



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

**Evaluación de la activación *in vivo* de células dendríticas
y linfocitos inducida por la protoxina y toxina Cry1Ac**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

LICENCIADA EN BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA

PRESENTA

CYNTHIA DANIELA IBARRA MORENO

ASESOR: Dra. Leticia Moreno Fierros

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO, 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

**M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**

**ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: **Trabajo de Tesis.**

Evaluación de la activación *in vivo* de células dendríticas y linfocitos inducida por la protoxina y toxina Cry1Ac

Que presenta la pasante: **Cynthia Daniela Ibarra Moreno**
Con número de cuenta: **311505559** para obtener el Título de la carrera: **Licenciatura en Bioquímica Diagnóstica**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO.**

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 14 de Febrero de 2019.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dr. Marco Antonio Vega López	
VOCAL	Dra. Leticia Moreno Fierros	
SECRETARIO	Dr. Andrés Romero Rojas	
1er. SUPLENTE	M.V.Z. Angel Germán Martínez Sosa	
2do. SUPLENTE	Q.F.B. Ladislao Palomar Morales	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

LMCF/javg

Agradecimientos

Esta tesis fue financiada por los proyectos:

- UNAM PAPIIT (IN223319)
- CONACYT (CB283319)

A la técnico académico del laboratorio 9 de inmunidad de mucosas

M. en C. Damaris Ilhuicatzí Alvarado por todo el apoyo brindado en la realización de los experimentos de este trabajo, por enseñarme todas las técnicas y siempre tener la disposición de enseñarnos y ayudarnos en el laboratorio.

A la UNAM, por darme todas las herramientas y los conocimientos para mi formación académica, y por permitirme conocer personas y vivir experiencias que siempre recordaré.

Índice

Lista de Abreviaturas	5
Índice de figuras	7
Índice de tablas	8
Resumen	9
1. Introducción	11
1.1 Proteínas Cry1	11
1.2 Estructura	12
1.3 Mecanismo de acción en insectos	12
2. Antecedentes	14
2.1 Propiedades inmunogénicas de las proteínas Cry1Ac	14
2.2 Efecto adyuvante y efecto protector de las proteínas Cry1Ac	14
2.3 Mecanismo adyuvante	15
Planteamiento del problema	17
Objetivo	17
Objetivos particulares	18
Hipótesis	18
3. Estrategia experimental	19
4. Metodología experimental	19
4.1 Obtención y purificación de la protoxina Cry1Ac	19
4.3 Inmunización de ratones C57BL/6 con las proteínas Cry1Ac	21
4.4 Obtención de células de bazo, ganglio poplíteo y peritoneo de ratones C57BL/6	21
4.5 Tinción extracelular de células de bazo, ganglio poplíteo y peritoneo de ratones C57BL/6	22
4.6 Ensayo de proliferación de linfocitos T y B con carboxifluoresceína (CFSE)	23
4.7 Ensayo de citocinas	24
4.8 Análisis estadístico	24
5. Resultados	25
5.1 Las proteínas Cry1Ac incrementaron el número de células dendríticas en ganglio poplíteo e indujeron sobreexpresión de CD86	25
5.2 Las proteínas Cry1Ac incrementaron la proporción de linfocitos B CD69 ⁺ en ganglio poplíteo	31
5.3 La toxina Cry1Ac indujo la activación de linfocitos T en ganglio poplíteo y peritoneo	35
5.4 La tCry1Ac indujo la proliferación de linfocitos B (CD19 ⁺) de bazo de ratones inmunizados y no inmunizados	39
5.5 Producción de citocinas de sobrenadantes de células estimuladas <i>in vitro</i>	44
6. Discusión	47
7. Conclusiones	54
8. Perspectivas	55
9. Referencias	56

Lista de Abreviaturas

ALP Fosfatasa alcalina

APN N-aminopeptidasa

ANOVA Análisis de varianza

BAL Lavado broncoalveolar

Bt *Bacillus thuringensis*

CADR Receptor tipo cadherina

CFSE Éster de succinimidil-carboxifluoresceína

CD Células dendríticas

CL Células de Langerhans

CPA Célula presentadora de antígeno

DTT Ditioneitol

EDTA Ácido etilendiaminotetraacético

IFN- γ Interferón gamma

ID Intradérmica

IDO Indolamina 2,3-dioxigenasa

IL-2 Interleucina 2

IL-4 Interleucina 4

IL-6 Interleucina 6

IL-8 Interleucina 8

IL-10 Interleucina 10

IL-17 Interleucina 17

IP Intraperitoneal

LPS Lipopolisacárido

MAPKs Proteínas cinasas activadas por mitógenos

MCP-1 Proteína quimiotáctica de monocitos 1

MHC-II Complejo Mayor de Histocompatibilidad de Clase II

NALT Tejido linfoide asociado a la cavidad nasal

PBA Amortiguador de fosfato-salino con albúmina sérica bovina

PBS Amortiguador de fosfato-salino

PMSF Fluoruro de fenilmetilsulfonio

RPMI Medio Roswell Memorial Institute

SFB Suero Fetal Bovino

SB Suero Bovino

TC Toxina de Cólera

TLR Receptor tipo Toll

TNF- α Factor de Necrosis Tumoral

Índice de figuras

	Página
Figura 1. Estructura de la proteína Cry1Ac	14
Figura 2. Mecanismo de acción en insectos de las proteínas Cry	15
Figura 3. Efecto de la administración peritoneal de pCry1Ac en la expresión de CD80 y CD86 en macrófagos de bazo	18
Figura 4. Efecto de la administración peritoneal de pCry1Ac en la expresión de CD80 y CD86 en macrófagos de peritoneo	18
Figura 5. Proporción y número de células dendríticas (CD11c ⁺ /MHC- II ⁺) en ganglio poplíteo a las 24, 48 y 72 horas después de la administración ID e IP de las proteínas Cry1Ac	28
Figura 6. Proporción y número de células dendríticas (CD11c ⁺ /MHC- II ⁺) en bazo a las 24, 48 y 72 horas después de la administración ID e IP de las proteínas Cry1Ac	30
Figura 7. Proporción y número de células dendríticas (CD11c ⁺ /MHC- II ⁺) en peritoneo a las 24, 48 y 72 horas después de la administración ID e IP de las proteínas Cry1Ac	32
Figura 8. Expresión de CD69 en linfocitos B (CD19 ⁺) en ganglio a las 24, 48 y 72 horas después de la administración ID e IP de las proteínas Cry1Ac	33
Figura 9. Expresión de CD69 en linfocitos B (CD19 ⁺) en bazo a las 24, 48 y 72 horas después de la administración ID e IP de las proteínas Cry1Ac	34
Figura 10. Expresión de CD69 en linfocitos B (CD19 ⁺) en peritoneo a las 24, 48 y 72 horas después de la administración ID e IP de las proteínas Cry1Ac	35
Figura 11. Expresión de CD25 en linfocitos B (CD19 ⁺) de ganglio poplíteo, bazo y peritoneo a las 24, 48 y 72 horas después de la administración ID e IP de las proteínas Cry1Ac	36
Figura 12. Expresión de CD69 en linfocitos T (CD3 ⁺) en ganglio a las 24, 48 y 72 horas después de la administración ID e IP de las proteínas Cry1Ac	37
Figura 13. Expresión de CD69 en linfocitos T (CD3 ⁺) en bazo y peritoneo a las 24, 48 y 72 horas después de la administración ID e IP de las proteínas Cry1Ac	38
Figura 14. Expresión de CD69 en linfocitos T CD4 ⁺ y CD8 ⁺ en ganglio poplíteo, bazo y peritoneo después de 24, 48 y 72 horas de la administración ID e IP de las proteínas Cry1Ac	39
Figura 15. Expresión de CD25 en linfocitos T (CD3 ⁺) en ganglio poplíteo, bazo y peritoneo después de 24, 48 y 72 horas de la administración ID e IP de las proteínas Cry1Ac	40
Figura 16. Proliferación de linfocitos T (CD3 ⁺) en bazo a las 48 horas después de la administración ID e IP de las proteínas Cry1Ac	41
Figura 17. Proporción y proliferación de linfocitos B (CD19 ⁺) en bazo a las 48 horas después de la administración ID e IP de las proteínas Cry1Ac	43
Figura 18. Proporción y proliferación de linfocitos B (CD19 ⁺) de bazo a las 48 horas después de la administración ID e IP de las proteínas Cry1Ac	45
Figura 19. Proliferación de linfocitos T (CD3 ⁺) en bazo de ratones no inmunizados	46
Figura 20. Citocinas en sobrenadantes de células de ganglio poplíteo y bazo de ratones inmunizados reestimuladas <i>in vitro</i> durante 72 horas	47
Figura 21. Citocinas en sobrenadantes de células de ganglio mesentérico y peritoneo de ratones inmunizados reestimuladas <i>in vitro</i> durante 72 horas	48

Índice de tablas

Tabla 1. Esquema de inmunización de ratones C57BL/6.....	23
Tabla 2. Esquema de anticuerpos utilizados para las tinciones extracelulares.....	25
Tabla 3. Esquema de anticuerpos para tinciones extracelulares en ensayo de proliferación.....	26

Resumen

La protoxina Cry1Ac de *Bacillus thuringiensis* (Bt) es un potente inmunógeno y adyuvante protector sistémico y mucosal. El mecanismo del efecto inmunopotenciador podría deberse a su capacidad de activar células presentadoras de antígeno, ya que la protoxina (p) y toxina (t) Cry1Ac son capaces de activar macrófagos. Sin embargo, es importante evaluar si tienen la capacidad de inducir *in vivo* la activación de otro tipo de células presentadoras de antígeno como células dendríticas y los linfocitos B. Por lo tanto, en este trabajo se evaluó la activación de células dendríticas, linfocitos T y linfocitos B en ratones C57BL/6 inducida por la aplicación de toxina y protoxina Cry1Ac.

Se utilizaron ratones de la cepa C57BL/6 a los cuales se les aplicó una dosis con pCry1Ac (50 µg/µL) o tCry1Ac (50 µg/µL) vía intraperitoneal y vía intradérmica. Se sacrificaron a las 24, 48 y 72 horas, y se obtuvieron células peritoneales, de bazo y de ganglio poplíteo, se tiñeron con anticuerpos y se analizaron por citometría de flujo. La proliferación se analizó con 9arboxifluoresceína (CFSE) en células de bazo. La cuantificación de citocinas se realizó en células de bazo, ganglio poplíteo, ganglio mesentérico y peritoneo de ratones inmunizados 48 horas antes, con un kit de perlas para citometría de flujo.

Se observó que tanto la toxina como la protoxina Cry1Ac provocaron el reclutamiento y activación de células dendríticas en el ganglio poplíteo y en bazo, aunque con diferencias en el curso temporal y la magnitud de los efectos. La toxina Cry1Ac aumentó la proporción de células dendríticas CD11c⁺ MHC-II⁺ de ganglio poplíteo y bazo e indujo la expresión de CD86 desde las 24 h en ganglio; mientras que la protoxina incrementó la proporción de células dendríticas en ganglio y peritoneo a las 72 y 48 h respectivamente, e indujo la expresión de CD86 a las 24 h en ganglio y bazo. Al analizar la activación de linfocitos en los mismos tejidos también se observaron diferencias en los efectos entre toxina y protoxina Cry1Ac. La protoxina y la toxina Cry1Ac aumentaron el número de linfocitos B activados CD69⁺ en bazo y ganglio desde las 24 h; mientras que la tCry1Ac también los activó a las 24 h en peritoneo y bazo. La toxina Cry1Ac incrementó el número de linfocitos T CD69⁺ en ganglio poplíteo y peritoneo a las 24 h. Sin embargo, con ninguna de las proteínas se observó la expresión de CD25 en linfocitos T y B a los tiempos analizados. La toxina indujo proliferación de linfocitos B estimulados *in vitro* tanto de ratones previamente estimulados o no. Al analizar la producción de citocinas en los cultivos de leucocitos también se encontraron diferencias en el perfil mezclado de citocinas y magnitud inducido por ambas proteínas en los distintos sitios. Se encontró que la toxina Cry1Ac indujo un patrón mezclado

de citocinas con mayor incremento de IL-10, TNF- α e IL-6 en bazo, mientras que la protoxina indujo la producción de IL-10.

Se concluye que las proteínas toxina y protoxina Cry1Ac tienen la capacidad de inducir la activación *in vivo* de células dendríticas y linfocitos B y T especialmente en ganglio poplíteo, al ser aplicadas en cojinete plantar. Existen diferencias entre la toxina y protoxina Cry1Ac en la magnitud y temporalidad los efectos de activación de células dendríticas y linfocitos inducidos. La magnitud del efecto de activación en linfocitos B inducido por la toxina Cry1Ac es significativamente mayor al de la protoxina y además induce proliferación policlonal de linfocitos B.

1. Introducción

1.1 Proteínas Cry1

Las proteínas Cry o δ -endotoxinas son producidas en las bacterias gram positivas *Bacillus thuringiensis* como un cuerpo de inclusión en la fase de esporulación. *Bacillus thuringiensis* es una bacteria gram positiva, anaerobia facultativa que puede encontrarse en suelos, bosques, plantas y agua, se caracteriza por ser capaz de producir, durante su fase de esporulación, un cuerpo de inclusión paraesporal con aspecto de cristal formado por proteínas Cry. Estas proteínas se producen como protoxinas de 130 kDa, que al ser procesadas proteolíticamente pierden aproximadamente 600 residuos de su extremo carboxilo terminal, y entre unos 20 y 50 residuos de su extremo amino terminal obteniéndose la toxina de 60 kDa con acción insecticida (Torres-Martinez & Moreno-Fierros, 2017).

Las proteínas Cry se agrupan en 50 grupos y varios subgrupos, cada grupo presenta especificidad hacia un tipo de insecto; el grupo mayoritario de toxinas Cry se conoce como la familia de los tres dominios. La nomenclatura de estas proteínas se designa con un número arábigo que corresponde hasta el 45 % de identidad entre toxinas (Cry1, Cry2, etc.). La segunda es una letra mayúscula que corresponde a identidades de 45 a 78 % entre toxinas (Cry1A, Cry1B, etc.). La siguiente es una letra minúscula que corresponde a identidades de 78 a 95 % (Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, etc.). Por último, se incluye un número arábigo al final de la nomenclatura indicando más de 95 % de identidad (Cry1Aa1, Cry1Aa2, etc.) (Soberón & Bravo, 2007).

Algunas características que poseen las proteínas Cry son: gran estabilidad a pH alcalinos, resistencia a proteólisis y no son tóxicas para vertebrados (Rubio-Infante & Moreno-Fierros, 2016). Actualmente son ampliamente utilizadas como bioinsecticidas para el control de insectos plaga de diferentes órdenes tales como Lepidóptera, Coleóptera, Himenóptera, Homóptera, Ortóptera y Mallophaga, así como nemátodos que atacan a los cultivos y también para el control de insectos vectores causantes de enfermedades como la malaria y el dengue (Torres-Martinez & Moreno-Fierros, 2017). Las formulaciones agrícolas con Bt usadas contra insectos se han aplicado en forma de pulverizados, polvos humectables, líquidos concentrados, cebos y anillos de liberación prolongada, que se aplican en áreas como las hojas y las raíces, donde se alimentan los insectos y sus larvas. Así mismo, se

han creado cultivos transgénicos que expresan a la toxina Cry activa en diferentes tejidos de la planta (Torres-Martinez & Moreno-Fierros, 2017).

1.2 Estructura

La protoxina posee 7 dominios, de los cuales del I al III corresponden a la toxina. El dominio I está constituido por siete hélices α antiparalelas y anfipáticas, y es el encargado de formar el poro iónico (Pigott, King, & Ellar, 2008). El dominio II es el menos conservado entre las toxinas Cry, es el encargado de la unión al receptor y está formado por tres láminas plegadas β y por tres asas (Soberón & Bravo; 2007). Estas últimas interactúan con el receptor de caderina (CADR), localizado en las microvellosidades de las células epiteliales del intestino medio, produciendo un corte en el extremo amino terminal, en donde se pierde la hélice α -1 (Rubio-Infante & Moreno-Fierros, 2016), permitiendo la formación de un pre-poro formado por 4 monómeros. Posteriormente es necesaria la interacción con la N- aminopeptidasa (APN) para la inserción del pre-poro en la membrana provocando la muerte del insecto. El dominio III está formado por dos láminas β plegadas antiparalelas y también está involucrado en la interacción con receptores (Soberón & Bravo, 2007), además de que confiere estabilidad a la toxina (Guerrero, Russell, & Moreno-Fierros, 2007).

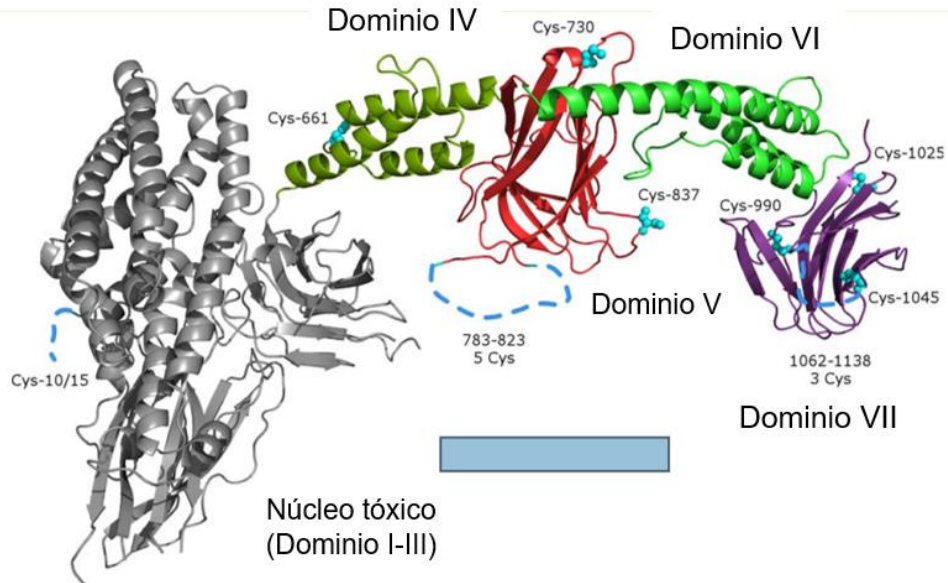


Figura 1. Estructura de la proteína Cry1Ac (Evdokimov *et al.*, 2014)

1.3 Mecanismo de acción en insectos

El mecanismo de acción en el insecto comienza con la ingesta del cristal de la protoxina, el cual es solubilizado en el intestino medio de las larvas debido al pH altamente alcalino y

procesada proteolíticamente a toxina mediante un corte en su extremo amino terminal de 25 a 30 aminoácidos y de 500 a 600 aminoácidos del extremo carboxilo terminal. Ésta interacciona con proteínas de superficie de las microvellosidades de las células epiteliales del intestino medio. En insectos lepidópteros se han descrito cuatro receptores para las toxinas Cry1A: receptor de caderina (CADR), N-aminopeptidasa (APN), fosfatasa alcalina (ALP) y proteína p252 (Rubio-Infante & Moreno-Fierros, 2016). La primera interacción se da con el receptor de caderina, en la cual se produce un corte adicional en el extremo amino terminal, en el que se pierde la hélice α -1 permitiendo la formación de un oligómero, formado de 4 monómeros, conocido como pre poro (Rubio-Infante & Moreno-Fierros, 2016). Posteriormente el oligómero interacciona con las proteínas ancladas por GPI (ALP o APN), las cuáles se distribuyen en regiones de la membrana denominadas balsas lipídicas, para insertarse en la membrana, formar el poro y provocar la muerte del insecto mediante un choque osmótico (Soberón & Bravo, 2007). En el caso de la pCry1Ac la unión a la ALP se da a través de los residuos de N-acetilgalactosamina (Jurat-Fuentes & Adang, 2004). Adicionalmente, Zhang, *et al* (2006) proponen que la unión de la toxina al receptor de caderina induce apoptosis mediante una vía de señalización que involucra proteínas G y la activación de la PKA (cinasa A), que podría ser complementaria a la muerte por choque osmótico.

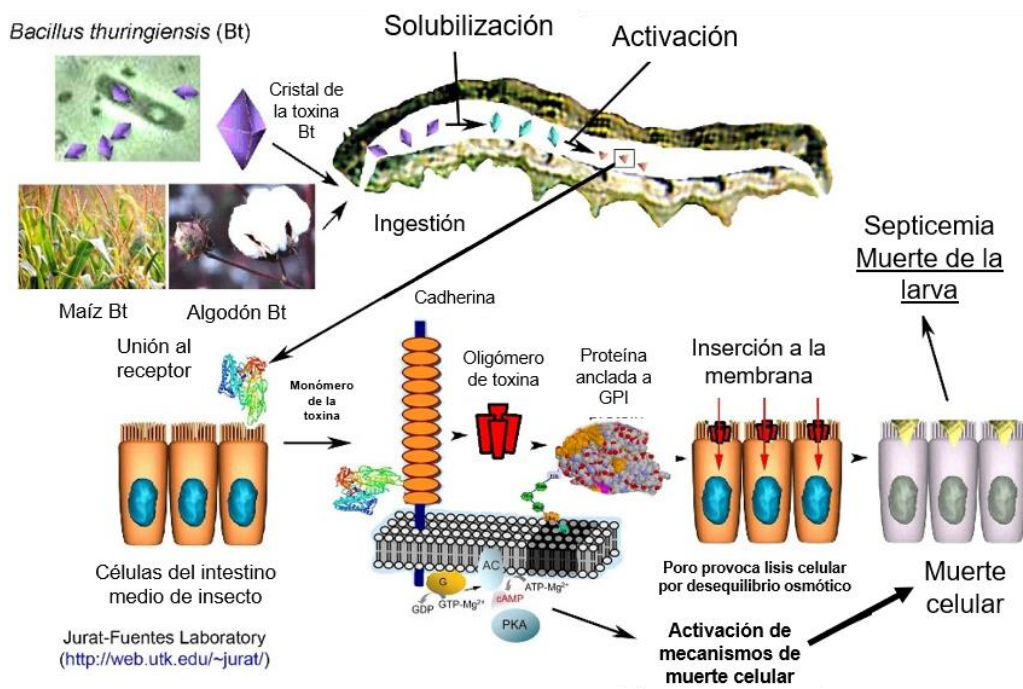


Figura 2. Mecanismo de acción en insectos de las proteínas Cry (Jurat-Fuentes, s/f)

2. Antecedentes

2.1 Propiedades inmunogénicas de las proteínas Cry1Ac

La protoxina Cry1Ac ha demostrado ser un potente inmunógeno sistémico y de mucosas, con efectos adyuvantes tan potentes como la toxina del cólera (TC). Los primeros estudios evaluaron los efectos de la protoxina Cry1Ac recombinante soluble y cristalizada, y se encontró que ambas formas son capaces de inducir una respuesta sistémica de anticuerpos IgG e IgM al administrarse vía intraperitoneal (IP) e intragástrica en ratones Balb/c. Mientras que la forma soluble indujo una respuesta mucosal más eficiente al administrarse por vía intragástrica. En este mismo estudio también se administraron ambas formas de la pCry1Ac solas o junto con la TC y se analizaron los títulos de anticuerpos en suero y heces; se encontró que al administrar pCry1Ac con TC aumentaron los anticuerpos anti-TC en heces, sugiriendo que las proteínas Cry podían tener un efecto adyuvante al administrarse con otros antígenos (Torres-Martinez & Moreno-Fierros, 2017; Vazquez-Padron, *et al.*, 1999).

2.2 Efecto adyuvante y efecto protector de las proteínas Cry1Ac

El efecto adyuvante de la pCry1Ac se ha evaluado con respecto a respuestas de anticuerpos específicos alcanzadas a nivel sistémico y mucoso al coadministrarse junto con otros antígenos como, péptidos de HIV, polisacáridos neumocócicos y el antígeno de superficie de hepatitis B (Torres-Martinez & Moreno-Fierros, 2017). Con este último se observó que al coadministrarlo con pCry1Ac, por las vías oral e intraperitoneal, se indujo una respuesta de anticuerpos intestinales y sistémicos en ratones BALB/c (Vazquez-Padron *et al.*, 1999).

Por otro lado, la pCry1Ac confiere protección en modelos murinos experimentales a infección parasitaria como meningoencefalitis por *N. fowleri*, al ser administrada sola o como adyuvante se obtuvo un 100 % de protección al administrarse por vía intranasal y del 80 % vía intraperitoneal, se observó que administrar pCry y TC solas inducía protección similar que al administrar lisados solos y se obtuvieron títulos de anticuerpos en mucosa y suero al administrar lisados de *N. fowleri* solos o con pCry1Ac (Rojas-Hernandez, *et al.*, 2004). En un modelo de malaria por *P. chabaudi*; se generó una menor parasitemia y la supervivencia en el 100 % de los ratones, mientras que para la infección con *P. berguei* (letal), la supervivencia de los ratones se incrementó en 12 días y en los grupos tratados con Cry1Ac hubo un incremento en la producción del mRNA de IFN- γ (Legorreta-Herrera,

Meza, & Moreno-Fierros, 2010); de igual forma, la protoxina Cry1Ac confirió protección contra un modelo de cisticercosis por *Taenia crassiceps* al ser administrada junto con un extracto del parásito (Ibarra-Moreno, Garcia-Hernandez, & Moreno-Fierros, 2014).

Por otra parte, en modelos de infección bacteriana, al administrar la vacuna RB51 junto con la protoxina Cry1Ac se observaron mayores títulos de anticuerpos tipo Th1 en suero, mayores respuestas proliferativas de linfocitos B y niveles de IFN- γ y TNF- α , confiriendo una protección efectiva frente a la infección contra *Brucella abortus* (Gonzalez-Gonzalez, *et al.*, 2015).

Se ha demostrado que gran parte de la inmunogenicidad de la protoxina reside en el extremo N-terminal, correspondiente a la estructura de la toxina Cry1Ac. En un estudio en el que se evaluaron diferentes familias de toxinas Cry se encontró que Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Ac eran capaces de inducir respuestas específicas de anticuerpos IgG e IgA en suero y mucosas después de administrarse vía intraperitoneal o intranasal, demostrando la inmunogenicidad de las tCry1A tanto a nivel sistémico como mucosal (Torres-Martinez & Moreno-Fierros, 2017).

2.3 Mecanismo adyuvante

Como parte del mecanismo adyuvante de la protoxina Cry1Ac se sabe que es capaz de inducir *in vivo* la sobreexpresión de moléculas coestimuladoras CD80 y CD86 en macrófagos de peritoneo, bazo, ganglio mesentérico y pulmón; y se propuso que estaba mediado por las vías de señalización de MAPK: MEK y p38 (Moreno-Fierros *et al.*, 2013).

Al ser administrada vía intraperitoneal, pCry1Ac induce un incremento en la expresión de CD80 y CD86 en macrófagos de peritoneo, bazo y ganglio mesentérico similar a lo observado con LPS, con ligeras diferencias en la cinética de activación dependiendo el antígeno y el tejido (Moreno-Fierros *et al.*, 2013). En este mismo estudio pCry1Ac también se administró por vía intranasal y sus efectos fueron analizados en pulmón y en el BAL. En este último se observó un aumento en CD86 más tardío que con LPS, pero sostenido por más tiempo.

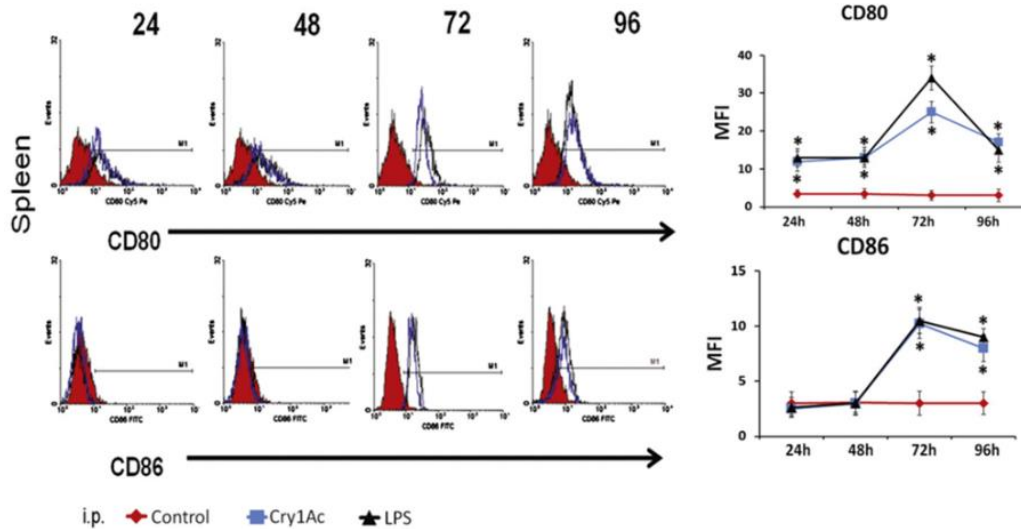


Figura 3. Efecto de la administración peritoneal de pCry1Ac en la expresión de CD80 y CD86 en macrófagos de bazo (Moreno-Fierros *et al.*, 2013).

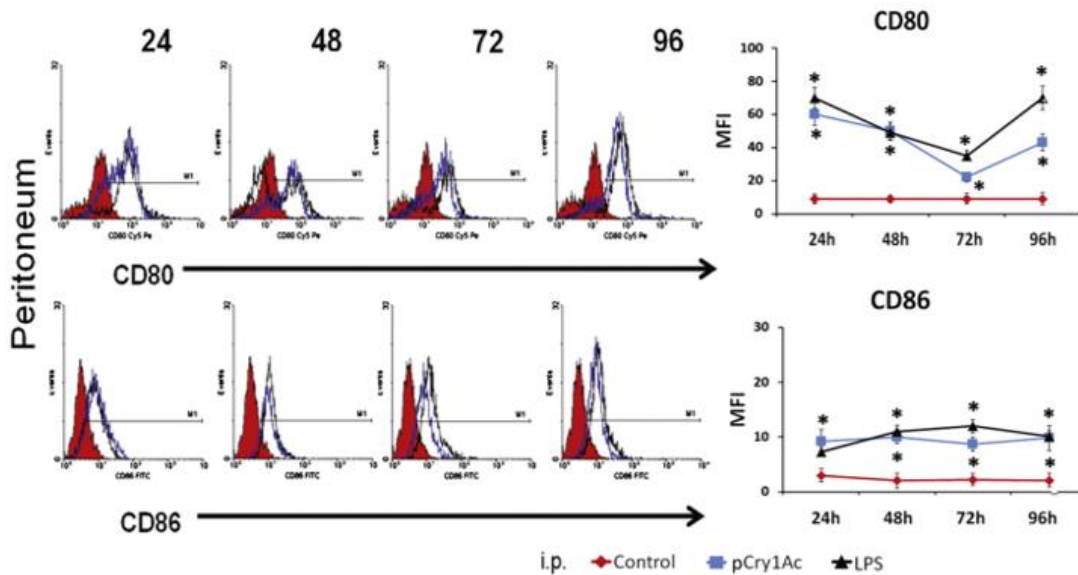


Figura 4. Efecto de la administración peritoneal de pCry1Ac en la expresión de CD80 y CD86 en macrófagos de peritoneo (Moreno-Fierros *et al.*, 2013)

Así mismo la protoxina Cry1Ac es capaz de inducir la producción de citocinas proinflamatorias como TNF- α , IL-6 y MCP-1 y de la citocina reguladora IL-10; al estimular *in vitro* macrófagos de bazo, peritoneo, ganglio mesentérico, pulmón y BAL (lavado broncoalveolar) de ratones sin estímulo previo (Moreno-Fierros *et al.*, 2013).

Por último, en este mismo trabajo se estudiaron los efectos *in vitro* de la protoxina estimulando con pCry1Ac macrófagos de la línea RAW 264.7, observándose la sobreexpresión de MHC-II y CD40, así como producción de citocinas IL-6, TNF- α y MCP- 1,

en niveles similares al LPS; y se propuso que era mediado por la vía de MAPK p38 (Moreno-Fierros *et al.*, 2013).

En otros tipos celulares, se ha observado en estudios *in vitro* que tanto la protoxina como la toxina Cry1Ac, tienen la capacidad de incrementar la expresión de CD69 en linfocitos CD4 y CD8 de poblaciones totales y aisladas de linfocitos T, aumentando la expresión de CD69 de manera gradual respecto al tiempo, siendo con la toxina Cry1Ac con la que se presentaron mayores porcentajes de activación (Ortega, 2014). Sin embargo, la expresión de CD69 fue mayor en linfocitos totales, lo que sugirió la participación de células presentadoras de antígeno en la activación de linfocitos T.

Así mismo, en la tesis de Camargo en 2013 se observó que ambas proteínas Cry1Ac fueron capaces de inducir *in vitro* la expresión moderada de CD69, en linfocitos B sin aislar y purificados, observando también un mayor porcentaje de expresión con tCry1Ac.

Por otro lado, estudios más recientes con la toxina Cry1Ac demostraron su capacidad para activar macrófagos de bazo y de la línea celular RAW264.7, induciendo la expresión de las moléculas coestimuladoras CD80 y CD86 e ICOS-L y la producción de las citocinas proinflamatorias IL-6, TNF- α y la quimiocina MCP-1, mediante la activación de las MAPKs ERK1/2, p38 y JNK (Torres-Martinez *et al.*, 2016).

Planteamiento del problema

La protoxina Cry1Ac ha demostrado ser un potente inmunógeno sistémico y de mucosas, confiriendo protección en modelos murinos de infección; y como parte de su mecanismo adyuvante se sabe que es capaz de inducir la secreción de citocinas proinflamatorias y la sobreexpresión de moléculas coestimuladoras (CD80 y CD86) en macrófagos, por otro lado, la toxina Cry1Ac también ha demostrado tener algunos de estos efectos. Sin embargo, no se ha evaluado si las proteínas Cry1Ac (protoxina y toxina) tienen la capacidad de inducir *in vivo* la activación de otras células presentadoras de antígeno como las células dendríticas y linfocitos B, después de una sola aplicación de las proteínas.

Objetivo

Evaluar el efecto de la administración intraperitoneal y en el cojinete plantar en la activación de células dendríticas, linfocitos B y T de bazo, ganglio popliteo y peritoneo de la protoxina y toxina Cry1Ac, a diferentes tiempos en ratones C57BL/6.

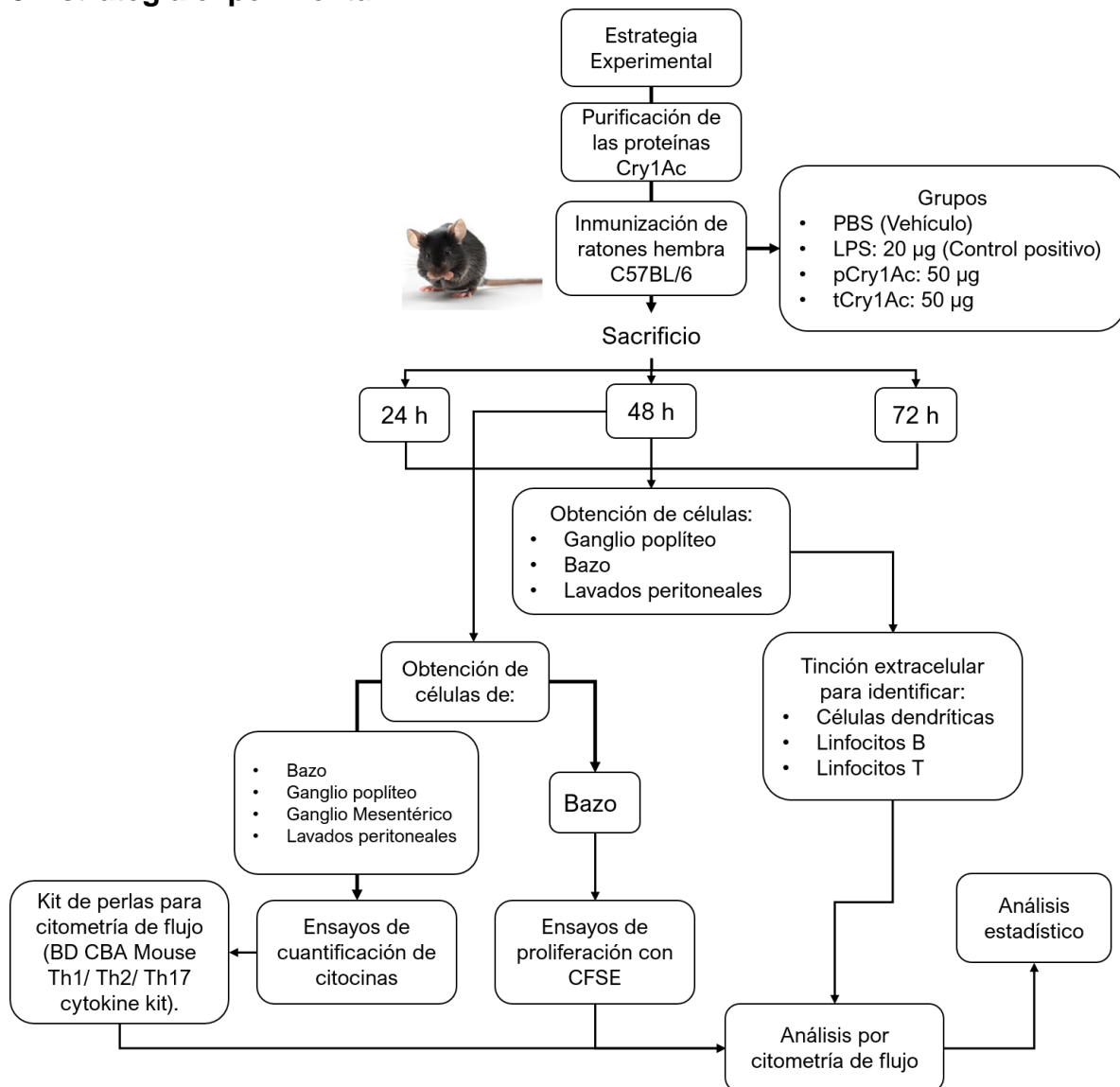
Objetivos particulares

- Determinar si se modifica la proporción de células dendríticas y linfocitos de bazo, ganglio popliteo y peritoneo a las 24, 48 y 72 horas.
- Evaluar si se induce activación de las células dendríticas mediante la sobreexpresión de moléculas coestimuladoras (CD80/CD86).
- Determinar si se induce la activación de linfocitos B y T mediante la expresión de los marcadores CD69 y CD25.
- Evaluar si se induce la proliferación de linfocitos T y B.

Hipótesis

La protoxina y toxina Cry1Ac serán capaces de inducir *in vivo* la activación de células presentadoras de antígeno como células dendríticas y linfocitos B.

3. Estrategia experimental



4. Metodología experimental

4.1 Obtención y purificación de la protoxina Cry1Ac

La proteína Cry1Ac se purificó a partir de una cepa *E. coli* recombinante. Se sembraron placas de agar por estriación con una alícuota de *E. coli* Cry y se incubaron por 24 horas a 37 °C. Pasado este tiempo se tomó una colonia, se transfirió a 100 mL de medio LB con 100 mg de ampicilina y se incubó en agitación por 24 horas a 37 °C. Finalmente se cultivaron los 100 mL en 1500 mL de medio LB con ampicilina durante 48 horas a 37 °C con agitación constante.

Transcurrido este tiempo se cosecharon las bacterias, centrifugando a 12 857 g 15 minutos a 4 °C. Las pastillas se resuspendieron en 50 mL de Tris-EDTA y se sonicaron a 40 % de amplitud (QEX 750, 750 WATTS, F: 20 kHz) por 3 ciclos continuos de 5 minutos. Se centrifugó la pastilla a 12 857 g 10 minutos a 4 °C. Se resuspendió en 50 mL de Tris-EDTA con sacarosa (15 %) y lisozima (2 mg/mL) y se incubó durante 1 hora a 37 °C con agitación. Pasado este tiempo se sonicaron las bacterias por ciclos continuos de 5 minutos a 40 % de amplitud hasta que la mayoría de las bacterias estuvieron rotas, verificando al microscopio.

Las bacterias se centrifugaron nuevamente a 12 857 g 10 minutos a 4 °C. Posteriormente se resuspendió la pastilla en 50 mL de NaCl 0.5 M con Tritón X 100 1 %, se sonicó con pulsos hasta disolverla a 40 % de amplitud y finalmente se centrifugó a 12 857 g 10 minutos a 4 °C; este paso se repitió 5 veces. Se resuspendió la pastilla en 50 mL de NaCl 0.5 M, se sonicó con pulsos hasta disolverse a 40 % de amplitud y se centrifugó a 12 857 g 10 minutos a 4 °C, este paso se repitió 4 veces. La pastilla se resuspendió en 30 mL de agua fría y se centrifugó a 12 857 g 10 minutos a 4 °C, dos veces. Se solubilizó la pastilla en 10 mL de amortiguador de carbonatos 0.1 M pH 9.6 con 10 mM de DTT por 30 minutos a 37 °C en agitación. Pasado este tiempo se centrifugó a 12 857 rpm 10 minutos a 4 °C y se recuperó el sobrenadante en el cual se encontraba la protoxina Cry1Ac.

Posteriormente se pasó la protoxina Cry1Ac a través de una columna de polimixina, se filtró con perinola con filtros de 0.22 µm, se alicuotó y se almacenó a 4 °C. Por último, se cuantificó la concentración de proteína por el método de Bradford y se corrió en una electroforesis en gel de poliacrilamida para verificar la pureza.

4.2 Obtención de la toxina Cry1Ac

La protoxina Cry1Ac soluble en amortiguador de carbonatos se digirió a toxina agregando 1 mg de tripsina por cada 20 mg de proteína. Se incubó durante dos horas y media a 37 °C con agitación. Posteriormente se colocó a 4 °C para detener la acción de la tripsina y se corrió una electroforesis en gel de poliacrilamida para comprobar la digestión (la toxina tiene un peso de 65 kDa). Al completarse la digestión se agregó el inhibidor enzimático PMSF (fluoruro de fenilmetilsulfonio) al 0.5 mM. Por último, se pasó la toxina Cry1Ac a través de la columna de polimixina, se cuantificó la concentración por el método de Bradford y se alicuotó. Se almacenó a 4 °C.

4.3 Inmunización de ratones C57BL/6 con las proteínas Cry1Ac

Se inmunizaron ratones hembra de la cepa C57BL/6 de 5-7 semanas de edad por vía intraperitoneal y subcutánea, simultáneamente, de acuerdo con la tabla 1. Los experimentos se realizaron con 3-4 ratones por grupo experimental. Para la inmunización intraperitoneal se administró a los ratones con pCry, tCry, LPS o amortiguador de fosfatos (PBS), en un volumen total de 100 μ L en el peritoneo. Mientras que para la inmunización intradérmica se administró pCry, tCry, LPS o PBS en un volumen total de 50 μ L en el cojinete plantar de la pata derecha trasera del ratón. Para la preparación de las dosis se diluyó la protoxina, la toxina y el LPS en PBS. Los ratones fueron proporcionados por el bioterio de la FES Iztacala, UNAM con alimento y agua estéril.

Tabla 1. Esquema de inmunización de ratones C57BL/6

GRUPO	No. RATONES	DOSIS	VOLUMEN (μ L)	
			IP	ID
PBS (vehículo)	3	-	100	50
LPS	3	20 μ g		
pCry1Ac	3	50 μ g		
tCry1Ac	3	50 μ g		

*IP: Intraperitoneal, ID: Intradérmica

4.4 Obtención de células de bazo, ganglio poplíteo y peritoneo de ratones C57BL/6

Se sacrificó a los ratones después de 24, 48 y 72 horas de la inmunización. Se impregnaron en alcohol. En la cavidad peritoneal se inyectaron 5 mL de PBS frío y estéril. Se frotó el abdomen del ratón para despegar las células de la cavidad, se colocó al ratón en posición vertical y se realizó un corte debajo del esternón, cuidando de no cortar ningún órgano. Sin soltar la piel y el músculo se introdujo una pipeta Pasteur y se recolectó el lavado.

Después se despejó la cavidad torácica para exponer el corazón y se realizó punción cardíaca para la obtención de sangre. Posteriormente se despejó la cavidad abdominal y se extrajo el bazo. Se colocó en una caja Petri con medio RPMI y 100 μ L de suero fetal bovino (SFB) y se mantuvo en hielo hasta su procesamiento. Se obtuvo el ganglio poplíteo retirando la piel de la pierna inmunizada para despejar el músculo de la pata, posteriormente se realizó un corte en el músculo para abrirlo ligeramente y se extrajo parte de la grasa que se expone, en dónde está incluido el ganglio; de la misma forma que el bazo se colocó en una caja Petri con medio y SFB, y se mantuvo en hielo.

Los lavados peritoneales se centrifugaron a 1500 rpm por 10 minutos a 4 °C, se realizó un lavado con medio, se filtraron, se centrifugaron y por último se llevaron a 1 mL para tinción, se agregó amortiguador de lisis cuando la muestra se obtenía con sangre. Se disgregaron los ganglios y bazos, se transfirieron los macerados a tubos de 15 mL y se centrifugaron a 453 g 10 minutos a 4 °C. Se decantó el sobrenadante, para el caso del bazo se agregaron a la pastilla 3 mL de amortiguador de lisis y se incubó a temperatura ambiente durante 7 minutos. Pasado este tiempo se agregó PBS frío hasta completar 12 mL, se resuspendió y se centrifugó la muestra a 453 g 10 minutos.

Se decantó el sobrenadante, la pastilla se resuspendió en 3 mL de medio RPMI, se agregó 100 µL de SFB y se filtró. Se recuperó el filtrado en un tubo nuevo, se centrifugó a 453 g por 10 minutos. Al ganglio se le agregaron 2 mL de medio y 100 µL de SFB, se resuspendió y se filtró, por último, se centrifugó el filtrado a 453 g por 10 minutos y se resuspendió la pastilla en 1 mL.

4.5 Tinción extracelular de células de bazo, ganglio poplíteo y peritoneo de ratones C57BL/6

Se decantaron los sobrenadantes de las células filtradas y centrifugadas, y se resuspendieron los paquetes celulares en medio RPMI, los bazos en 3 mL y los ganglios y lavados peritoneales en 1 mL. Se transfirieron todas las células de ganglio y peritoneo a un microtubo eppendorf de 1.5 mL, mientras que de las de bazo se tomaron 500 µL (para teñir aproximadamente 10 000 células). Se centrifugaron los tubos a 453 g por 5 minutos, se decantaron los sobrenadantes y se agregó a las pastillas 15 µL de una dilución $\frac{1}{100}$ de anticuerpo anti-CD16/32 (93, BioLegend; San Diego, CA, USA) para bloquear receptores Fc gamma II/III. Se incubaron las muestras durante 15 minutos en hielo y posteriormente se agregó 1 mL de PBA, se resuspendieron, se dividieron en los tubos de las tinciones correspondientes y se centrifugaron a 453 g 5 minutos. Se retiraron los sobrenadantes y se agregó a cada tubo 25 µL de una dilución $\frac{1}{100}$ de los anticuerpos para las tinciones correspondientes (Tabla 2.) y se incubaron durante 30 minutos en hielo. Pasado este tiempo se agregó 1 mL de PBA a cada tubo y se centrifugaron a 453 g 5 minutos, se retiraron los sobrenadantes y se agregaron 150 µL de paraformaldehído al 1 %. Por último, se resuspendieron las pastillas en el paraformaldehído y se transfirieron a tubos de citometría. Las muestras se leyeron en un citómetro de flujo.

Tabla 2. Esquema de anticuerpos utilizados para las tinciones extracelulares.

TINCIÓN	ANTICUERPO	FLUOROCROMO	MARCA	CLONA	No. CATÁLOGO	PAÍS
1	CD11c	FITC	BioLegend	N418	117306	San Diego, CA, USA
	CD86	PE	eBioscience	gL1	12-0862-83	
	CD80	PECy5	BioLegend	1610A1	104712	
	MHC-II	Cy5	BioLegend	M5/1114.15.2	107614	
2	CD25	FITC	BioLegend	3C7	101908	
	CD3	PE	eBioscience	145-2C11	12-0031-83	
	CD69	PECy5	eBioscience	H1.2F3	15-0691-82	
	CD19	APC	BioLegend	6D5	115512	
3	CD4	FITC	BioLegend	GK1.5	100406	
	CD3	PE	eBioscience	145-2C11	12-0031-83	
	CD69	PECy5	eBioscience	H1.2F3	15-0691-82	
	CD8	Cy5	BioLegend	53-6.7	100712	

4.6 Ensayo de proliferación de linfocitos T y B con carboxifluoresceína (CFSE)

Se realizó el conteo de células de los bazos macerados, lisados y filtrados, haciendo una dilución $\frac{1}{10}$ de las células agregando azul tripano y PBS. Se calculó el volumen necesario para tomar 40 millones de células que fueron teñidas con CFSE. Se adicionó este volumen a un tubo de 15 mL.

Se tomaron 30 μ L de CFSE 5 mM y se llevaron a 1.5 mL con PBS, de esta dilución se tomaron 110 μ L y se colocó el tubo con las células en posición horizontal, se agregó la gota en la pared del tubo sin tocar las células. Se cerró el tubo y se volteó el tubo para mezclar las células con la CFSE e inmediatamente se agitó con vortex por 5 segundos. Se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. Pasado el tiempo de incubación, se realizaron 3 lavados con PBS frío al 5 % de suero bovino llevando a 12 mL y centrifugando a 453 g durante 10 minutos. Después del último lavado la pastilla se resuspendió en 3 mL de medio, y se calculó que volumen se debe de tomar para sembrar 4 millones de células por pozo. Se sembraron las células en placas de 12 pozos al 10 % de SFB. Se incubaron a 37 °C, 5 % de CO₂ durante 72 horas con el estímulo correspondiente en concentración de 1 μ g/ μ L.

Pasado este tiempo se cosecharon las células con raspador (cell scraper), se recuperaron en microtubos eppendorf y se centrifugaron a 453 g 5 minutos. Se retiró el sobrenadante y se tiñieron las células como se mencionó en el apartado anterior con los siguientes anticuerpos:

Tabla 3. Esquema de anticuerpos para tinciones extracelulares en ensayo de proliferación

TINCIÓN 1				
ANTICUERPO	FLUOROCROMO	MARCA	CLONA	NO. CATÁLOGO
CD3	PE	eBioscience	145-2C11	12-0031-83
CD4	PECy5	BioLegend	GK1.5	100410
CD8	APC	BioLegend	53-6.7	100712
TINCIÓN 2				
ANTICUERPO	FLUOROCROMO	MARCA	CLONA	NO. CATÁLOGO
CD19	APC	BioLegend	6D5	115512

4.7 Ensayo de citocinas

Se inmunizaron 3 ratones por cada grupo experimental por vía intraperitoneal e intradérmica y se sacrificaron después de 48 horas, se obtuvieron células de bazo, ganglio poplíteo, peritoneo y ganglio mesentérico. Los tejidos fueron procesados como se mencionó en el apartado de obtención de células. Se realizó el conteo, se sembraron 4 millones de células de bazo, peritoneo y ganglio mesentérico en placas de 12 pozos y 1 millón de células de ganglio poplíteo en placas de 24 pozos. Se colocó el estímulo (10 µg/mL) de protoxina o toxina Cry1Ac y se incubaron durante 72 horas a 37 °C 5 % CO₂. Pasado el tiempo de incubación se recolectaron los sobrenadantes, se centrifugaron a 2465 g 5 minutos y se alicuotaron. Con los sobrenadantes se realizó un ensayo de cuantificación de citocinas con un kit de perlas para citometría de flujo (BD CBA Mouse Th1/ Th2/ Th17 cytokine kit).

4.8 Análisis estadístico

El análisis estadístico y las gráficas se realizaron en el programa *GraphPad Prism 5*. Los resultados se expresaron como media ± error estándar.

Los ensayos de citometría (Fig. 5 a 15) se analizaron mediante análisis de varianza (ANOVA) de dos vías con pruebas posteriores de Bonferroni.

Los ensayos de proliferación y de producción de citocinas (Fig. 16 a 21) se analizaron mediante ANOVA de una vía con pruebas posteriores de Bonferroni (comparación de todos los grupos) y de Dunnet (comparar los grupos contra el control negativo) respectivamente. Un valor de P<0.05 se consideró estadísticamente significativo.

5. Resultados

5.1 Las proteínas Cry1Ac incrementaron el número de células dendríticas en ganglio poplíteo e indujeron sobreexpresión de CD86

Para determinar si la aplicación de toxina y protoxina Cry1Ac podían activar células dendríticas se usó el esquema de administración intradérmica que permite evaluar a las células dendríticas en el ganglio cercano. Después de la administración intradérmica en el cojinete plantar con pCry1Ac, tCry1Ac, LPS o el vehículo (PBS) se analizó por citometría, la población de células dendríticas en base a la expresión de CD11c y MHC-II en el ganglio cercano (poplíteo). En el cual se distinguieron dos poblaciones: células dendríticas (CD11c⁺ MHC-II⁺) y células CD11c⁻ MHC-II⁺ las cuáles podrían ser linfocitos B.

Se observó que tanto la pCry1Ac como la tCry1Ac incrementaron el porcentaje de células dendríticas (CD11c⁺ MHC-II⁺) desde las 24 horas, sin embargo, el incremento no fue significativo hasta las 48 horas con toxina y a las 72 horas con protoxina. A las 72 horas se observó que el porcentaje disminuyó después de administrar toxina Cry1Ac. El LPS usado como control positivo indujo un incremento en el porcentaje de células similar al inducido con las proteínas Cry1Ac (Fig. 5A-C). En los paneles A y B de la fig. 5 se muestran los porcentajes y en el C el número de células (CD11c⁺ MHC-II⁺) registradas en ganglio poplíteo.

Por otro lado, también se incrementó la proporción de las células CD11c⁻ MHC-II⁺ (posiblemente linfocitos B) en los grupos con tratamientos con Cry1Ac y LPS, desde las 24 horas manteniéndose aumentada hasta las 72 horas (Fig. 5A).

La activación de las células dendríticas (CD11c⁺ MHC-II⁺) se determinó mediante el análisis de la sobreexpresión de moléculas coestimuladoras (CD80 y CD86), en el panel D de la figura 5 se muestran la intensidad media de fluorescencia de ambas moléculas de la población de células dendríticas (CD11c⁺ MHC-II⁺). Se observó que para CD80 a las 24 horas tanto la protoxina como la toxina incrementaron la expresión del marcador. Sin embargo, el incremento en CD80 sólo fue significativo con toxina Cry1Ac a las 24 horas (Fig. 5D).

La protoxina y toxina Cry1Ac indujeron un incremento en el número de células dendríticas y en la expresión de CD86. A las 24 horas el incremento en la expresión fue significativo

con toxina y protoxina, con esta última muy similar al inducido por el control LPS. Con toxina se mantuvo incrementado hasta las 72 horas (Fig. 5D).

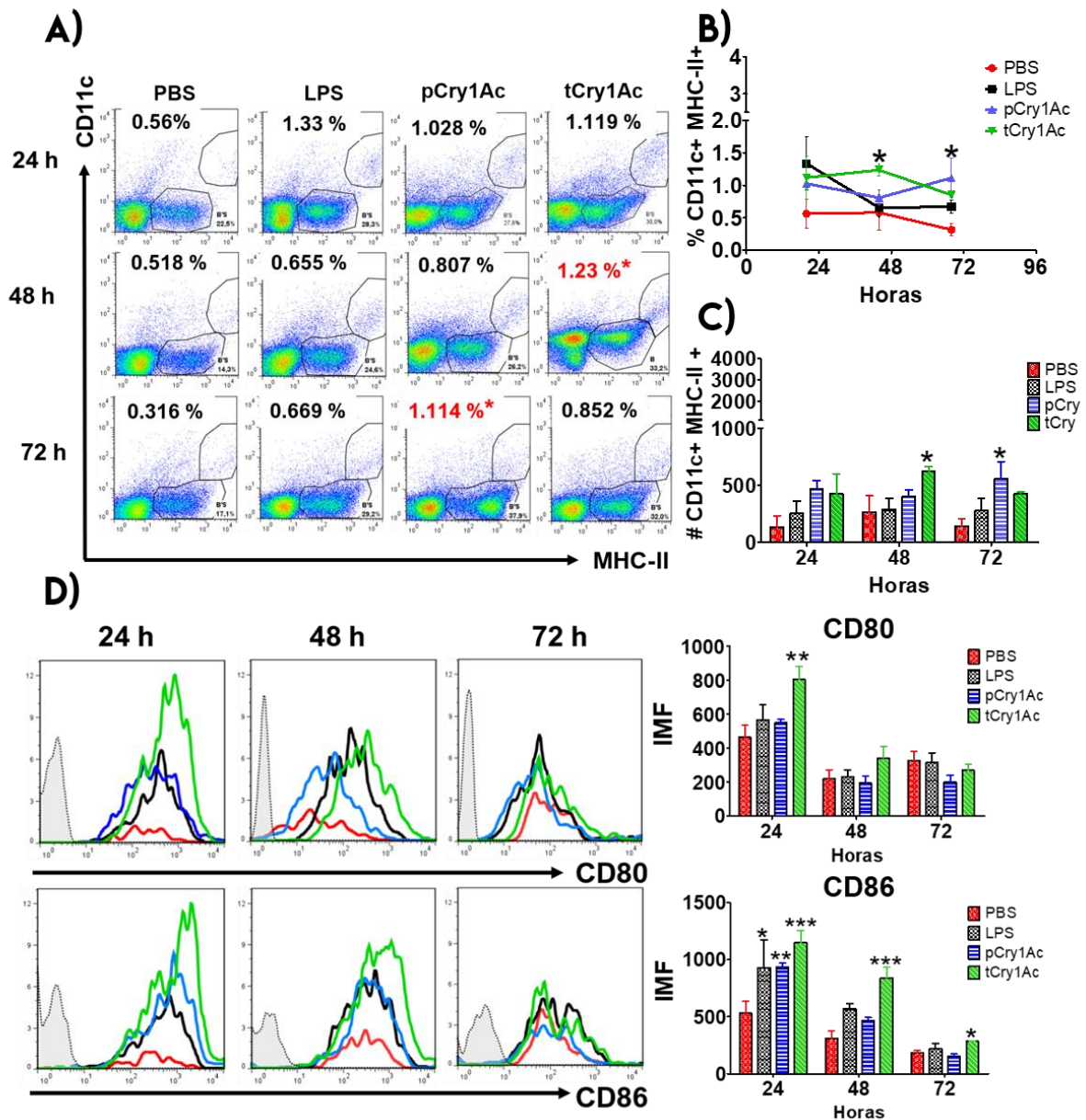


Figura 5. Proporción y número de células dendríticas (CD11c⁺ MHC-II⁺) en ganglio poplíteo a las 24, 48 y 72 horas después de la administración ID e IP de las proteínas Cry1Ac. A) Dot plots representativos en los que se indican los porcentajes de células dendríticas (CD11c⁺ MHC-II⁺) y células CD11c⁺ MHC-II⁺. B) Gráfica que indica la media de los porcentajes y EE de células (CD11c⁺ MHC-II⁺). C) Número de células dendríticas (CD11c⁺ MHC-II⁺) en ganglio poplíteo. D) Sobreexpresión de moléculas coestimuladoras (CD80 y CD86) en células dendríticas de ganglio poplíteo a las 24, 48 y 72 horas. A la izquierda se muestran histogramas representativos y las gráficas muestran los valores de intensidad media de fluorescencia indicando los valores medios y EE de tres experimentos independientes (n=3). Diferencia significativa vs PBS * (P< 0.05), ** (P< 0.01) y *** (P< 0.001).

Los ratones también se administraron vía intraperitoneal permitiendo analizar una respuesta sistémica y local, en bazo y lavados peritoneales, respectivamente. En bazo se observó que la toxina incrementa significativamente el porcentaje de células dendríticas a las 48 horas. Con la protoxina y LPS se observaron porcentajes similares al vehículo durante los tres tiempos evaluados (Fig. 6A-C).

Por otro lado, la proporción de las células CD11c⁻ MHC-II⁺ se mantuvo muy similar al vehículo en todos los grupos con tratamientos.

En cuanto a la activación, con los tratamientos se observaron valores de expresión de CD80 muy similares al grupo vehículo en todos los tiempos. Mientras que de CD86 se observó sobreexpresión significativa con ambas proteínas a las 24 horas (Fig. 6D).

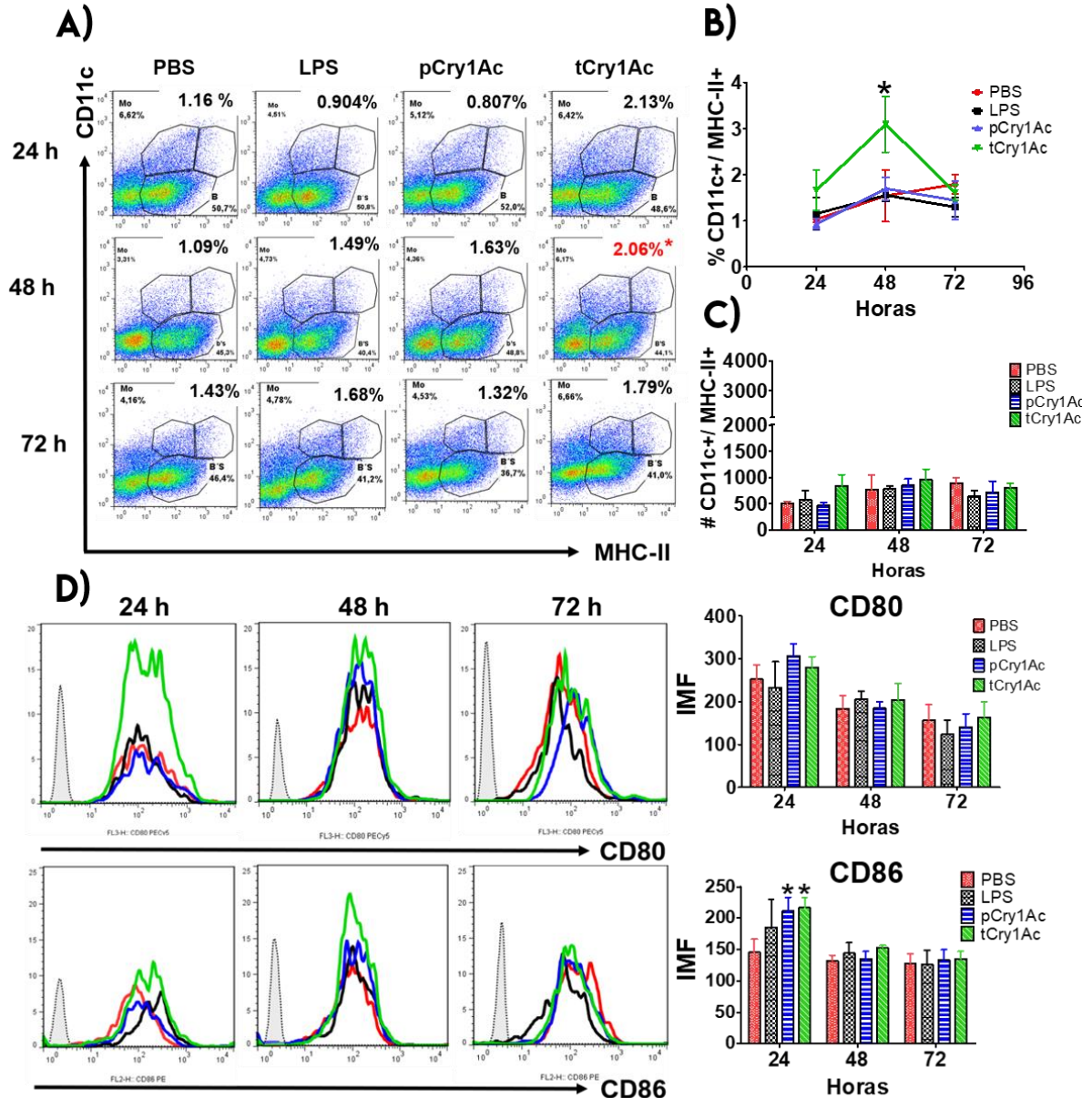


Figura 6. Proporción y número de células dendríticas (CD11c⁺ MHC-II⁺) en bazo a las 24, 48 y 72 horas después de la administración ID e IP de las proteínas Cry1Ac. A) *Dot plots* representativos en los que se indican los porcentajes de células dendríticas (CD11c⁺ MHC-II⁺) y células (CD11c⁻ MHC-II⁺). B) Gráfica que indica la media de los porcentajes y EE de células CD11c⁺ MHC-II⁺. C) Número de células dendríticas (CD11c⁺ MHC-II⁺) en bazo. D) Sobreexpresión de moléculas coestimuladoras (CD80 y CD86) en células dendríticas de bazo a las 24, 48 y 72 horas. A la izquierda se muestran histogramas representativos y las gráficas muestran los valores de intensidad media de fluorescencia indicando los valores medios y EE de tres experimentos independientes (n=3). Diferencia significativa vs PBS *(P< 0.05).

En lavados peritoneales no se observaron incrementos estadísticamente significativos ($p > 0.05$) en el porcentaje de células dendríticas con la toxina Cry1Ac. Por otro lado, la protoxina incrementó significativamente el porcentaje de células dendríticas hasta las 48 horas y regresó a valores similares al vehículo a las 72 horas (Fig. 7A-C). En peritoneo se observó también una población CD11c⁺MHC-II⁻ y una CD11c⁻MHC-II⁺, la primera tuvo un incremento con toxina a las 72 horas, mientras que la segunda se mantuvo similar al vehículo con los tratamientos.

Al analizar la expresión de CD80 y CD86 se observaron valores basales, en el grupo PBS, muy elevados por lo tanto no se observaron los incrementos estadísticamente significativos ($p > 0.05$) con ninguna de las proteínas Cry1Ac.

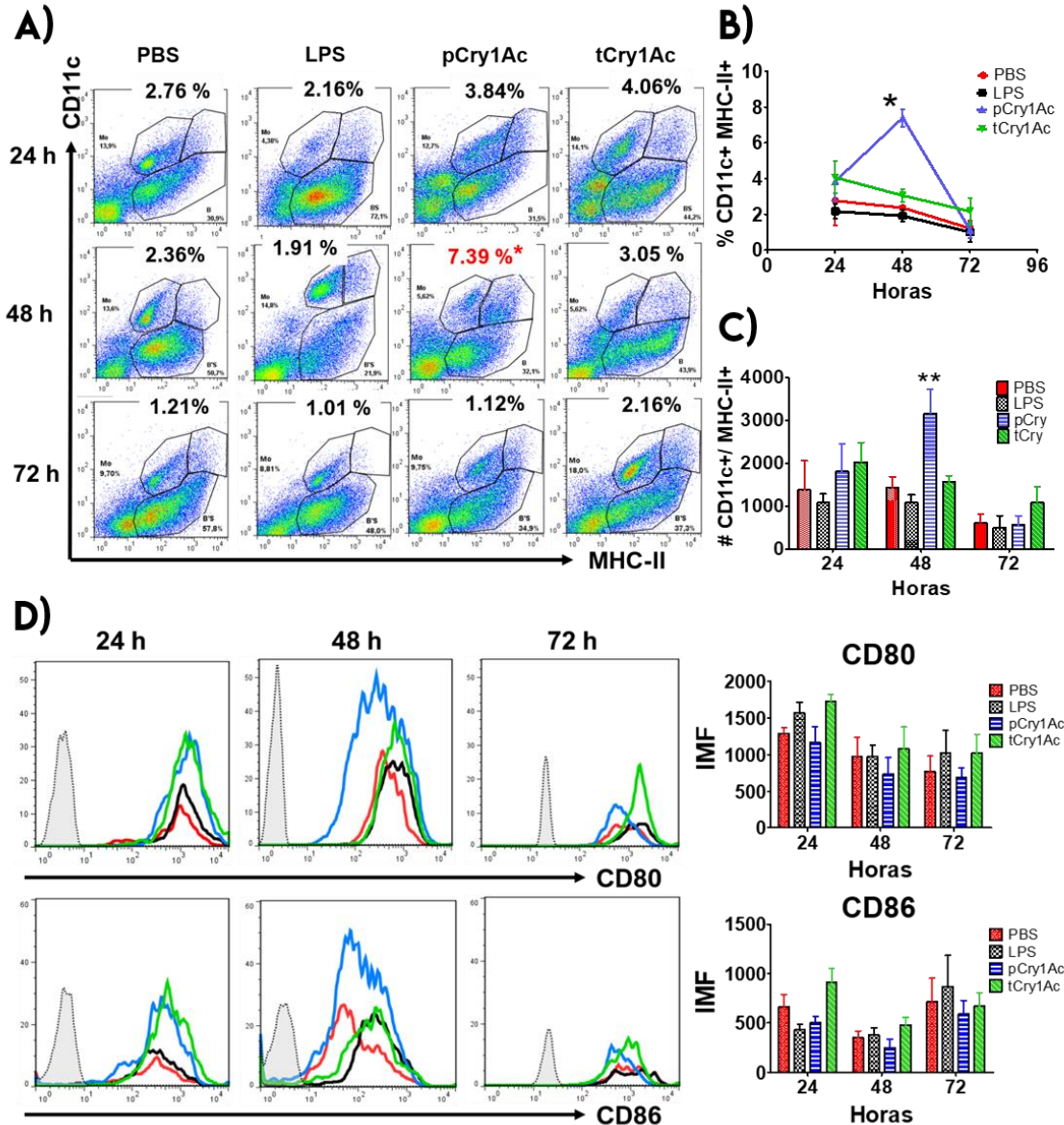


Figura 7. Proporción y número de células dendríticas (CD11c⁺ MHC- II⁺) en peritoneo a las 24, 48 y 72 horas después de la administración ID e IP de las proteínas Cry1Ac. A) *Dot plots* representativos en los que se indican los porcentajes de células dendríticas (CD11c⁺ MHC- II⁺) y células (CD11c⁺ MHC-II⁻). B) Gráfica que indica la media de los porcentajes y EE de células (CD11c⁺ MHC-II⁺). C) Número de células dendríticas (CD11c⁺ MHC-II⁺) en peritoneo. D) Sobreexpresión de moléculas coestimuladoras (CD80 y CD86) en células dendríticas de peritoneo a las 24, 48 y 72 horas. A la izquierda se muestran histogramas representativos y las gráficas muestran los valores de intensidad media de fluorescencia indicando los valores medios y EE de tres experimentos independientes (n=3). Diferencia significativa vs PBS * (P< 0.001) y ** (P< 0.01)

5.2 Las proteínas Cry1Ac incrementaron la proporción de linfocitos B CD69⁺ en ganglio poplíteo

Se analizó la activación en la población de linfocitos B (CD19⁺) en los tejidos obtenidos y se observó que la toxina Cry1Ac induce un incremento estadísticamente significativo en la expresión de CD69 en el ganglio poplíteo desde las 24 hasta las 48 horas. Por otro lado, la protoxina Cry1Ac induce un incremento significativo en la expresión de CD69 a las 24 y a las 72 horas (Fig. 8).

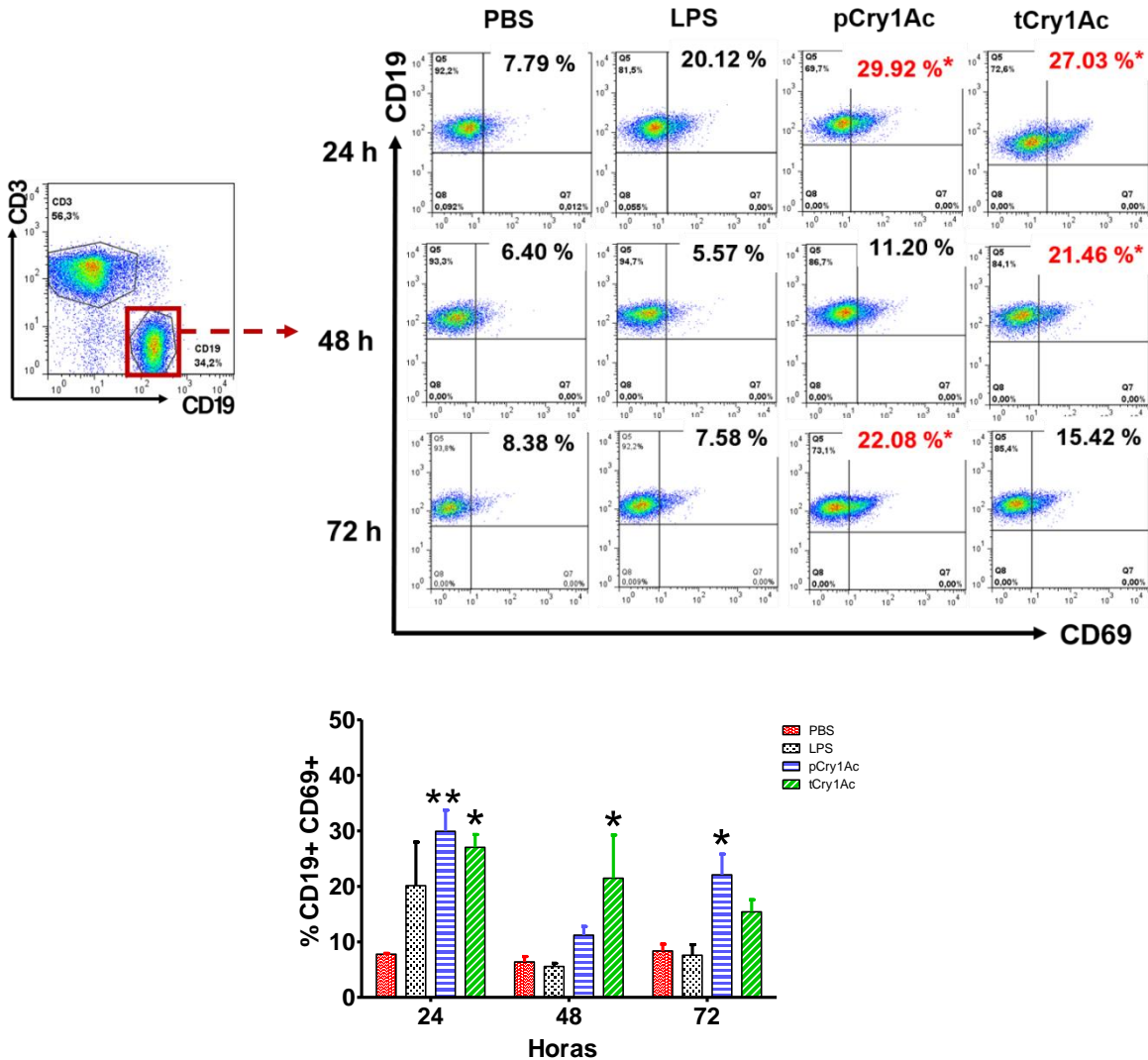


Figura 8. Expresión de CD69 en linfocitos B (CD19⁺) en ganglio a las 24, 48 y 72 horas después de la administración ID e IP de las proteínas Cry1Ac. Arriba se muestran los *dot plots* representativos con los porcentajes de células B (CD19⁺) expresando el marcador de activación CD69. La gráfica muestra los porcentajes de células CD19⁺ CD69⁺ indicando los valores medios y EE de tres experimentos independientes (n=3). Diferencia significativa vs PBS *(P<0.05) y ** (P< 0.01).

En bazo se observó un incremento significativo en la expresión de CD69 en linfocitos B con toxina Cry1Ac únicamente a las 24 horas. Con protoxina no se observaron incrementos estadísticamente significativos a ninguno de los tiempos analizados (Fig. 9).

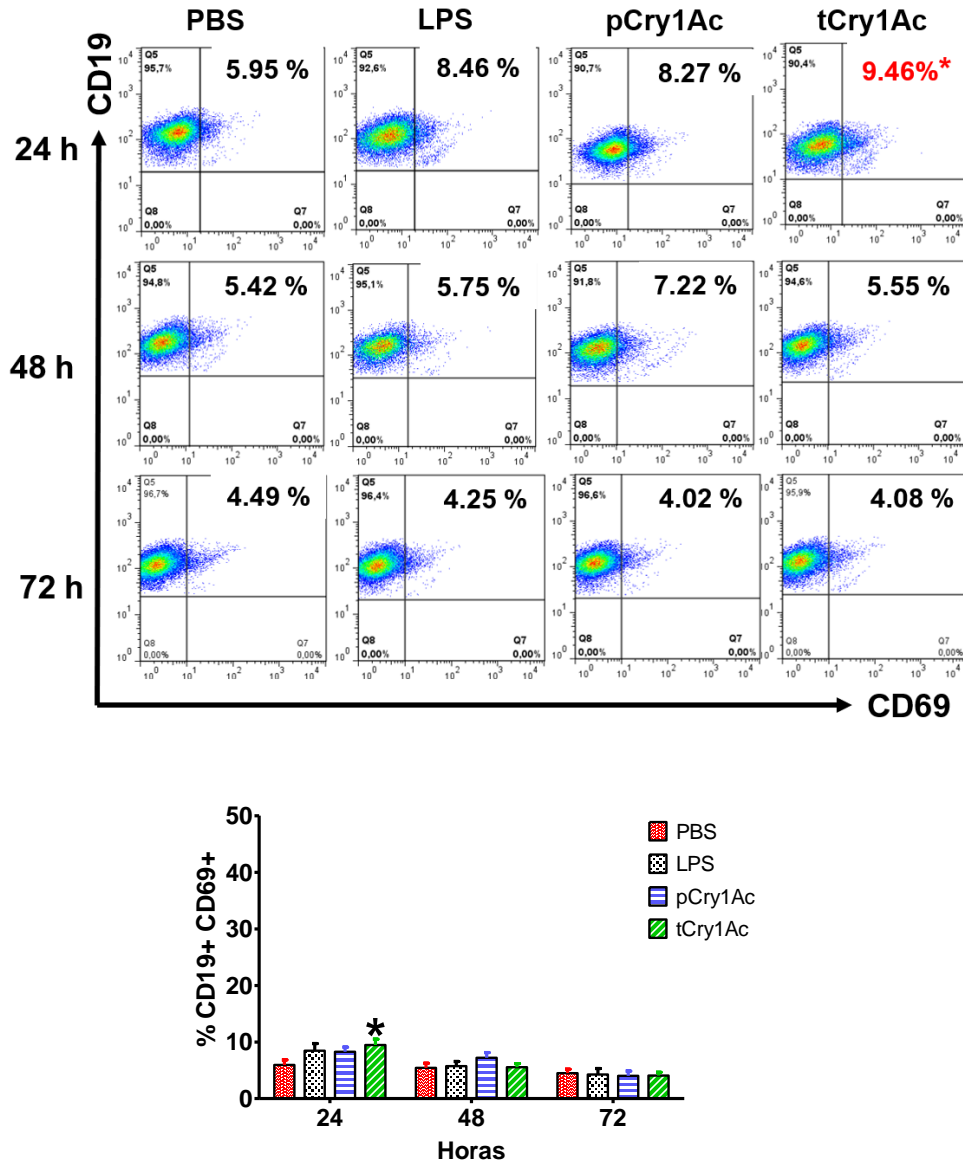


Figura 9. Expresión de CD69 en linfocitos B (CD19⁺) en bazo a las 24, 48 y 72 horas después de la administración ID e IP de las proteínas Cry1Ac. Arriba se muestran los *dot plots* representativos con los porcentajes de células B (CD19⁺) expresando el marcador de activación CD69. La gráfica muestra los porcentajes de células CD19⁺ CD69⁺ indicando los valores medios y EE de tres experimentos independientes (n=3). Diferencia significativa vs PBS *(p<0.05).

En peritoneo se observó una respuesta similar a la de bazo, teniendo un incremento significativo en la expresión de CD69 en linfocitos B después de 24 horas de aplicar la toxina Cry1Ac, y disminuyó a partir de las 48 horas. Con protoxina no se observó un incremento estadísticamente significativo (Fig. 10).

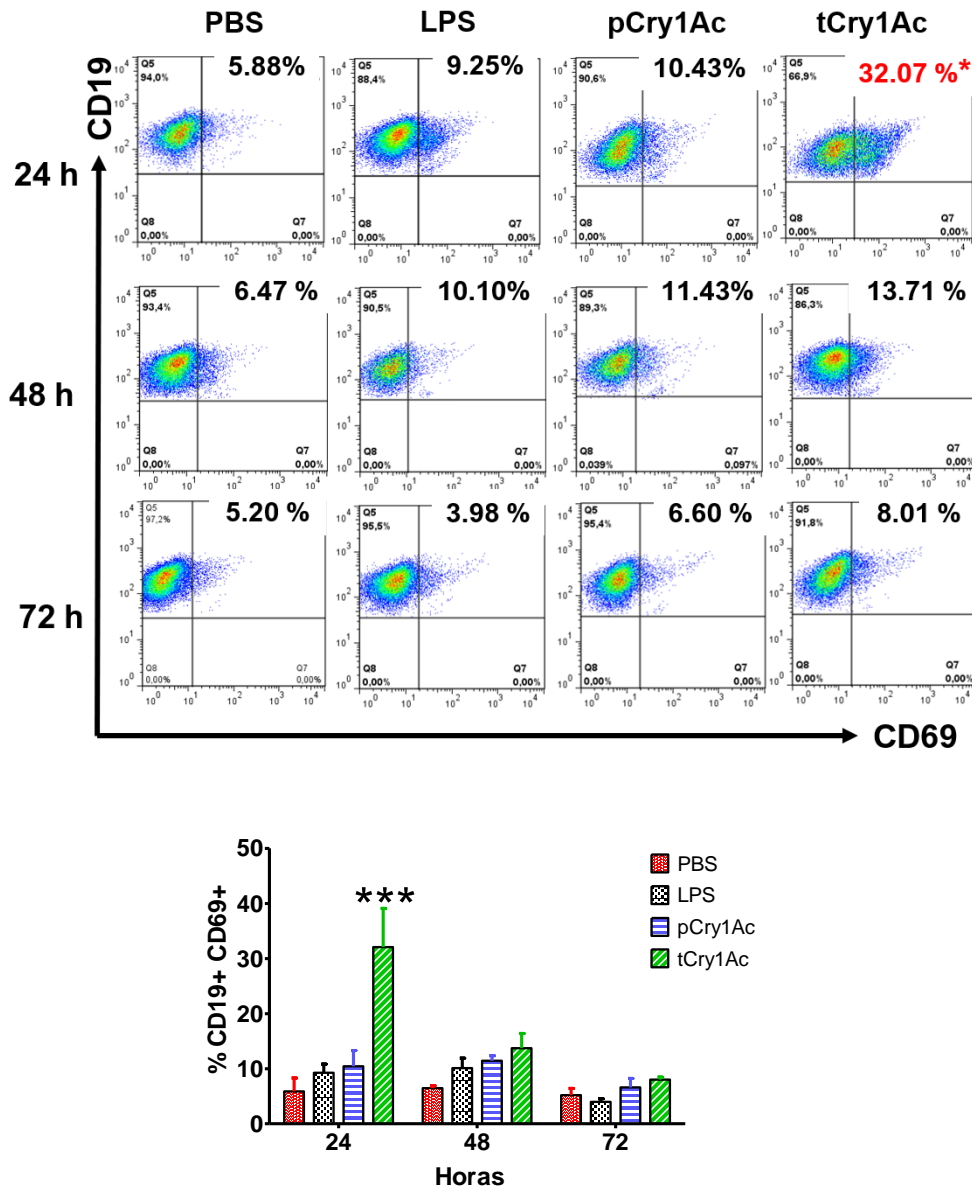


Figura 10. Expresión de CD69 en linfocitos B (CD19⁺) en peritoneo a las 24, 48 y 72 horas después de la administración ID e IP de las proteínas Cry1Ac. Arriba se muestran los *dot plots* representativos con los porcentajes de células B (CD19⁺) expresando el marcador de activación CD69. La gráfica muestra los porcentajes de células CD19⁺ CD69⁺ indicando los valores medios y EE de tres experimentos independientes (n=3). Diferencia significativa vs PBS *** (P< 0.001).

La activación de los linfocitos B también se analizó mediante la expresión del marcador CD25, no obstante, no se observaron incrementos estadísticamente significativos en ninguno de los tejidos a ninguno de los tiempos evaluados (Fig. 11).

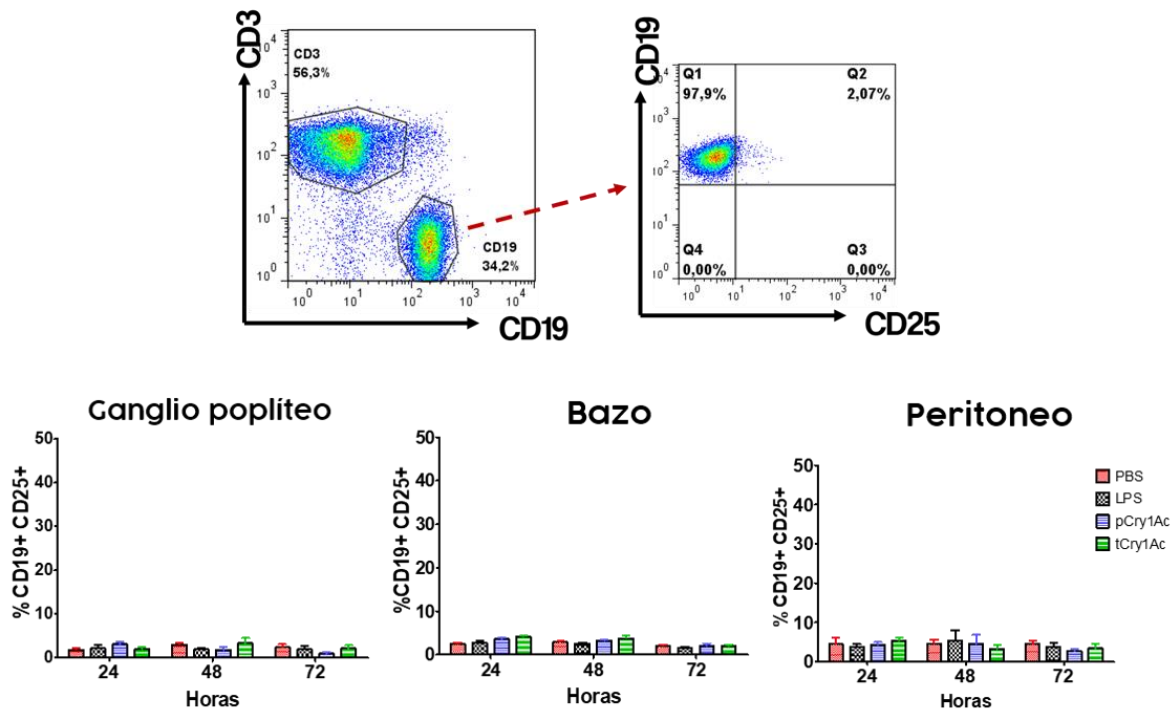


Figura 11. Expresión de CD25 en linfocitos B (CD19⁺) de ganglio poplíteo, bazo y peritoneo a las 24, 48 y 72 horas después de la administración ID e IP de las proteínas Cry1Ac. Los dot plots muestran el gate de células CD19⁺ en el cuál se analizó la expresión de CD25. Las gráficas muestran los porcentajes de células CD19⁺ CD25⁺ indicando los valores medios y EE de tres experimentos independientes (n=3).

5.3 La toxina Cry1Ac indujo la activación de linfocitos T en ganglio poplíteo y peritoneo

En los linfocitos T también se evaluó la activación mediante la expresión del marcador CD69. En ganglio poplíteo se observó un incremento significativo a las 24 horas con toxina Cry1Ac y con LPS. Con protoxina Cry1Ac no se observó un incremento estadísticamente significativo ($p < 0.05$) en la expresión de CD69 (Fig. 12).

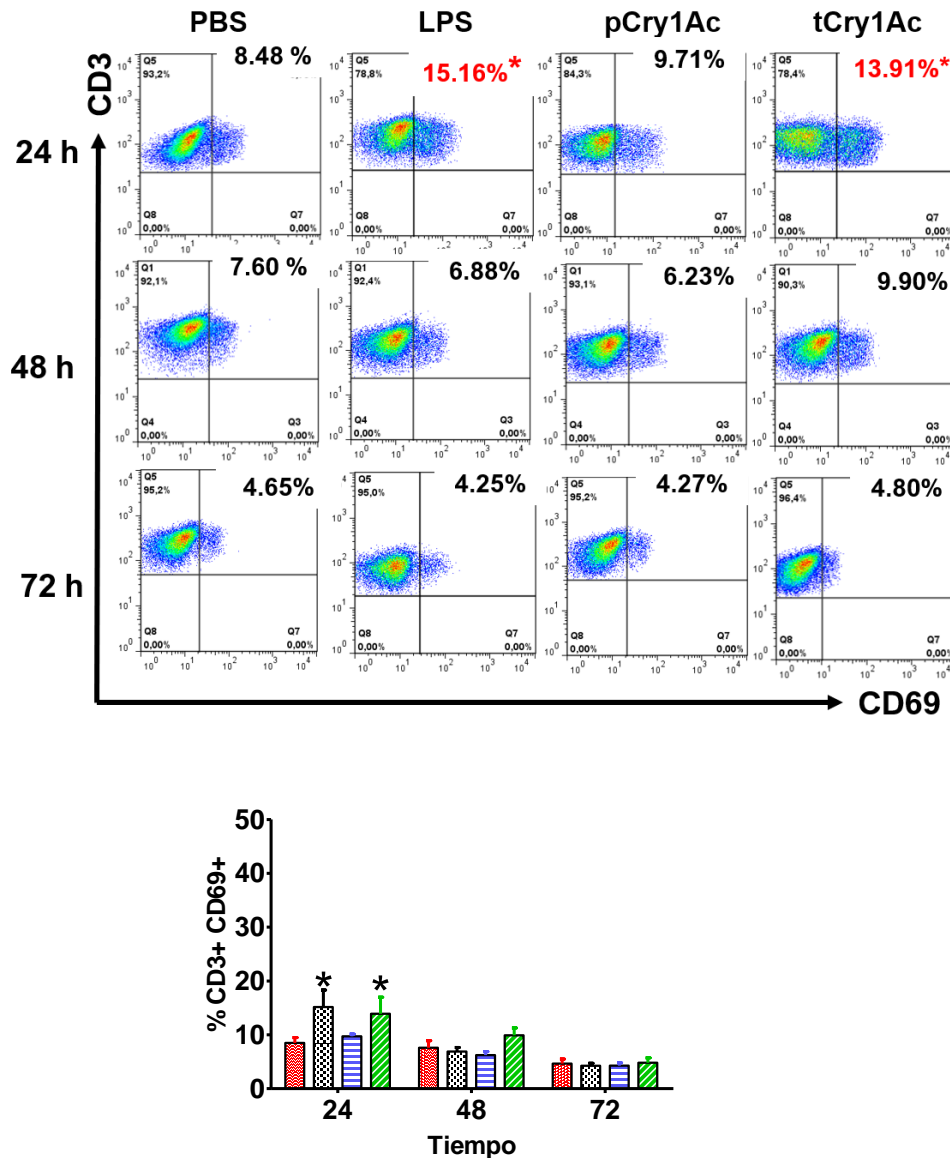


Figura 12. Expresión de CD69 en linfocitos T (CD3⁺) en ganglio a las 24, 48 y 72 horas después de la administración ID e IP de las proteínas Cry1Ac. Se muestran los dot plots representativos con los porcentajes de células T (CD3⁺) expresando el marcador de activación CD69. La gráfica muestra los porcentajes de células CD3⁺ CD69⁺ indicando los valores medios y EE de tres experimentos independientes (n=3). Diferencia significativa vs PBS *(P<0.05).

En bazo se observó un aumento estadísticamente significativo ($p < 0.05$) únicamente en el grupo control positivo (LPS) a las 24 horas, mientras que en peritoneo se observó un incremento significativo en el grupo de toxina Cry1Ac a este mismo tiempo (Fig. 13).

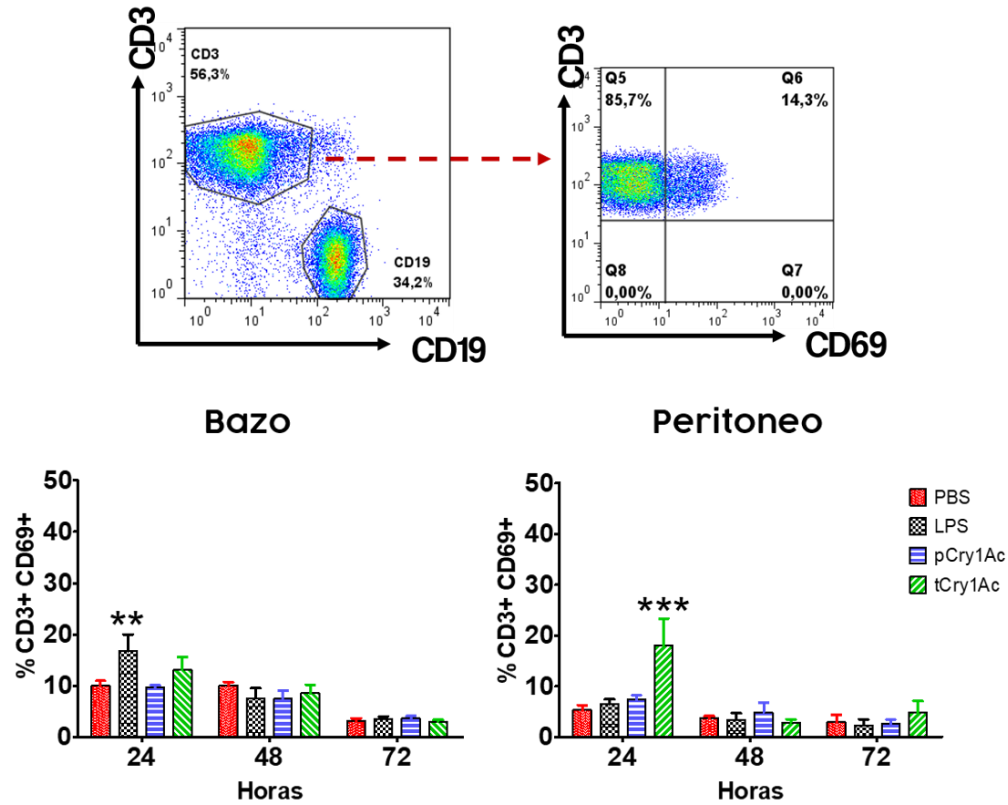


Figura 13. Expresión de CD69 en linfocitos T (CD3⁺) en bazo y peritoneo a las 24, 48 y 72 horas después de la administración ID e IP de las proteínas Cry1Ac. Los *dot plots* muestran el *gate* de células CD3⁺ en el cual se analizó la expresión de CD69 después de la aplicación de las proteínas Cry1Ac. Las gráficas muestran los porcentajes de células CD3⁺ CD69⁺ en bazo y peritoneo indicando los valores medios y EE de tres experimentos independientes (n=3). Diferencia significativa vs PBS **($P < 0.01$) y ***($P < 0.001$).

En los linfocitos T (CD3⁺) se analizó también la activación de las subpoblaciones CD4 y CD8 mediante la expresión de CD69. En los linfocitos T CD4⁺ no se observaron incrementos significativos en la expresión de CD69 en ninguno de los tejidos analizados (Fig. 14A). En los linfocitos T CD8⁺ sólo se observó un incremento significativo en la expresión de CD69 en bazo a las 24 horas con LPS, mientras que con los otros tratamientos no se observaron cambios significativos (Fig. 14B).

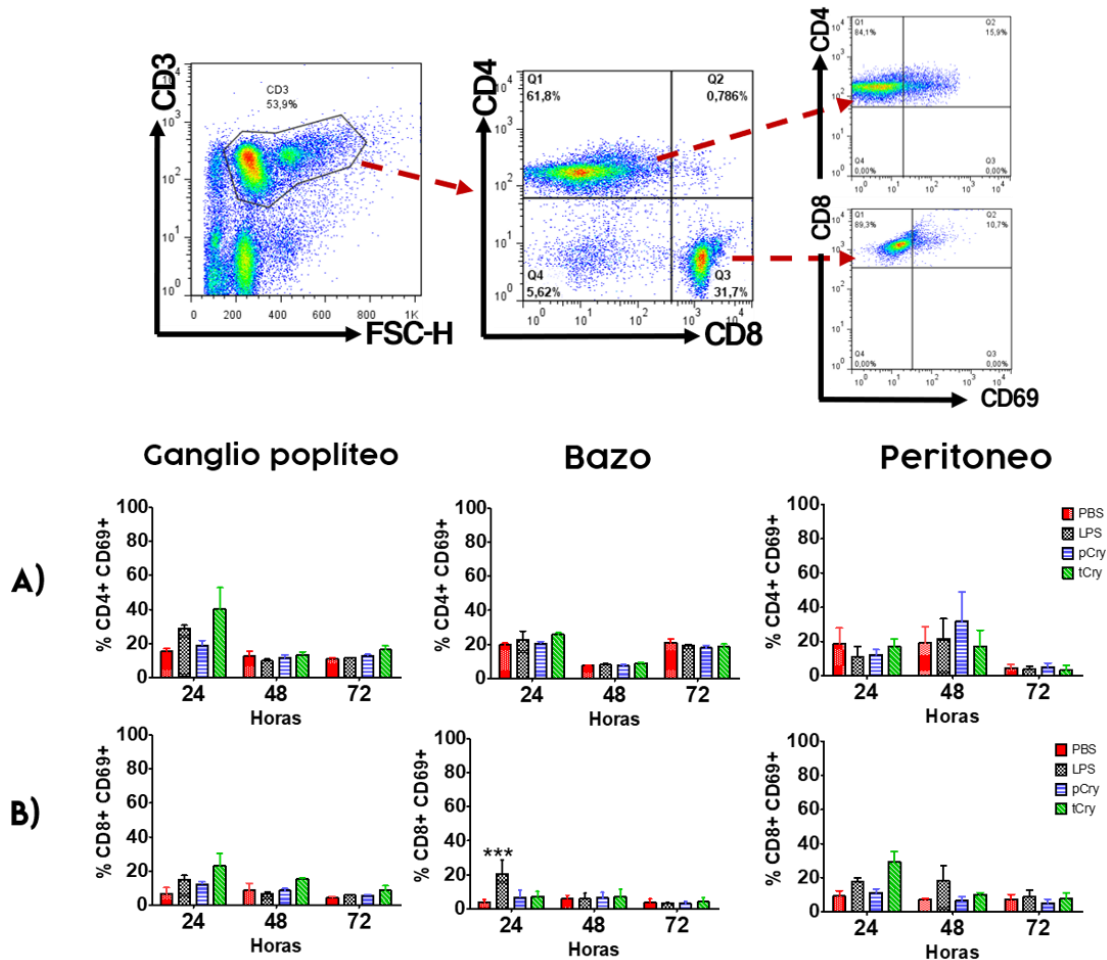


Figura 14. Expresión de CD69 en linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ en ganglio poplíteo, bazo y peritoneo después de 24, 48 y 72 horas de la administración ID e IP de las proteínas Cry1Ac. Los dot plots muestran el gate de CD3⁺ la cual se separó en linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺, en las cuales se analizó la expresión de CD69. A) Las gráficas muestran los porcentajes de linfocitos T CD4⁺ CD69⁺ indicando los valores medios y EE de tres experimentos independientes (n=3). B) Las gráficas muestran los porcentajes de linfocitos T CD8⁺ CD69⁺ indicando los valores medios y EE de tres experimentos independientes (n=3). *** Diferencia significativa vs PBS (P < 0.001).

La activación de los linfocitos T se analizó también mediante la expresión del marcador CD25, no obstante, no se observaron incrementos significativos en ninguno de los tejidos a ninguno de los tiempos evaluados (Fig. 15).

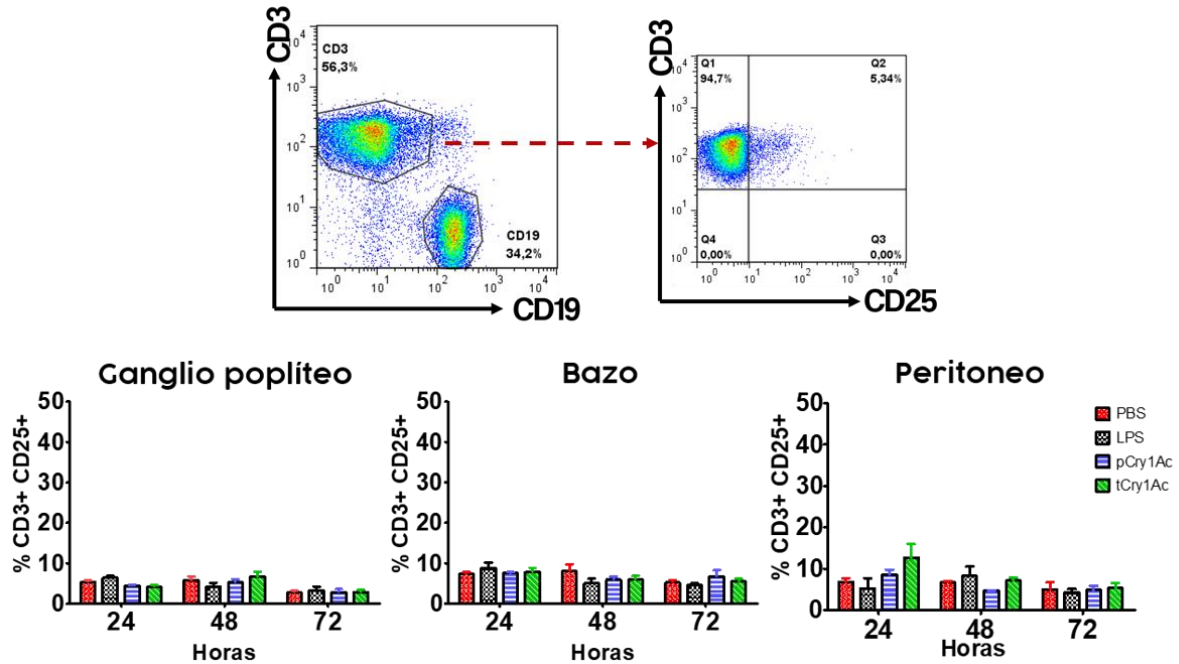


Figura 15. Expresión de CD25 en linfocitos T (CD3⁺) en ganglio poplíteo, bazo y peritoneo después de 24, 48 y 72 horas de la administración ID e IP de las proteínas Cry1Ac. Los dot plots muestran el gate de células CD3⁺ en el cual se analizó la expresión de CD25. Las gráficas muestran los porcentajes de linfocitos T CD3⁺ CD25⁺ indicando los valores medios y EE de tres experimentos independientes (n=3).

5.4 La tCry1Ac indujo la proliferación de linfocitos B (CD19⁺) de bazo de ratones inmunizados y no inmunizados

Se realizaron ensayos de proliferación teñiendo con CFSE células de bazo de ratones inmunizados, las cuales se incubaron durante 72 horas con los tratamientos y se analizó la proliferación en linfocitos T y B. En los linfocitos T de bazo no se observó un incremento estadísticamente significativo en la proliferación con las proteínas Cry1Ac (Fig. 16).

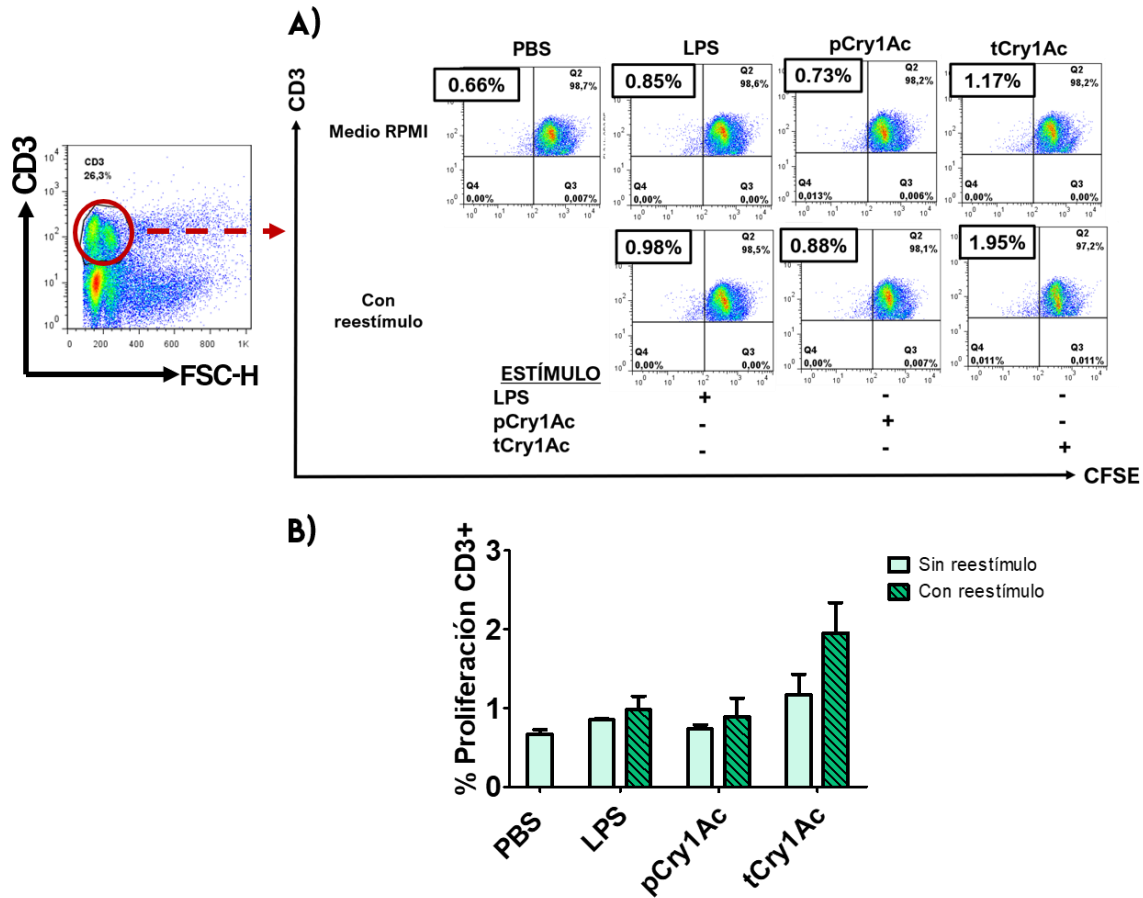


Figura 16. Proliferación de linfocitos T (CD3⁺) en bazo a las 48 horas después de la administración ID e IP de las proteínas Cry1Ac. Las células totales de bazo de ratones inmunizados fueron teñidas con CFSE e incubadas durante 72 horas con el estímulo correspondiente, la primera fila de *dot plots* indica la proliferación de las células de ratones inmunizados sin reestímulo *in vitro*, y la segunda fila la proliferación de células de ratones inmunizados con reestímulo *in vitro*. A) *Dot plots* representativos con los porcentajes de proliferación de la población CD3⁺. B) Gráfica que muestra los porcentajes de proliferación indicando los valores medios y EE de tres experimentos independientes (n=3).

Por otra parte, en linfocitos B se encontraron dos poblaciones de linfocitos CD19⁺, pequeños y grandes, y en ésta última se observó un incremento en el porcentaje especialmente con la toxina Cry1Ac de 10.4 a 36% (Fig. 17A).

La proliferación de las poblaciones CD19⁺ se analizó por separado. En los linfocitos CD19⁺ pequeños (R1) de ratones estimulados la tCry1Ac fue capaz de inducir proliferación de 2.5 a 14.6 %. Con protoxina no se observó aumento en la proliferación ante el reestímulo *in vitro* (Fig 17B).

Al analizar la proliferación de la población de linfocitos CD19⁺ grandes (R2) de bazo de ratones inmunizados no se observó que las proteínas Cry1Ac indujera proliferación estadísticamente significativa ante el reestímulo *in vitro* (Fig. 17C).

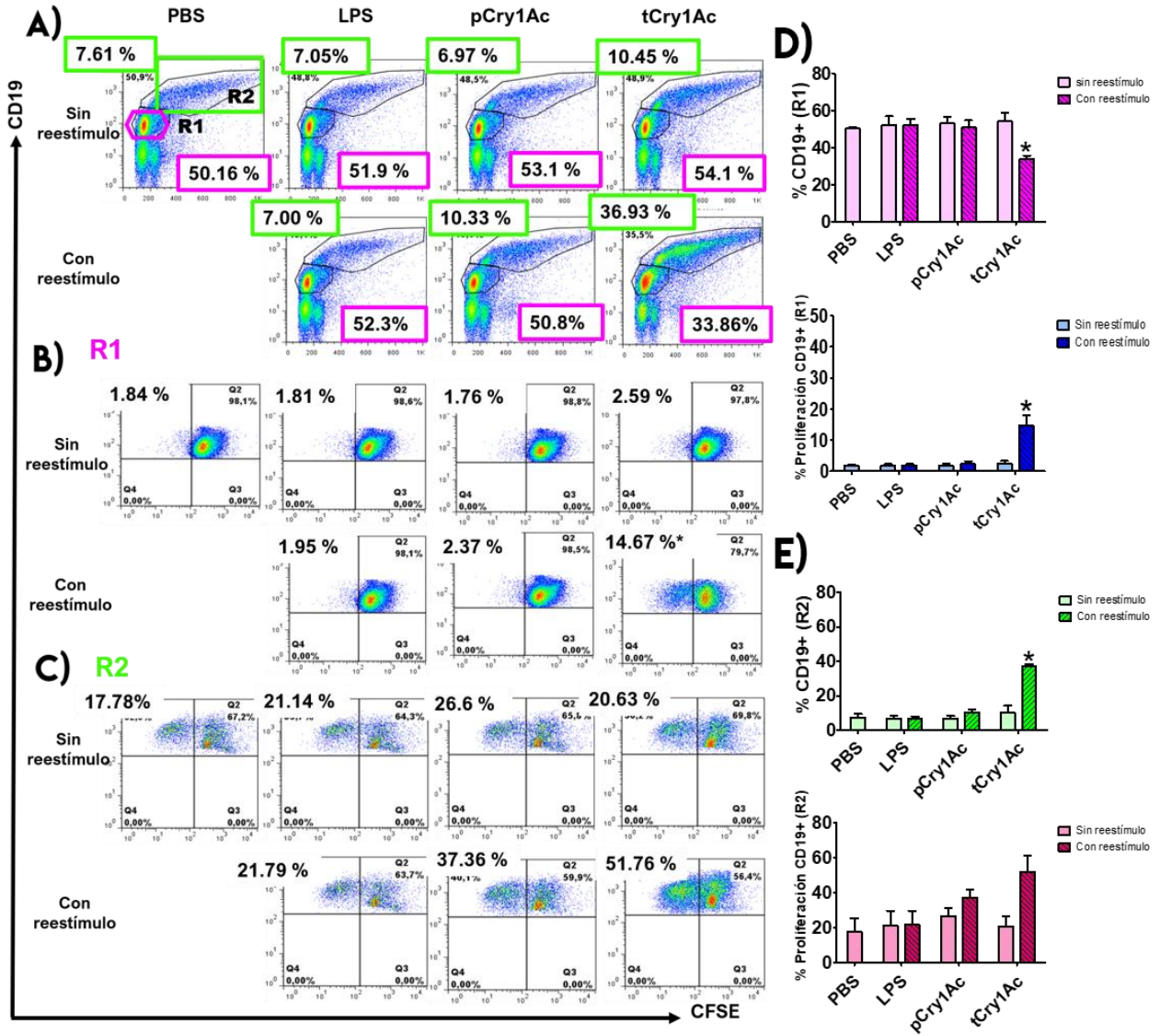


Figura 17. Proporción y proliferación de linfocitos B (CD19⁺) en bazo a las 48 horas después de la administración ID e IP de las proteínas Cry1Ac. Las células totales de bazo de ratones inmunizados fueron teñidas con CFSE e incubadas durante 72 horas con el estímulo correspondiente, para cada panel la primera fila de dot plots indica la proliferación de las células de ratones inmunizados sin estímulo *in vitro*, y la segunda fila la proliferación de células de ratones inmunizados con reestímulo *in vitro*. A) Dot plots representativos con los porcentajes de las dos regiones (R1 y R2) correspondientes a dos poblaciones de células CD19⁺. B) Porcentaje de proliferación de las células de R1. C) Porcentaje de proliferación de las células de R2. D y E) Gráficas que muestran los porcentajes de células en R1 y R2 respectivamente, y la proliferación de dichas regiones indicando los valores medios y EE de tres experimentos independientes (n=3). *Diferencia significativa vs grupo sin reestímulo (P < 0.05).

Se analizó también la proliferación en células totales de bazo de ratones no estimulados, es decir, que únicamente se les administró el vehículo, las cuales fueron estimuladas *in vitro* con las proteínas Cry1Ac para comprobar si la respuesta era específica, y se observó que las proteínas Cry1Ac son capaces de incrementar el porcentaje de linfocitos CD19⁺ grandes al igual que en células de ratones estimulados (Fig. 18A).

De igual forma, en linfocitos CD19⁺ pequeños (R1) de ratones no inmunizados se indujo proliferación al estimular *in vitro* con la toxina Cry1Ac de 2.12 a 13.7 % (Fig. 18B). En linfocitos CD19⁺ grandes (R2) de ratones no inmunizados no se observó proliferación significativa inducida por las proteínas Cry1Ac, con respecto al grupo que no recibió el estímulo (Fig. 18B).

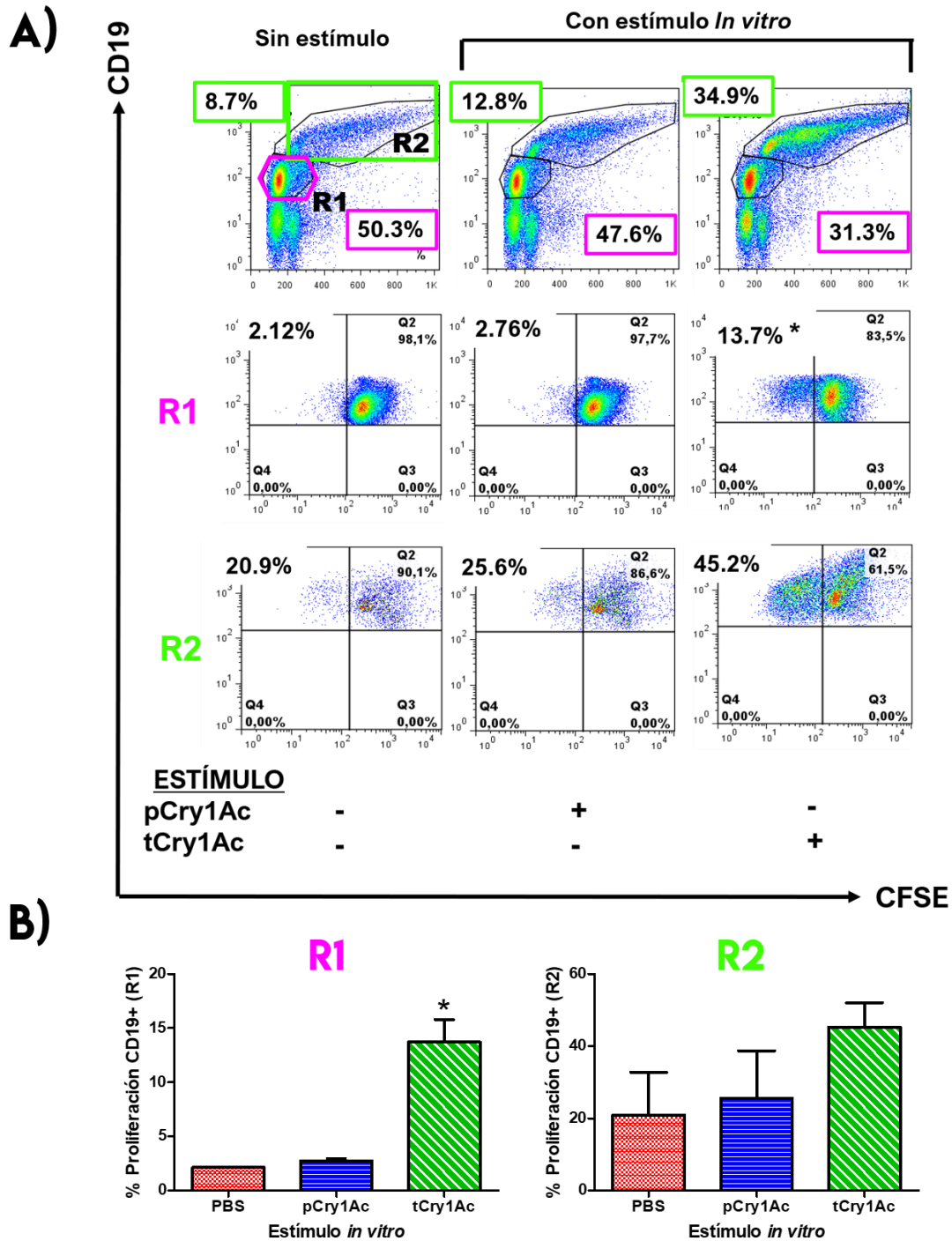


Figura 18. Proporción y proliferación de linfocitos B (CD19⁺) de bazo a las 48 horas después de la administración ID e IP de las proteínas Cry1Ac. Las células totales de bazo de ratones no inmunizados fueron teñidas con CFSE e incubadas durante 72 horas con el estímulo correspondiente. Arriba se muestran los *dot plots* representativos con los porcentajes. La primera fila muestra dos regiones R1 y R2 correspondientes a dos poblaciones de células CD19⁺, y posteriormente en las últimas dos filas se muestra la proliferación de dichas regiones después del estímulo *in vitro*. Abajo las gráficas muestran los porcentajes indicando los valores medios y EE de dos experimentos independientes (n=2). Diferencia significativa vs grupo sin reestímulo *(P< 0.05).

Por último, en los linfocitos T de bazo de ratones no inmunizados, se observó también un incremento en la proliferación de más del 1 % ante el estímulo *in vitro* con toxina Cry1Ac (Fig. 19)

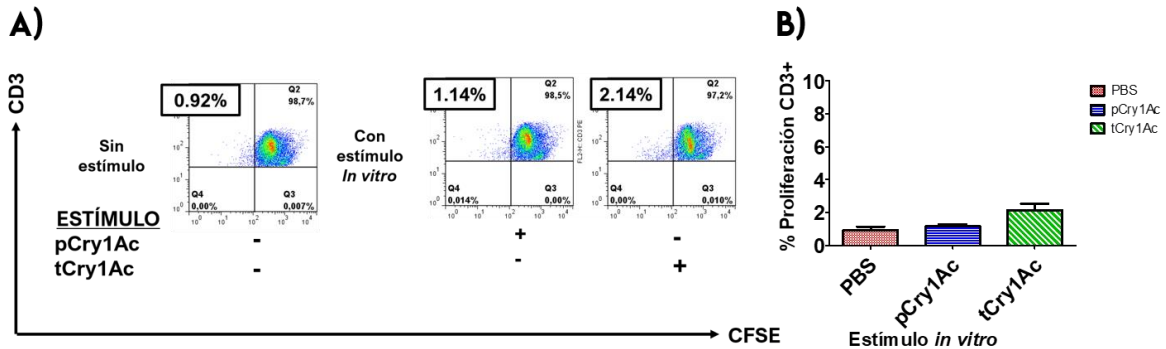


Figura 19. Proliferación de linfocitos T (CD3⁺) en bazo de ratones no inmunizados. Las células totales de bazo de ratones no inmunizados fueron teñidas con CFSE e incubadas durante 72 horas con el estímulo correspondiente. Los *dot plots* representativos con los porcentajes de proliferación de la población CD3⁺. B) Gráfica que muestra los porcentajes de proliferación indicando los valores medios y EE de dos experimentos independientes (n=2).

5.5 Producción de citocinas de sobrenadantes de células estimuladas *in vitro*

Se analizó la concentración de citocinas en el sobrenadante de las células de los ensayos de proliferación y se encontró que la protoxina induce la producción de IL-17 en células de bazo de ratones estimulado. Mientras que la toxina Cry1Ac incrementa significativamente la producción de IL-10, TNF- α , IL-2 e IL-6 en células de bazo de ratones inmunizados (Fig. 20).

En las células de peritoneo se encontraron concentraciones basales de citocinas muy elevadas, no obstante, se observó un incremento significativo en la producción de IFN- γ ante el reestímulo con la protoxina Cry1Ac (Fig. 21).

Finalmente, en los sobrenadantes de las células de ganglio poplíteo y mesentérico no se encontraron incrementos estadísticamente significativos por la dispersión de datos en la producción de citocinas (Fig. 20 y 21).

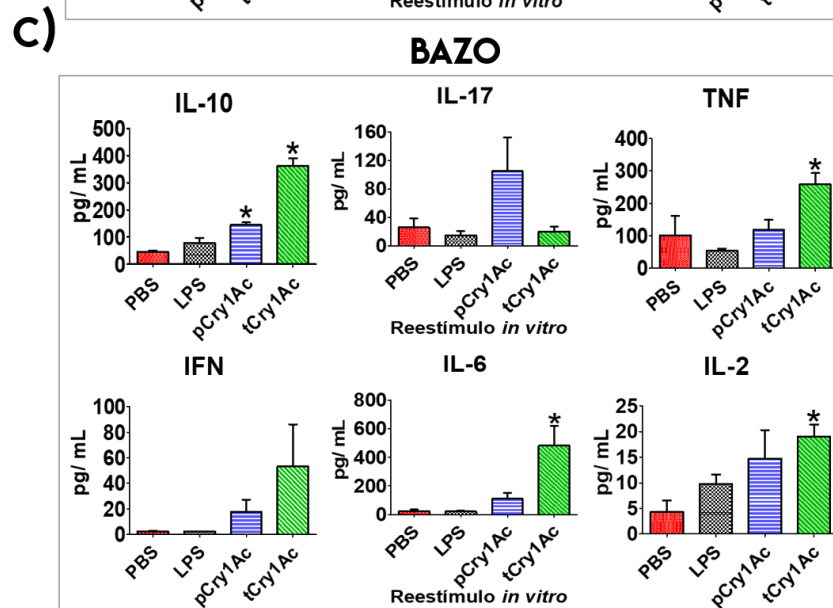
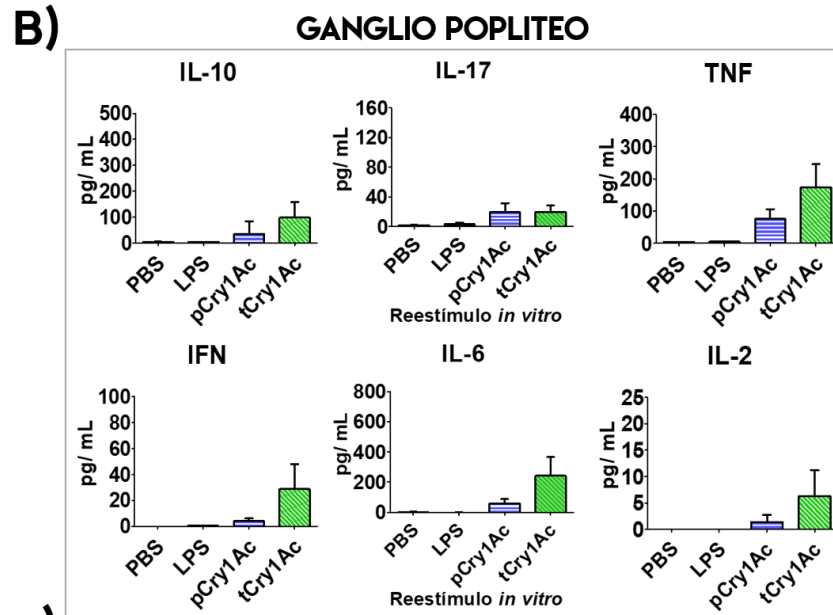
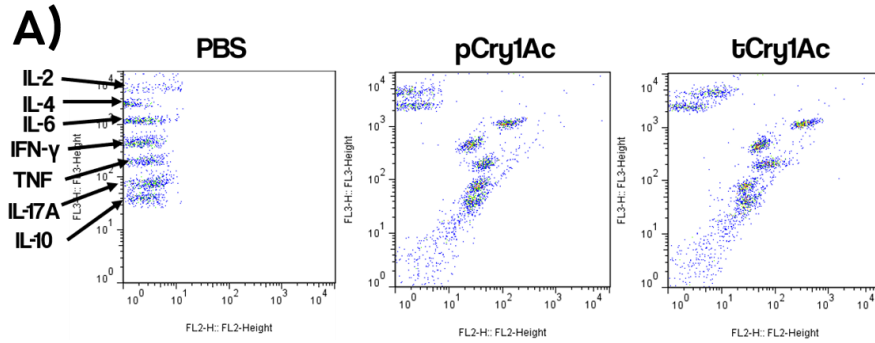
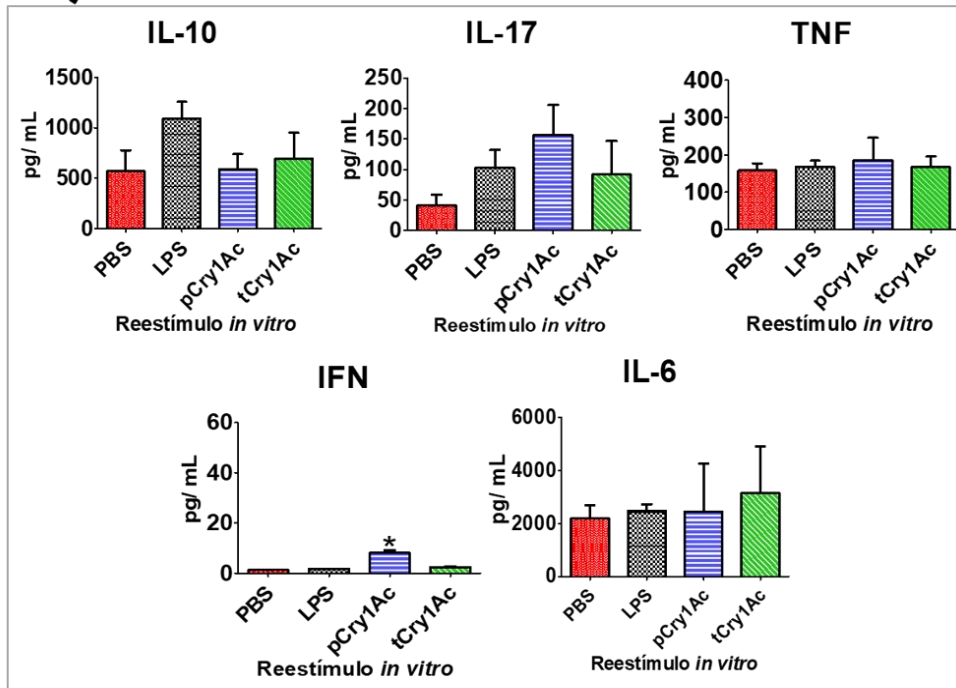


Figura 20. Citocinas en sobrenadantes de células de ganglio poplíteo y bazo de ratones inmunizados reestimuladas *in vitro* durante 72 horas. A) *Dot plots* representativos de producción de citocinas en células de ganglio poplíteo. B y C) Gráficas que muestran las concentraciones de citocinas en pg/mL de ganglio poplíteo y bazo respectivamente indicando los valores medios y EE de tres experimentos independientes (n=3). Diferencia significativa vs PBS * (P < 0.05).

A)

PERITONEO



B)

GANGLIO MESENTÉRICO

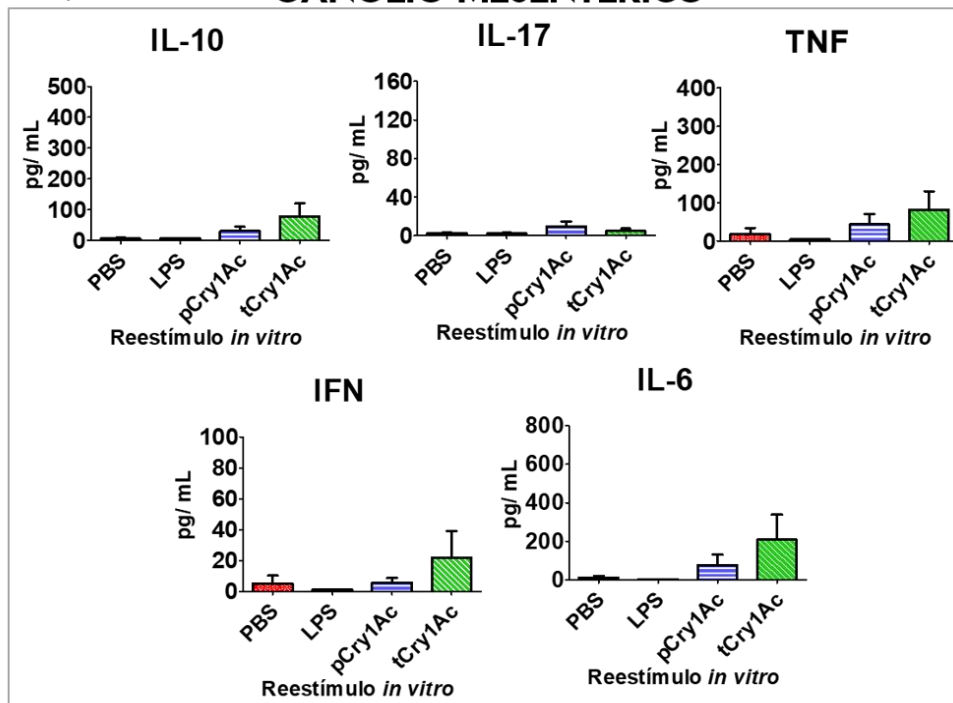


Figura 21. Citocinas en sobrenadantes de células de peritoneo y ganglio mesentérico de ratones inmunizados reestimuladas *in vitro* durante 72 horas. Las gráficas muestran las concentraciones de citocinas en pg/mL de peritoneo (A) y ganglio mesentérico (B) indicando los valores medios y EE de tres experimentos independientes (n=3). Diferencia significativa vs PBS *(P< 0.05).

6. Discusión

En estudios previos, se ha demostrado que la protoxina y la toxina Cry1Ac son inmunógenas, además la protoxina tiene efecto adyuvante mucosal y sistémico (Torres-Martinez & Moreno-Fierros, 2017). Parte del mecanismo adyuvante de la protoxina Cry1Ac ya se ha caracterizado, y se sabe que es capaz de activar macrófagos induciendo sobreexpresión de moléculas coestimuladoras (CD80 y CD86) en diferentes tejidos al ser administrada por vía intraperitoneal e intranasal (Moreno-Fierros *et al.*, 2013). Por otro lado, el efecto adyuvante de la toxina Cry1Ac solo se ha evaluado por la vía intragástrica siendo moderado, pero se sabe que también es capaz de activar macrófagos induciendo sobreexpresión de moléculas coestimuladoras y síntesis de citocinas por activación de vías de MAPKs (Torres-Martinez *et al.*, 2016).

Sin embargo, hasta ahora solo se había analizado la respuesta en macrófagos; por lo que en este estudio se analizó el efecto *in vivo* de la protoxina y toxina Cry1Ac en células dendríticas (CD), las cuales son células presentadoras de antígeno (CPA) y se encuentran distribuidas a lo largo de toda la superficie corporal, concentradas principalmente en zonas más propensas a la entrada de patógenos como las superficies mucosas y la piel. Su función principal es captar antígenos en la periferia y presentarlos a linfocitos T inexpertos, para activarlos, en los tejidos linfáticos secundarios (Sen, Forrest, Kepler & Parker, 2010; Vázquez, Sureda, & Rebollo, 2011).

Se decidió utilizar la inmunización en el cojinete plantar, ya que es una ruta que combina las vías de administración intradérmica y subcutánea; y permite activar a las células dendríticas de la piel para que migren al ganglio poplíteo y analizar ahí la respuesta (Kamala, 2007).

Los resultados de este trabajo en general indican que tanto la toxina como la protoxina son capaces de inducir el reclutamiento y la activación de células dendríticas, aunque se aprecian diferencias entre ambas proteínas en la magnitud y en el curso temporal de los efectos. Ya que se observó un incremento significativo en el número de células dendríticas en el ganglio poplíteo en los grupos administrados con protoxina y toxina Cry1Ac a las 48 y 72 horas respectivamente (Fig. 5). Con los marcadores utilizados no es posible identificar qué tipo de células dendríticas son las observadas en el ganglio poplíteo pero, podrían ser principalmente células dendríticas dérmicas, ya que de acuerdo con la literatura estas adquieren motilidad y migran al ganglio más rápidamente que las células de Langerhans

(Sen *et al.*, 2010; Voisin *et al.*, 2014). Sin embargo, sería necesario analizar a las CD utilizando marcadores, como CD103 y Langerina, para conocer qué tipo de células dendríticas se movilizan y se activan por acción de las proteínas Cry1Ac por esta vía de inmunización.

Posteriormente en la población de células dendríticas (CD11c⁺ MHC-II⁺) se analizó la activación mediante la sobreexpresión de los ligandos de CD28, CD80 y CD86, las cuales son esenciales para la correcta activación de los linfocitos T durante la presentación de antígeno. Se sabe que CD86 se expresa constitutivamente en monocitos, células dendríticas, linfocitos B y T, y se sobreexpresa rápidamente al activarse la respuesta inmune. Mientras que la expresión de CD80 es menor y se induce más lentamente después de la activación (Mark *et al.*, 1998). Estas diferencias en la cinética de expresión de dichas moléculas han sugerido que existan diferencias funcionales en la activación de los linfocitos T y algunos estudios mencionan que se pueden inducir respuestas Th1 o Th2 dependiendo de si la coestimulación se da con CD80 o con CD86 (Mark *et al.*, 1998; Slavik, Hutchcroft & Bierer, 1999; Sansom, Manzotti & Zheng, 2003), sin embargo, no hay suficientes estudios que puedan comprobarlo.

Hochweller & Anderton, observaron que las células dendríticas expresan constitutivamente CD80 y CD86, y ambas se sobreexpresan rápidamente después de la administración de OVA con LPS, pero con diferente cinética. CD80 se mantuvo sobreexpresado hasta el segundo día, mientras que CD86 se mantuvo elevado durante tres días. Este comportamiento en la expresión de CD86 es similar al observado en ganglio poplíteo con la toxina Cry1Ac en donde el incremento significativo en la expresión se mantuvo hasta las 72 horas, mientras que el de CD80 sólo se observó a las 24 horas (Fig. 5D). Por otro lado, con la protoxina sólo se incrementó la expresión de CD86 a las 24 horas. Como se puede observar existen diferencias entre la activación de las células dendríticas con LPS y con las proteínas Cry1Ac; y esto es porque, aunque ambas tengan la capacidad de activar de las células presentadoras de antígeno no lo hacen con la misma cinética. Esto se comprobó en trabajos anteriores en donde se comparó mediante un curso temporal, la activación de las vías de MAPKs en macrófagos RAW 264.7 estimulados con toxina o protoxina y se observó que las activan a diferentes tiempos (Rubio-Infante *et al.*, 2018; Torres-Martinez *et al.*, 2016). A su vez esto puede relacionarse con el tipo de receptor al que se unan para inducir la activación de estas vías. El LPS induce activación de CPA principalmente mediante la unión al TLR-4, mientras que en los estudios que se han realizado para determinar el

receptor de la protoxina, no se ha encontrado evidencia de que haya unión a TLRs, y se ha propuesto como receptor en vertebrados a la proteína HSP-70 de superficie y se continua explorando la identificación de otros receptores (Rubio-Infante *et al.*, 2018).

Los ratones también se administraron por vía intraperitoneal, lo que permitió observar si se generaba una respuesta sistémica analizando la respuesta en bazo y la respuesta local en el peritoneo. En peritoneo se observó un incremento significativo en el porcentaje de células dendríticas a las 48 horas con pCry1Ac el cual disminuyó a las 72 horas (Fig. 7). Anteriormente se había observado un efecto de reclutamiento transitorio de macrófagos en el peritoneo, relacionado con el incremento en la producción de MCP-1, quimiocina involucrada en el reclutamiento de monocitos, macrófagos y células dendríticas, al administrar pCry1Ac por vía intraperitoneal después de 24 horas (Rubio-Infante *et al.*, 2018). Lo observado con la protoxina podría ser un efecto similar de reclutamiento de células dendríticas al sitio de inyección, mediado por producción de MCP-1 en el peritoneo.

En cuanto a la activación de las células dendríticas de peritoneo, no se observaron incrementos significativos en la sobreexpresión de CD80 y CD86 ya que los valores basales estaban muy elevados (Fig. 7D), lo que sugiere que la inyección en el peritoneo por sí sola induzca activación de las células, ya que incluso en el grupo vehículo se observó un aumento de la expresión de CD80, y a las 72 horas se observaron niveles de activación menores a los observados a las 24 horas; o bien puede ser que las células dendríticas activadas migren a otro sitio para la presentación de antígeno, como podría ser el omento o el ganglio mesentérico, provocando que la activación no se observe localmente.

Por otro lado, en bazo se incrementó significativamente el porcentaje de células dendríticas con toxina a las 48 horas (Fig. 6B). Debido a que las células dendríticas viajan a través de los vasos linfáticos desde el sitio de captura de antígeno hasta el órgano linfático secundario más cercano, la ausencia de vasos linfáticos aferentes en bazo podría explicar por qué no se observaron cambios en la proporción de células dendríticas con las proteínas Cry1Ac, ya que las células deben entrar primero a torrente sanguíneo desde la cavidad peritoneal para ingresar al bazo lo que podría impedir o retrasar la llegada de células dendríticas activadas (Bronte & Pittet, 2013). A pesar de no observar cambios en la proporción de las células dendríticas en bazo, se observaron células activadas a las 24 horas (sobreexpresión de CD86) con protoxina como con toxina (Fig. 6D), lo que podría sugerir que corresponden a células dendríticas residentes del bazo, las cuáles se localizan en la zona marginal y

pueden captar antígenos circulantes y migrar a la pulpa blanca para activar linfocitos (Bronte & Pittet, 2013), y no a células dendríticas que hayan migrado desde el peritoneo.

Como se puede observar existieron diferencias en los efectos encontrados entre los grupos inmunizados con protoxina y toxina Cry1Ac, lo que sugiere que en su estructura de protoxina (Fig. 1) no se expongan sitios de reconocimiento de la toxina que permitan su interacción con las células dendríticas y linfocitos B provocando las diferencias entre los resultados de activación y de proliferación entre ambas proteínas.

Se evaluó también la activación en linfocitos T y B mediante la expresión de dos marcadores: CD69 y CD25. El primero, CD69, es una proteína homodimérica formada por dos subunidades transmembranales glicosiladas que poseen un dominio extracelular lectina tipo C. Su ligando específico es la galectina-1, la cual se expresa en células dendríticas y macrófagos. La expresión de este receptor se induce rápidamente (2-3 horas) en la membrana de linfocitos T después de recibir el estímulo, activando la síntesis de citocinas y la expansión policlonal (Cibrian & Sanchez-Madrid, 2017).

En linfocitos T totales la toxina indujo activación por la expresión de CD69 en ganglio poplíteo (Fig. 12) y peritoneo a las 24 horas (Fig. 13). También se analizó por separado la activación en linfocitos T CD4⁺ y T CD8⁺, sin embargo, no se observó expresión de CD69 (Fig. 14), a diferencia de lo observado en un estudio previo, en el que se analizó el efecto *in vivo* de la administración intranasal de protoxina Cry1Ac en donde hubo un aumento en el número de linfocitos T y B tanto en pasajes nasales como en el NALT así como incremento en la expresión de los marcadores de activación CD69 y CD25 (Rodríguez-Monroy & Moreno-Fierros, 2010). No obstante, existen diferencias metodológicas con respecto a dicho estudio, como los tejidos en los cuales fue evaluada la respuesta, el número de inmunizaciones y los tiempos de evaluación de los efectos; en el primero se utilizaron 4 inmunizaciones (una cada 7 días) y los efectos se evaluaron al día 28, mientras que en este trabajo sólo se aplicó una inmunización y los tiempos evaluados fueron mucho más cortos como para permitir el inicio de una respuesta adaptativa, por lo cual para evaluar la respuesta *in vivo* en linfocitos T y B sería conveniente evaluar el efecto a tiempos más tardíos y aumentando el número de inmunizaciones.

Por otra parte, en linfocitos B (CD19⁺) de ganglio poplíteo se indujo activación en los grupos tratados con protoxina y toxina Cry1Ac, al observar un incremento en la expresión del marcador CD69 desde las 24 horas (Fig.8), mientras que en bazo y peritoneo sólo se

observó aumento de la expresión de CD69 a las 24 horas con toxina (Fig. 9 y 10). Lo que pudo ocurrir en bazo y ganglio es que parte del antígeno llegó libre y pudo ser captado por macrófagos del seno subcapsular facilitando la captación del antígeno por los linfocitos B (Murphy, 2012) sin embargo, en bazo la activación fue menor porque es probable que llegue menos antígeno desde el sitio de inyección. Mientras que en peritoneo gran parte de las células en esta cavidad son linfocitos B (alrededor del 40%), los cuales podrían estarse activando localmente antes de que se movilice el antígeno (Ghosn *et al.*, 2010).

Por otro lado, CD25 es la cadena alfa del receptor de IL-2, y se sintetiza ante el estímulo de activación permitiendo la proliferación de los linfocitos B y T al formar el receptor de IL-2 de alta afinidad (Amu, Gjertsson, Tarkowski, & Brisslert, 2006). Ya que es también un marcador de activación de linfocitos se evaluó su expresión en linfocitos sin embargo, no se encontraron incrementos en la expresión de CD25 ni en linfocitos B ni T, en ninguno de los tejidos a ninguno de los tiempos evaluados (Fig. 11 y 15) no obstante, la expresión de CD69 es mucho más temprana que la de CD25 (Cibrian & Sanchez-Madrid, 2017), lo que podría explicar porque no se observaron cambios en la expresión de este receptor a los tiempos estudiados.

Posteriormente, se evaluó la proliferación de linfocitos T y B, y se encontró que en linfocitos T (CD3⁺) las proteínas Cry1Ac no incrementaron significativamente la proliferación ante el reestímulo *in vitro* (Fig. 16). Sin embargo, por la limitación en el número de células obtenidas de los ganglios y lavados peritoneales la proliferación sólo fue evaluada en células de bazo, en donde el incremento y la activación de células dendríticas fue baja, lo que podría explicar la baja respuesta proliferativa en las células T y sería adecuado evaluarla también en ganglio poplíteo.

Por otra parte, en los linfocitos B (CD19⁺) se encontraron dos poblaciones, pequeños (R1) y grandes (R2), y se observó que la toxina Cry1Ac fue capaz de inducir un incremento en la proporción de los linfocitos CD19⁺ grandes, mientras que la de linfocitos pequeños disminuyó (Fig. 17A). La primera población (R1) corresponde a los linfocitos B, ya que el tamaño de la población coincide con el de los linfocitos. Mientras que la población de linfocitos CD19⁺ grandes podrían ser linfocitos B que estaban proliferando y aumentaron su tamaño transitoriamente durante la división celular. Otra posibilidad es que, de acuerdo con la literatura, en bazo existe un tipo de esplenocitos CD19⁺ similares a células dendríticas que se generan a partir de progenitores de linfocitos B y pueden expresarIDO (indolamina 2,3-dioxigenasa), enzima que participa en la regulación de la activación de los linfocitos T

(Johnson III, *et al.*, 2010). En ese estudio encontraron en bazo una población de células CD19⁺ CD11c⁺ después de administrar CpGs y observaron que poseen características como mayor tamaño y granularidad que los linfocitos B, lo que coincide con la población de linfocitos CD19⁺ observada, además expresan marcadores tanto de linfocitos B (CD19, CD23 y CD21) como de células dendríticas (CD11c, CD4, CD8 α) (Johnson III, *et al.*, 2010).

La proliferación en estas poblaciones de linfocitos CD19⁺ se analizó por separado. En los linfocitos B (CD19⁺ pequeños, R1) se observó proliferación ante el reestímulo con la toxina (Fig. 17B), mientras que en los linfocitos CD19⁺ grandes (R2) no se indujo incremento estadísticamente significativo en la proliferación ya que en esta población se observó una proliferación basal alta (Fig. 17C).

En estos ensayos de proliferación se evaluó también la proliferación en células de bazo de ratones no estimulados, es decir administrados sólo con el vehículo PBS, estimulándolas *in vitro* con las proteínas Cry1Ac para determinar si se trataba de una respuesta específica. Se observó que la toxina es capaz de inducir proliferación significativa de los linfocitos B (linfocitos CD19⁺ pequeños) de ratones no estimulados, indicando una activación policlonal (Fig. 18). La interacción entre las proteínas Cry1Ac y los linfocitos B ya se ha evaluado y se encontró que se unen a la superficie de los linfocitos B (Camargo, 2013). Recientemente en una tesis de maestría en proceso (Del Palacio, 2019) se ha propuesto que la unión de la toxina Cry1Ac a los linfocitos B se da en las regiones glicosiladas con N-acetilgalactosamina de las inmunoglobulinas de superficie (BCR). Este posible mecanismo de unión coincide con el descrito en receptores de insectos, en donde el dominio III de la toxina se une a residuos de N-acetilgalactosamina de la caderina, fosfatasa alcalina y aminopeptidasa (Jurat-Fuentes & Crickmore, 2017). Por lo cual, relacionando lo que sabe de la unión en insectos y lo que se propone que ocurre en los linfocitos B, se sugiere una posible explicación a la activación policlonal observada pensando que la toxina, al unirse a estas regiones glicosiladas en las inmunoglobulinas de superficie, pueda lograr el entrecruzamiento del receptor de los linfocitos B activándolos, de una forma no específica, e induciendo su proliferación. Esta activación policlonal inducida por la toxina en los linfocitos B ayudaría a explicar también la formación de hiperplasias linfoides en intestino grueso observadas en un modelo de alergia intestinal con tCry1Ac (Santos-Vigil, 2018).

Finalmente, después de observar que la toxina Cry1Ac indujo proliferación se decidió evaluar que citocinas estaban presentes en los cultivos de células de bazo, ganglio poplíteo,

peritoneo y ganglio mesentérico reestimuladas *in vitro* con las proteínas Cry1Ac, lo que además permitió completar la caracterización del perfil de citocinas inducido por las proteínas Cry1Ac.

En bazo se observó que ambas proteínas inducen la síntesis de IL-6 y TNF- α , que coincide con lo ya reportado en macrófagos aislados de bazo y de línea celular (Moreno-Fierros *et al.*, 2013; Torres-Martinez *et al.*, 2016), e IL-10 (Fig. 20) sin embargo, en este trabajo las cuantificaciones se realizaron en células totales, por lo cual las citocinas fueron producidas tanto por macrófagos, células dendríticas y linfocitos, generando diferencias en el perfil de citocinas. En los ganglios poplíteo y mesentérico, los incrementos no fueron significativos, lo cual pudo ser provocado por la diferencia en el número de células empleadas para estos ensayos, ya que en bazo se usaron 4 millones, mientras que en ganglio poplíteo sólo se utilizaron 1 millón (Fig. 20 y 21). En peritoneo no se observaron diferencias entre los tratamientos, ya que las concentraciones basales de citocinas en el grupo vehículo estaban muy elevadas, con excepción del IFN- γ en la que se observó un incremento significativo con pCry1Ac (Fig. 21).

7. Conclusiones

1. El estímulo *in vivo* con la protoxina y la toxina Cry1Ac provocó un incremento y activación transitoria en las células dendríticas principalmente del ganglio poplíteo. Aunque con efectos diferenciales en magnitud y temporalidad, ambas proteínas indujeron la activación de células dendríticas y linfocitos B en bazo, ganglio poplíteo y peritoneo, lo cual contribuye a completar la caracterización del mecanismo adyuvante de la pCry1Ac, el cual consiste en la capacidad de reclutar y activar células presentadoras de antígeno.
2. La toxina Cry1Ac indujo proliferación de linfocitos B de bazo, tanto de animales no estimulados como reestimulados, por lo tanto, es un activador policlonal de linfocitos B.

8. Perspectivas

- Realizar estudios para analizar el efecto *in vivo* de las proteínas hacia otro antígeno.
- Evaluar si la activación de células dendríticas aisladas de ganglio poplíteo es funcional para activar linfocitos inexpertos.
- Completar los perfiles de citocinas y quimiocinas.
- Probar otra ruta de inmunización para analizar activación en mucosas.

9. Referencias

- Amu, S., Gjertsson, I., Tarkowski, A., & Brisslert, M. (2006). B-cell CD25 expression in murine primary and secondary lymphoid tissue. *Scand J Immunol*, 64(5), 482-492. doi:10.1111/j.1365-3083.2006.01832.x
- Bollampalli, V. P., Nysten, S., & Rothfuchs, A. G. (2016). A CFSE-based Assay to Study the Migration of Murine Skin Dendritic Cells into Draining Lymph Nodes During Infection with *Mycobacterium bovis* Bacille Calmette-Guerin. *J Vis Exp*(116). doi:10.3791/54620
- Bronte, V., & Pittet, M. J. (2013). The spleen in local and systemic regulation of immunity. *Immunity*, 39(5), 806-818. doi:10.1016/j.immuni.2013.10.010
- Camargo, S. (2013). *Estudio sobre el efecto de la toxina y protoxina Cry1Ac de Bacillus thuringiensis en la activación de linfocitos T*. (Tesis de Licenciatura), Universidad Nacional Autónoma de México, Estado de México.
- Carlow, D. A., Gold, M. R., & Ziltener, H. J. (2009). Lymphocytes in the peritoneum home to the omentum and are activated by resident dendritic cells. *J Immunol*, 183(2), 1155-1165. doi:10.4049/jimmunol.0900409
- Cibrian, D., & Sanchez-Madrid, F. (2017). CD69: from activation marker to metabolic gatekeeper. *Eur J Immunol*, 47(6), 946-953. doi:10.1002/eji.201646837
- Del Palacio, M. (2019) *Mecanismo de unión y activación en linfocitos B inducido por la protoxina y toxina Cry1Ac*. (Tesis de Maestría), Universidad Nacional Autónoma de México, Estado de México.
- Evdokimov, A. G., Moshiri, F., Sturman, E. J., Rydel, T. J., Zheng, M., Seale, J. W., & Franklin, S. (2014). Structure of the full-length insecticidal protein Cry1Ac reveals intriguing details of toxin packaging into in vivo formed crystals. *Protein Sci*, 23(11), 1491-1497. doi:10.1002/pro.2536
- Ghosn, E. E., Cassado, A. A., Govoni, G. R., Fukuhara, T., Yang, Y., Monack, D. M., Herzenberg, L. A. (2010). Two physically, functionally, and developmentally distinct peritoneal macrophage subsets. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(6), 2568-2573. doi:10.1073/pnas.0915000107
- Gonzalez-Gonzalez, E., Garcia-Hernandez, A. L., Flores-Mejia, R., Lopez-Santiago, R., & Moreno-Fierros, L. (2015). The protoxin Cry1Ac of *Bacillus thuringiensis* improves the protection conferred by intranasal immunization with *Brucella abortus* RB51 in a mouse model. *Vet Microbiol*, 175(2-4), 382-388. doi:10.1016/j.vetmic.2014.11.021
- Guerrero, G. G., Russell, W. M., & Moreno-Fierros, L. (2007). Analysis of the cellular immune response induced by *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxins in mice: effect of the hydrophobic motif from diphtheria toxin. *Mol Immunol*, 44(6), 1209-1217. doi:10.1016/j.molimm.2006.06.007

- Ibarra-Moreno, S., Garcia-Hernandez, A. L., & Moreno-Fierros, L. (2014). Coadministration of protoxin Cry1Ac from *Bacillus thuringiensis* with metacestode extract confers protective immunity to murine cysticercosis. *Parasite Immunol*, 36(6), 266-270. doi:10.1111/pim.12103
- Jurat-Fuentes, J. L., & Adang, M. J. (2004). Characterization of a Cry1Ac-receptor alkaline phosphatase in susceptible and resistant *Heliothis virescens* larvae. *Eur J Biochem*, 271(15), 3127-3135. doi:10.1111/j.1432-1033.2004.04238.x
- Jurat-Fuentes, J. L., & Crickmore, N. (2017). Specificity determinants for Cry insecticidal proteins: Insights from their mode of action. *J Invertebr Pathol*, 142, 5-10. doi:10.1016/j.jip.2016.07.018
- Kamala, T. (2007). Hock immunization: a humane alternative to mouse footpad injections. *J Immunol Methods*, 328(1-2), 204-214. doi:10.1016/j.jim.2007.08.004
- Legorreta-Herrera, M., Meza, R. O., & Moreno-Fierros, L. (2010). Pretreatment with Cry1Ac protoxin modulates the immune response, and increases the survival of Plasmodium-infected CBA/Ca mice. *J Biomed Biotechnol*, 2010, 198921. doi:10.1155/2010/198921
- Mark, D. A., Donovan, C. E., De Sanctis, G. T., Krinzman, S. J., Kobzik, L., Linsley, P. S., . . . Finn, P. W. (1998). Both CD80 and CD86 co-stimulatory molecules regulate allergic pulmonary inflammation. *Int Immunol*, 10(11), 1647-1655.
- Moreno-Fierros, L., Garcia-Hernandez, A. L., Ilhuicatz-Alvarado, D., Rivera-Santiago, L., Torres-Martinez, M., Rubio-Infante, N., & Legorreta-Herrera, M. (2013). Cry1Ac protoxin from *Bacillus thuringiensis* promotes macrophage activation by upregulating CD80 and CD86 and by inducing IL-6, MCP-1 and TNF-alpha cytokines. *Int Immunopharmacol*, 17(4), 1051-1066. doi:10.1016/j.intimp.2013.10.005
- Murphy, K. (2012). *Janeway's Immunobiology* (8th ed.). United States of America: Garland Science Taylor & Francis Group.
- Newson, J., Stables, M., Karra, E., Arce-Vargas, F., Quezada, S., Motwani, M., . . . Gilroy, D. W. (2014). Resolution of acute inflammation bridges the gap between innate and adaptive immunity. *Blood*, 124(11), 1748-1764. doi:10.1182/blood-2014-03-562710
- Ortega, S. (2014). *Estudio sobre el efecto de la toxina y protoxina Cry1Ac de Bacillus thuringiensis en la activación de linfocitos T*. (Tesis de licenciatura), Universidad Nacional Autónoma de México, Estado de México
- Pigott, C. R., King, M. S., & Ellar, D. J. (2008). Investigating the properties of *Bacillus thuringiensis* Cry proteins with novel loop replacements created using combinatorial molecular biology. *Appl Environ Microbiol*, 74(11), 3497-3511. doi:10.1128/aem.02844-07
- Rodriguez-Monroy, M. A., & Moreno-Fierros, L. (2010). Striking activation of NALT and nasal passages lymphocytes induced by intranasal immunization with Cry1Ac protoxin. *Scand J Immunol*, 71(3), 159-168. doi:10.1111/j.1365-3083.2009.02358.x

- Rojas-Hernandez, S., Rodriguez-Monroy, M. A., Lopez-Revilla, R., Resendiz-Albor, A. A., & Moreno-Fierros, L. (2004). Intranasal coadministration of the Cry1Ac protoxin with amoebal lysates increases protection against *Naegleria fowleri* meningoencephalitis. *Infect Immun*, 72(8), 4368-4375. doi:10.1128/iai.72.8.4368-4375.2004
- Rubio-Infante, N., Ilhuicatzí-Alvarado, D., Torres-Martínez, M., Reyes-Grajeda, J. P., Nava-Acosta, R., González-González, E., & Moreno-Fierros, L. (2018). The Macrophage Activation Induced by *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac Protoxin Involves ERK1/2 and p38 Pathways and the Interaction with Cell-Surface-HSP70. *J Cell Biochem*, 119(1), 580-598. doi:10.1002/jcb.26216
- Rubio-Infante, N., & Moreno-Fierros, L. (2016). An overview of the safety and biological effects of *Bacillus thuringiensis* Cry toxins in mammals. *J Appl Toxicol*, 36(5), 630-648. doi:10.1002/jat.3252
- Sansom, D. M., Manzotti, C. N., & Zheng, Y. (2003). What's the difference between CD80 and CD86? *Trends Immunol*, 24(6), 314-319.
- Santos-Vigil, K. I., Ilhuicatzí-Alvarado, D., García-Hernández, A. L., Herrera-García, J. S., & Moreno-Fierros, L. (2018). Study of the allergenic potential of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin following intra-gastric administration in a murine model of food-allergy. *Int Immunopharmacol*, 61, 185-196. doi:10.1016/j.intimp.2018.05.029
- Sen, D., Forrest, L., Kepler, T. B., Parker, I., & Cahalan, M. D. (2010). Selective and site-specific mobilization of dermal dendritic cells and Langerhans cells by Th1- and Th2-polarizing adjuvants. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(18), 8334-8339. doi:10.1073/pnas.0912817107
- Shortman, K., & Liu, Y. J. (2002). Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat Rev Immunol*, 2(3), 151-161. doi:10.1038/nri746
- Slavik, J. M., Hutchcroft, J. E., & Bierer, B. E. (1999). CD28/CTLA-4 and CD80/CD86 families: signaling and function. *Immunol Res*, 19(1), 1-24. doi:10.1007/bf02786473
- Soberón, M., & Bravo, A. (2007). Las toxinas Cry de *Bacillus thuringiensis*: modo de acción y consecuencias de su aplicación. *Biotecnología*, 14(CS3), 303-313.
- Torres-Martínez, M., & Moreno-Fierros, L. (2017). Efectos inmunológicos y adyuvantes de las proteínas Cry1A efectos inmunológicos y adyuvantes de las proteínas Cry1A *Rev Educ Bioquímica*, 36(4), 118-128.
- Torres-Martínez, M., Rubio-Infante, N., García-Hernández, A. L., Nava-Acosta, R., Ilhuicatzí-Alvarado, D., & Moreno-Fierros, L. (2016). Cry1Ac toxin induces macrophage activation via ERK1/2, JNK and p38 mitogen-activated protein kinases. *Int J Biochem Cell Biol*, 78, 106-115. doi:10.1016/j.biocel.2016.06.022
- Vázquez-Padron, R. I., Moreno-Fierros, L., Neri-Bazan, L., de la Riva, G. A., & Lopez-Revilla, R. (1999). Intragastric and intraperitoneal administration of Cry1Ac protoxin from *Bacillus*

thuringiensis induces systemic and mucosal antibody responses in mice. *Life Sci*, 64(21), 1897-1912.

- Vázquez, M. B., Sureda, M., & Rebollo, J. (2011). Células dendríticas I: aspectos básicos de su biología y funciones. *Inmunología*. doi:10.1016/j.inmuno.2011.10.001
- Voisin, B., Mairhofer, D. G., Chen, S., Stoitzner, P., Mueller, C. G., & Flacher, V. (2014). Anatomical distribution analysis reveals lack of Langerin+ dermal dendritic cells in footpads and tail of C57BL/6 mice. *Exp Dermatol*, 23(5), 354-356. doi:10.1111/exd.12373
- Zhang, X., Candas, M., Griko, N. B., Taussig, R., & Bulla, L. A. (2006). A mechanism of cell death involving an adenylyl cyclase/PKA signaling pathway is induced by the Cry1Ab toxin of *Bacillus thuringiensis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(26), 9897-902.