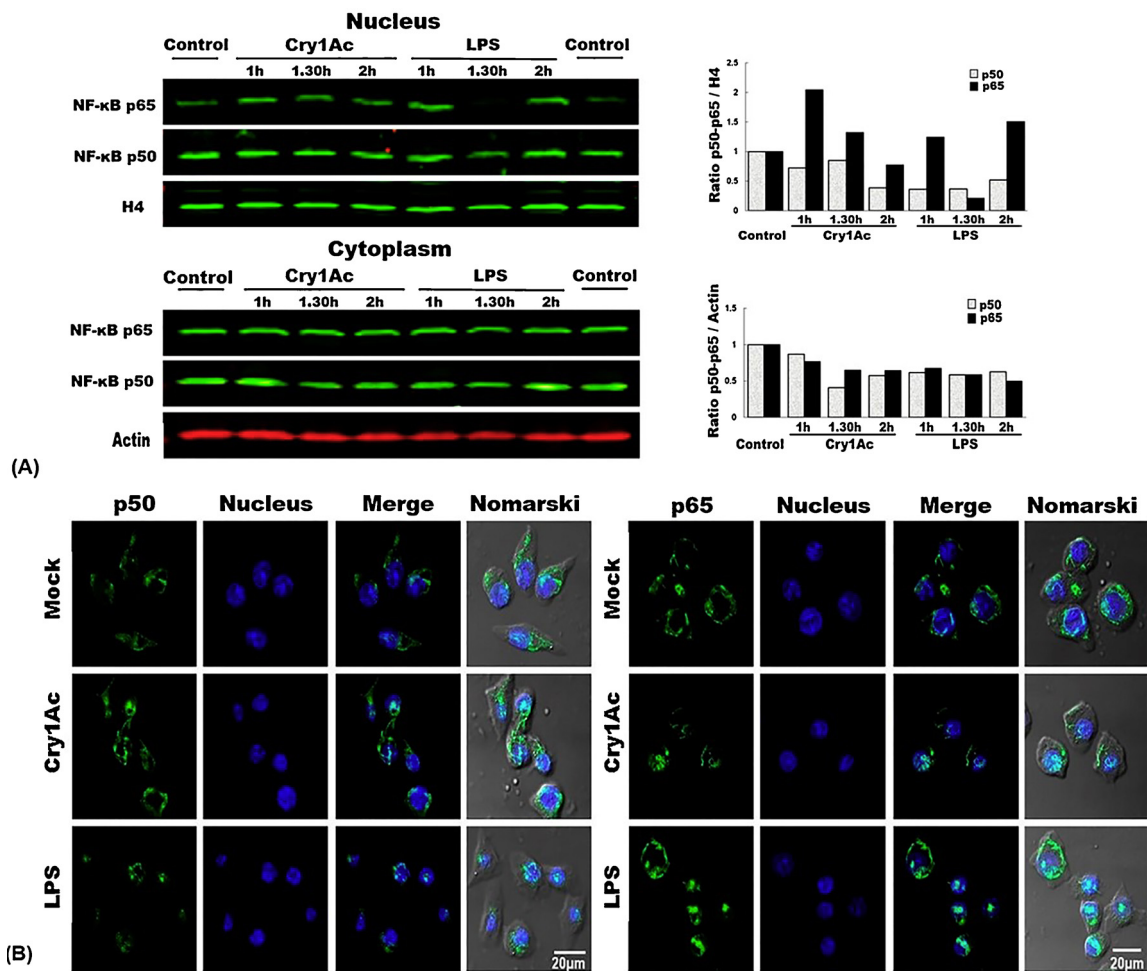


Fig. 5. Cry1Ac toxin promoted the nuclear translocation of NF- κ B in RAW264.7 macrophages. A) RAW264.7 cells were left untreated or were treated with Cry1Ac toxin ($20 \mu\text{g}/1 \times 10^6$ cells/mL) or LPS ($3 \mu\text{g}/1 \times 10^6$ cells/mL) and cultured for 1, 1.30 and 2 h at 37°C . The cells were washed with PBS, and nuclear and cytosolic fractions were separated. Western blotting was performed using specific anti-p50 and anti p65 antibodies; anti-actin and histone antibodies were used as internal controls for the cytoplasmic and nuclear fractions, respectively. A) A representative immunoblot is shown for the cytoplasmic and nuclear fractions, and the graph shows a densitometric analysis of the Western blots for NF- κ B p50 and p65. Values were, respectively normalized to actin or histone 4 (H4) for the cytoplasmic or nuclear fractions. B) Cry1Ac toxin promoted the nuclear translocation of NF- κ B in RAW264.7 cells. Macrophages were left untreated or were treated with Cry1Ac toxin ($20 \mu\text{g}/5 \times 10^6$ cells/mL) or LPS ($3 \mu\text{g}/1 \times 10^6$ cells/mL) for 1 h. Cry1Ac toxin was stained with fluorescein (green), and nuclear DNA was stained with TO-PRO 3 (blue). The slides were observed by confocal microscopy. Scale bar: $20 \mu\text{m}$ (for interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

overproduction of IL-6 and TNF- α observed with LPS stimulation (Fig. 7).

In MEK1/2-ERK1/2 inhibitor-pretreated cells subsequently stimulated with Cry1Ac toxin or LPS, IL-6 and MCP-1 production was partially inhibited. Finally, the LPS-induced production of MCP-1 was inhibited by the JNK inhibitor, indicating that ERK1/2 is involved in the production of MCP-1 in macrophages stimulated with Cry1Ac toxin and JNK is involved in the overproduction of MCP-1 in LPS-stimulated macrophages (Fig. 7).

4. Discussion

Cry1Ac protein has been used extensively as a biopesticide (Sansinenea, 2012), and it is expressed as a truncated toxin in transgenic plants for human and animal consumption. However, its effects in mammals have not been fully evaluated, and efforts have been centred around evaluating safety and potential toxicity (Rubio-Infante and Moreno-Fierros, 2015). Our research group has previously reported that Cry1Ac is immunogenic (Guerrero et al., 2004). In this work, we show for the first time that Cry1Ac toxin is able to induce macrophage activation by promoting the upregulation of the costimulatory molecules CD80 and CD86 and inducing

overproduction of the proinflammatory cytokines TNF- α and IL-6, the MCP-1 chemokine and nitric oxide. Moreover, it was demonstrated that stimulation with Cry1Ac in RAW264.7 cells induced the phosphorylation of ERK1/2, p38 and JNK kinases and promoted the nuclear translocation of the p50 and p65 NF- κ B subunits. Furthermore, our data indicate the participation of the MAPK pathways in Cry1Ac-induced macrophage activation, as the upregulation of CD80 and the production of cytokines were significantly abrogated by the p38 inhibitor SB203580, while the MEK1/2 MAPK inhibitor PD98059 increased the production of MCP-1.

We compared the magnitude of the activation effects elicited by Cry1Ac toxin with those of LPS. The ability of the LPS endotoxin to activate macrophages has been broadly characterized, and its activation effects are known to be mediated by MAPKs (Rao, 2001; Tada et al., 2013).

Notably, we found that Cry1Ac toxin upregulated CD80 and CD86 and induced cytokine production in macrophages at similar levels to those attained with LPS. However, when the phosphorylation of ERK1/2, p38 and JNK and the nuclear translocation of the p50 and p65 NF- κ B subunits induced by stimulation with Cry1Ac toxin or LPS were compared, we noticed that they exhibited different activation kinetics, distinct response magnitudes and dissimilar

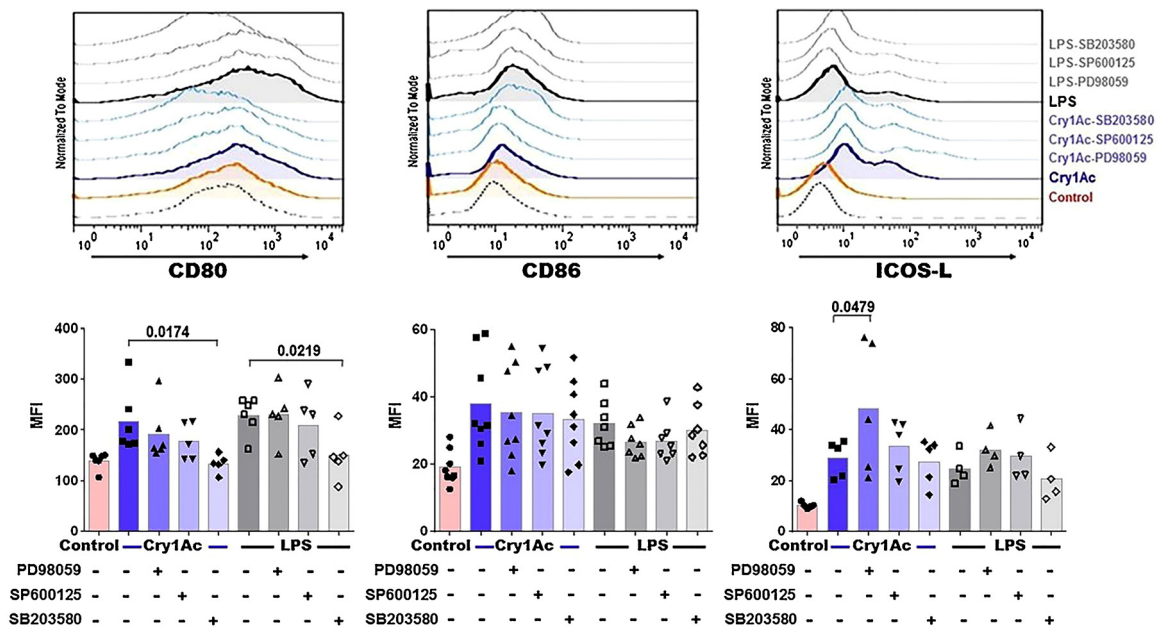


Fig. 6. Effects of specific MAPK inhibitors on Cry1Ac- or LPS-induced upregulation of CD80 and CD86 and ICOS-L in RAW264.7 macrophages. Cells were left untreated (–) or were pretreated (+) for 1 h with MAPK inhibitors against MEK1/2-ERK1/2 (PD98059), JNK (SP600125) and p38 (SB203580). The cells were subsequently treated with Cry1Ac toxin ($20 \mu\text{g}/1 \times 10^6$ cells/mL) or LPS ($3 \mu\text{g}/1 \times 10^6$ cells/mL) and cultured for 24 h at 37°C . The cells were harvested and stained for a flow cytometry analysis as described in the Materials and Methods. Representative FACS histograms of CD80, CD86 and ICOS-L are shown. Scatter dot plots show individual data of independent experiments. Values shown in bar plots are the means expressed as the mean fluorescence intensities (MFI) of the total population. Significant differences were assessed by a non-parametric Kruskal–Wallis one-way ANOVA test followed by Dunn's post hoc test. Inserted numbers indicate significant differences expressed as p values.

effects with MAPK inhibitors. Together, these results suggest independent activation mechanisms.

Concurrent with the present results showing the participation of MAPKs and NF- κ B in the effects related to Cry1Ac-induced activation, various effects induced during macrophage activation are mediated by the MAPK and NF- κ B pathways (Arthur and Ley, 2013; Jeffrey et al., 2007). It is also known that MAPK pathways activate NF- κ B (p50/p65) transcription factors (Guha and Mackman, 2001), which is necessary for the transcription of many proinflammatory cytokines such as TNF- α , IL-1, IL-6, and IL-8 (Blackwell and Christman, 1997; Dinarello, 2000).

In a previous study, our group demonstrated that Cry1Ac protoxin was also capable of activating macrophages, while the participation of NF- κ B transcription factors and MAPKs was suggested based on the upregulation of costimulatory molecules and proinflammatory cytokine production as well as partial inhibition of the effects induced by pretreatment with MEK1/2, ERK1/2 and p38 MAPK inhibitors (Moreno-Fierros et al., 2013). However, the induction of phosphorylated MAPKs was not evaluated by Western blot, as was performed in the present study with Cry1Ac toxin. Moreover, it is important to note that although both Cry1Ac toxin and protoxin are able to activate macrophages, there are subtle differences in their effects; for example, p38 is primarily involved in toxin-induced activation effects.

On the other hand, the molecular mechanisms regulating the expression of the costimulatory molecules CD80 and CD86 have not been fully characterized, but some evidence also suggests MAPK pathway participation. LPS-induced CD80 expression is mediated through JNK activation in monocytic cells (Lim et al., 2005), and JNK MAPK and p38 MAPK are involved in LPS-induced CD80 and CD86 expression in human DCs (Nakahara et al., 2004). Furthermore, it has been clearly established that p38 MAPK is one of the kinase pathways that regulates the production of proinflammatory cytokine such as IL-1 β , TNF- α and IL-6 (Adams et al., 2001; Ashwell, 2006; Clark, 2009). In contrast, our results suggest that ERK1/2 is involved in the overexpression of CD86, and the produc-

tion of MCP-1 in macrophages is stimulated by Cry1Ac toxin, while JNK is involved in the overproduction of MCP-1 in LPS-stimulated macrophages, suggesting that Cry1Ac toxin and LPS act differentially on the production of MCP-1.

Although in the present work the Cry1Ac-induced activation of MAPK induced in macrophages was related to proinflammatory responses, ERK1/2, JNK and p38 kinases are enzymes that also modulate various cellular events and responses to physical and chemical stress and are involved in growth processes, stress, differentiation, inflammation and apoptosis (Arthur and Ley, 2013; Plotnikov et al., 2011).

Altogether, the present findings indicate the capacity of Cry1Ac toxin to activate macrophages via MAPK pathways, contributing to our understanding of the molecular bases underlying its immunostimulatory mechanisms. However, our results also urge the need for a deeper evaluation in further studies, to determine whether MAPKs activation might be also provoked in other cellular types particularly at the intestinal mucosa. We consider it important because GM crops producing these toxins are currently considered safe (McClintock and Schaffer, 1995; Rubio-Infante and Moreno-Fierros, 2016), and in particular, Cry1Ac is currently expressed in GM plants such as maize and eggplant, which are used for human consumption. Furthermore, exposure to Bt toxins is also expected to occur through food contamination. We assume that the food consumed by the mice used in the present study did not contain significant traces of Cry1Ac derived from transgenic plants because the sera from non-immunized mice did not exhibit significant levels of anti-Cry1Ac antibodies (data not shown), and we know that these proteins are highly immunogenic when administered via mucosal routes (Guerrero et al., 2004).

To determine whether the in vitro doses used in the present study are related to potential GM crop exposure required to induce biological effects, we made the following speculative estimations. In the assays performed with primary culture spleen macrophages, it was observed that Cry1Ac toxin could induce the upregulation of costimulatory molecules starting at concentrations of $0.5 \mu\text{g}/\text{mL}$,

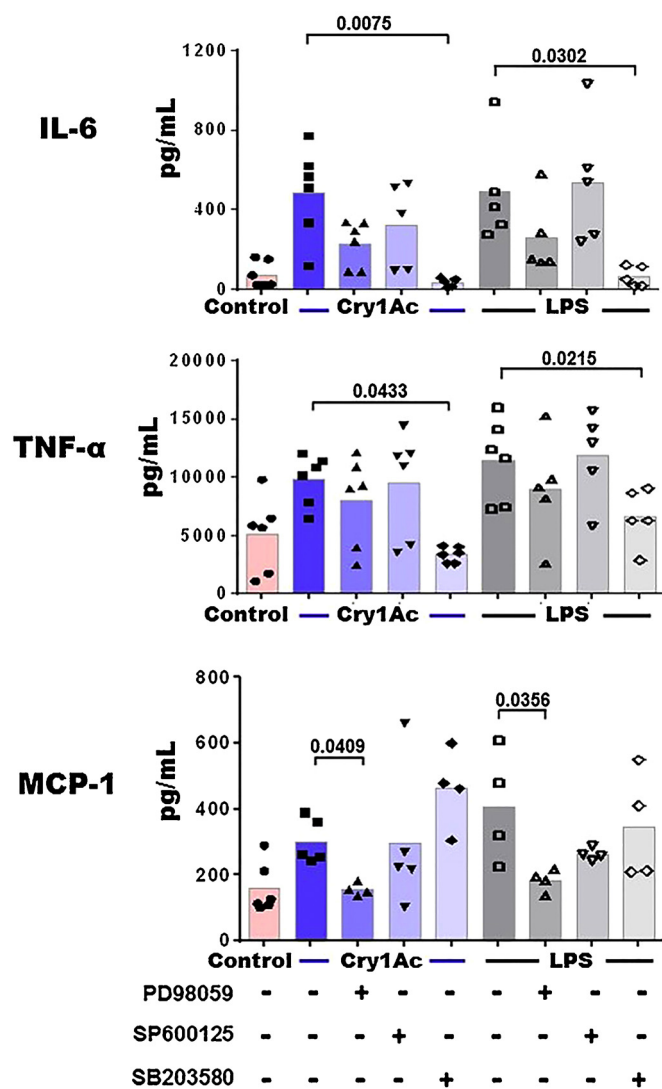


Fig. 7. Cry1Ac toxin increases levels of the proinflammatory cytokines TNF- α and IL-6 via the p38 MAPK pathway and MCP-1 via ERK1/2 pathway in RAW264.7 macrophages. Cells were untreated (control) or pretreated for 1 h with the following MAPK signalling inhibitors: MEK1/2-ERK1/2 (10 μ M PD98059), JNK (5 μ M SP600125) and p38 (10 μ M SB203580). The cells were subsequently stimulated with Cry1Ac toxin (20 μ g/1 \times 10⁶ cells/mL) or LPS (3 μ g/1 \times 10⁶ cells/mL) and cultured for 24 h at 37 °C. Supernatants were collected, and proinflammatory cytokine levels were assessed by flow cytometry. Scatter dot plots present the individual data of independent experiments. The values shown in the bar plots are the means expressed in pg/mL. Significant differences were assessed by a non-parametric Kruskal-Wallis one-way ANOVA test followed by Dunn's post hoc test. Inserted numbers indicate significant differences expressed as p values.

which is equivalent to 0.5 ppm. This concentration represents approximately less than 0.5% of the dose used in toxicological studies performed with Cry1Ac toxins in mice (EPA, 1995; Spencer, 1996), in which no evidence of toxic effects was found. However, it is rather difficult to make a precise toxicological evaluation of transgenic plants expressing Cry toxins or to estimate how much of this protein could be taken up after being consumed by animals or humans because the expression levels and the Cry protein contents in transgenic insect-resistant plants such as maize may vary between tissues within plants and between plants grown under different environmental conditions (Center for Environmental Risk Assessment, 2011; Székács and Darvas, 2013). Nevertheless, the highest reported protein concentration of Cry1Ac in GM plant tissue was 626.8 \pm 141.62 ng/g of fresh weight, and the expression of Cry1Ac in the grains of the corn Zea mays was estimated to

be 36.0–42.8 ng/g of dry weight, which is 0.0036%–0.0043% of the total protein content (Center for Environmental Risk Assessment, 2011). Therefore, if we consider that an estimated dose of Cry1Ac of approximately 0.2–2 mg/kg is required to achieve a biological effect, given that an immunostimulatory effect in mice can be elicited with doses of 5–50 μ g of Cry1Ac per 25-g mouse administered via the intranasal route (Guerrero et al., 2004; Moreno-Fierros et al., 2013) and the expression of Cry1Ac in the grains of the corn Zea mays was estimated to be 36.0–42.8 ng/g, then it would be sufficient for an individual weighing 60 kg to exhibit an immunostimulatory effect via the intranasal route with 0.28–2.79 g of corn. However, eating this amount of corn containing the Cry1Ac toxin would not be expected to produce an immunostimulatory effect because higher antigen doses are usually required to induce a significant immune response by the oral route than by the intranasal route. Therefore, the potential immunological effects of each transgenic plant should be directly evaluated by the oral route.

Conversely, it is important to note that in this study we used purified native Cry1Ac toxin, so we cannot assume that the activation effects observed will be similar to those induced by proteins expressed in transgenic plants in which the toxin is truncated or modified; therefore, the effects of each of these modified proteins should be evaluated in mammals and non-target organisms. As a result of these modifications, the immunological properties of Cry1Ac may also be modified (Rubio-Infante and Moreno-Fierros, 2016).

Furthermore, future studies are still needed to determine how this protein is recognized by mammalian cells as well as to explore other signalling pathways that might be implicated in the effects induced by Cry1Ac toxin and to perform a wider scan of the induced cytokine profile.

5. Conclusion

Cry1Ac toxin is able to activate macrophages through the upregulation of costimulatory molecules and the production of proinflammatory cytokines IL-6 and TNF- α , chemokine MCP-1, and nitrites, and these effects are mediated by MAPK pathways and the transcription factor NF- κ B.

Conflict of interest

The authors declare no conflicts of interest or financial conflicts.

Acknowledgements

The authors acknowledge Dr. Javier Varona for editorial assistance. Marilu Torres-Martínez is a doctoral student from Programa de Doctorado en Ciencias Bioquímicas from UNAM and is a CONACYT doctoral fellow. NRI is a doctoral student from Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas and is a CONACYT doctoral fellow. R.N.A. was a postdoctoral fellow from UNAM DGAPA. This work was supported by UNAM PAPIIT IN219013, IN219416, PAPCA 2014-11 and CONACYT CB177612, Mexico.

References

- Adams, J.L., Badger, A.M., Kumar, S., Lee, J.C., 2001. p38 MAP kinase: molecular target for the inhibition of pro-inflammatory cytokines. *Prog. Med. Chem.* 38, 1–60.
- Arthur, J.S.C., Ley, S.C., 2013. Mitogen-activated protein kinases in innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 13, 679–692. <http://dx.doi.org/10.1038/nri3495>.
- Ashwell, J.D., 2006. The many paths to p38 mitogen-activated protein kinase activation in the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 6, 532–540. <http://dx.doi.org/10.1038/nri1865>.
- Blackwell, T.S., Christman, J.W., 1997. The role of nuclear factor-kappa B in cytokine gene regulation. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 17, 3–9.

- Bravo, A., Likitvivanavong, S., Gill, S.S., Soberón, M., 2011. *Bacillus thuringiensis*: a story of a successful bioinsecticide. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 41, 423–431, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ibmb.2011.02.006>.
- Center for Environmental Risk Assessment, I.R.F., 2011. *A review of the environmental safety of the Cry1Ac protein*. *Environ. Biosaf. Res.* 10, 27–49.
- Cho, E.J., An, H.J., Shin, J.S., Choi, H.E., Ko, J., Cho, Y.W., Kim, H.M., Choi, J.H., Lee, K.T., 2011. Roxatidine suppresses inflammatory responses via inhibition of NF- κ B and p38 MAPK activation in LPS-induced RAW 264.7 macrophages. *J. Cell. Biochem.* 112, 3648–3659, <http://dx.doi.org/10.1002/jcb.23294>.
- Choi, H.J., Eun, J.-S., Park, Y.-R., Kim, D.K., Li, R., Moon, W.S., Park, J.M., Kim, H.S., Cho, N.-P., Cho, S.-D., Soh, Y., 2008. Ikariside A inhibits inducible nitric oxide synthase in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 cells via p38 kinase and nuclear factor-kappaB signaling pathways. *Eur. J. Pharmacol.* 601, 171–178, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2008.09.032>.
- Clark, A.R., 2009. The p38 MARK pathway mediates both antiinflammatory and proinflammatory process: comment on the article by Damjanov and the editorial by Genovese. *Arthritis Rheum.* 60, 3513–3514, <http://dx.doi.org/10.1002/art.24919>.
- Dinarello, C.a., 2000. Proinflammatory cytokines. *Chest* 118, 503–508, <http://dx.doi.org/10.1378/chest.118.2.503>.
- EPA (US Environmental Protection Agency). 1995. Pesticide Fact Sheet: *Bacillus thuringiensis* subsp. kurstaki Delta Endotoxin and its Controlling Sequences as Expressed in Cotton. Issued October 31, 1995.
- Esquivel-Pérez, R., Moreno-Fierros, L., 2005. Mucosal and systemic adjuvant effects of cholera toxin and Cry1Ac protoxin on the specific antibody response to HIV-1 C4/V3 peptides are different and depend on the antigen co-administered. *Viral Immunol.* 18, 695–708, <http://dx.doi.org/10.1089/vim.2005.18.695>.
- González-González, E., García-Hernández, A.L., Flores-Mejía, R., López-Santiago, R., Moreno-Fierros, L., 2015. The protoxin Cry1Ac of *Bacillus thuringiensis* improves the protection conferred by intranasal immunization with *Brucella abortus* RB51 in a mouse model. *Vet. Microbiol.* 175, 382–388, <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.11.021>.
- 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, 1177–1183, <http://dx.doi.org/10.1016/j.molimm.2004.06.026>.
- Guha, M., Mackman, N., 2001. LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cell Signal.* 13, 85–94, [http://dx.doi.org/10.1016/S0898-6568\(00\)00149-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0898-6568(00)00149-2).
- Hayden, M.S., West, A.P., Ghosh, S., 2006. NF-kappaB and the immune response. *Oncogene* 25, 6758–6780, <http://dx.doi.org/10.1038/sj.onc.1209943>.
- Ibarra-Moreno, S., García-Hernández, A.L., Moreno-Fierros, L., 2014. Coadministration of protoxin Cry1Ac from *Bacillus thuringiensis* with metacastode extract confers protective immunity to murine cysticercosis. *Parasite Immunol.* 36, 266–270, <http://dx.doi.org/10.1111/pim.12103>.
- Jeffrey, K.L., Camps, M., Rommel, C., Mackay, C.R., 2007. Targeting dual-specificity phosphatases: manipulating MAP kinase signalling and immune responses. *Nat. Rev. Drug Discov.* 6, 391–403, <http://dx.doi.org/10.1038/nrd2289>.
- Kwon, J.-W., Kwon, H.-K., Shin, H.-J., Choi, Y.-M., Anwar, M.A., Choi, S., 2015. Activating transcription factor 3 represses inflammatory responses by binding to the p65 subunit of NF- κ B. *Sci. Rep.* 5, 14470, <http://dx.doi.org/10.1038/srep14470>.
- Lregorreta-Herrera, M., Meza, R.O., Moreno-Fierros, L., 2010. Pretreatment with Cry1Ac protoxin modulates the immune response, and increases the survival of plasmodium-infected CBA/Ca mice. *J. Biomed. Biotechnol.*, 198921, <http://dx.doi.org/10.1155/2010/198921>.
- Lim, W., Gee, K., Mishra, S., Kumar, A., 2005. Regulation of B7.1 costimulatory molecule is mediated by the IFN regulatory factor-7 through the activation of JNK in lipopolysaccharide-stimulated human monocytic cells. *J. Immunol.* 175, 5690–5700, <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.175.9.5690>.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265–275.
- McClintock, J.T., Schaffer, C.R., S.R., 1995. A comparative review of the mammalian toxicity of *Bacillus thuringiensis*-based pesticides. *Pestic. Sci.* 45, 95–105.
- Mesnager, R., Clair, E., Gress, S., Then, C., Székács, 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, 695–699, <http://dx.doi.org/10.1002/jat.2712>.
- Moreno-Fierros, L., García, N., Gutiérrez, R., López-Revilla, R., Vázquez-Padrón, R.I., 2000. Intranasal, rectal and intraperitoneal immunization with protoxin Cry1Ac from *Bacillus thuringiensis* induces compartmentalized serum intestinal, vaginal and pulmonary immune responses in Balb/c mice. *Microbes Infect.* 2, 885–890.
- Moreno-Fierros, L., Perez-Ordóñez, 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, 2667–2680.
- Moreno-Fierros, L., Ruiz-Medina, E.J., Esquivel, R., López-Revilla, R., Piña-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, <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-3083.2003.01190.x>.
- Moreno-Fierros, L., García-Hernández, A.L., Ilhuicatzí-Alvarado, D., Rivera-Santiago, L., Torres-Martínez, 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, 1051–1066, <http://dx.doi.org/10.1016/j.intimp.2013.10.005>.
- Nakahara, T., Uchi, H., Urabe, K., Chen, Q., Furue, M., Moroi, Y., 2004. Role of c-Jun N-terminal kinase on lipopolysaccharide induced maturation of human monocyte-derived dendritic cells. *Int. Immunol.* 16, 1701–1709, <http://dx.doi.org/10.1093/intimm/dxh171>.
- Plotnikov, A., Zehorai, E., Procaccia, S., Seger, R., 2011. The MAPK cascades: signaling components, nuclear roles and mechanisms of nuclear translocation. *Biochim. Biophys. Acta—Mol. Cell Res.* 1813, 1619–1633, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2010.12.012>.
- Rao, K.M.K., 2001. MAP kinase activation in macrophages. *J. Leukoc. Biol.* 69, 3–10.
- Rodríguez-Monroy, M.A., Rojas-Hernández, S., Moreno-Fierros, L., 2007. Phenotypic and functional differences between lymphocytes from NALT and nasal passages of mice. *Scand. J. Immunol.* 65, 276–288, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3083.2006.01898.x>.
- Rojas-Hernández, S., Rodríguez-Monroy, M.a., López-Revilla, R., Reséndiz-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, 4368–4375, <http://dx.doi.org/10.1128/IAI.72.8>.
- Rubio-Infante, N., Moreno-Fierros, L., 2016. An overview of the safety and biological effects of *Bacillus thuringiensis* Cry toxins in mammals. *J. Appl. Toxicol.* 36, 630–648, <http://dx.doi.org/10.1002/jat.3252>.
- Sansinenea, E., 2012. *Bacillus thuringiensis* Biotechnol., <http://dx.doi.org/10.1007/978-94-007-3021-2>.
- Schnitzler, A.C., Burke, J.M., Wetzler, L.M., 2007. Induction of cell signaling events by the cholera toxin B subunit in antigen-presenting cells. *Infect. Immun.* 75, 3150–3159, <http://dx.doi.org/10.1128/IAI.00581-06>.
- Spencer, T.M., 1996. Petition for Determination of Nonregulated Status: *Insect Protected Corn (Zea Mays L.) with the CryIA (b) Gene from Bacillus Thuringiensis* Subsp. Kurstaki. DEKALB Genetics Corporation.
- Székács, A., Darvas, B., 2013. Advanced Technologies for Managing Insect Pests. In: Ishaaya, I., Palli, R.S., Horowitz, R.A. (Eds.). Springer, Netherlands, Dordrecht, pp. 195–230, http://dx.doi.org/10.1007/978-94-007-4497-4_10.
- Tada, R., Koide, Y., Yamamuro, M., Hidaka, A., Nagao, K., Negishi, Y., Aramaki, R., Koide, Y., Yamamuro, M., Hidaka, A., Nagao, K., Negishi, Y., Aramaki, Y., 2013. O. J. I. 3, 184–189, <http://dx.doi.org/10.4236/oji.2013.34023>.
- Vázquez, R.I., Moreno-Fierros, L., Neri-Bazán, L., De La Riva, G.a., López-Revilla, R., 1999. *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac protoxin is a potent systemic and mucosal adjuvant. *Scand. J. Immunol.* 49, 578–584, <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-3083.1999.00534.x>.
- Vázquez-Padrón, R.I., Moreno-Fierros, L., Neri-Bazan, L., de la Riva, G.A., López-Revilla, R., 1999. Intragastric and intraperitoneal administration of Cry1Ac protoxin from *Bacillus thuringiensis* induces systemic and mucosal antibody responses in mice. *Life Sci.* 64, 1897–1912.
- Zavala, L.E., Pardo-López, L., Cantón, P.E., Gómez, I., Soberón, M., Bravo, A., 2011. Domains II and III of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin remain exposed to the solvent after insertion of part of domain I into the membrane. *J. Biol. Chem.* 286, 19109–19117, <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M110.202994>.
- Zhang, X., Goncalves, R., Mosser, D.M., 2008. The isolation and characterization of murine macrophages. *Curr. Protoc. Immunol.* 83, 1–18, <http://dx.doi.org/10.1002/0471142735.im1401s83>.