



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO**

PROGRAMA DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

“La activación de macrófagos inducida por la protoxina Cry1Ac de *Bacillus thuringiensis* involucra las vías de señalización de ERK1/2, p38 y la interacción con la HSP70 de superficie”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

PRESENTA:

M. EN C. NESTOR RUBIO INFANTE

TUTOR DE TESIS: DRA. LETICIA MORENO FIERROS

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM

COMITÉ TUTOR:

DRA. ROMINA RODRÍGUEZ SANOJA

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

DR. ENRIQUE ORTEGA SOTO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## AGRADECIMIENTOS

Mi entero agradecimiento al Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por otorgarme la beca número 339167 para la realización de mis estudios de Doctorado.

Este proyecto se realizó gracias a los siguientes apoyos recibidos:

SEP CONACYT proyecto CB177612

UNAM PAPIIT proyecto IN219416

Proyecto PAPCA 2016-28 de la UNAM

A la Doctora Leticia Moreno Fierros por ser mi tutora de tesis y brindarme su conocimiento y apoyo siempre.

A los doctores Romina Rodríguez Sanoja y Enrique Ortega Soto por su valioso apoyo como mi comité tutorial.

A la Maestra en Ciencias Damaris Ilhuicatzi Alvarado por su apoyo en la mayoría de las técnicas que utilicé para realizar la tesis.

## AGRADECIMIENTOS PERSONALES

### **El trabajo dignifica al hombre.**

Es esta una de las frases que más me gustan y que he llevado a la práctica gracias a mi padre quien me ha inspirado toda la vida para trabajar muy duro por mis sueños con honestidad, respeto y esmero. Y es a él y a mi madre a quien agradezco profundamente por apoyarme siempre en cada una de mis metas, gracias Fidel Rubio Castillo y Ma. del Rosario Infante López por todo.

Agradezco el apoyo de mis hermanos Carolina Rubio Castillo y Omar Rubio Infante por aguantar todas mis observaciones y mis locuras. Gracias a mi familia Rita Rubio, Benigno Guerrero, Hugo, Eva, Esther, Iker, Gael por ser mis pilares en la vida.

### **La felicidad no es el fin sino el camino y cada quien decide el asiento en el que viajará.**

Una gran enseñanza de María Julia González que se convirtió en mi amiga, mi cómplice, mi guía, mi roomie, mi familia y mi ejemplo de vida. Agradezco a la vida por coincidir con grandes personas como ella y como la señora Isabel Juárez Yepez quien me ha recibido como un miembro más de su familia.

### **Los amigos son la familia que uno elige.**

No hay nada más cierto que esta frase, yo elegí desde hace mucho como mi familia a Iván Herrera, Nubi Baltazar, Nancy Camarena, Benita Ortega, Velita Rangel, Gaby Reyes, Brenda Ocegüera, Abraham Escobedo, Salma Jiménez.

Gracias Damaris Ilhuicatzí porque hemos pasado por tantas cosas, te he visto crecer demasiado y estoy muy orgulloso de ti (sin contar que sin ti jamás habría terminado la tesis), gracias a Gustavo Marciaga mi gran amigo y cómplice. Gracias a Marilú Torres quien siempre me inspiraba a seguir adelante con su empeño, dedicación y fuerza me llena de orgullo haber pertenecido a la familia del lab 9 con mis amigos Karlita, Robert, Itzel, Ernesto, Davicito, Toño y Lisina. Gracias a todos por ser parte de mi vida.

### **El conocimiento te hará libre.**

Gracias Dra. Ana Lilia García Hernández por ayudarme a ser libre eres una gran amiga de la cual he aprendido mucho y de quien siempre he sentido apoyo total.

Gracias infinitas a la Dra. Moreno (la jefa) por ser el tipo de jefe que todo mundo quisiera tener, por su enorme apoyo académico y personal. Gracias a todas sus enseñanzas he crecido no solo como investigador sino también como ser humano. He aprendido el amor a la ciencia, esa ciencia honesta que no se debe corromper y que siempre está para aportar.

## ÍNDICE

ABSTRACT.....	1
RESUMEN.....	2
ABREVIATURAS.....	3
INTRODUCCIÓN.....	4
Papel de las Mucosas en el desarrollo de infecciones.....	4
Vacunas de administración a nivel mucosas.....	6
Uso de adyuvantes para mejorar la respuesta inmune en mucosas.....	6
Protoxina Cry1Ac de <i>Bacillus thuringiensis</i> y su uso como adyuvante de mucosas.....	10
Principales receptores para las toxinas Cry1A en insectos.....	10
ANTECEDENTES.....	13
Uso de la protoxina Cry1Ac de <i>Bacillus thuringiensis</i> como adyuvante de mucosas.....	13
JUSTIFICACIÓN.....	15
HIPÓTESIS.....	15
OBJETIVO GENERAL.....	15
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	16
Materiales.....	16
Obtención y purificación de protoxina Cry1Ac.....	16
Cultivo de macrófagos.....	17
Activación de MAP cinasas (MAPK).....	17
Unión de pCry1Ac a los macrófagos.....	18
Ensayos de endocitosis.....	19
Determinación de proteínas de unión a pCry1Ac por ensayos de co-inmunoprecipitación e identificación por MALDI-TOF-TOF.....	19
Identificación de HSP70, $\alpha$ -enolasa y actina como proteínas de unión a pCry1Ac.....	21
Ensayos de inmunoprecipitación cruzada con anticuerpos anti-HSP70.....	21
Uso de anticuerpos anti HSP70 para el bloqueo de la activación de MAPK y la producción de citocinas inducidas por pCry1Ac.....	22

Inhibición <i>in vivo</i> de HSP70...	22
Análisis estadístico.....	23
RESULTADOS.....	24
El estímulo con pCry1Ac activa las MAPK ERK1/2, p38 y JNK en macrófagos.....	24
La unión de pCryAc a la superficie de macrófagos RAW264.7 es específica y saturable.....	26
pCry1Ac es endocitada y se transporta por vía endosomal desde endosomas tempranos a endosomas tardíos.....	28
Los macrófagos endocitan pCry1Ac vía clatrina.....	28
pCry1Ac co-inmunoprecipita con diversas proteínas incluyendo: HSP70, vimentina, actina y $\alpha$ -enolasa.....	31
Detección por western blot de HSP70, actina, $\alpha$ -enolasa y vimentina en las proteínas co-inmunoprecipitadas por pCry1Ac.....	32
pCry1Ac interacciona con HSP70.....	32
El pre-tratamiento con anticuerpos anti-HSP70 disminuye la fosforilación de ERK1 la producción de MCP-1 inducidas por pCry1Ac.....	34
Participación <i>in vivo</i> de la HSP70 en el reclutamiento de SPM.....	38
Tabla 1 Proteínas inmunoprecipitadas identificadas por MALDI-TOF-TOF.....	42
DISCUSIÓN.....	44
CONCLUSIONES.....	48
PERSPECTIVAS.....	49
BIBLIOGRAFÍA.....	50
ANEXOS.....	54
Artículos del doctorado.....	54
Artículo requisito.....	55

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Principales mecanismos de defensa contra patógenos en mucosas.....	5
Figura 2. Inducción de la respuesta inmune en mucosas.....	7
Figura 3. Estructura cristalizada de la protoxina Cry1Ac de <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	9
Figura 4. Vista detallada de los dominios individuales de la protoxina Cry1Ac y su comparación con estructuras conocidas.....	12
Figura 5. Efecto de pCry1Ac en la activación de p38, ERK1/2 y JNK.....	25
Figura 6. La unión de pCry1Ac a macrófagos es específica y saturable.....	27
Figura 7. pCry1Ac es internalizada vía endocítica.....	29
Figura 8. pCry1Ac se une y co-inmunoprecipita con proteínas de macrófagos, incluyendo HSP70, vimentina, $\alpha$ -enolasa y actina.....	33
Figura 9. pCry1Ac interacciona de manera específica con HSP70 de superficie.....	35
Figura 10. Los anticuerpos anti-HSP70 inhiben la fosforilación de ERK1 inducida por pCry1Ac, y disminuyen la producción de MCP-1.....	36
Figura 11. La población de LPM de PerC tiene alta expresión de csHSP70.....	39
Figura 12. pCry1Ac aumenta los SPM MHCII+ in vivo y este efecto es parcialmente inhibido por PES, un inhibidor funcional de HSP70 24h después de la administración de pCry1Ac.....	40
Figura 13. Efecto de la estimulación in vivo con pCry1Ac con o sin PES después de 72h.....	41

## ABSTRACT

Here, we aimed to further characterize the mechanisms involved in protoxin (p) Cry1Ac-induced macrophage activation. We demonstrated that pCry1Ac induces MAPK ERK1/2, p38 and JNK phosphorylation in RAW264.7 macrophages. Because MAPK activation is mainly triggered via ligand-receptor interactions, we focused on the identification of potential pCry1Ac-receptor proteins. Flow cytometry and confocal analysis showed specific saturable pCry1Ac-binding to the macrophage surface and evidence of its internalization via the clathrin-pathway. We performed immunoprecipitation assays and identified by MALDI-TOF-TOF several possible pCry1Ac-binding proteins, such as heat shock proteins (HSPs), vimentin,  $\alpha$ -enolase and actin; whose interaction and presence was confirmed respectively by ligand blot and Western blot assays. We also detected cell-surface (cs) pCry1Ac-HSP70 co-localization, so HSP70 was chosen for further characterization. Co-immunoprecipitation with HSP70 antibodies followed by Western blot confirmed the pCry1Ac-HSP70 interaction. Furthermore, pretreatment of RAW264.7 cells with HSP70 antibodies reduced pCry1Ac-induced ERK1 phosphorylation and MCP-1 production; thus suggest the functional participation of csHSP70 in pCry1Ac-induced macrophage activation. csHSP70 also was evaluated in peritoneal-cavity (PerC) macrophages of untreated BALB/c mice, interestingly it was found that the predominant population namely large-peritoneal-macrophages (LPM) displayed csHSP70+hi. Furthermore, the dynamics of PerC macrophage subsets, LPM and small-peritoneal macrophages (SPM) was evaluated in response to *in vivo* pCry1Ac stimuli in presence or not of Phenylethanesulfonamide (PES) a functional HSP70 inhibitor. It was found that pCry1Ac increased the proportion of SPM CD11b+F4/80+lowMHCII+csHSP70+low and markedly reduced the amount of LPM CD11b+F4/80+hiMHCII-csHSP70+hi; while PES, partially suppressed this pCry1Ac-induced effect, further suggesting the participation of HSP70 in macrophage activation process.

## RESUMEN

La mayoría de los agentes infecciosos que penetran al organismo utilizan como vía de entrada las superficies mucosas (gastrointestinal, respiratoria y genitourinaria) por lo que es necesario el desarrollo de estrategias que activen la respuesta inmune en estos sitios y generen protección. Debido a la amplia regulación de las superficies mucosas la mayoría de las vacunas administradas por esta vía carecen de eficacia y por lo general es necesario el uso de adyuvantes para romper la tolerancia y generar inmunidad. En la búsqueda de adyuvantes de mucosas eficaces y seguros nuestro grupo de trabajo demostró que la protoxina Cry1Ac de *Bacillus thuringiensis* (pCry1Ac) es un potente inmunógeno y adyuvante sistémico y de mucosas. La capacidad adyuvante de pCry1Ac está relacionada con la activación de células presentadoras de antígeno induciendo la sobreexpresión de moléculas co-estimuladoras y la secreción de citocinas pro-inflamatorias. En este estudio nosotros caracterizamos la vía de activación de macrófagos inducida por pCry1Ac e identificamos los posibles receptores para esta proteína. Se determinó por Western blot la participación de las MAPK en la activación de macrófagos inducida por pCry1Ac, también se determinó que la unión de pCry1Ac a la superficie de macrófagos es específica y saturable, además se demostró que la pCry1Ac es endocitada vía clatrina. Se identificaron diversas proteínas de unión a pCry1Ac en macrófagos entre ellos la proteína de choque térmico 70 (HSP70), la vimentina, la  $\alpha$ -enolasa y la actina. Se demostró la co-localización en la superficie celular (cs) de pCry1Ac con HSP70, por lo que HSP70 fue elegida para su posterior caracterización. La co-inmunoprecipitación con anticuerpos anti HSP70 seguida por Western blot confirmó la interacción entre pCry1Ac y HSP70. Además, el pretratamiento de células RAW264.7 con anticuerpos anti-HSP70 (que solo detectan csHSP70) disminuyó la fosforilación de ERK1 inducida por pCry1Ac y la producción de MCP-1 lo que sugiere la participación funcional de la csHSP70 en la activación de macrófagos. Se evaluó la expresión de la csHSP70 en los macrófagos de la cavidad peritoneal (PerC) de ratones BALB/c no tratados, se encontró que la población predominante llamada macrófagos de peritoneo grandes (LPM) expresan constitutivamente csHSP70+ hi. Además, se evaluó *in vivo* la dinámica de las poblaciones de los macrófagos de PerC, los LPM y los macrófagos peritoneales pequeños (SPM) en respuesta al estímulo con pCry1Ac en presencia o ausencia de feniletilsulfonamida (PES), un inhibidor funcional de HSP70. Se demostró que pCry1Ac aumenta la proporción de SPM CD11b+F4/80+ low MHCII+ csHSP70+low y redujo notablemente la cantidad de LPM CD11b+F4/80+hiMHCII-csHSP70+hi; mientras que el pretratamiento con PES, suprimió parcialmente este efecto confirmando la participación de la csHSP70 en el proceso de activación de macrófagos inducido por pCry1Ac.

ABREVIATURAS:

B-CSP: Proteínas de superficie celular biotiniladas

BSA: albúmina de suero bovina

cs: Superficie celular

Cy5: Cianina 5

DMEM: Medio Modificado Eagle de Dulbecco

DTT: Ditiotreitól, EDTA: Etilenodiaminotetraacético

ERK1 / 2 : Cinasas reguladas por señales extracelulares ½

FBS: Suero bovino fetal

FITC: isotiocianato de fluoresceína

HSP70: Proteína de choque térmico 70

IP: Inmunoprecipitación

JNK: Cinasas c-Jun N-terminal

LPS: Lipopolisacárido

MALDI-TOF-TOF: Desorción / Ionización por Láser Asistida por Matriz en Tiempo de vuelo

MAPK: Proteínas cinasas de activación por mitógenos

MCP-1: Proteína monocítica quimioatrayente 1

IMF: intensidad media de fluorescencia

OVA: ovoalbúmina

p: fosforilado

p38: proteína cinasa activada por mitógenos p38

PBS: solución salina tamponada con fosfato

PFA: Paraformaldehído

PerC: cavidad peritoneal

PES: feniletilsulfonamida

PMSF: fluoruro de fenilmetilsulfonilo

RIPA: buffer de ensayos de radioinmunoprecipitación

SDS-PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida

TBS: solución salina tamponada con Tris

TNF- $\alpha$ : Factor de Necrosis tumoral  $\alpha$

TRITC: isocianato de tetrametil rodamina.

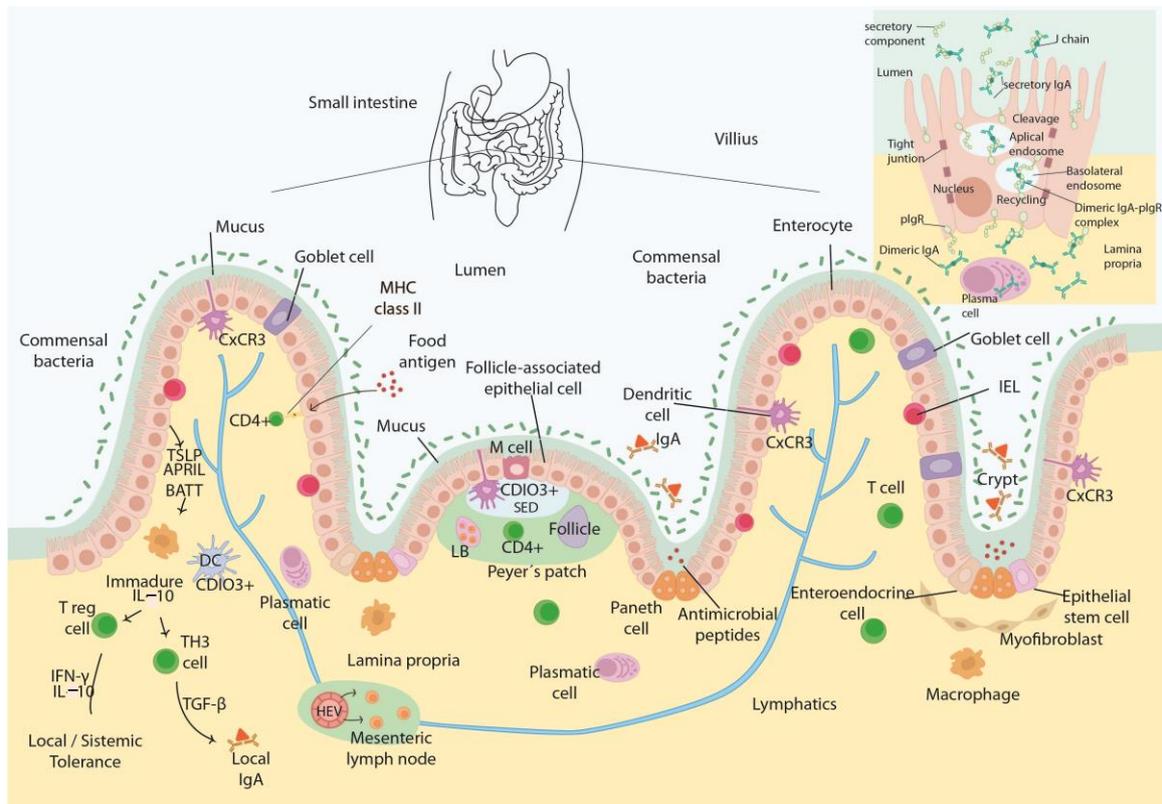
## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 Papel de las Mucosas en el desarrollo de infecciones.

Las superficies mucosas cubren  $\sim 400\text{m}^2$  de la superficie del cuerpo humano y funcionan tanto como barreras físicas y en la defensa inmune contra la invasión de patógenos (Rose 2014). Esta enorme superficie de contacto hace que sean los principales sitios de entrada de patógenos al organismo y por lo tanto es necesario desarrollar estrategias de protección en estos sitios mucosos (Holmgren and Czerkinsky 2005; Vela Ramirez et al. 2017). Uno de los métodos más eficaces para prevenir las enfermedades es el desarrollo de vacunas. Las mucosas son la primera línea de defensa y es necesario generar inmunidad en estos sitios (aplicando vacunas). Además, la vacunación a través del sistema inmune de mucosas puede inducir respuestas inmunes sistémicas eficaces e inmunidad a nivel de mucosas a diferencia de la vacunación parenteral, que es un pobre inductor de inmunidad en las superficies mucosas (Kim et al. 2012).

Las mucosas cuentan con diversos mecanismos de defensa que las mantienen protegidas de ataques externos. En primer lugar se encuentran las barreras fisicoquímicas, luego la inmunidad innata y finalmente la inmunidad adaptativa. Las mucosas están protegidas por una barrera física que es el epitelio, las células epiteliales (enterocitos) liberan citocinas y factores que permiten la homeostasis de la mucosa. Algunas células especializadas como las células de Goblet y de Paneth secretan moco y péptidos antimicrobianos respectivamente que sirven como defensa. Las células M captan antígenos de la dieta y antígenos de patógenos los cuales son procesados y presentados en las placas de Peyer para generar inmunidad adaptativa contra los patógenos y tolerancia hacia los antígenos comensales. Existe producción basal de IgA dimérica en las mucosas lo que permite neutralizar patógenos antes de que invadan el epitelio (Figura 1). Sin embargo, el sistema inmune de mucosas está ampliamente regulado por una compleja interacción entre los mecanismos capaces de provocar una fuerte respuesta inmune contra los patógenos y los mecanismos de tolerancia para proteger el cuerpo previniendo la inducción de respuesta inmune contra proteínas de la dieta, bacterias comensales, o antígenos inofensivos, evitando así las enfermedades inflamatorias crónicas (Pabst and Mowat 2012).

El sistema inmune de mucosas se puede dividir en sitios de inducción y sitios efectores. Los primeros están constituidos por el tejido linfoide asociado a la mucosa (MALT) así como los ganglios linfáticos de las mucosas. Los sitios efectores están representados por la lámina propia (LP), el estroma de las glándulas exocrinas y los epitelios superficiales. EL MALT comprende múltiples compartimentos, la mucosa más extensa que a su vez es el



**Figura 1. Principales mecanismos de defensa contra patógenos en mucosas.** En la Figura se muestra la organización de la mucosa intestinal, las células que participan en la defensa contra patógenos y los mecanismos de defensa inmune (tomado de García-Hernández et al. 2015).

órgano inmunológico de mayor tamaño en humanos es el tejido linfoide asociado al intestino (GALT) (Holmgren and Czerkinsky 2005).

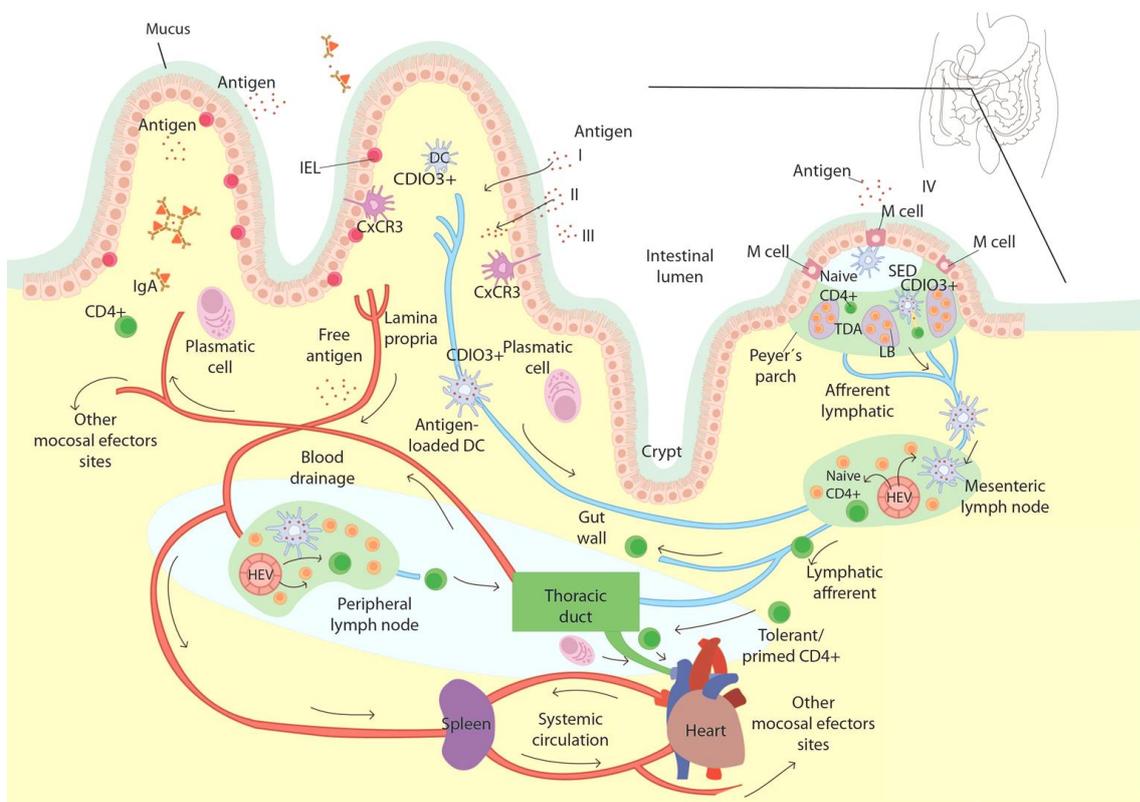
En el GALT, los tejidos organizados son responsables de la fase de inducción de la respuesta inmunitaria, estos comprenden las placas de Peyer (PP) y los ganglios linfáticos mesentéricos (MLNs) así como los folículos linfoides aislados (ILFS), que tienen apariencia microscópica y se distribuyen a lo largo de las paredes del intestino delgado y del grueso. El tejido linfoide difuso de los sitios efectores en la mucosa intestinal se componen de linfocitos dispersos por todo el epitelio y la lámina propia (LP) (Lamichhane et al. 2014). Un objetivo importante en el diseño de vacunas de mucosas comprende la inducción de inmunidad protectora duradera contra los patógenos en las superficies mucosas, inoculando antígenos directamente en estos sitios (Figura 2) que son procesados por las células dendríticas debajo de las células M en las placas de Peyer. Los antígenos pueden ser transportados a los ganglios linfáticos más cercanos como los mesentéricos (MLN) activando la respuesta inmune efectora y generando células de memoria que permitirán una respuesta efectora más rápida y eficaz en próximas infecciones. Este tipo de respuestas son pobremente inducidas por vías parenterales (Neutra and Kozlowski 2006).

### 1.2 Vacunas de administración a nivel mucosas

Actualmente existen pocas vacunas de administración mucosa que están permitidas para uso en humanos; estas vacunas son microorganismos atenuados como las vacunas contra el rotavirus, el poliovirus, la *Salmonella typhi* y el cólera, las cuales se administran por vía oral (Pavot et al. 2012; Woodrow et al. 2012). Las vacunas intranasales como FluMist, una vacuna viva atenuada contra el virus de la influenza, generan IgA secretora (SIgA) en los tractos respiratorio, gástrico y genital (Quan et al. 2012). Tras la vacunación sublingual, se inducen respuestas inmunitarias específicas en el tracto gastrointestinal y en el tracto respiratorio superior e inferior (Czerkinsky and Holmgren 2012). Las vacunas actuales son vacunas enteras vivas atenuadas. Uno de los nuevos enfoques en el desarrollo de vacunas de mucosas son las vacunas de subunidades que carecen de patógenos completos ya que se consideran más seguras, sin embargo, generalmente son vacunas con baja inmunogenicidad, susceptibles a la degradación de los materiales de la vacuna en el ambiente de la mucosa. Otro problema en el desarrollo de vacunas de mucosas es la modulación del ambiente inmune de la mucosa que tiende hacia la tolerancia (Pavot et al. 2012; Vela Ramirez et al. 2017).

### 1.3 Uso de adyuvantes para mejorar la respuesta inmune en mucosas.

Las vacunas de mucosas ofrecen numerosos beneficios como: i) inducción de respuesta efectora a nivel local, ii) menores costos para su administración y iii) no son invasivas.

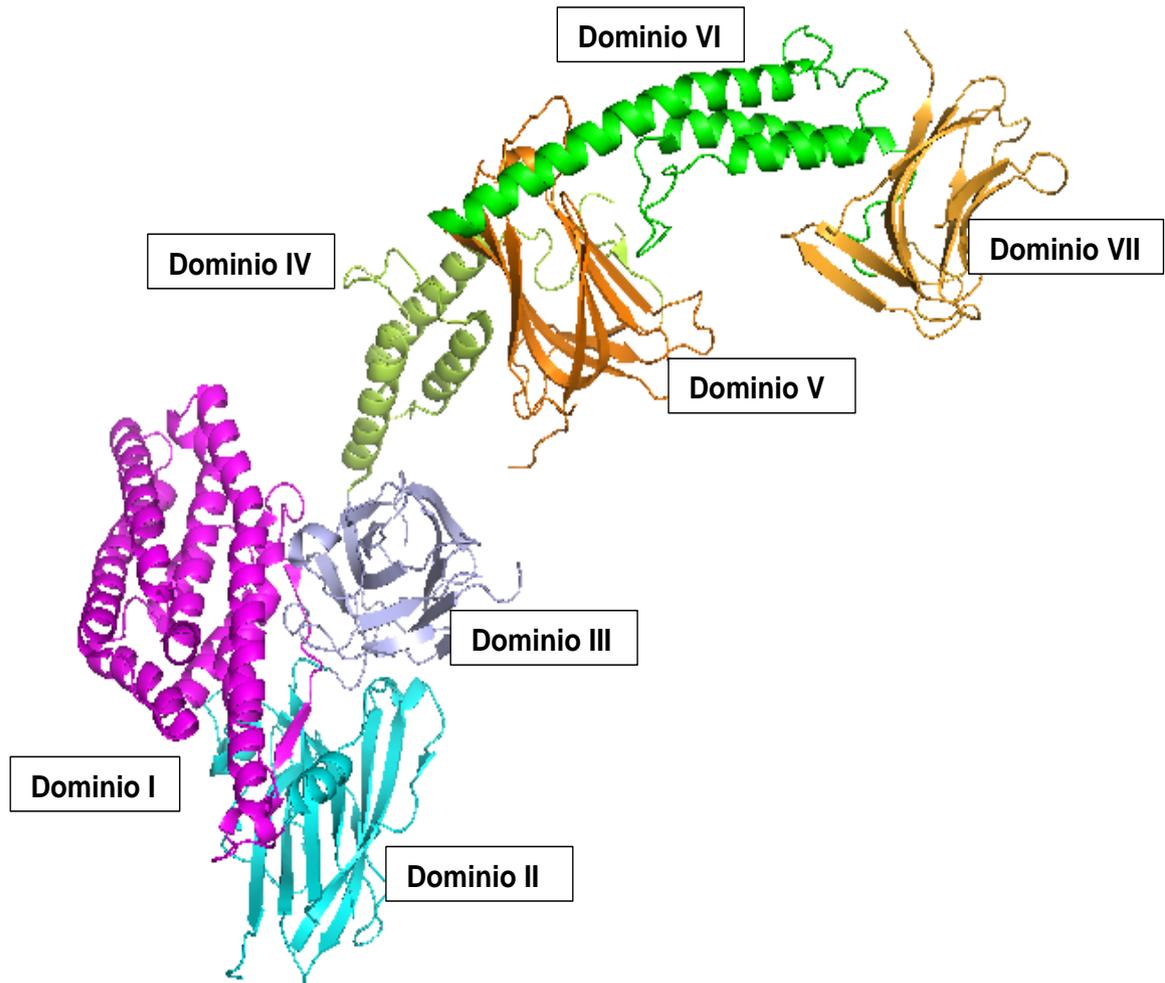


**Figura 2. Inducción de la respuesta inmune en mucosas.** En la figura se muestra el intestino delgado y las diferentes formas en las que se captan los antígenos; I) Los antígenos pueden entrar a lámina propia entre las uniones estrechas de las células epiteliales, II) los antígenos pueden entrar por endocitosis a través de las células epiteliales, III) los antígenos son captados por células especializadas (macrófagos C<sub>x</sub>CR3) y finalmente los antígenos pueden ser captados directamente por las células M presentes en el intestino delgado y grueso (tomado de García-Hernández et al. 2015).

Existe un número limitado de vacunas de mucosas aprobadas para su uso en y generalmente es necesario el uso de estrategias como el desarrollo de adyuvantes de o sistemas de entrega de antígeno para una vacunación en mucosas exitosa. Los adyuvantes de mucosas tienen la finalidad de incrementar la inducción de respuestas inmunes específicas contra un antígeno en un microambiente tolerogénico, esto se logra mediante diversos mecanismos como activación del inflammasoma (en el caso del Hidróxido de aluminio), la inducción de células B de alta afinidad y con la diferenciación hacia células B de memoria (Lore and Karlsson Hedestam 2009) y por la activación de células presentadoras de antígeno.

Los principales adyuvantes usados a nivel sistémico y de manera importante a nivel mucosas son los ligandos de los TLRs los cuales estimulan la inmunidad innata y ayudan a generar una respuesta adaptativa eficaz. Por ejemplo, el adyuvante comercial IC31 contiene un oligodesoxinucleótido sintético (ODN1a), un agonista de TLR-9, y es capaz de inducir respuestas tanto Th1 como inmunidad mediada por células T citotóxicas (Pattacini et al. 2012). El monofosforil lípido A, el muramil dipéptido, y la flagelina, que son ligandos de TLR-2, TLR-4, TLR-5 o, respectivamente, también se utilizan como adyuvantes en vacunas de mucosas (Rhee et al. 2012). El lipopolisacárido (LPS), es otro componente importante de algunos adyuvantes de mucosas. Por otra parte, el quitosán, las saponinas, y citocinas tales como IL-1 e IL-12 son otros candidatos de adyuvantes de mucosas. Los adyuvantes de mucosas más efectivos y de mayor utilización a nivel experimental son la toxina de cólera (CT) y la toxina termolábil de *E. coli* (LT) que activan la adenilato ciclasa a través de receptores de la membrana celular para generar una cantidad excesiva de AMP cíclico en las células afectadas. Aunque estas toxinas tienen potente efecto adyuvante son demasiado tóxicas para su uso en humanos y se pueden unir al GM1 presente en neuronas (Lee et al. 2009).

Otro adyuvante de mucosas es la emulsión de aceite en agua MF59, que actualmente está autorizada para uso humano. Aunque el mecanismo de acción sigue siendo poco claro, MF59 no sólo mejora el reclutamiento de células inmunes innatas a través de la liberación de ATP y la absorción de antígeno, sino que también aumenta la respuesta de células B de Centro germinal (GC) a través de la activación de las células T cooperadoras foliculares (Mohan et al. 2013). Finalmente, la catelicidina LL-37 es un adyuvante que dirige a los antígenos hacia las células M. LL-37 aumenta el suministro de antígeno a estas células y activa las células dendríticas foliculares por la interacción con el receptor de formil dipéptido. Esto mejora la inducción de respuestas inmunitarias específicas de antígeno en los compartimentos tanto sistémico como de mucosas (Kim et al. 2015).



**Figura 3. Estructura cristalizada de la protoxina Cry1Ac de *Bacillus thuringiensis*.** Estructura general del monómero Cry1Ac, coloreado por dominio: los dominios I, II y III (la toxina) están en color rosa, azul y morado respectivamente, el dominio IV es de color verde oscuro, el dominio V en color naranja el dominio VI en verde claro y el dominio VII en amarillo. Esta figura se realizó usando la herramienta The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0, Schrödinger, LLC.

#### 1.4 Protoxina Cry1Ac de *Bacillus thuringiensis* y su uso como adyuvante de mucosas.

Las proteínas Cry son el bioinsecticida de mayor importancia a nivel mundial, se producen durante la fase de esporulación de la bacteria *Bacillus thuringiensis* (Bt) (Zhang et al. 2016). Por definición, una proteína Cry es una inclusión paraesporal proteínica de Bt que presenta efectos tóxicos verificables experimentalmente sobre un organismo susceptible, o una proteína que posee una similitud de secuencia con alguna proteína Cry ya descrita. Las proteínas Cry se producen como  $\delta$ -endotoxinas de diferentes pesos moleculares que oscilan entre 27 y 140 kilo Daltones (kDa). Las proteínas Cry se producen en forma de protoxinas de pesos moleculares altos que al ser procesadas proteolíticamente generan el fragmente activo (la toxina)(Xu et al. 2014). Nuestro grupo de trabajo propone a la pCry1Ac como adyuvante mucosal ya que tienen características que la hacen inmunogénica como: elevado peso molecular, es una toxina bacteriana, y tiene una estructura compleja.

La estructura tridimensional de las toxinas Cry1A está formada por tres dominios funcionales (Figura 3). El dominio I está formado de siete  $\alpha$ -hélices antiparalelas (hidrofóbicas y anfipáticas), 6 de las cuales rodean a la quinta hélice. Este dominio es responsable de la formación de poros en las células del epitelio intestinal del insecto blanco. La oligomerización para formar el poro inicia con una horquilla helicoidal hidrofóbica ( $\alpha 4$ - $\alpha 5$ ). El dominio II está formado por tres láminas plegadas  $\beta$  y por tres asas, este dominio juega un papel fundamental en la especificidad de la toxina ya que las asas interactúan con el receptor específico en las células epiteliales del insecto. El dominio III está formado por dos láminas  $\beta$  anti paralelas formando un sándwich (de Maagd et al. 2003).

Los dominios IV y VI son haces de hélices alfa que se parecen a la estructura de interacción de la espectrina o al inhibidor bacteriano de complemento de unión al fibrinógeno. Los dominios V y VII son láminas  $\beta$  que se asemejan mucho a los sitios de unión de carbohidratos (CBM) que se encuentran en las hidrolasas de azúcar (Figura 4), sin embargo, no se ha determinado a que hidratos de carbono (si los hubiera) se pueden unir estos dominios (Evdokimov et al. 2014).

#### 1.5 Principales receptores para las toxinas Cry1A en insectos.

##### 1.5.1 APN

En el intestino de lepidopteros esta proteína que pertenece a la familia de las aminopetidasa digiere las proteínas derivadas de la dieta del insecto y trabaja en cooperación con endopeptidasas y carboxipeptidasas (Wang et al., 2005). La APN escinde aminoácidos neutros desde el extremo N terminal de los polipéptidos. Las proteínas Cry se

unen de manera diferencial a la APN; por ejemplo, la toxina Cry1Ac se une al dominio III específicamente a residuos de N-acetil Galactosamina (GalNAc) presentes en el receptor de la APN. Los dominios de unión en Cry1Ac se han determinado y corresponden los residuos 509QNR511, N506 y Y513 (Burton et al. 1999). En contraste los dominios de Cry1Aa, que interactúan con la APN de *Bombix mori* (Nakanishi et al. 2002) se encuentran en el dominio III en las regiones de aminoácidos: 508STRVN513 y 582VFTLSAHV589 (Atsumi et al. 2005).

#### 1.5.2 Proteínas tipo E-Caderina

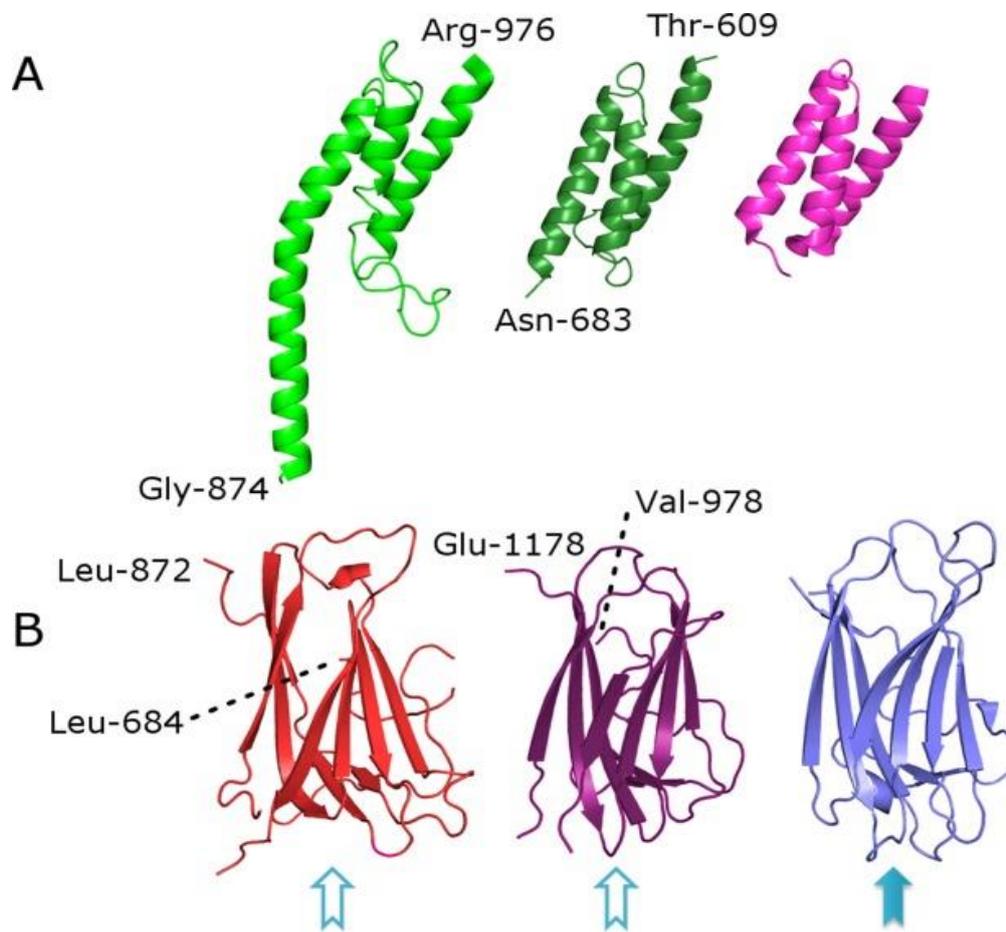
Las E-caderinas (CADR) son proteínas de adhesión y son proteínas transmembrana que juegan un papel importante en la adhesión celular, la migración, la organización del citoesqueleto, y la morfogénesis (Gumbiner 1996). Las caderinas de lepidópteros se han identificado en la membrana apical de las células del intestino medio del insecto en el epitelio columnar, están expuestas e interactúan con las toxinas Cry (Aimanova et al. 2006; Atsumi et al. 2005; Braun and Keddie 1997; Midboe et al. 2003). Las regiones principales que interactúan con las toxinas Cry1A en las caderinas (CADR) son tres residuos: 865NITIHITDTNN875 situado en la repetición 7 e interactúa con Cry1Ab en el bucle 2. Los loops a-8 y 2 de Cry1A interactúan con los residuos 1331IPLPASILTVTV1342 ubicados en la repetición 11 de CADR (Gomez et al. 2002; Gomez et al. 2003) y los residuos 865NITIHITDTNN875 situados en la repetición 7 de CADR.

#### 1.5.3 ALP

Las fosfatasa alcalinas son proteínas ancladas a GPI y se han caracterizado como proteínas de unión Cry1A en *H. virescens* y *M. sexta*. Estas proteínas se encuentran en balsas lipídicas en las membranas celulares. Las balsas lipídicas están enriquecidas con glicoesfingolípidos, colesterol y proteínas ancladas a GPI y se propone que participan en la transducción de señales y en la clasificación y el tráfico de proteínas de la membrana plasmática (Munro 2003).

#### 1.5.4 Otras proteínas

Cry1Ac también se une a V-ATPasa a la subunidad A y a la actina, lo que indica que el modo de acción de las toxinas Cry puede implicar la unión de las toxinas con otros componentes de las células del intestino medio; Sin embargo, su papel en el mecanismo de acción queda por analizar (McNall and Adang 2003).



**Figura 4. Vista detallada de los dominios individuales de la protoxina Cry1Ac y su comparación con estructuras conocidas.** (A) El dominio VI (verde) y el dominio IV (verde oscuro) tienen semejanza al inhibidor de complemento PDB ID 2GOM (rosa). (B) El dominio V (rojo) y el dominio VII (violeta) tienen parecido al dominio de unión a carbohidratos (PDB ID 2ZEW, azul). La flecha en azul indica sitios conocidos de unión a carbohidratos, las flechas vacías indican probables sitios de unión a azúcares. Tomado de Evdokimov et al. 2014.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Uso de la protoxina Cry1Ac de *Bacillus thuringiensis* como adyuvante de mucosas.

En la búsqueda de adyuvantes de mucosas seguros y eficaces nuestro grupo de trabajo propone a la proteína Cry1Ac de *Bacillus thuringiensis*. En reportes previos se demostró que la protoxina (133 kDa) es un potente inmunógeno, adyuvante mucosal y sistémico, y no es tóxica para vertebrados (Moreno-Fierros et al. 2000; Vazquez et al. 1999; Vazquez-Padron et al. 1999). Además, puede ser producida a gran escala y a bajo costo debido a que el gen codificante para la protoxina se expresa de manera recombinante en *Escherichia coli*. La alta inmunogenicidad de la protoxina Cry1Ac se demostró por su capacidad para inducir respuestas de anticuerpos específicos en suero y en las secreciones mucosas recuperadas del intestino delgado y grueso, lavados bronco-alveolares y vaginales después de la inmunización de ratones BALB/c por vía intraperitoneal, intragástrica, intranasal y rectal.

Se ha demostrado el efecto adyuvante de la coadministración de pCry1Ac hacia diversos antígenos de diferente naturaleza (proteínas tales como el Antígeno de superficie de la hepatitis B, péptidos del VIH (Esquivel-Perez and Moreno-Fierros 2005) y polisacáridos de neumococos (Moreno-Fierros et al. 2003). Además, el efecto adyuvante en mucosas provocado por la pCry1Ac puede ser tan potente como el efecto provocado por la toxina del cólera. La pCry1Ac puede funcionar como acarreador de distintos antígenos como polisacáridos de neumococos mejorando la respuesta de anticuerpos hacia estos antígenos a nivel mucosas y a nivel sistémico (Moreno-Fierros et al. 2003).

Como adyuvante la protoxina Cry1Ac confiere protección contra parasitosis provocadas por *Naegleria fowleri*, *Taenia crassiceps*, *Plasmodium chabaudi* AS, *Plasmodium berghei* ANKA (Ibarra-Moreno et al. 2014; Legorreta-Herrera et al. 2010; Rojas-Hernandez et al. 2004) y recientemente se ha demostrado protección contra *Brucella abortus* en un modelo murino (Gonzalez-Gonzalez et al. 2015). El efecto protector de la protoxina Cry1Ac contra *Naegleria fowleri* es mediado por STAT6 y una respuesta Th2 de anticuerpos IgG1 e interleucina-4 (IL-4) (Carrasco-Yeppez et al. 2010).

Recientemente, se ha demostrado que los efectos inmunopotenciadores de la pCry1Ac pueden ser utilizados para incrementar la respuesta inmune hacia antígenos tumorales en un modelo murino de cáncer de mama inducido por la línea celular 4T1. La administración profiláctica de pCry1Ac co-administrada con lisados celulares de la línea tumoral impide el desarrollo de tumores en los ratones, se ha demostrado que la pCry1Ac impide la eliminación de linfocitos TCD4+ y TCD8+ ocasionada por la formación del tumor, además la pCry1Ac disminuye la producción de las células mieloides supresoras (MDSC) (Safarzadeh

et al. 2017) las cuales están directamente relacionadas con el desarrollo y la progresión de los tumores.

La protoxina Cry1Ac es capaz de activar macrófagos murinos de cultivos primarios induciendo la expresión de moléculas co-estimuladoras CD80 y CD86 y la producción de citocinas pro-inflamatorias, también se ha propuesto que parte del mecanismo de la protoxina en la activación de macrófagos RAW264.7 podría ser activando vías de señalización como la de las MAP cinasas (MAPK), entre ellas ERK1/2 y p38 (Moreno-Fierros et al. 2013), sin embargo no se ha demostrado que la pCry1Ac pueda inducir la fosforilación de MAPK.

## JUSTIFICACIÓN

Debido a que nuestro grupo de investigación ha demostrado que la protoxina Cry1Ac (pCry1Ac) de *Bacillus thuringiensis* es un potente adyuvante sistémico y de mucosas es necesario, seguro y eficaz que puede ser utilizado para mejorar vacunas, es preciso caracterizar el mecanismo inmunoestimulador de la pCry1Ac en macrófagos e identificar el o los posibles receptores para su posible utilización en el desarrollo de vacunas y como adyuvante antitumoral en nuevas terapias contra el cáncer. Además se tienen evidencias que la pCry1Ac pudiera inducir la activación de MAPK tales como ERK1/2, p38, y JNK sin embargo estos efectos necesitan ser dilucidados.

## HIPÓTESIS

La protoxina Cry1Ac se une a la superficie de macrófagos a través de receptores específicos capaces de activar vías de señalización como ERK1/2, p38 y JNK.

## OBJETIVO GENERAL

Identificar los posibles receptores para la pCry1Ac y caracterizar su mecanismo inmunoestimulador en macrófagos.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- i) Determinar el efecto del estímulo con pCry1Ac en la activación de MAPK cinasas.
- ii) Establecer si la pCry1Ac es capaz de unirse a macrófagos y de ser internalizada.
- iii) Determinar las proteínas de unión a pCry1Ac en macrófagos.
- iv) Identificar los receptores para pCry1Ac en macrófagos.

### 3. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.

#### 3.1 Materiales.

Suero fetal bovino (FBS), L-glutamina, HEPES 20 mM, 5 mM 2-β-mercaptoetanol, 1% de aminoácidos esenciales (GIBCO / BRL, Nueva York, EE.UU.); anticuerpos de conejo anti fosfo (p) ERK o anti-ERK no fosforilada (ERK1/2), anti p-38 y JNK formas fosforiladas y no fosforiladas (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, EE.UU.). Anticuerpos de conejo anti Rab5, Rab7 y anticuerpos de cabra anti-HSP70 y anti α-enolasa (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EE.UU.). Cámaras Lab-Tek, isotiocianato de fluoresceína (FITC), cianina 5 (Cy5), biotina (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, EE.UU.). Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA, EE.UU.). Anticuerpos secundarios marcados con fluorocromos infrarrojos anti-IgG de conejo-Dye800, estreptavidina-Dye800 y anti-cabra-Dye680 (LiCor Biosciences, Licor, Lincoln, NE, EE.UU.), anti-IgG de cabra-Cy5 de Jackson ImmunoResearch (West Grove, PE, EE.UU.). Coctel Minicomplete inhibidor de proteasas de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE.UU.) (Roche); resina de polimixina (Bio-Rad, Hercules, CA, EE.UU.). Sefarosa 4B activada con bromuro de cianógeno, isocianato de tetrametil rodamina (TRITC) Faloidina, LPS (*E. coli*, serotipo 0111: B4), Monodansilcadaverina (MDC), Nistatina (NYS), paraformaldehído, Triton-X-100, E-Toxate, penicilina, estreptomycin, PD98059, Nonidet P-40, aprotinina, leupeptina, fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), ortovanadate, ditiotreitol, proteína A-agarosa, Tween 20, de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) todos los demás reactivos químicos fueron adquiridos de Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, EE.UU.).

#### 3.2 Obtención y purificación de protoxina Cry1Ac.

Se utilizó una cepa recombinante de *E. coli* con el gen que codifica para la protoxina Cry1Ac. Las bacterias se cultivaron en medio "Luria Broth" (US Biological Swampscott, MA 01907) y se adicionó ampicilina (100 µg/mL). Posteriormente se incubó a 37 °C por 48 horas a 300 rpm en agitación constante. Las bacterias se cosecharon mediante centrifugación a 10000 rpm a 4 °C por 15 minutos y se lavaron dos veces con TE (Tris-HCl 0.05 M, EDTA 1mM, pH 8.0). Las bacterias se lisaron incubándolas a 37 °C durante 1 hora con 20 mg/mL de lisozima + sacarosa al 15%, posteriormente las bacterias se sonicaron durante ciclos de 5 minutos cada uno, a una amplitud de 100 Htz. Los cuerpos de inclusión se recuperaron por centrifugación a 10000 rpm a 4 °C por 10 minutos.

La pastilla se lavó 5 veces con 50 mL de NaCl 0.5 M más Tritón X-100 al 1%, sonicando entre cada lavado. Se lavó la pastilla con 30mL de agua bidestilada a 4°C. Una vez más se centrifugó a 10000 rpm por 15 minutos a 4°C y se solubilizó la pastilla en 10 mL de amortiguador de carbonatos (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.1M, pH 9.6, 10 mM de DTT) por 30 minutos a 37 °C en agitación (300 rpm). La protoxina Cry1Ac que fue solubilizada se obtiene por centrifugación a

10000 rpm 4°C por 15 minutos, mediante la recuperación del sobrenadante. Los restos de endotoxinas se eliminaron con una columna de polimixina (BioRad Lab, CA) y se verificó la ausencia de LPS mediante el kit de E-TOXATE. Finalmente la concentración de proteínas se determinó por el método de Bradford y la pureza mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).

### 3.3 Cultivo de macrófagos.

Las células RAW 264.7 se cultivaron en medio DMEM suplementado con L- glutamina (1 mM) suplementado con antibióticos (100 U/mL de Antibac) y 10% de SFB y se incubaron a 37 °C, 5% de CO<sub>2</sub>.

### 3.4 Activación de MAP cinasas (MAPK).

En estudios previos demostramos que la estimulación *in vitro* con pCry1Ac inducía la activación de macrófagos y mediante el uso de inhibidores específicos para MEK1/2, p38 y JNK sugerimos la participación de estas MAPK en este proceso (Moreno-Fierros et al. 2013). En este trabajo, realizamos ensayos de Western blot para determinar si la estimulación con pCry1Ac inducía la fosforilación de ERK1/2, p38 y JNK en macrófagos RAW 264.7. Debido a que ERK1/2 estaba activa de forma constitutiva en las células cultivadas con 10% de FBS, los ensayos de fosforilación de MAPK se realizaron en células parcialmente privadas de suero (con 5%). Las células se colocaron en placas (3x10<sup>6</sup> células/mL/ pozo) y se estimularon con 10 µg/mL (73 nM) de pCry1Ac a tiempos de 2,5, 5, 15, 30 y 60 minutos. Los macrófagos RAW264.7 tratados con lipopolisacárido (LPS) se utilizaron como control positivo de activación de MAPKs. Después de los estímulos, las células se lavaron con buffer de fosfatos (PBS), las células se recuperaron con un cosechador de células y se centrifugaron a 400g durante 5 minutos a 4°C. Las células se resuspendieron en tampón de lisis (50 mM HEPES pH = 7,0, NaCl 250 mM, EDTA 5 mM, 0,1% Nonidet P-40, 1 mM de PMSF, 0,5 mM de DTT, fluoruro de sodio 5 mM, ortovanadato de sodio 0,5 mM, 5 mg/mL de aprotinina y 5 g/mL leupeptina) y se incubaron durante 30 min a 4°C. Los lisados se centrifugaron a 400g durante 5 min (4°C) para recolectar los sobrenadantes. La concentración de proteínas se determinó por el método de Lowry modificado. Los extractos de proteínas celulares (40 µg/carril) se separaron mediante SDS-PAGE y se transfirieron a membranas de PVDF. Las membranas se bloquearon 1h a temperatura ambiente (RT) con 5% de leche sin grasa en solución salina con Tris 0,05% de Tween-20 (TBS-T). Las membranas se incubaron con anticuerpos de conejo anti-p38 a, p-p38, ERK1/2, p-ERK1 / 2, JNK y p-JNK en TBS-T (1: 1000 diluido) durante toda la noche a 4°C para cada MAPK. Finalmente se añadió el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo-Dye800 para

detectar las bandas inmunoreactivas con el escáner Odyssey CLx (LI-COR) a 800nm. Para obtener resultados del mismo experimento, las membranas se incubaron primero con anticuerpos anti p-MAPK y fueron reveladas, después las membranas fueron sometidas a stripping (por incubación dos veces con 25 mM de glicina, 1% SDS pH 2 durante 15 min), bloqueadas y se incubaron con los anticuerpos anti MAPK no fosforiladas y finalmente fueron revelados.

### 3.5 Unión de pCry1Ac a los macrófagos.

Para determinar si pCry1Ac se unía a los macrófagos y si esta unión era saturable (como ocurre en la unión receptor-ligando) los macrófagos RAW264.7 ( $5 \times 10^5$  cells/mL) fueron sembrados en placas de 12 pozos en medio DMEM con 10% de SFB. Los macrófagos fueron lavados con PBS antes de ser recuperados con el cosechador de células, los macrófagos fueron re-suspendidos en buffer de unión por 15 minutos (PBS 1% de BSA o PBS 1% de OVA para los ensayos de unión con BSA-FITC usados como control negativo), después se incubaron por 1h a 4°C con concentraciones crecientes de pCry1Ac-FITC o BSA-FITC (3, 5, 10, 20, y 40  $\mu\text{g/mL}$ ). Los macrófagos fueron lavados con PBS y re suspendidos en paraformaldehído 1% para su análisis por citometría de flujo (FACS), se adquirieron 30,000 eventos por muestra con el citómetro FACS Calibur (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA). La intensidad media de fluorescencia (MFI) de las muestras se determinó con el software FlowJo v7.6.5. La unión de las proteínas marcadas a FITC se estimó con el índice de unión el cual corresponde al radio de la MFI de la muestra con respecto a la MFI del control (células incubadas solo con buffer de unión) (Silva-Alvarez et al. 2016).

Para determinar el curso temporal de la unión de pCry1Ac a las células, se incubaron  $1 \times 10^6$  células en buffer de unión a 4°C con 3  $\mu\text{g/mL}$  de pCry1Ac-FITC a diferentes tiempos, 10 min, 1h, 2h y 3h las células se lavaron y se adquirieron como se describió anteriormente. Para los ensayos de competencia, los macrófagos RAW264.7 se pre-incubaron en buffer de unión con pCry1Ac no marcada (200  $\mu\text{g/mL}$ ) o BSA no marcada (10 mg /mL) durante 30 minutos a 4°C. A continuación, se añadieron las proteínas marcadas pCry1Ac-FITC (3  $\mu\text{g/mL}$ ) o BSA-FITC (3  $\mu\text{g/mL}$ ) y la incubación continuó durante 1 h más en hielo. Posteriormente, las células se lavaron con PBS y se re-suspendieron en paraformaldehído al 1%. Las muestras se adquirieron como se ha descrito anteriormente. Para determinar si la unión de pCry1Ac-FITC se modificaba con la temperatura, las células RAW264.7 se incubaron a 37°C o 4 ° C durante 1 h con 3  $\mu\text{g} / \text{mL}$  de pCry1Ac-FITC en buffer de unión. Las células se fijaron y se analizaron mediante FACS como se ha descrito o se colocaron en portaobjetos para su análisis por microscopía confocal

con el microscopio de láser Leica TCS / SP-2 (Leica, Wetzlar, Alemania) con un objetivo de 63X para determinar la localización de la pCry1Ac-FITC unida a los macrófagos.

### 3.6 Ensayos de endocitosis.

Para determinar si la unión de pCry1Ac era seguida por endocitosis, los macrófagos RAW 264.7 ( $5 \times 10^4$  células/pozo) se sembraron en 0,2 mL de medio al 10% de FBS en cámaras Lab-Tek y se incubaron a diferentes tiempos con pCry1Ac-FITC de 10 a 20 minutos. Posteriormente, las células se lavaron, se fijaron durante 20 min con PFA 4%, se lavaron y se permeabilizaron con PBS-0,1% de Triton X-100 durante 7 min. Las células fueron incubadas con anticuerpos anti Rab5 o Rab7 (marcadores de endosomas tempranos y tardíos respectivamente) (Bucci et al. 1992; Vitelli et al. 1997) durante 1 hora a temperatura ambiente, después las células se incubaron durante 30 min con anticuerpos anti IgG conjugados con TRITC. Con el fin de determinar la co-localización de Rab5 y Rab7 con pCry1Ac-FITC las muestras se examinaron por microscopía confocal como se describe anteriormente. Para determinar la vía de endocitosis las células ( $5 \times 10^4$  células/mL) se trataron previamente por 30 minutos a 37°C con 0,03 mM nistatina (inhibidor de la caveolina)(Parton and Simons 2007; Perry and Wobus 2010) o 0,5 mM de monodansil cadaverina (MDC) el cual inhibe clatrina (Haigler et al. 1980; Srivastava et al. 2014). Después, las células se incubaron a 37°C con pCry1Ac-FITC durante 1 hora y se lavaron dos veces con PBS. Las células se fijaron, se permeabilizaron, y se montaron para ser examinadas por microscopía confocal como se describió anteriormente.

### 3.7 Determinación de proteínas de unión a pCry1Ac por ensayos de co-inmunoprecipitación e identificación por MALDI-TOF-TOF.

Para determinar las proteínas de unión a pCry1Ac en macrófagos RAW264,7 se realizaron dos tipos de co-inmunoprecipitación (IP). El primero de ellos se basó en el uso de anticuerpos; las células se incubaron con pCry1Ac y después con anticuerpos anti pCry1Ac unidos a proteína A-agarosa. Las células se recuperaron de las placas de cultivo con un cosechador de células y se lavaron con PBS frío. Las células se incubaron con pCry1Ac durante 2h ( $10 \mu\text{g}/\text{millón}$  de células) en ligera agitación a 4°C para disminuir la endocitosis. Paralelamente, el antisuero de conejo anti pCry1Ac se incubó con proteína A-agarosa durante 30 minutos, después se lavó por centrifugación con PBS verificando las lecturas de densidad óptica (DO) a 280nm para eliminar el anticuerpo no unido. Después de la incubación con pCry1Ac, las células se lavaron 2 veces con PBS frío y se lisaron con tampón RIPA-Triton frío (Tris HCl 50 mM, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, Triton X-100 1%, se añadió cóctel Minicomplete inhibidor de proteasas, todo se

realizó en hielo. Los lisados se incubaron después con el anticuerpo anti pCry1Ac unido a proteína A-agarosa (1 hora a 4°C). Los inmunocomplejos se colectaron por centrifugación a 400g durante 1 minuto, y los sobrenadantes se descartaron. El inmunocomplejo se lavó con PBS frío-inhibidor de proteasas hasta que la absorbancia en el sobrenadante dió valor de 0.0 a 280 nm. El inmunocomplejo de agarosa se resuspendió en 0,2 mL de tampón de carga sin agente reductor y se hirvió durante 7 min. Las proteínas inmunoprecipitadas fueron separadas por SDS-PAGE 10% y se tiñeron con azul de Coomassie. Las bandas fueron extraídas del gel para su identificación por análisis MALDI-TOF-TOF. Las proteínas se trataron con agente reductor DTT 10 mM, se alquilaron con iodoacetamida 100 mM y se destiñeron con acetonitrilo: 50 mM de NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> (50:50 v/v), la proteólisis se llevó a cabo mediante la incubación durante 18 h a 37°C con tripsina grado masas. Los péptidos digeridos se extrajeron, las muestras se concentraron, se desalaron y se colocaron por sextuplicado en las placas utilizando una matriz de  $\alpha$ -ciano y se analizaron con un MALDI TOF / TOF 4800. Con los espectros de MS/MS obtenidos se realizó la identificación con una búsqueda usando el algoritmo del software Paragon pilot de proteínas utilizando la base de datos de UniProt (<http://www.uniprot.org>) con un grado de confianza de 66%.

El segundo tipo de inmunoprecipitación se realizó utilizando pCry1Ac directamente conjugada con Sefarosa 4B con el fin de eliminar la IgG contaminante del ensayo de co-inmunoprecipitación basado en anticuerpos. Las células  $80 \times 10^6$  fueron incubadas con Sefarosa-pCry1Ac (0,2 mL) durante 2 horas a 4°C en agitación suave. Posteriormente, las células se lisaron con 1% de Tritón y la sefarosa-pCry1Ac se lavó con PBS frío (10 mL) hasta que las lecturas de absorbancia a 280 nm fueron cero. Se añadió buffer de muestra (0,2 mL) a la Sepharose-pCry1Ac precipitada y se hirvió durante 7 minutos. Las proteínas fueron separadas por SDS-PAGE 10%, se tiñeron y se analizaron por MALDI-TOF-TOF como se describe anteriormente. Las inmunoprecipitaciones control se llevaron a cabo omitiendo las etapas de incubación con pCry1Ac para el primer ensayo y con sefarosa bloqueada sin pCry1Ac, además se realizó un control adicional con sefarosa conjugada a BSA como control negativo. Para corroborar la unión de pCry1Ac a las bandas inmunoprecipitadas, se realizaron dos tipos de ensayos de Blot ligando. En ambos ensayos las proteínas co-inmunoprecipitadas y los lisados totales se separaron por SDS-PAGE 10% y se transfirieron en membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad) que luego se bloquearon durante la noche con 5% de leche sin grasa a 4°C en TBS-T. Las membranas se lavaron con TBS-T y se incubaron durante 2 horas a 4°C con pCry1Ac unida a Cy5 o pCry1Ac biotinilada (10µg/mL) en TBS-T. Las membranas se lavaron y después se incubaron durante 1h con estreptavidina-Dye800. Por último, las membranas se lavaron a fondo y se visualizaron con el escáner Odyssey (LI-COR) a 700 nm o 800 nm, respectivamente.

### 3.8 Identificación de HSP70, $\alpha$ -enolasa y actina como proteínas de unión a pCry1Ac.

Después de la identificación por medio de MALDI-TOF-TOF y de los ensayos de blot ligando se realizaron ensayos de Western y microscopía confocal con anticuerpos anti: HSP70,  $\alpha$ -enolasa, vimentina y actina, para confirmar su presencia en las proteínas inmunoprecipitadas y para determinar su localización en los macrófagos y su co-localización con pCry1Ac. Los ensayos de Western blot hechos ya sea con anti HSP70,  $\alpha$ -enolasa (anticuerpos de cabra) o anti vimentina, o actina (hechos en conejo), diluidos 1:1500 en TBS-T durante 2 horas a 4°C se realizaron en las proteínas inmunoprecipitadas. Las reacciones antígeno-anticuerpo se visualizaron con el escáner Oddysey (LI-COR) utilizando anti-cabra IgG unido a Dye 680 o anti IgG de conejo unido a Dye 800 como se describió anteriormente. La localización de pCry1Ac con HSP70, actina o  $\alpha$ -enolasa se analizó en las células RAW264.7. Las células  $5 \times 10^4$  en 0,2 mL se sembraron en cámara Lab-Tek y se incubaron con pCry1Ac-FITC (10  $\mu$ g / ml) durante 1 hora; las células se lavaron dos veces con PBS, se fijaron con 4% de PFA pero no se permeabilizaron. Las células se lavaron con PBS y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente, ya sea con anticuerpos anti HSP70 o anti  $\alpha$ -enolasa (1: 100). Las células se lavaron exhaustivamente y se añadieron anticuerpos anti-cabra marcados con TRITC durante 30 minutos a temperatura ambiente. La co-localización de pCry1Ac con la actina se probó con faloidina-rodaminada en células permeabilizadas como se indicó anteriormente. Los portaobjetos se montaron y se examinaron por microscopía confocal.

### 3.9 Ensayos de inmunoprecipitación cruzada con anticuerpos anti HSP70.

La interacción entre la HSP70 y pCry1Ac se demostró mediante ensayos de inmunoprecipitación cruzada incubando las células con pCry1Ac 10  $\mu$ g/millón de células como se describió anteriormente, después las células fueron lavadas con PBS a 4°C dos veces y posteriormente se incubaron con anticuerpos de cabra anti HSP70 (1:50 por 1 h a 4°C), las células se lavaron y se lisaron como se describió anteriormente para la co-inmunoprecipitación. El lisado se puso a interaccionar con proteína A unida a anticuerpos de conejo anti cabra IgG por 30 min. Después, los precipitados se lavaron para eliminar el anticuerpo no unido hasta que las lecturas de DO a 280 nm dieron valores iguales a cero.

Las proteínas precipitadas se resuspendieron en buffer de muestra con DTT, se hirvieron durante 7 min y se separaron mediante geles SDS-PAGE 10%. Las proteínas precipitadas se separaron por electroforesis, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y se realizó un western blot para detectar pCry1Ac en las proteínas inmunoprecipitadas. La detección se realizó con anticuerpos anti pCry1Ac de conejo (1:4000) seguido de la incubación con anti

conejo IgG-Dye800 (1: 10.000). Las membranas fueron reveladas como se describió anteriormente. Como controles de especificidad se utilizó pCry1Ac purificada (control positivo de reactividad) y las inmunoprecipitaciones hechas sin el paso de la incubación con anti-HSP70 (Control negativo).

### 3.10 Uso de anticuerpos anti HSP70 para el bloqueo de la activación de MAPK y la producción de citocinas inducidas por pCry1Ac.

Con el fin de determinar el papel funcional de HSP70 como un posible receptor para pCry1Ac en la superficie celular de macrófagos, las células se trataron con anticuerpos anti HSP70 por 30 min a 37°C, posteriormente se realizó el estímulo con pCry1Ac por 30 o 60 minutos. La fosforilación de ERK1/2 y p38 se determinó mediante análisis de Western blot como se describió previamente. Las células control (en DMEM tratadas solo con vehículo) y las células tratadas solamente con anticuerpos HSP70 se incubaron durante 30 y 60 minutos más (el mismo tiempo de incubación utilizado para las células que se incubaron con anticuerpos HSP70 más pCry1Ac). Las células se lavaron, se lisaron y se sometieron a ensayos de Western blot. Las formas no fosforiladas de ERK1/2 y p38 se determinaron como control de carga y como control basal de fosforilación se usaron las células tratadas solo con vehículo. Para la inhibición de citocinas pro inflamatorias inducidas por pCry1Ac se incubaron las células RAW264.7 por 30 min con anticuerpos anti HSP70, posteriormente se incubaron por 1 hora con pCry1Ac a 37°C, las células fueron lavadas para retirar el anticuerpo no unido y el estímulo y se añadió medio DEMEM 10% SFB por 24 horas. Las citocinas pro inflamatorias fueron determinadas por medio del kit BD para FACS utilizando una curva estándar y determinando por interpolación las concentraciones de IL-6, TNF- $\alpha$  y MCP-1.

### 3.11 Inhibición *in vivo* de HSP70.

Se utilizó el tratamiento con un inhibidor funcional de la HSP70, el PES, para probar *in vivo* la participación de HSP70 en los efectos inducidos por pCry1Ac. Se determinó el efecto de pCry1Ac en la dinámica de las subpoblaciones de macrófagos de la cavidad peritoneal (PerC), en los llamados Macrófagos de peritoneo grandes (LPM) y macrófagos de peritoneo pequeños SPM. El PES fue elegido como inhibidor porque se sabe que interactúa selectivamente con HSP70 y evita la asociación entre HSP70 y varias de sus co-chaperonas y proteínas de unión (Leu et al. 2009) y su efecto se ha evaluado *in vivo* (Wang et al. 2012). La administración intraperitoneal (i.p.) con pCry1Ac es conocida por inducir la activación de macrófagos (Moreno-Fierros et al. 2013) de modo que los ratones BALB/c recibieron una inyección i.p. de pCry1Ac (50  $\mu$ g) o de pCry1Ac administrada 30 minutos después de la administración de PES (2,5

mg/kg) disuelto en DMSO y diluido en PBS, los ratones fueron tratados solo con vehículo como control negativo (n = 3-5 ratones por grupo de 3 experimentos independientes). Los ratones se sacrificaron 24 horas o 72 horas después de las administraciones y las células de PerC se recuperaron y se tiñeron con anticuerpos anti CD11b, F4/80, MHCII, HSP70 marcados con flourocromos como se ha descrito anteriormente para el análisis de citometría de flujo.

### 3.12 Análisis estadístico.

El análisis estadístico se realizó con el programa PRISM (GraphPad 5,0 , San Diego , CA ,EE.UU.). Las diferencias entre los grupos fueron establecidas mediante análisis estadístico de ANOVA seguido de pruebas de comparación múltiple de Tukey. Un valor de  $p < 0,05$  fue considerado significativo.

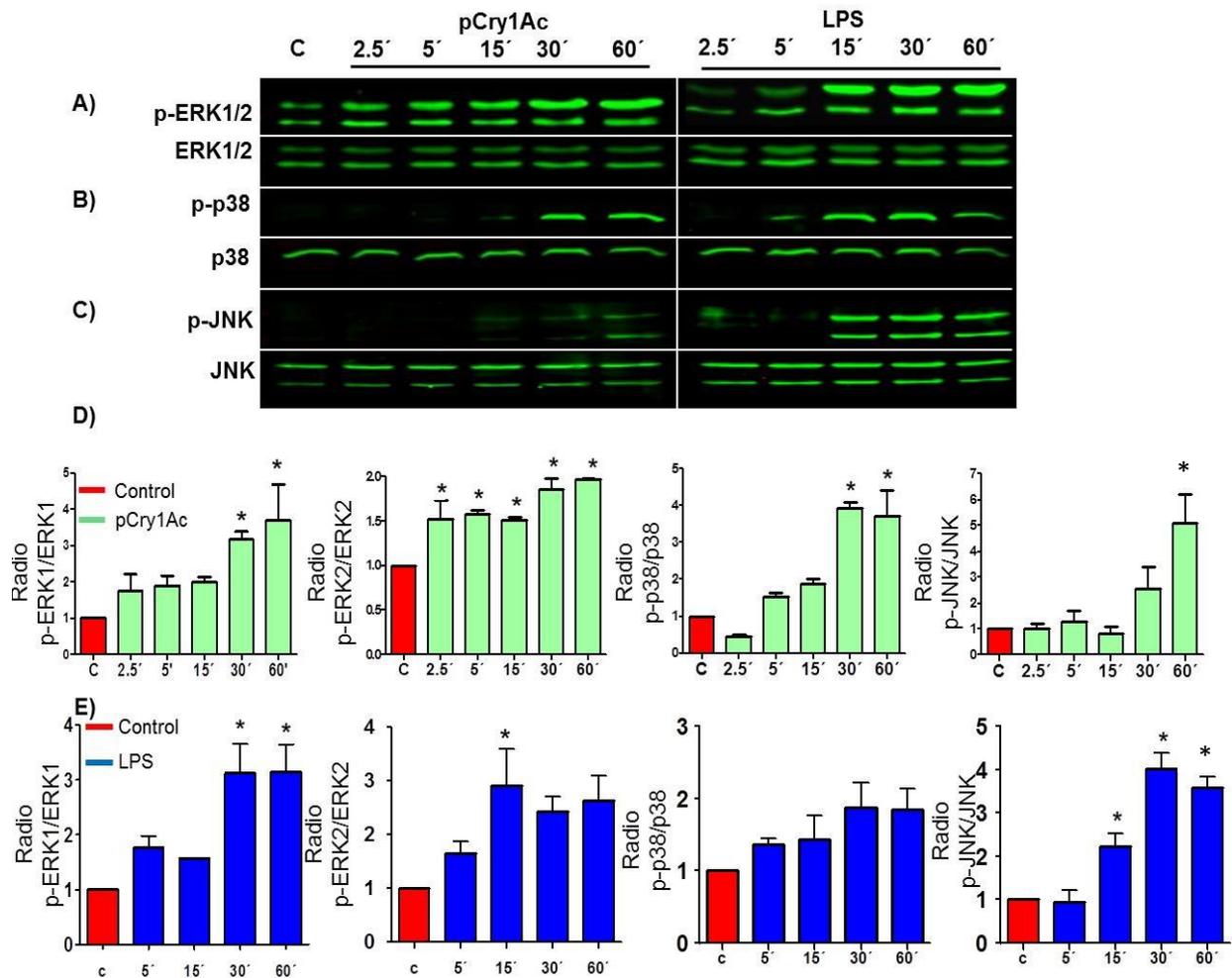
## 4. RESULTADOS

### 4.1 El estímulo con pCry1Ac activa las MAPK ERK1/2, p38 y JNK en macrófagos.

Debido a que nuestros resultados anteriores utilizando inhibidores para MEK 1/2 y p38 habían sugerido la participación de estas vías en la activación de macrófagos inducida por pCry1Ac (Moreno-Fierros et al. 2013), en este trabajo realizamos ensayos de Western blot para determinar el efecto del estímulo con pCry1Ac en la fosforilación (p) de ERK1/2, p38 y JNK en macrófagos RAW264.7. Encontramos que la pCry1Ac incrementa la fosforilación de las tres MAPK analizadas, sin embargo las cinéticas de activación fueron distintas. Por otra parte, la cinética de activación de estas MAPK inducida por la pCry1Ac fue distinta a la inducida por el estímulo con LPS, que se incluyó como un control positivo de activación de macrófagos capaz de activar MAPK (Sweet and Hume 1996).

Se observó que pCry1Ac aumentó gradualmente la fosforilación de ERK1/2 desde los primeros 2.5 min y este aumento se mantuvo hasta los 60 min después del estímulo (Figura 5A). El nivel de fosforilación de ERK1/2 inducido por pCry1Ac ocurrió antes y fue superior a la fosforilación inducida por el LPS. Además, el nivel de p-ERK1/2 se mantuvo constante de 15 min a 60 min mientras que con el LPS la activación fue en aumento (Figura 5A, panel izquierdo). Las células del control (estimuladas con vehículo) mostraron nivel basal bajo de p-ERK1/2.

También se demostró que pCry1Ac induce la fosforilación de p38 (p-p38) a los 30 y 60 min después del estímulo. La estimulación con LPS indujo p-p38 desde los 15 min. No se observó fosforilación significativa de p38 en las células control (Figura 5B). pCry1Ac indujo una ligera activación de JNK, a los 30 y 60 min después del estímulo (Figura 5C). Mientras que LPS indujo una activación mucho mayor de p-JNK a este tiempo de estímulo. Como control de carga y para normalizar los datos se determinaron las formas no fosforiladas de ERK1/2, p38 o JNK en las mismas membranas revelando previamente las formas fosforiladas y realizando stripping (incubación a pH=2 para eliminar los anticuerpos unidos a las membranas). La relación entre los valores de densitometría de las MAPK fosforiladas entre las MAPKS no fosforiladas ante el estímulo con pCry1Ac (Figura 5D) o LPS (Figura 5E) se muestra en las gráficas correspondientes a 3 experimentos independientes.

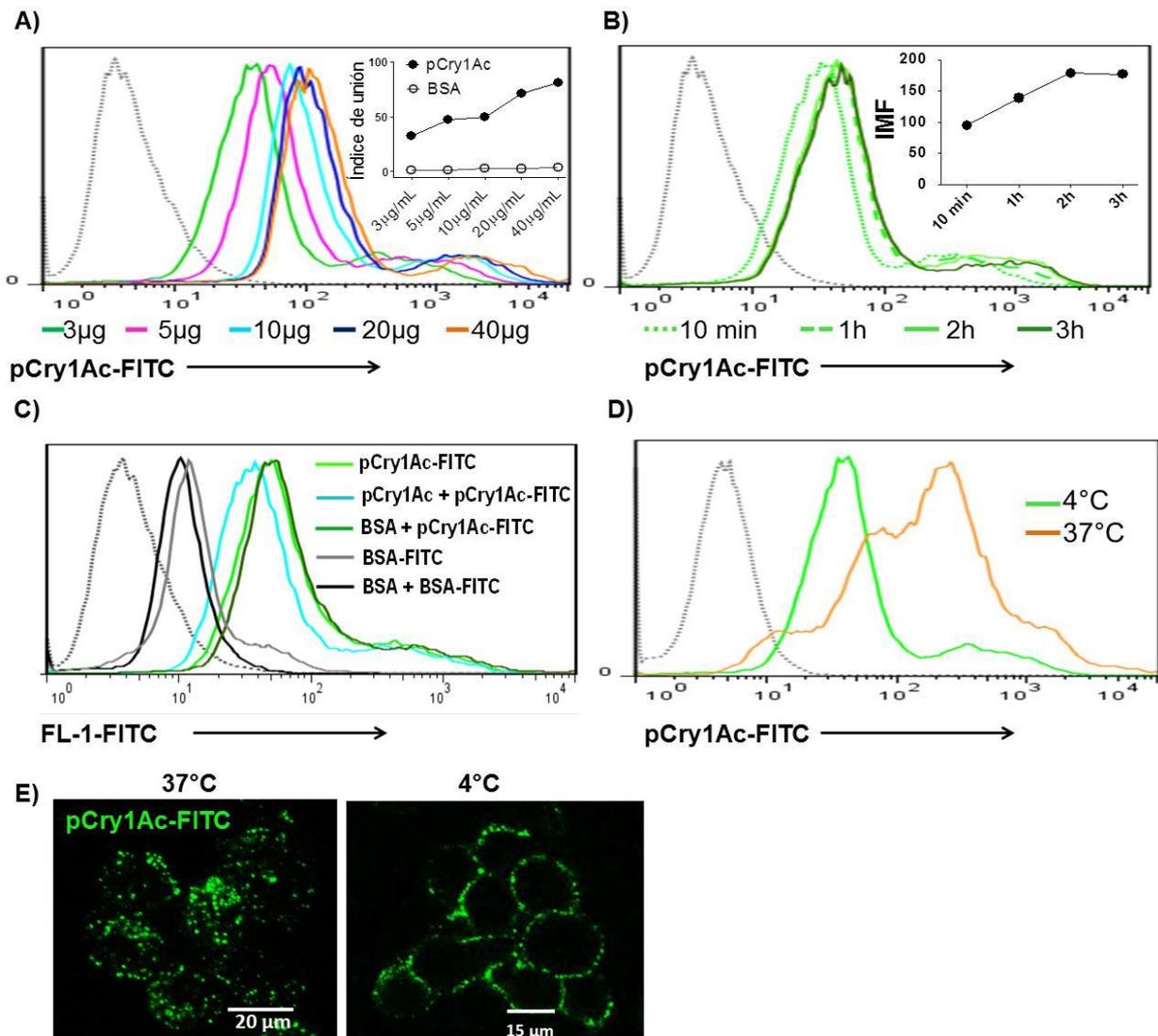


**Figura 5. Efecto de pCry1Ac en la activación de p38, ERK1/2 y JNK.** Los macrófagos RAW 264.7 se estimularon con pCry1Ac (20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) o LPS (3  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) durante 2,5, 5, 15, 30 y 60 min. El análisis Western Blot de la fosforilación de las MAPK; A) ERK1/2, B) p38 y C) JNK y de sus formas no fosforiladas como control de carga se muestran en los blots. Las gráficas muestran la relación de las formas fosforiladas de las MAPK entre las no fosforiladas ante el estímulo con pCry1Ac (D) o LPS (E); Los datos de las intensidades medias de fluorescencia (IMF) se normalizaron con respecto al control (C = 1). Se muestran los Western Blots representativos y el análisis densitométrico que se realizó en membranas de tres ensayos independientes. \* Estadísticamente significativo a  $p < 0,05$ .

4.2. La unión de pCryAc a la superficie de macrófagos RAW264.7 es específica y saturable.

Debido a que se observó que la pCry1Ac indujo la activación de MAPK y debido al hecho de que este proceso se desencadena principalmente por la interacción ligando-receptor, se determinó la unión de pCry1Ac marcada con FITC a la superficie de los macrófagos; la unión específica de la pCry1Ac se verificó por FACS y microscopía confocal. Se observó que la pCry1Ac-FITC se unió a los macrófagos RAW264.7 (a 4°C) de una manera dosis-dependiente ya que utilizando concentraciones crecientes de pCry1Ac-FITC (3 µg, 5 µg, 10 µg, 20 µg y 40µg/mL), la IMF aumenta gradualmente; sin embargo la saturación se alcanza a los 40 µg debido a que la IMF permanece casi igual con 20 µg/mL y 40 µg/mL de pCry1Ac. Se determinó el índice de unión para pCry1Ac-FITC y para BSA-FITC (la BSA fue utilizada como proteína control de unión negativa). Se observó que BSA-FITC tiene un índice de unión mucho menor que pCry1Ac-FITC (Figura 6A). La unión de pCry1Ac-FITC a células RAW264.7 también se analizó en diferentes tiempos a 4°C, la unión se llevó a cabo desde los primeros 10 minutos de incubación, pero la IMF de FITC aumentó después de 1 h de incubación con pCry1Ac-FITC y permaneció constante después de 2h y 3h de incubación (Figura 6B). Estos resultados indican que la unión de pCry1Ac ocurre de una manera dependiente del tiempo y alcanza el equilibrio después de 1h.

La unión específica de pCry1Ac se determinó mediante ensayos de competencia; observamos que la competencia con pCry1Ac no marcada disminuyó la unión de pCry1Ac-FITC mientras que la competencia con BSA no marcada no afectó la unión de pCry1Ac-FITC (Figura 6C) a los macrófagos. La BSA-FITC se usó como un control negativo y como se esperaba, no se unió significativamente a los macrófagos; la unión de BSA-FITC no se compitió con BSA no marcada. Cuando se evaluó la unión de pCry1Ac a 37 ° C se encontró que era mucho mayor que la unión a 4°C (Figura 6D). Una posible explicación para este incremento podría ser la internalización de pCry1Ac-FITC. Por lo tanto, se examinó por microscopía confocal si pCry1Ac estaba siendo internalizado a esta temperatura. Se observó que a 4°C pCry1Ac-FITC se unía a la superficie celular, mientras que a 37°C se detectó principalmente internalizada (Figura 6E).



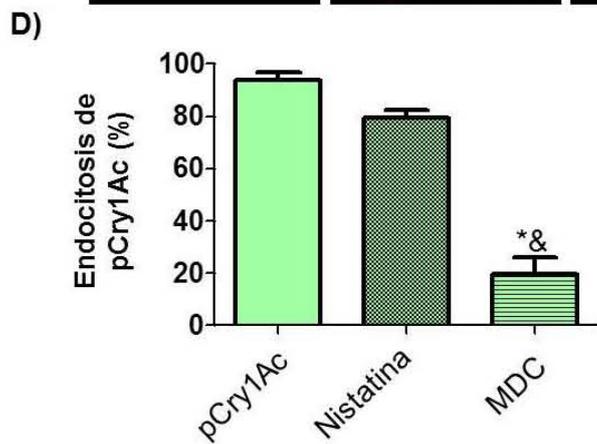
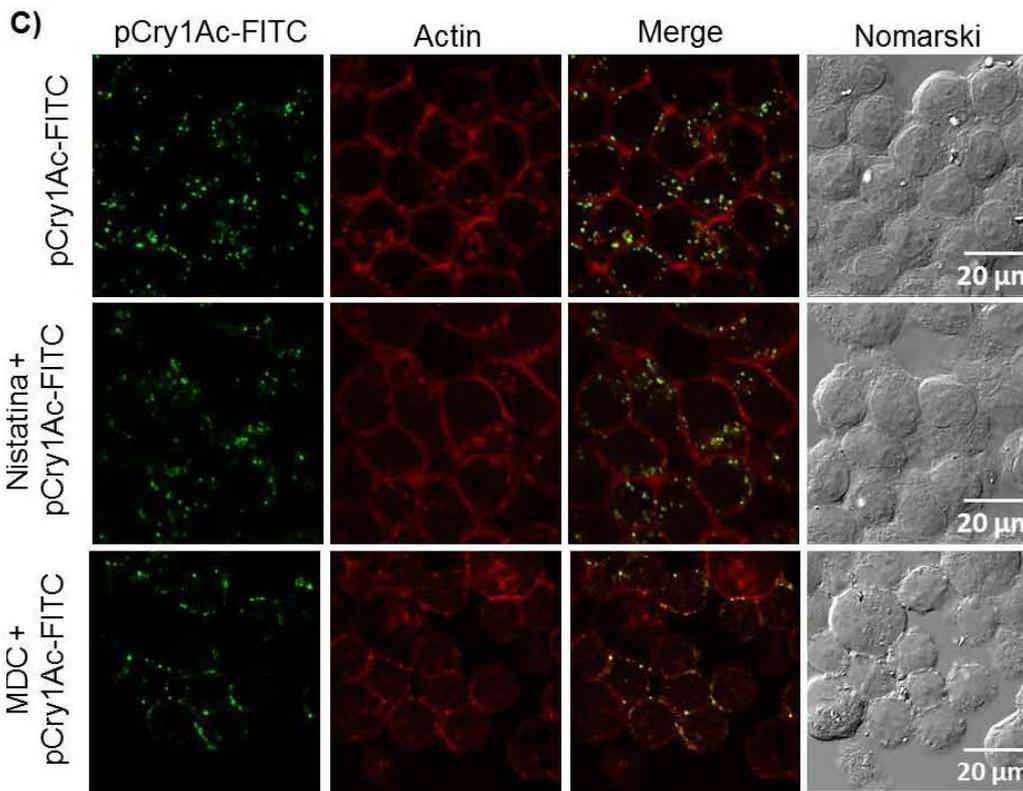
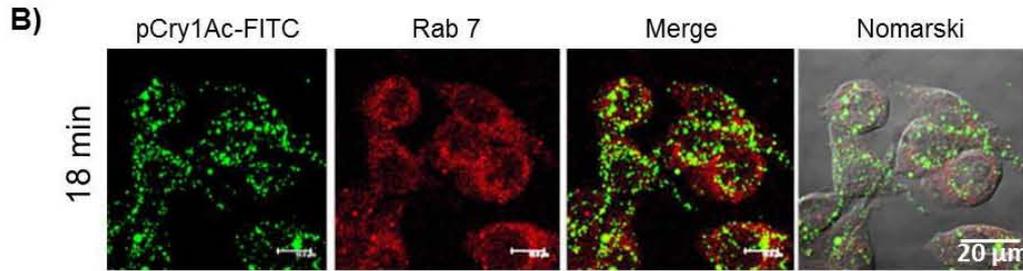
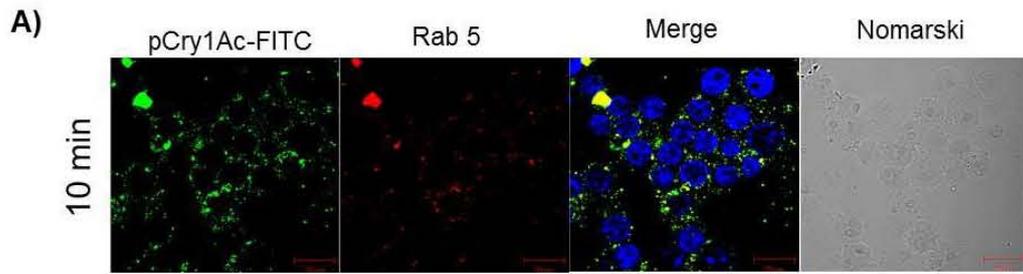
**Figura 6. La unión de pCry1Ac a macrófagos es específica y saturable.** Los ensayos de unión se realizaron mediante FACS y análisis confocal. A) La unión de pCry1Ac a las células es dosis-dependiente. Las células RAW264.7 fueron incubadas durante 1h con dosis crecientes de pCry1Ac-FITC (3-40 μg / ml) a 4°C. La gráfica muestra el índice de unión (eje Y) de pCry1Ac y BSA a diferentes dosis (eje X) estimado como se indica en la metodología. B) La unión de pCry1Ac-FITC es dependiente del tiempo. Las células RAW264.7 se incubaron a distintos tiempos con pCry1Ac (3 μg/mL) a 4°C. La gráfica muestra la IMF en los tiempos indicados. C) Unión específica de pCry1Ac a las células RAW264.7. Para los ensayos de competencia las células se pre-incubaron durante 30 min a 4°C con 200 μg/mL de pCry1Ac no marcada o 10 mg/mL de BSA no marcada (como control de no unión), posteriormente se incubaron con pCry1Ac-FITC (3 μg/mL) o BSA-FITC (3 μg/mL). D) La unión de pCry1Ac a los macrófagos se incrementa a 37°C ya que la IMF está aumentada en comparación con células incubadas con pCry1Ac a 4°C. E) Imágenes de microscopía confocal de células RAW264.7 incubadas con pCry1Ac a 37°C y a 4°C, se muestran las proyecciones máximas de las secciones Z. A-D) Histogramas representativos de 3 ensayos independientes por duplicado (n = 3). La FMO (la Fluorescencia menos uno) para todos los histogramas se muestra en gris en líneas punteadas.

4.3 pCry1Ac es endocitada y se transporta por vía endosomal desde endosomas tempranos a endosomas tardíos.

Para investigar si la unión de pCry1Ac a los macrófagos era seguida por endocitosis, las células RAW 264.7 se incubaron a 37°C con pCry1Ac-FITC. Curiosamente, se observó que pCry1Ac-FITC era endocitada rápidamente ya que se detectó co-localización con endosomas tempranos (Rab5) justo después de 10 min de incubación (Figura 7A). Se confirmó la endocitosis de pCry1Ac a través de la co-localización con Rab7 (marcador de endosomas tardíos) después de 18 minutos de incubación (Figura 7B, en amarillo). Estos resultados sugieren que la unión de pCry1Ac es dinámica, se produjo en la membrana y esta unión fue seguida por la endocitosis. Una gran cantidad de pCry1Ac se visualizó en la superficie de los macrófagos y no co-localizó con el marcador de endosomas, lo que indica que sólo una parte de pCry1Ac fue endocitada a estos tiempos.

4.4 Los macrófagos endocitan pCry1Ac vía clatrina.

Para determinar que vía estaba mediando la internalización de pCry1Ac en los macrófagos, los macrófagos se pretrataron con inhibidores específicos para las dos principales vías endocíticas. Utilizamos Nistatina y Monodansilcadaverina (MDC) inhibidores de la caveolina y clatrina respectivamente y determinamos si alguno de ellos bloqueaba la internalización de pCry1Ac. En estos ensayos se utilizó faloidina marcada con TRITC para visualizar el citoesqueleto de actina. Como era de esperar, en las células no tratadas con fármacos, la pCry1Ac-FITC fue endocitada (Fig. 7C, primera fila). Cuando se utilizó el tratamiento con nistatina (que interrumpe las balsas lipídicas de la membrana y, por consiguiente, evita la formación de caveolas secuestrando el colesterol), se observó que la endocitosis de pCry1Ac-FITC se realizaba de manera normal como en las células sin tratamiento con fármaco (Figura 3C, segunda fila). Por el contrario, el pretratamiento con MDC impidió la endocitosis de pCry1Ac (Fig. 7C, tercera fila), ya que esta sólo se observó en la superficie de los macrófagos. Curiosamente, se observaron algunos puntos de co-localización de pCry1Ac con actina; estos se distinguen en amarillo en el merge. Los gráficos de barras muestran la cuantificación del proceso endocítico (100 células de 2 campos de cada tratamiento a 63X de 3 experimentos independientes) (Figura 7D).



**Figura 7. pCry1Ac es internalizada vía endocítica.** A) Los macrófagos RAW264.7 se incubaron con pCry1Ac-FITC (10 min); La co-localización con el marcador Rab5 de endosomas tempranos se realizó mediante microscopía confocal y se visualiza en color amarillo. B) La co-localización de pCry1Ac con Rab7 marcador de endosomas tardíos se determinó a los 18 min (en amarillo). Se muestran imágenes representativas de la proyección máxima de las secciones Z. C) A través del uso de inhibidores específicos, se determinó la vía endocítica de pCry1Ac-FITC. Las células RAW264.7 se trataron durante 30 min con monodansilcadaverina o nistatina, y después se añadió pCry1Ac-FITC durante 1h. Las imágenes de microscopía confocal muestran los cortes intermedios de las células RAW264.7. La imagen de contraste de interferencia diferencial (DIC) para todos los tratamientos se muestra en los últimos paneles. La barra de escala representa 20 micras. Las imágenes mostradas son representativas de 3 experimentos independientes con resultados similares. D) Gráficas del porcentaje de pCry1Ac-FITC endocitada en células pre-tratadas con MDC, nistatina o células control sin pretratamiento.

4.5 pCry1Ac co-inmunoprecipita con diversas proteínas incluyendo: HSP70, vimentina, actina y  $\alpha$ -enolasa.

Después de observar que la pCry1Ac se unía a los macrófagos y la endocitosis era mediada por clatrina (que generalmente es debida a la interacción receptor-ligando), decidimos determinar las posibles proteínas de unión a pCry1Ac por ensayos de blot ligando y co-inmunoprecipitación y luego identificamos estas bandas por análisis MALDI-TOF-TOF. Se determinaron varias proteínas de unión a pCry1Ac en forma nativa por medio de dos tipos de inmunoprecipitación: una realizada con pCry1Ac más anticuerpos anti-pCry1Ac y proteína A- agarosa (IP-A) y la segunda realizada con pCry1Ac directamente acoplada a perlas de sefarosa (IP-S). Como se puede apreciar en las geles representativos teñidos con azul Coomassie, numerosas proteínas se precipitaron por ambos tipos de ensayos, posiblemente debido a que algunas de ellas forman parte de un complejo de proteínas que interaccionan con pCry1Ac o entre ellas. Es importante destacar que sin tomar en cuenta las bandas de IgG, el perfil electroforético de las proteínas precipitadas coincidió en ambos métodos de precipitación utilizados (Figura 8A). Por otra parte, se detectaron proteínas diferenciales en comparación con los controles IP (IP sin pCry1Ac).

Los lisados totales de células RAW264.7 y las proteínas inmunoprecipitadas con pCry1Ac se sometieron a análisis de blot ligando con pCry1Ac-Cy5 o pCry1Ac biotinilada. pCry1Ac se une a las proteínas precipitadas de ambos ensayos; notablemente en ambos tipos de precipitaciones la pCry1Ac tuvo un patrón de reconocimiento muy similar (Figura 8B). Las proteínas inmunoprecipitadas separadas en SDS-PAGE fueron cortadas e identificadas por MALDI - TOF - TOF. Las proteínas identificadas se muestran en la tabla 1, donde se indican sus nombres, números de acceso, cobertura y número de péptidos > 95 %.

Para determinar cuáles de las proteínas identificadas podrían funcionar como receptor para pCry1Ac seleccionamos candidatos de acuerdo a las características funcionales y a su localización. Entre las diversas proteínas inmunoprecipitadas por pCry1Ac se identificaron proteínas de choque térmico como HSP90, HSP70, HSPA8 y HSP1B, además se identificaron también vimentina, actina,  $\alpha$ -enolasa y ribonucleoproteínas. Como era de esperarse en los ensayos de inmunoprecipitación realizados con anticuerpo-proteína A se detectó una banda prominente de IgG de alto peso molecular relativo (170 kDa) y también una banda de 40 kDa se identificó como la cadena pesada de IgG, a pesar de que los ensayos se realizaron en condiciones no reductoras.

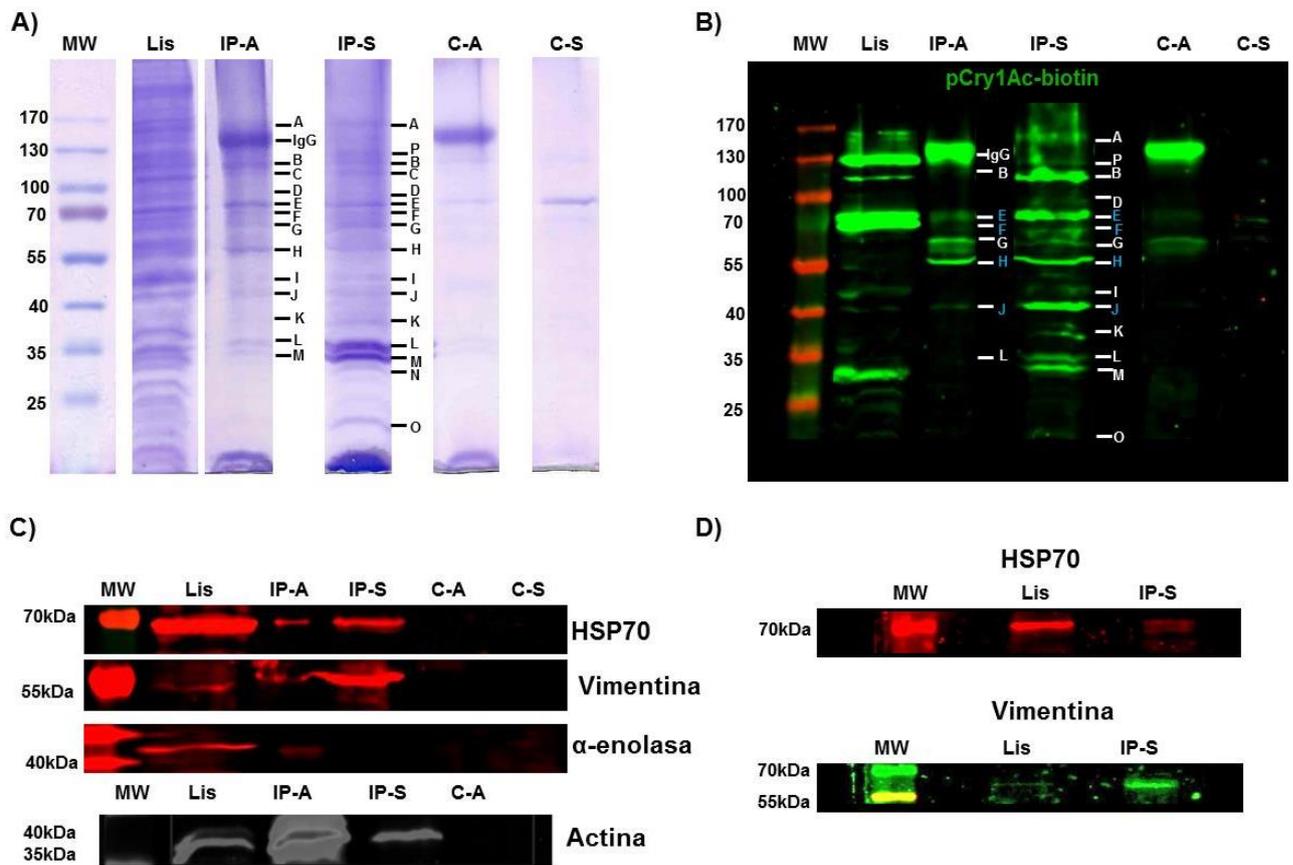
#### 4.6 Detección por western blot de HSP70, actina, $\alpha$ -enolasa y vimentina en las proteínas co-inmunoprecipitadas por pCry1Ac.

Las proteínas co-inmunoprecipitadas por pCry1Ac (proteínas de unión) se separaron en geles de acrilamida SDS-PAGE y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa para ser sometidas a ensayos de western blot utilizando anticuerpos específicos dirigidos a HSP70, vimentina, actina y  $\alpha$ -enolasa (Figura 8C). Se determinó la presencia de estas 4 proteínas en las bandas inmunoprecipitadas por pCry1Ac en los dos tipos de inmunoprecipitaciones (basada en proteína A-anticuerpos o en Sefarosa-pCry1Ac), sin embargo la  $\alpha$ -enolasa solo se detectó en los ensayos de inmunoprecipitación realizados con proteína A-anticuerpos. Para determinar si las proteínas de unión a pCry1Ac encontradas en la línea celular podrían encontrarse en cultivos primarios de macrófagos, se realizó la inmunoprecipitación con pCry1Ac en macrófagos de bazo de ratón y las proteínas co-inmunoprecipitadas fueron sometidas a ensayos western blot donde se detectó la presencia de HSP70 y vimentina (Figura 8D).

#### 4.7 pCry1Ac interacciona con HSP70.

Debido a que se detectó que HSP70, actina, vimentina y  $\alpha$ -enolasa tenían el mayor porcentaje de cobertura y el mayor número de péptidos en las proteínas inmunoprecipitadas y que en los ensayos de blot ligando pCry1Ac-marcada seguía manteniendo la capacidad de unión a estas 4 proteínas, decidimos analizar por microscopía confocal la co-localización en superficie de estas proteínas con pCry1Ac para tratar de encontrar cual podía funcionar como receptor de superficie para pCry1Ac. La co-localización entre HSP70 y pCry1Ac se evidenció en la superficie celular en células no permeabilizadas. pCry1Ac se detectó en varias regiones celulares independientemente de la presencia de HSP70, lo que indica que HSP70 no es la única proteína de unión a pCry1Ac en los macrófagos (Figura 9A). No se pudo determinar la co-localización de pCry1Ac y  $\alpha$ -enolasa ya que la expresión en la superficie de los macrófagos es muy pobre (Figura 9B). En las células permeabilizadas se observó co-localización de pCryAc con F-actina en compartimentos intracelulares (Figura 7C) y también hubo co-localización de pCry1Ac con HSP70 en las regiones intracelulares y esta fue mayor que en la superficie celular (datos no mostrados).

Para confirmar que p-Cry1Ac estaba co-precipitando con la HSP70 de superficie, realizamos un ensayo de inmunoprecipitación con proteínas de membrana biotiniladas. Se observa que pCryAc co-precipita con la HSP70 de superficie (en verde) y se corrobora la identidad con anticuerpos  $\alpha$ -HSP70 (en rojo), la sobre posición de ambos fluorocromos se observa en amarillo (Figura 9C). Es importante mencionar que aproximadamente un 20% de la HSP70 total se encuentra en superficie (datos no mostrados).



**Figura 8. pCry1Ac se une y co-immunoprecipita con proteínas de macrófagos, incluyendo HSP70, vimentina,  $\alpha$ -enolasa y actina.** A) Se utilizaron macrófagos RAW264.7 para realizar los ensayos de inmunoprecipitación utilizando pCry1Ac seguida de anticuerpos anti-pCry1Ac más perlas de proteína A-agarosa (IP-A) o bien utilizando pCry1Ac conjugada a Sefarosa (IP-S). Las proteínas inmunoprecipitadas se separaron por medio de SDS-PAGE para su identificación MALDI-TOF-TOF (resultados de la Tabla 1). Se detectaron pocas proteínas inespecíficas en el control de IP-A realizado sin pCry1Ac. B) Los ensayos blot ligando con pCry1Ac-biotina se realizaron en proteínas inmunoprecipitadas por pCry1Ac, se muestran imágenes representativas de 5 experimentos independientes. Las letras azules representan las proteínas reconocidas por pCry1Ac en ambos tipos de inmunoprecipitación. C) Las inmunoprecipitaciones realizadas con pCry1Ac en células RAW264.7 se sometieron a análisis de Western blot para confirmar la identidad de algunas de las proteínas identificadas por MALDI-TOF-TOF, usando anticuerpos específicos anti HSP70, vimentina, actina y  $\alpha$ -enolasa. D) Los macrófagos derivados de bazo y peritoneo fueron utilizados para realizar ensayos de inmunoprecipitación con pCry1Ac (IP-S); las proteínas inmunoprecipitadas fueron sometidas a Western blot para detectar HSP70 y vimentina, las reacciones antígeno-anticuerpo se visualizaron mediante el escáner infrarrojo como se describe en los métodos.

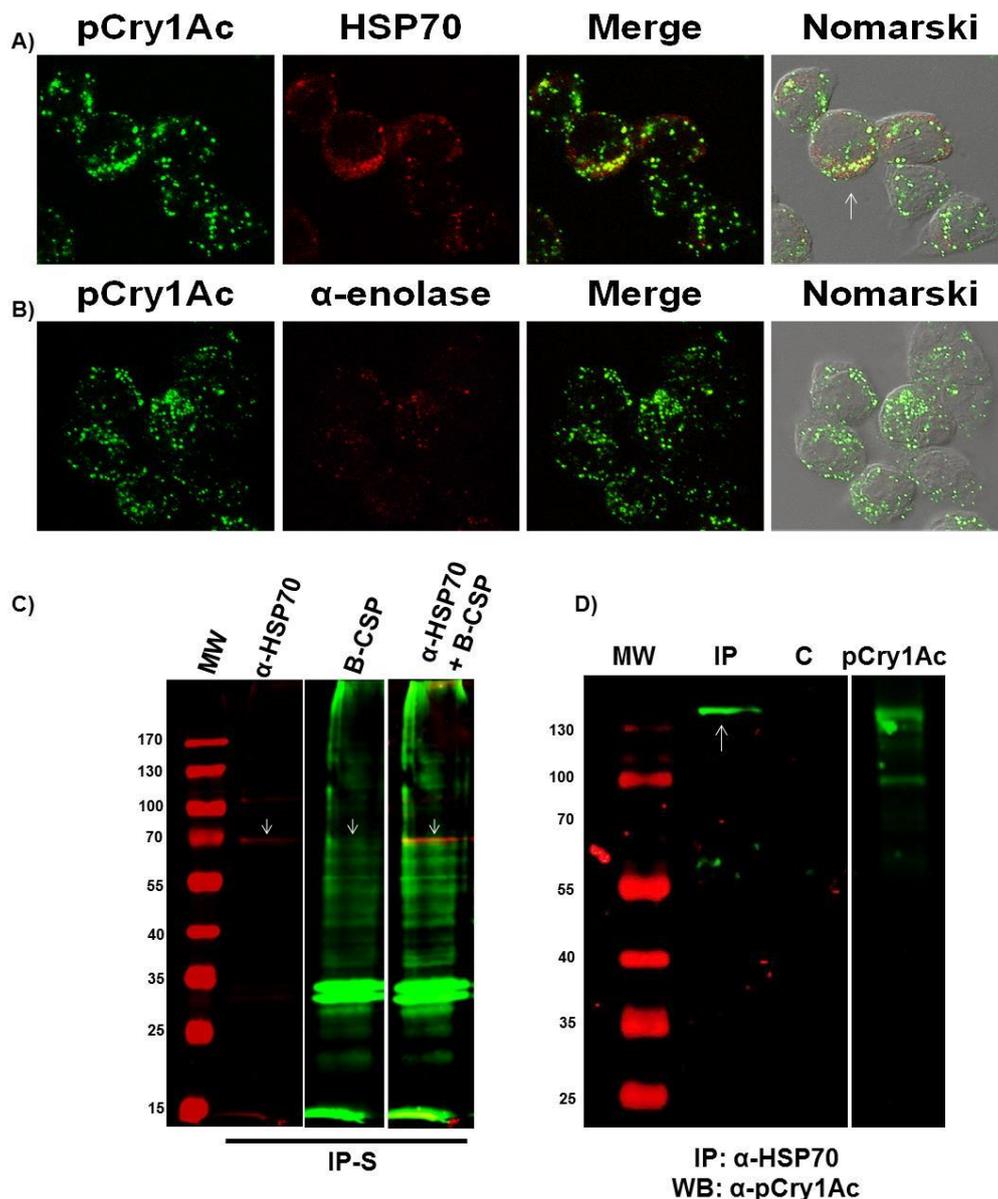
La interacción entre pCry1Ac y HSP70 fue confirmada por ensayos de inmunoprecipitación realizados con anticuerpos anti-HSP70 transfiriendo las bandas inmunoprecipitadas a nitrocelulosa y revelando las membranas con anticuerpos anti-pCry1Ac. Se evidenció una banda en el peso correspondiente a la pCry1Ac (130 kDa). En estos ensayos las células se incubaron a 4°C para disminuir la posible interacción intracelular de pCry1Ac con HSP70. pCry1Ac no se detectó en los ensayos de inmunoprecipitación control, hechos sin anticuerpos anti- HSP70 (Figura 9D).

4.8 El pre-tratamiento con anticuerpos anti-HSP70 disminuye la fosforilación de ERK1 y la producción de MCP-1 inducidas por pCry1Ac.

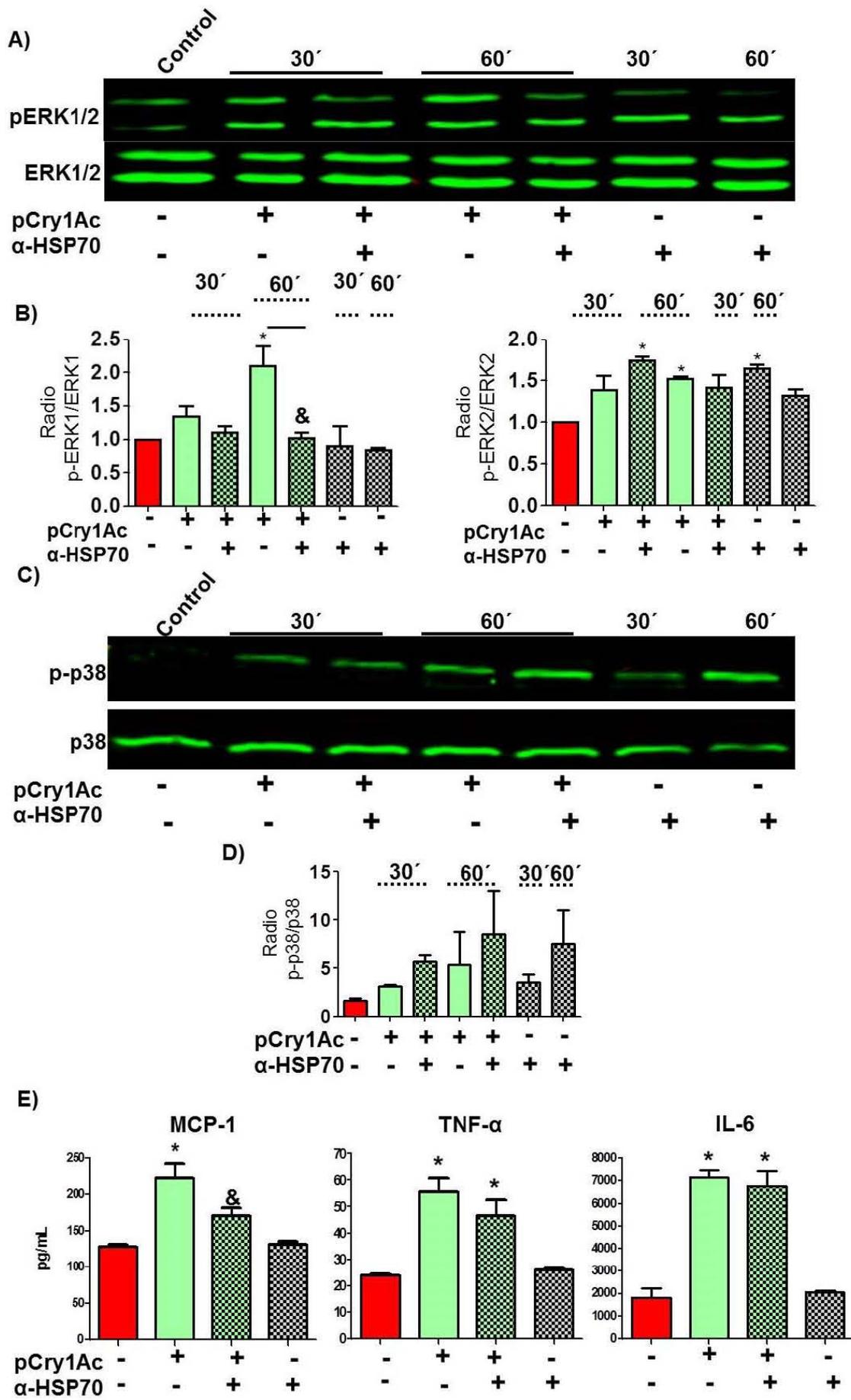
Para establecer el papel funcional de la csHSP70 en la activación de ERK1/2 y p38 inducida por pCry1Ac, las células RAW264.7 fueron pre-tratadas con anticuerpos anti HSP70 por 30 min antes del estímulo con pCry1Ac. Se observó que a los 30 y 60 min pCry1Ac aumentó p-ERK1/ 2, mientras que la activación de ERK1 fue inhibida por la adición de anticuerpos anti HSP70. p-ERK2 no se vió afectada por el pretratamiento con anti HSP70. El tratamiento con los anticuerpos sin pCry1Ac no aumentó p-ERK1/2 en los macrófagos ni a los 30 min ni a los 60 min (Figura 10A). La fosforilación basal de ERK 1/2 en las células control fue baja. El análisis estadístico de los tratamientos se muestra en las gráficas de barras. Los valores de la gráfica muestran la relación de la IMF de p-ERK1/ERK1 ó p-ERK2 / ERK2 de las células tratadas que fueron normalizadas con respecto al valor de pERK1 o 2/ERK1 o 2 del control (=1) Se grafican 3 experimentos independientes (Figura 10B).

Los anticuerpos anti HSP70 aumentaron la fosforilación de p38 (p-p38) en las células estimuladas con pCry1Ac. Mientras que los anticuerpos por sí solos también aumentaron el nivel de p-p38 (Figura 10C). Las gráficas de barras se muestran en la Figura 10D, se grafican los valores de la relación de la IMF de p-p-38 / p-38 normalizados con respecto al control como se describió anteriormente.

Nuestro grupo de investigación ha descrito que pCry1Ac induce la producción de MCP-1, TNF- $\alpha$  e IL-6 en macrófagos, y que la producción de MCP-1 es parcialmente inhibida por el inhibidor de ERK1/2 (Moreno-Fierros et al. 2013). Por tanto, para determinar el papel de HSP70 en la producción de citocinas inducida por pCry1Ac, se pre-incubaron las células RAW264.7 con anticuerpos anti HSP70 como se describe en los Métodos. El anticuerpo anti-HSP70 disminuyó la producción de MCP-1 inducida por pCry1Ac (Figura 10E, primer panel), pero no inhibió significativamente la producción de IL-6 (Figura 10E segundo panel) ni TNF- $\alpha$  (Figura 10E tercer panel). Los anticuerpos HSP70 por sí solos no afectaron la producción de citocinas ya que las células tratadas presentaron bajos niveles basales como en las células control.



**Figura 9. pCry1Ac interacciona de manera específica con HSP70 de superficie.** A) Microscopía confocal de fluorescencia de células RAW264.7 donde se muestra la co-localización de pCry1Ac (verde) con HSP70 (rojo) en la superficie celular. B) Las imágenes de microscopía confocal no muestran co-localización de pCry1Ac con  $\alpha$ -enolasa en la superficie celular. Las imágenes DIC se muestran en los últimos paneles. Las imágenes son representativas de tres experimentos independientes y muestran la máxima proyección de las secciones Z. C) Inmunoprecipitación realizada con pCry1Ac-sefarosa (IP-S) en proteínas de membrana biotiniladas (B-CSP) y utilizando estreptavidina-Dye800 (verde) y anticuerpos  $\alpha$ -HSP70 (rojo) para la detección. D) Inmunoprecipitación cruzada realizada con anticuerpos anti-HSP70 para corroborar la interacción de HSP70 con pCry1Ac. El análisis de Western blot revela la presencia de pCry1Ac (130 kDa aprox.) en las proteínas inmunoprecipitadas por HSP70 (verde). Se realizó un control de IP sin anticuerpos anti HSP70 (C) y no se detectaron bandas inespecíficas. Se detectó la banda de pCry1Ac en el control positivo (cargado con 0,6  $\mu$ g de pCry1Ac sola).



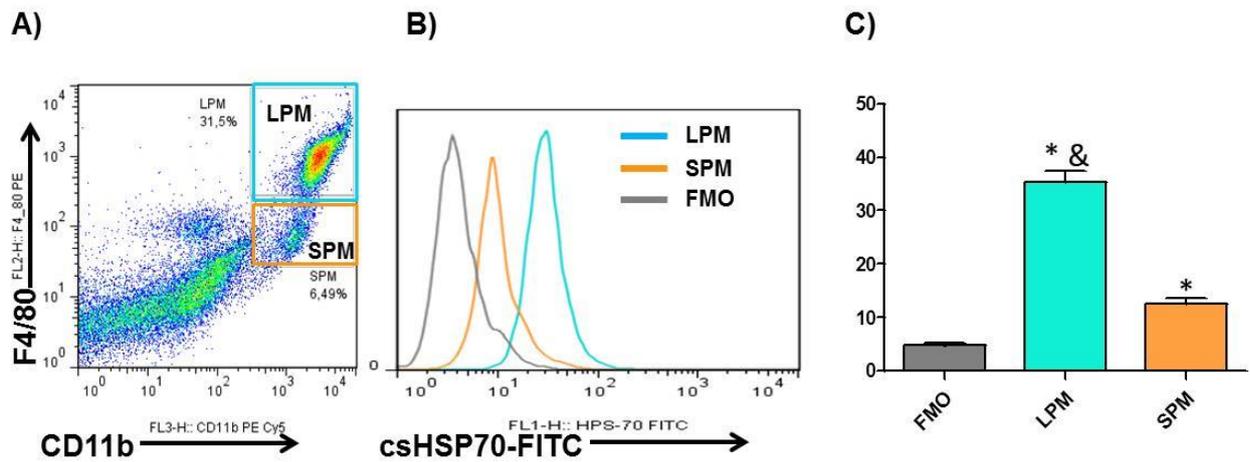
**Figura 10. Los anticuerpos anti-HSP70 inhiben la fosforilación de ERK1 inducida por pCry1Ac, y disminuyen la producción de MCP-1.** Las células se trataron con anticuerpos anti-HSP70 por 30 min, después se añadió pCry1Ac. A) Los ensayos de Western blot con anticuerpos anti p-ERK1/2 se llevaron a cabo en células control (C) tratadas con vehículo (-/-), en células estimuladas con pCry1Ac a los 30 y 60 min sin anticuerpos (+/-) y en células pre-tratadas con anticuerpos anti HSP70 y estimuladas con pCry1Ac (+/+). Las células tratadas solamente con anticuerpos HSP70 (-/+ se muestran en las imágenes representativas. B) El nivel de p-ERK normalizado (C=1) de 3 experimentos independientes se muestra en las gráficas (relación de p-ERK1/ERK1). C) Western blot para la detección de p-p38 en las células no tratadas (-/-), en células estimuladas sólo con la pCry1Ac (+/-), y en las células tratadas previamente con anticuerpos HSP70 más pCry1Ac (+/+). Las células tratadas solamente con anticuerpos HSP70 se añadieron como un control (-/+). D) Los gráficos de la relación normalizada (C=1) de p-p38/p38 de 2 ensayos independientes se muestran en la figura. El control se muestra en barras rojas, el estímulo con pCry1Ac se muestra en barras verdes, anti-HSP70 + pCry1Ac se muestra en verde con cuadros y las células tratadas solamente con anticuerpos anti-HSP70 se muestran en barras grises cuadrículadas. \* Estadísticamente significativo con respecto a las células estimuladas con pCr1Ac a  $p < 0.05$ . E) Las células RAW264.7 se trataron previamente con anticuerpos anti-HSP70 por 30 min. Después, se añadió pCry1Ac durante 1h, se lavaron las células, y se agregó medio nuevo, a las 24 horas post tratamiento se determinó la concentración de MCP-1, IL6 y TNF- $\alpha$ . \* Estadísticamente significativo con respecto al control, <sup>§</sup> estadísticamente significativo con respecto al estímulo con pCry1Ac ( $p > 0,05$ ). Los datos son representativos de 2 experimentos independientes.

#### 4.9 Participación *in vivo* de la HSP70 en el reclutamiento de SPM.

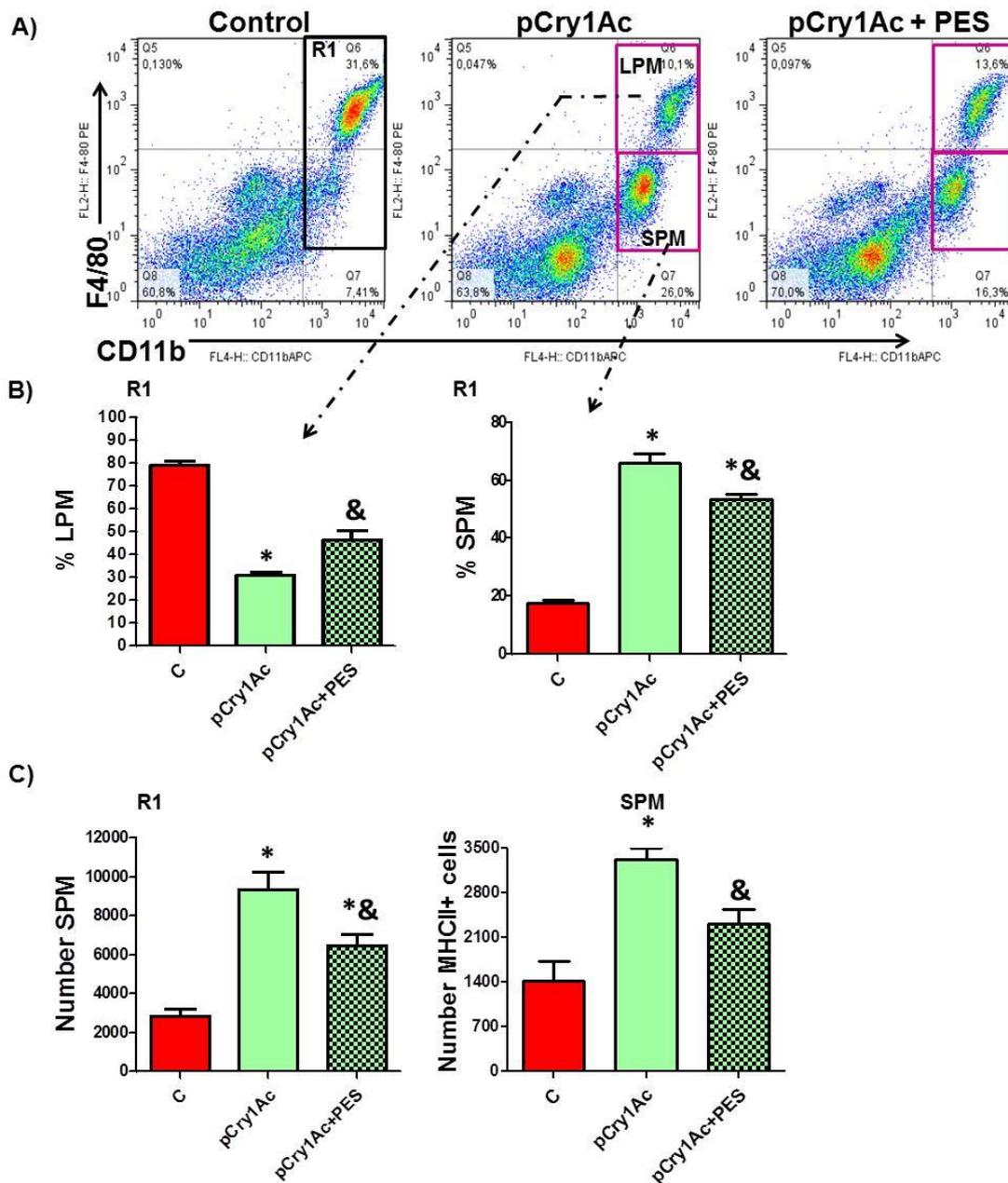
En condiciones fisiológicas la población de macrófagos en cavidad peritoneal (PerC) está constituida principalmente por macrófagos de peritoneo grandes (LPM); se ha observado que en respuesta a los estímulos inflamatorios típicos como el LPS o el tioglicolato la composición celular de los macrófagos de PerC se altera dramáticamente. Los LPM disminuyen notablemente y se reclutan desde circulación los llamados macrófagos de peritoneo pequeños (SPM) que se convierten en la población predominante. Nosotros encontramos que la csHSP70 se expresa principalmente en la subpoblación LPM y que la subpoblación SPM expresa un nivel de csHSP70 muy bajo (Figura 11).

Por lo tanto, para estudiar *in vivo* la participación de HSP70 en los efectos inducidos por pCry1Ac en macrófagos; se evaluó la dinámica de las poblaciones de macrófagos peritoneales, a saber SPM y LPM, en respuesta al estímulo con pCry1Ac después de 24 horas. El primer dot plot de la Figura 12A muestra las subpoblaciones en el control (sin estimular, primer dot plot), después de la estimulación con pCry1Ac se observó que la población de macrófagos CD11b+F4/80+hiMHCII-csHSP70+hi (LPM) se redujo significativamente en la cavidad peritoneal (PerC), mientras que la población de macrófagos CD11b+F4/80+lowMHCII+csHSP70+low (SPM) se incrementó de manera significativa (segundo dot plot, Figura 12A). Cuando pre-tratamos a los ratones con 2-Phenylethynesulfonamide (PES) un inhibidor funcional de la HSP70 los cambios inducidos por la pCry1Ac son parcialmente inhibidos (tercer dot plot, Figura 12A) por lo que el reclutamiento de SPM después de la estimulación con pCry1Ac se disminuye. Los cambios en las subpoblaciones después de los tratamientos mencionados se muestran en las gráficas en la figura 12B. El pre-tratamiento con PES también disminuyó el reclutamiento de SPM MHCII+ inducido por la pCry1Ac, como se muestra en la Figura 12C.

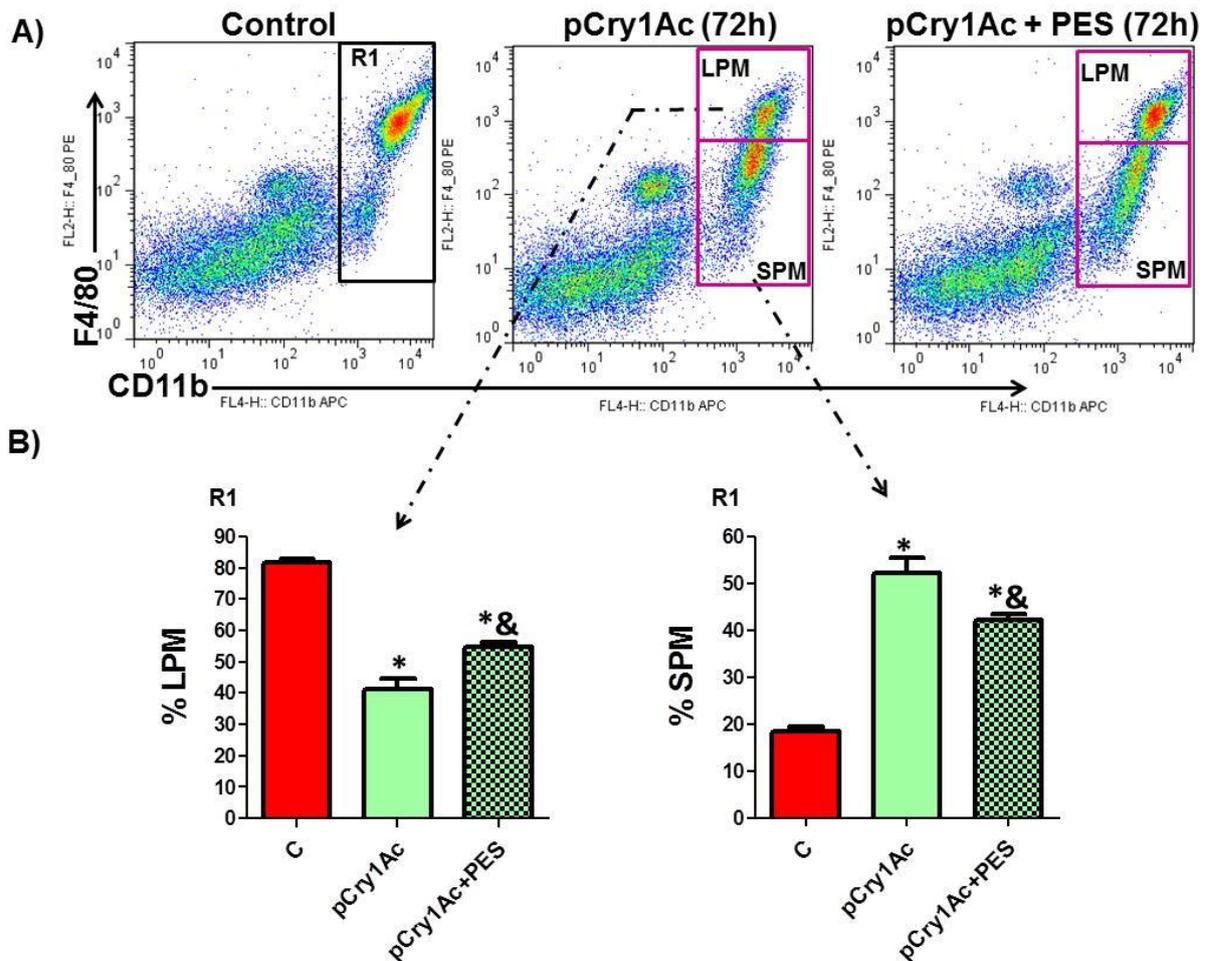
Estos cambios en la dinámica de subpoblaciones de macrófagos de PerC y los efectos inhibitorios del pretratamiento con PES se mantuvieron 72 horas después del estímulo con pCry1Ac (Figura 13), estos resultados fueron similares a los obtenidos tras la estimulación con LPS y tioglicolato (Ghosn et al. 2010), pero en nuestro trabajo se describe la HSP70 de superficie celular como un marcador adicional para los LPM. Es importante destacar que los resultados *in vivo* obtenidos tras la estimulación con pCry1Ac en presencia de PES sugieren la participación de HSP70 en los efectos inducidos por pCry1Ac en el reclutamiento de SPM y en la rápida disminución de LPM ya que el PES inhibe parcialmente estos efectos.



**Figura 11. La población de LPM de PerC tiene alta expresión de csHSP70.** Se recuperaron las células de PerC de ratones BALB/c sin tratamiento con el fin de caracterizar la expresión de la csHSP70 en las subpoblaciones de macrófagos de PerC. A) Dot plot de la población total de células recuperadas del peritoneo, marcadas con CD11b y F4/80. Las subpoblaciones de macrófagos fueron definidas según el nivel de expresión de estos marcadores de superficie, la población LPM está marcada en naranja y la población de SPM en azul. B) Histogramas representativos de la expresión de csHSP70 en los LPM (línea naranja) y en los SPM (línea azul); el FMO de las células es representado con la línea gris. C) Los gráficos de barras muestran el porcentaje de células con expresión de csHSP70 las barras azules representan a los LPM y las barras naranjas a los SPM, las barras grises representan el FMO. Diferencia estadísticamente significativa  $p < 0,05$  \* LPM o SPM contra el FMO. & LPM vs SPM. Las imágenes son representativas de tres ensayos independientes ( $n = 3$ ).



**Figura 12. pCry1Ac aumenta los SPM MHCII + *in vivo* y este efecto es parcialmente inhibido por PES, un inhibidor funcional de HSP70 24h después de la administración de pCry1Ac.** A) Dot plots representativos que muestran las subpoblaciones de LMP y SPM en ratones control (C), en ratones administrados con pCry1Ac y en ratones administrados con PES y pCry1Ac. Se analizaron los Macrófagos LPM y SPM de acuerdo a la expresión diferencial de CD11b, F4/80 y MHCII. El gate 1 (R1) muestra el total de los macrófagos LPM y SPM. B) Gráficas donde se muestran los cambios en las poblaciones después del estímulo con pCry1Ac; R1 es el total de los macrófagos PerC (100%). C) Las gráficas muestran el marcado aumento de las células SPM MHCII + después de la inmunización con pCry1Ac, y este aumento es parcialmente bloqueado en presencia de PES. Diferencia estadística significativa  $p < 0,05$ ; \* pCry1Ac versus control y & pCry1Ac versus pCry1Ac + PES. Las imágenes son representativas de tres ensayos independientes usando 3 ratones por tratamiento.



**Figura 13. Efecto de la estimulación *in vivo* con pCry1Ac con o sin PES después de 72h.** Los macrófagos fueron recuperados 72 horas después de la administración con pCry1Ac. A) Los ratones fueron administrados vía i.p. con pCry1Ac con o sin PES, los ratones control fueron administrados solo con vehículo (C). Las células de PerC se obtuvieron 72 h después del estímulo con pCry1Ac, las subpoblaciones de macrófagos LPM y SPM se determinaron en base a la expresión diferencial de F4/80 y CD11b. Los dot plots representativos muestran las células de PerC totales; La región 1 (R1) muestra el total de macrófagos (SPM y LPM). B) Después de 72 h de la administración *in vivo* de la pCry1Ac se observa el aumento de los SPM y una reducción de LPM; y este efecto es parcialmente inhibido por el PES. Los gráficos muestran estos cambios en LPM (izquierda) y SPM (Derecha) dentro de la región R1 que es el total de macrófagos de PerC (100%). La diferencia estadísticamente significativa a  $p < 0,05$ ; \* pCry1Ac versus control y & pCry1Ac versus pCry1Ac + PES. Los datos en gráficos se obtuvieron a partir de dos experimentos independientes utilizando 3 ratones por grupo.

**Tabla 1. Cobertura y número de péptidos usados para la identificación de las proteínas inmunoprecipitadas por pCry1Ac.**

Código	Peso molecular (KDa)		IP	Cobertura (%)	# de acceso	Péptidos >95 %	Nombre
	E	T					
<b>B</b>	120	45.6	IP-A	4.6	Q8BHW9	0	Proteína tipo Schlafen 1
<b>C</b>	113	32	IP-A	5.7	Z4YM95	0	Proteína del complejo de poro nuclear Nup85 (Fragmento)
		16.6	IP-S	12.7	Q3U3U9	0	Proteína no caracterizada (Fragmento)
<b>D</b>	90	83.3	IP-A	17.1	Q71LX8	3	Proteína de choque térmico 84b (HSP90)
		35.9	IP-A	2.3	Q3U466	0	Proteína Cln6
		17.6	IP-A	6.9	W4VSN7	0	MCG123916
<b>E</b>	76	72.4	IP-A	18.6	Q9DC41	6	Proteína no caracterizada (pertenece a la familia de HSP70)
		67.7	IP-A	10.1	Q3TZQ2	1	Proteína no caracterizada
		117	IP-A	6	Q8CGY8	0	UDP-N-acetilglucosamina-péptido N-acetilglucosaminiltransferasa subunidad de 110 kDa
		22.3	IP-A	22.1	Q62276-2	0	Isoforma 2 del mediador de la subunidad de transcripción de ARN polimerasa II
<b>F</b>	70	70.8	IP-A	37.8	Q3TZJ3	7	Proteína no caracterizada (pertenece a la familia de HSP70)
		70	IP-A IP-S	16.4	Q3TU85	3	Proteína de Choque Térmico 1B (HSP70)
		161	IP-A	3.4	A2AM05	0	Centleína
<b>H</b>	58	57.8	IP-A	19.4	P52480	4	Piruvato cinasa (PKM)
		74.1	IP-A	5.3	Q6RKD9	1	Proteína transmembranal 1 rica en leucine y fibronectina.
		53.7	IPS IP-A	49.1	Q3TFD9	7	Vimentina
<b>I</b>	47	47.1	IP-A	50	Q5FW97	9	Alfa Enolasa
		66.8	IP-A	12	Q5SW15	0	Proteína tipo metiltransferasa
<b>J</b>	44	41.8	IP-A IP-S	43.5	Q4KL81	8	Actina

		3906	IP-A	5.7	A2ASS6	1	Proteína Ankrd36
		42	IP-S	6.6	Q9CXK3	1	Proteína no caracterizada (Pertenece a la familia de la actina)
<b>L</b>	36	36	IP-S	27.6	B7ZP22	6	Ribonucleoproteína nuclear A2/B1
		39.7	IP-S	30.1	Q5FB19	2	Ribonucleoproteína nuclear A3
		14	IP-S	45.7	Q8CGP4	1	Histona H2A
<b>M</b>	35	21.3	IP-S	17.5	Q5SZA3	2	Histona H1.2
		15.2	IP-S	17	F8WI35	1	Histona H3
<b>P</b>	130	15.3	IP-S	29.4	P02301	0	Histona H3.3C

La Tabla 1 muestra la cobertura, el peso molecular experimental (E) y teórico (T) de las proteínas co-inmunoprecipitadas con pCry1Ac e identificadas mediante análisis MALDI-TOF-TOF. Las proteínas se identificaron con al menos 1 péptido > 95% de identidad usando como plantillas proteínas de ratón (*Mus musculus*). El código se refiere a las bandas mostradas en la Figura 9A y 9B. Los métodos de inmunoprecipitación (IP) fueron realizados con: pCry1Ac, anticuerpo-agarosa-proteína A (IP-A) o precipitación con pCry1Ac-Sepharose-4B (IP-S).

## 5. DISCUSIÓN

El principal hallazgo del presente estudio es la evidencia que indica la existencia de proteínas de unión a pCry1Ac en mamíferos, particularmente los datos sugieren la participación de HSP70 como receptor de pCry1Ac en macrófagos y su papel en la activación de ERK1 y la producción de MCP-1. Esta propuesta se basa en las siguientes pruebas: i) se demostró la capacidad de pCry1Ac para inducir la fosforilación de MAPKs en macrófagos; ii) se demostró que a 4°C la pCry1Ac se une a la superficie de macrófagos de manera específica y saturable, mientras que a 37°C la pCry1Ac se endocita vía clatrina, una vía que suele estar implicada en la endocitosis mediada por receptor. Esta vía de endocitosis se demostró ya que pCry1Ac co-localiza con los marcadores de endosomas Rab5 y Rab7 y su internalización fue inhibida por el inhibidor de clatrina, la monodansilcadaverina; iii) se detectaron diversas proteínas de unión a pCry1Ac en macrófagos mediante ensayos de blot ligando y co-inmunoprecipitación; iv) se identificaron mediante MALDI-TOF-TOF las bandas co-inmunoprecipitadas: HSP70,  $\alpha$ -enolasa y actina, y vimentina y su presencia se confirmó mediante ensayos de Western blot; v) se detectó la co-localización superficial de la csHSP70 con pCry1Ac; vi) la interacción de pCry1Ac con HSP70 se confirmó mediante ensayos de inmunoprecipitación cruzada con anticuerpos anti-HSP70; vii) los anticuerpos anti-HSP70 inhibieron parcialmente la fosforilación de ERK1 inducida por pCry1Ac y la producción de MCP-1; viii) la unión mayor de pCry1Ac es en células con alto nivel de expresión de csHSP70, como los LPM (la población de macrófagos predominante encontrada en PerC de ratones BALB/c no tratados) x) finalmente, la participación *in vivo* de HSP70 en el reclutamiento de los SPM inducido por pCry1Ac fue sugerido por la inhibición parcial con el PES, un inhibidor funcional de HSP70.

En este trabajo demostramos que la estimulación con pCry1Ac activa MAPK en macrófagos, ya que el estímulo indujo la fosforilación de p38, ERK1/2 y JNK. La participación de las vías p38 y ERK1/2 en la activación inducida por pCry1Ac fue sugerida por el uso de inhibidores de p-38 y MEK que disminuyeron la sobreproducción de citocinas proinflamatorias y moléculas coestimuladoras (Moreno-Fierros et al. 2013). Además, en un estudio reciente, se demostró que la toxina Cry1Ac (el núcleo tóxico) también es capaz de activar MAPK en macrófagos (Torres-Martinez et al. 2016) de la misma manera que la protoxina, pero con sutiles diferencias en la cinética y la magnitud de la respuesta. Por ejemplo, la protoxina provoca la activación temprana de ERK1/2, mientras que la toxina activa p38. Estos hallazgos confirman que pCry1Ac ejerce efectos biológicos en células de mamíferos aunque esta proteína se consideraba inocua para vertebrados y no se ha demostrado evidencia de toxicidad en mamíferos (Betz et al. 2000; Siegel 2001). En estudios anteriores, hemos demostrado la inmunogenicidad; y el efecto adyuvante de esta proteína, mientras que los presentes resultados demuestran la capacidad de pCry1Ac para activar MAPK en macrófagos y plantea la posibilidad de que estos efectos también podrían ser ejercidos por la toxina y la protoxina Cry1Ac en otros tipos de células de mamífero, sin embargo aún se necesitan estudios adicionales para evaluar esta posibilidad.

La activación de MAPK inducida por pCry1Ac nos llevó a la hipótesis de que pCry1Ac activa vías de señalización a través de receptores en la superficie de macrófagos. En primer lugar, la unión de pCry1Ac a los macrófagos se demostró mediante citometría de flujo y se confirmó por microscopía confocal. A continuación, como un enfoque para identificar los posibles receptores de pCry1Ac en macrófagos, identificamos las proteínas de unión a pCry1Ac por MALDI-TOF-TOF en las proteínas co-inmunoprecipitadas por pCry1Ac. En un

estudio previo usando ensayos de blot ligando, se detectaron seis polipéptidos de unión a pCry1Ac (con pesos moleculares relativos de 102, 87, 62, 55, 51 y 39 kDa)(Vazquez-Padron et al. 2000) en vesículas aisladas del intestino delgado de ratón, pero estas proteínas no fueron identificadas.

Entre las proteínas de unión a pCry1Ac se identificaron varias proteínas con diversas funciones descritas. Curiosamente, varias de estas proteínas fueron HSP, tres de ellas pertenecientes a la familia de proteínas HSP70 y una a la familia de la HSP90. Además, también se identificaron  $\alpha$ -enolasa, actina y vimentina. Es importante mencionar que HSP70 y vimentina también se encontraron en las proteínas co-inmunoprecipitadas por pCry1Ac-en los macrófagos derivados del bazo por lo que pCry1Ac también podría unirse a células de cultivos primarios.

En este estudio, se seleccionó a la HSP70 como el primer candidato para realizar un análisis adicional de su posible papel como un receptor de pCry1Ac, sobre todo porque se demostró la co-localización con pCry1Ac en la superficie de los macrófagos y también porque fue identificada por ambos tipos de co-inmunoprecipitaciones, fue una de las proteínas precipitadas en mayor cantidad y tuvo una cobertura alta en el análisis de MALDI TOF-TOF. Por otra parte, de acuerdo con los resultados actuales y algunos trabajos descritos (discutidos más adelante) que sugieren la presencia de HSP70 en las membranas de la superficie celular y su participación en la activación de MAPK (Asea et al. 2002; Henderson et al. 2010). Cabe destacar que sus efectos coinciden con la activación de MAPK inducida por pCry1Ac que se demostró en el presente estudio.

Aunque HSP70 es ampliamente conocida como una chaperona intracelular principalmente implicada en el plegamiento de proteínas (Terada and Mori 2004), también se ha encontrado localizada en la superficie celular, principalmente en células cancerosas (Nimmervoll et al. 2015) y puede ser sobre expresada en condiciones tales como estrés, temperatura elevada e hipoxia (Campisi and Fleshner 2003; Campisi et al. 2003; Jolesch et al. 2012). Además, HSP70 puede interactuar con membranas lipídicas, mostrando un alto grado de especificidad por fosfatidilserina (Arispe et al. 2004). La unión de HSP70 depende del entorno lipídico (Armijo et al. 2014), pero también del tipo celular. En células normales, en contraste con lo que sucede en las células cancerosas, HSP70 se asocia con receptores de superficie celular; De hecho, HSP70 parece estar integrada en la membrana plasmática (Multhoff and Hightower 2011).

La interacción de pCry1Ac con HSP70 se confirmó mediante ensayos de co-inmunoprecipitación con anticuerpos anti-HSP70. Además, la participación funcional de la  $\alpha$ -HSP70 en algunos de los efectos de activación de macrófagos inducidos por pCry1Ac fue sugerida por la inhibición parcial de la fosforilación de ERK1 por el pretratamiento con anticuerpos anti-HSP70. ERK1 es una cinasa serina/treonina que participa en la cascada de señalización Ras-Raf-MEK-ERK, esta cascada de señalización se activa principalmente por receptores de membrana tales como el receptor Tyr cinasas (RTKs), Receptores Acoplados a Proteínas G (GPCR), Canales iónicos, el Receptor para factor de crecimiento (EGF), el receptor factor de crecimiento vascular endotelial (VEGFR), algunos TLRs y otros mitógenos (Wortzel and Seger 2011). Esta cascada participa en la regulación de una gran variedad de procesos incluyendo la adhesión celular, la progresión del ciclo celular, la migración celular, la supervivencia celular, la diferenciación, el metabolismo, proliferación y transcripción. Se ha demostrado que HSP70 está anclada a la membrana por medio de

residuos de fosfatidilserina pero no tiene residuos transmembrana que inicien la cascada de señalización de ERK1/2, por lo cual nosotros proponemos que la csHSP70 está formando complejos con alguno de los receptores de membrana capaces de iniciar la cascada de señalización y la pCry1Ac se une a la csHSP70 entrecruzando varios de estos complejos induciendo la activación de ERK1/2.

Por otro lado se sugirió la participación de HSP70 en la producción de MCP-1 provocada por pCry1Ac ya que al bloquear con anticuerpos anti-HSP70 esta producción de MCP-1 fue disminuida. Se deben realizar estudios más a fondo para determinar de qué manera puede estar la pCry1Ac induciendo la producción de MCP-1 en los macrófagos, tal vez sea debido a que pCry1Ac activa ERK1/2 y esta a su vez lleva a la producción de MCP-1 ya que al utilizar inhibidores para MEK1/2 se disminuye la producción de MCP-1 inducida por pCry1Ac (Moreno-Fierros et al. 2013). Es compleja la asociación entre MCP-1 y pCry1Ac ya que MCP-1 puede ser inducida en los macrófagos por una gran cantidad de estímulos incluyendo: la misma MCP-, IL-1, IL-4, TNF- $\alpha$ , PDGF (factor de crecimiento derivado de plaquetas), GM-CSF (factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos), ECGF (factor de crecimiento de células endoteliales), IFN $\gamma$  (interferón  $\gamma$ ), PHA (fitohemaglutinina), LPS (lipopolisacárido), Lipoproteínas de baja densidad mínimamente modificadas, Complejos de IgG, Virus y otros (Rot and von Andrian 2004).

Utilizando la estimulación exógena con HSP70, se ha sugerido que la vía de señalización de p38 de las MAPK es crítica para la activación de macrófagos inducida por HSP70 (Wang et al. 2005). Por el contrario en este trabajo se observó que el tratamiento con anticuerpos anti HSP70 era capaz de activar p38 sugiriendo que la csHSP70 participa directamente en la activación. Por lo tanto con en base en estas pruebas, proponemos que la csHSP70 es uno de los receptores de pCry1Ac en los macrófagos y que es una de las proteínas responsables de la actividad inmunopotenciadora de la pCry1Ac.

Aunque en la mayoría de las células normales, los niveles de csHSP70 son indetectables en condiciones fisiológicas; nuestros datos sostienen que en los macrófagos LPM existe expresión constitutiva de csHSP70. Este nivel de expresión podría estar relacionado con su estado de diferenciación o activación, ya que se detectó la expresión diferencial de csHSP70 en los LPM y SPM, siendo los primeros los que expresaban de manera alta la csHSP70. Estas dos subpoblaciones de macrófagos son consideradas distintas fenotípicamente y funcionalmente (Cassado Ados et al. 2015; Ghosn et al. 2010). Se encontró que los LPM, la mayor subpoblación de macrófagos de PerC tienen un fenotipo CD11b+F4/80+hiMHCII- además de la alta expresión constitutiva de csHSP70, mientras que los SPM, la subpoblación menor de macrófagos tiene un fenotipo CD11b+F4/80+bajo y mostró bajos niveles de csHSP70, por lo tanto, proponemos a la csHSP70 como un marcador adicional para los LPM.

Debido a que se sabe que las subpoblaciones de macrófagos de PerC (LPM y SPM) cambian dramáticamente en respuesta a estímulos inflamatorios, se examinó la capacidad del estímulo con pCry1Ac para alterar estas subpoblaciones. Después del estímulo con pCry1Ac los LPM, CD11b + F4/80+hiMHCII- disminuyeron rápidamente (24h después de los estímulos) de la PerC y los SPM, CD11b+F4/80+bajo MHCII +, se incrementó. Después de 72h de estímulo con pCry1Ac, la población LPM se recuperó parcialmente (Figura 9). Estos resultados coinciden con algunos de los efectos reportados después del estímulo con LPS y tioglicolato, ya que con estos compuestos tóxicos la disminución dramática de LPM se

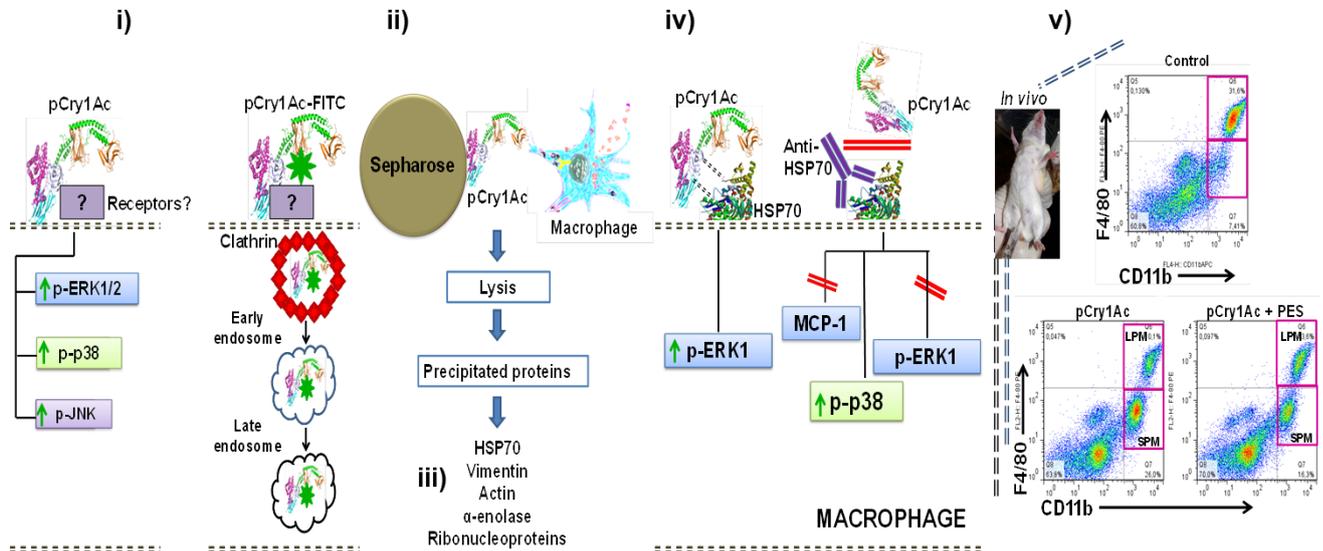
mantiene más tiempo (96h) (Ghosn et al. 2010). Estas diferencias en los efectos pueden deberse a un menor potencial inflamatorio de pCry1Ac con respecto al LPS o al tioglicolato.

Nuestros datos sugieren que la HSP70 participa parcialmente en el reclutamiento de SPM y la disminución de LPM inducida por el estímulo *in vivo* con pCry1Ac ya que estos cambios en macrófagos de PerC fueron parcialmente inhibidos por el PES (Leu et al. 2009) un inhibidor funcional de HSP70. Es posible que la HSP70 participe en la endocitosis de pCry1Ac a través de clatrina porque se ha reportado que algunos miembros de la familia HSP70, en particular la proteína cognada de choque térmico 70 (Hsc70), participan en la endocitosis mediada por clatrina (Newmyer and Schmid 2001). Hasta la fecha no se había reportado que la csHSP70 pudiera actuar como receptor, sin embargo, debido a que la HSP70 funciona como una chaperona, puede interactuar con un número amplio de proteínas. De hecho, el mecanismo de acción de HSP70 tanto en respuestas inmunes innatas como adaptativas no se ha determinado a detalle, en parte debido a su interacción promiscua con células presentadoras de antígeno (APC) a través de una amplia gama de receptores de superficie tales como LRP/CD91, CD40, Receptores de tipo lectina tales como LOX-1 y DC-Sign o con TLR2 y TLR4 (Henderson et al. 2010). Las HSPs y las proteínas similares a HSP, funcionan como agonistas de TLR4, por lo que se han propuesto como adyuvantes Th1.

Algunos de los efectos inducidos por HSP70 o HSP70L1 son similares a los provocados por pCry1Ac en los macrófagos, ya que activan vías de MAPK y NF- $\kappa$  B vías, incrementan la expresión de CD40, CD80 y CD86 y promueven la producción de citocinas proinflamatorias como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-12p70 (Fang et al. 2011). Sin embargo, tanto HSP70 como HSP70L1, pueden unirse directamente a TLR4 y/o TLR2 en la superficie de monocitos o células dendríticas y luego inducir los efectos de activación, sin embargo en este trabajo no se identificaron TLRs que pudieran estar asociados a la HSP70 co-inmunoprecipitada por pCry1Ac.

Se requieren estudios adicionales para determinar el papel de HSP90, HSP60, actina,  $\alpha$ -enolasa y vimentina, en la unión de pCry1Ac a los macrófagos. Particularmente, la actina se ha descrito como una proteína de unión para la toxina Cry1Ac en insectos (McNall and Adang 2003) y es una de las proteínas más conservadas. De hecho, la identidad *in silico* de la actina (UniProt, Q4KL81) en ratones e insectos (NCBI, 224305) es del 97%, lo que puede permitir la interacción de pCry1Ac con la actina de mamífero. Por otra parte, en el presente estudio, hay una clara co-localización de pCry1Ac y la actina en el citoplasma (Figura 7C). Estudios futuros deben tratar de determinar si estas proteínas están implicadas en la unión e internalización de pCry1Ac para definir su participación potencial en los efectos biológicos causados por pCry1Ac en los macrófagos, así como en otros tipos de células, lo que puede ayudar a dilucidar el mecanismo de acción de su efecto adyuvante. Además, también sería necesario determinar si otras toxinas Cry se unen a células de mamífero a través del mismo tipo de receptores. Estos temas planteados a partir de los resultados actuales son importantes para seguir estudiando a detalle la interacción de las toxinas Cry con células de mamíferos, debido a las implicaciones del uso y consumo de estas toxinas que actualmente son los bio-insecticidas de mayor importancia económica y de mayor distribución a nivel mundial.

## 6. CONCLUSIONES



i) La pCry1Ac induce la fosforilación de ERK1/2, JNK y p38.

ii) La pCry1Ac se une a los macrófagos y es endocitada vía clatrina.

iii) La pCry1Ac co-inmunoprecipita con varias proteínas de macrófagos incluidas HSP70, vimentina,  $\alpha$ -enolasa y actina.

iv) La HSP70 participa en la activación de ERK1 inducida por pCry1Ac.

v) La HSP70 participa en el reclutamiento de macrófagos inducido por la pCry1Ac *in vivo*.

## 7. PERSPECTIVAS

En este trabajo se identificaron algunas proteínas de unión a pCry1Ac (HSP70, Vimentina, Actina,  $\alpha$ -enolasa) y se demuestra la participación de la HSP70 en la activación de ERK1 y la producción de MCP-1 *in vitro*. Sin embargo, queda por determinar el papel *in vivo* que desempeña la unión de pCry1Ac a HSP70 en la producción de citocinas como IL-6, TNF- $\alpha$  y MCP-1.

Dentro de las perspectivas principales de este trabajo se encuentra determinar si la Vimentina, la Actina, la  $\alpha$ -enolasa y otras HSP (como HSP90) participan en la activación de macrófagos inducida por pCry1Ac o si solo son parte de un complejo y por ello co-inmunoprecipitan con pCry1Ac.

Otra de las perspectivas de este trabajo es determinar si existen receptores en balsas lipídicas con motivos citoplasmáticos que pudieran ser los responsables de la activación de p38, ERK2 y de la producción de TNF- $\alpha$  e IL-6, también determinar si las proteínas de unión para la protoxina (pCry1Ac) son las mismas que para la toxina Cry1Ac ya que esta última también tiene efectos inmunogénicos y también activa macrófagos.

Este trabajo permite continuar con la caracterización del mecanismo adyuvante de pCry1Ac y determinar la ruta final de pCry1Ac después de ser endocitada para comprobar si se degrada o no en lisosomas o como otros adyuvantes se dirige hacia el retículo endoplásmico.

## BIBLIOGRAFÍA

- Aimanova, K. G., Zhuang, M., and Gill, S. S. (2006), 'Expression of Cry1Ac cadherin receptors in insect midgut and cell lines', *J Invertebr Pathol*, 92 (3), 178-87.
- Arispe, N., et al. (2004), 'Hsc70 and Hsp70 interact with phosphatidylserine on the surface of PC12 cells resulting in a decrease of viability', *FASEB J*, 18 (14), 1636-45.
- Armijo, G., et al. (2014), 'Interaction of heat shock protein 70 with membranes depends on the lipid environment', *Cell Stress Chaperones*, 19 (6), 877-86.
- Asea, A., et al. (2002), 'Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70: role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4', *J Biol Chem*, 277 (17), 15028-34.
- Atsumi, S., et al. (2005), 'Location of the *Bombyx mori* aminopeptidase N type 1 binding site on *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa toxin', *Appl Environ Microbiol*, 71 (7), 3966-77.
- Betz, F. S., Hammond, B. G., and Fuchs, R. L. (2000), 'Safety and advantages of *Bacillus thuringiensis*-protected plants to control insect pests', *Regul Toxicol Pharmacol*, 32 (2), 156-73.
- Braun, L. and Keddie, B. A. (1997), 'A new tissue technique for evaluating effects of *Bacillus thuringiensis* toxins on insect midgut epithelium', *J Invertebr Pathol*, 69 (2), 92-104.
- Bucci, C., et al. (1992), 'The small GTPase rab5 functions as a regulatory factor in the early endocytic pathway', *Cell*, 70 (5), 715-28.
- Burton, S. L., et al. (1999), 'N-acetylgalactosamine on the putative insect receptor aminopeptidase N is recognised by a site on the domain III lectin-like fold of a *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxin', *J Mol Biol*, 287 (5), 1011-22.
- Campisi, J. and Fleshner, M. (2003), 'Role of extracellular HSP72 in acute stress-induced potentiation of innate immunity in active rats', *J Appl Physiol (1985)*, 94 (1), 43-52.
- Campisi, J., Leem, T. H., and Fleshner, M. (2003), 'Stress-induced extracellular Hsp72 is a functionally significant danger signal to the immune system', *Cell Stress Chaperones*, 8 (3), 272-86.
- Carrasco-Yepe, M., et al. (2010), 'Protection against *Naegleria fowleri* infection in mice immunized with Cry1Ac plus amoebic lysates is dependent on the STAT6 Th2 response', *Parasite Immunol*, 32 (9-10), 664-70.
- Cassado Ados, A., D'Imperio Lima, M. R., and Bortoluci, K. R. (2015), 'Revisiting mouse peritoneal macrophages: heterogeneity, development, and function', *Front Immunol*, 6, 225.
- Czerkinsky, C. and Holmgren, J. (2012), 'Mucosal delivery routes for optimal immunization: targeting immunity to the right tissues', *Curr Top Microbiol Immunol*, 354, 1-18.
- de Maagd, R. A., et al. (2003), 'Structure, diversity, and evolution of protein toxins from spore-forming entomopathogenic bacteria', *Annu Rev Genet*, 37, 409-33.
- Esquivel-Perez, R. and Moreno-Fierros, L. (2005), 'Mucosal and systemic adjuvant effects of cholera toxin and Cry1Ac protoxin on the specific antibody response to HIV-1 C4/V3 peptides are different and depend on the antigen co-administered', *Viral Immunol*, 18 (4), 695-708.
- Evdokimov, A. G., et al. (2014), 'Structure of the full-length insecticidal protein Cry1Ac reveals intriguing details of toxin packaging into in vivo formed crystals', *Protein Sci*, 23 (11), 1491-7.
- Fang, H., et al. (2011), 'Toll-like receptor 4 (TLR4) is essential for Hsp70-like protein 1 (HSP70L1) to activate dendritic cells and induce Th1 response', *J Biol Chem*, 286 (35), 30393-400.
- García-Hernández, A.L. (2015), 'Mucosal Immunology and Oral Vaccination'. *Genetically Engineered Plants as a Source of Vaccines Against Wide Spread Diseases* edited by Rosales-Mendoza, S.
- Ghosn, E. E., et al. (2010), 'Two physically, functionally, and developmentally distinct peritoneal macrophage subsets', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107 (6), 2568-73.
- Gomez, I., et al. (2003), 'Molecular basis for *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin specificity: two structural determinants in the *Manduca sexta* Bt-R1 receptor interact with loops alpha-8 and 2 in domain II of Cry1Ab toxin', *Biochemistry*, 42 (35), 10482-9.
- Gomez, I., et al. (2002), 'Hydropathic complementarity determines interaction of epitope (869)HITDTNNK(876) in *Manduca sexta* Bt-R(1) receptor with loop 2 of domain II of *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxins', *J Biol Chem*, 277 (33), 30137-43.

- Gonzalez-Gonzalez, E., et al. (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 (2-4), 382-8.
- Gumbiner, B. M. (1996), 'Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis', *Cell*, 84 (3), 345-57.
- Haigler, H. T., et al. (1980), 'Dansylcadaverine inhibits internalization of 125I-epidermal growth factor in BALB 3T3 cells', *J Biol Chem*, 255 (4), 1239-41.
- Henderson, B., et al. (2010), 'Caught with their PAMPs down? The extracellular signalling actions of molecular chaperones are not due to microbial contaminants', *Cell Stress Chaperones*, 15 (2), 123-41.
- Holmgren, J. and Czerkinsky, C. (2005), 'Mucosal immunity and vaccines', *Nat Med*, 11 (4 Suppl), S45-53.
- Ibarra-Moreno, S., Garcia-Hernandez, A. L., and Moreno-Fierros, L. (2014), 'Coadministration of protoxin Cry1Ac from *Bacillus thuringiensis* with metacestode extract confers protective immunity to murine cysticercosis', *Parasite Immunol*, 36 (6), 266-70.
- Jolesch, A., et al. (2012), 'Hsp70, a messenger from hyperthermia for the immune system', *Eur J Cell Biol*, 91 (1), 48-52.
- Kim, S. H., Lee, K. Y., and Jang, Y. S. (2012), 'Mucosal Immune System and M Cell-targeting Strategies for Oral Mucosal Vaccination', *Immune Netw*, 12 (5), 165-75.
- Kim, S. H., et al. (2015), 'Antimicrobial peptide LL-37 promotes antigen-specific immune responses in mice by enhancing Th17-skewed mucosal and systemic immunities', *Eur J Immunol*, 45 (5), 1402-13.
- Lamichhane, A., Azegamia, T., and Kiyono, H. (2014), 'The mucosal immune system for vaccine development', *Vaccine*, 32 (49), 6711-23.
- Lee, J. B., et al. (2009), 'Intranasal delivery of cholera toxin induces th17-dominated T-cell response to bystander antigens', *PLoS One*, 4 (4), e5190.
- Legorreta-Herrera, M., Meza, R. O., and 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*, 2010, 198921.
- Leu, J. I., et al. (2009), 'A small molecule inhibitor of inducible heat shock protein 70', *Mol Cell*, 36 (1), 15-27.
- Lore, K. and Karlsson Hedestam, G. B. (2009), 'Novel adjuvants for B cell immune responses', *Curr Opin HIV AIDS*, 4 (5), 441-6.
- McNall, R. J. and Adang, M. J. (2003), 'Identification of novel *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac binding proteins in *Manduca sexta* midgut through proteomic analysis', *Insect Biochem Mol Biol*, 33 (10), 999-1010.
- Midboe, E. G., Candas, M., and Bulla, L. A., Jr. (2003), 'Expression of a midgut-specific cadherin BT-R1 during the development of *Manduca sexta* larva', *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 135 (1), 125-37.
- Mohan, T., Verma, P., and Rao, D. N. (2013), 'Novel adjuvants & delivery vehicles for vaccines development: a road ahead', *Indian J Med Res*, 138 (5), 779-95.
- Moreno-Fierros, L., et al. (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 (8), 885-90.
- Moreno-Fierros, L., et al. (2003), 'Intranasal Cry1Ac protoxin is an effective mucosal and systemic carrier and adjuvant of *Streptococcus pneumoniae* polysaccharides in mice', *Scand J Immunol*, 57 (1), 45-55.
- Moreno-Fierros, L., et al. (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 (4), 1051-66.

- Multhoff, G. and Hightower, L. E. (2011), 'Distinguishing integral and receptor-bound heat shock protein 70 (Hsp70) on the cell surface by Hsp70-specific antibodies', *Cell Stress Chaperones*, 16 (3), 251-5.
- Munro, S. (2003), 'Lipid rafts: elusive or illusive?', *Cell*, 115 (4), 377-88.
- Nakanishi, K., et al. (2002), 'Aminopeptidase N isoforms from the midgut of *Bombyx mori* and *Plutella xylostella* -- their classification and the factors that determine their binding specificity to *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxin', *FEBS Lett*, 519 (1-3), 215-20.
- Neutra, M. R. and Kozlowski, P. A. (2006), 'Mucosal vaccines: the promise and the challenge', *Nat Rev Immunol*, 6 (2), 148-58.
- Newmyer, S. L. and Schmid, S. L. (2001), 'Dominant-interfering Hsc70 mutants disrupt multiple stages of the clathrin-coated vesicle cycle in vivo', *J Cell Biol*, 152 (3), 607-20.
- Nimmervoll, B., et al. (2015), 'Cell surface localised Hsp70 is a cancer specific regulator of clathrin-independent endocytosis', *FEBS Lett*, 589 (19 Pt B), 2747-53.
- Pabst, O. and Mowat, A. M. (2012), 'Oral tolerance to food protein', *Mucosal Immunol*, 5 (3), 232-9.
- Parton, R. G. and Simons, K. (2007), 'The multiple faces of caveolae', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8 (3), 185-94.
- Pattacini, L., et al. (2012), 'A novel HIV vaccine adjuvanted by IC31 induces robust and persistent humoral and cellular immunity', *PLoS One*, 7 (7), e42163.
- Pavot, V., et al. (2012), 'New insights in mucosal vaccine development', *Vaccine*, 30 (2), 142-54.
- Perry, J. W. and Wobus, C. E. (2010), 'Endocytosis of murine norovirus 1 into murine macrophages is dependent on dynamin II and cholesterol', *J Virol*, 84 (12), 6163-76.
- Quan, F. S., Compans, R. W., and Kang, S. M. (2012), 'Oral vaccination with inactivated influenza vaccine induces cross-protective immunity', *Vaccine*, 30 (2), 180-8.
- Rhee, J. H., Lee, S. E., and Kim, S. Y. (2012), 'Mucosal vaccine adjuvants update', *Clin Exp Vaccine Res*, 1 (1), 50-63.
- Rojas-Hernandez, S., et al. (2004), 'Intranasal coadministration of the Cry1Ac protoxin with amoebal lysates increases protection against *Naegleria fowleri* meningoencephalitis', *Infect Immun*, 72 (8), 4368-75.
- Rose, M. A. (2014), 'Mucosal immunization in perspective', *Hum Vaccin Immunother*, 10 (7), 2115-7.
- Rot, A. and von Andrian, U. H. (2004), 'Chemokines in innate and adaptive host defense: basic chemokine grammar for immune cells', *Annu Rev Immunol*, 22, 891-928.
- Safarzadeh, E., et al. (2017), 'Myeloid-derived suppressor cells: Important contributors to tumor progression and metastasis', *J Cell Physiol*.
- Siegel, J. P. (2001), 'The mammalian safety of *Bacillus thuringiensis*-based insecticides', *J Invertebr Pathol*, 77 (1), 13-21.
- Silva-Alvarez, V., et al. (2016), 'Echinococcus granulosus Antigen B binds to monocytes and macrophages modulating cell response to inflammation', *Parasit Vectors*, 9, 69.
- Srivastava, L., et al. (2014), 'Immunomodulatory glycan lacto-N-fucopentaose III requires clathrin-mediated endocytosis to induce alternative activation of antigen-presenting cells', *Infect Immun*, 82 (5), 1891-903.
- Sweet, M. J. and Hume, D. A. (1996), 'Endotoxin signal transduction in macrophages', *J Leukoc Biol*, 60 (1), 8-26.
- Terada, K. and Mori, M. (2004), '[Cellular functions of cytosolic Hsp70]', *Tanpakushitsu Kakusan Koso*, 49 (7 Suppl), 841-6.
- Torres-Martinez, M., et al. (2016), 'Cry1Ac toxin induces macrophage activation via ERK1/2, JNK and p38 mitogen-activated protein kinases', *Int J Biochem Cell Biol*, 78, 106-15.
- Vazquez-Padron, R. I., et al. (1999), 'Intragastric and intraperitoneal administration of Cry1Ac protoxin from *Bacillus thuringiensis* induces systemic and mucosal antibody responses in mice', *Life Sci*, 64 (21), 1897-912.
- Vazquez-Padron, R. I., et al. (2000), 'Cry1Ac protoxin from *Bacillus thuringiensis* sp. kurstaki HD73 binds to surface proteins in the mouse small intestine', *Biochem Biophys Res Commun*, 271 (1), 54-8.

- Vazquez, R. I., et al. (1999), 'Bacillus thuringiensis Cry1Ac protoxin is a potent systemic and mucosal adjuvant', *Scand J Immunol*, 49 (6), 578-84.
- Vela Ramirez, J. E., Sharpe, L. A., and Peppas, N. A. (2017), 'Current state and challenges in developing oral vaccines', *Adv Drug Deliv Rev*.
- Vitelli, R., et al. (1997), 'Role of the small GTPase Rab7 in the late endocytic pathway', *J Biol Chem*, 272 (7), 4391-7.
- Wang, Y., Rahman, D., and Lehner, T. (2012), 'A comparative study of stress-mediated immunological functions with the adjuvanticity of alum', *J Biol Chem*, 287 (21), 17152-60.
- Wang, Y., et al. (2005), 'Identification of stimulating and inhibitory epitopes within the heat shock protein 70 molecule that modulate cytokine production and maturation of dendritic cells', *J Immunol*, 174 (6), 3306-16.
- Woodrow, K. A., Bennett, K. M., and Lo, D. D. (2012), 'Mucosal vaccine design and delivery', *Annu Rev Biomed Eng*, 14, 17-46.
- Wortzel, I. and Seger, R. (2011), 'The ERK Cascade: Distinct Functions within Various Subcellular Organelles', *Genes Cancer*, 2 (3), 195-209.
- Xu, C., et al. (2014), 'Structural insights into Bacillus thuringiensis Cry, Cyt and parasporin toxins', *Toxins (Basel)*, 6 (9), 2732-70.
- Zhang, Q., Hua, G., and Adang, M. J. (2016), 'Effects and mechanisms of Bacillus thuringiensis crystal toxins for mosquito larvae', *Insect Sci*.

## ANEXOS

### Anexo I. Artículos del doctorado:

**a) The Macrophage Activation Induced by *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac Protoxin Involves ERK1/2 and p38 Pathways and the Interaction with Cell-Surface-HSP70.**

Rubio-Infante N, Ilhuicatzí-Alvarado D, Torres-Martínez M, Reyes-Grajeda JP, Nava-Acosta R, González-González E, Moreno-Fierros L. *J Cell Biochem.* 2017.

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

Torres-Martínez M, Rubio-Infante N, García-Hernández AL, Nava-Acosta R, Ilhuicatzí-Alvarado D, Moreno-Fierros L. *Int J Biochem Cell Biol.* 2016.

**c) An overview of the safety and biological effects of *Bacillus thuringiensis* Cry toxins in mammals.**

Rubio-Infante N, Moreno-Fierros L. *J Appl Toxicol.* 2016.

**d) Cry1Ac protoxin from *Bacillus thuringiensis* promotes macrophage activation by upregulating CD80 and CD86 and by inducing IL-6, MCP-1 and TNF- $\alpha$  cytokines.**

Moreno-Fierros L, García-Hernández AL, Ilhuicatzí-Alvarado D, Rivera-Santiago L, Torres-Martínez M, Rubio-Infante N, Legorreta-Herrera M. *Int Immunopharmacol.* 2013.

ARTICLE

Journal of Cellular Biochemistry 9999:1–19 (2017)

Journal of Cellular  
Biochemistry

## The Macrophage Activation Induced by *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac Protoxin Involves ERK1/2 and p38 Pathways and the Interaction with Cell-Surface-HSP70

Nestor Rubio-Infante,<sup>1</sup> Damaris Ilhuicatzí-Alvarado,<sup>1</sup> Marilu Torres-Martínez,<sup>1</sup>  
Juan Pablo Reyes-Grajeda,<sup>2</sup> Raúl Nava-Acosta,<sup>1</sup> Edith González-González,<sup>1</sup>  
and Leticia Moreno-Fierros <sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>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

<sup>2</sup>Instituto Nacional de Medicina Genómica, Periférico Sur No. 4809, Colonia Arenal Tepepan, Delegación Tlalpan, 14610 México, DF