



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

“IDENTIFICACIÓN DE RECEPTORES AFINES A LAS PROTEÍNAS CRY1AC DE *BACILLUS THURINGIENSIS* EN LINFOCITOS MURINOS: PARTICIPACIÓN DE LA N-ACETIL-GALACTOSAMINA EN LA UNIÓN DE LA TOXINA”.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:
MAURICIO ANTONIO DEL PALACIO ORTEGA

TUTOR PRINCIPAL
DRA. LETICIA MORENO FIERROS
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
DR. CARLOS ROSALES LEDEZMA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
DR. ENRIQUE ORTEGA SOTO
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

Ciudad de México. Diciembre, 2020



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.

Índice

Agradecimientos institucionales	4
Agradecimientos	5
Abreviaturas	6
Resumen	8
Introducción	10
Sistema inmunitario mucosal	10
Adyuvantes Mucosales	12
Proteína Cry1Ac	14
Glicosilación proteica	16
Antecedentes	17
Planteamiento de Problema y Justificación	20
Hipótesis	21
Objetivos	22
Objetivo General:	22
Particulares:	22
Estrategia Experimental	23
Materiales y Métodos	26
Cultivo Celular de Linfocitos y Separación de células T y B.	26
Obtención de la Protoxina y Toxina Cry1Ac.	26
Conjugación de Perlas de Sefarosa a toxina o protoxina Cry1Ac.	26
Ensayos de Blot Ligando	28
Ensayos de ELISA para evaluar interacción de Cry1Ac con inmunoglobulinas	28
Resultados	30
Obtención e identificación de proteínas precipitadas por la Toxina Cry1Ac en linfocitos totales	31
Obtención e identificación de proteínas precipitadas por la protoxina Cry1Ac en linfocitos	36
Obtención de Proteínas Precipitadas en Linfocitos aislados, T y B	39
Ubicación de las proteínas de superficie precipitadas por la Toxina Cry1Ac	42
Identificación de proteínas precipitadas con Cry1Ac en linfocitos previamente descritas en macrófagos	45
La unión de la tCry1Ac es dependiente de la N-Acetilgalactosamina (GalNAc)	48
La interacción tCry1Ac-GalNAc es específica y no se comparte con otros carbohidratos modificados	49

La toxina precipita a proteínas de linfocitos de manera dependiente e independiente a la GalNAc	51
La Toxina Cry1Ac precipita a las inmunoglobulinas M en suero e inmunoglobulinas de superficie (BCR) en linfocitos B de diversas especies	53
La Toxina Cry1Ac interactúa de manera dosis dependiente con las inmunoglobulinas de suero y lavados intestinales	55
Discusión	56
Conclusión	64
Bibliografía	65

Índice de Figuras

1.	Proteínas de linfocitos precipitadas por la interacción con la toxina Cry1Ac	32
2.	Proteínas de linfocitos de precipitadas por la interacción con la protoxina Cry1Ac	36
3.	Proteínas de linfocitos T y B aislados, precipitadas por la interacción con la toxina Cry1Ac	39
4.	Proteínas de superficie Inmunoprecipitadas por la toxina Cry1Ac en linfocitos	43
5.	Inmunoprecipitación de proteínas identificadas previamente macrófago e identificación de la unión de inmunoglobulina G a la toxina Cry1Ac	46
6.	La unión de la tCry1Ac a las inmonoglobulinas se inhibe ante la saturación de GalNAc.	48
7.	La igG de conejo tiene afinidad por la toxina Cry1Ac	48
8.	La unión específica de la tCry1Ac a Inmunoglublina G (IgG) es mediada únicamente por la GalNAc	50
9.	La unión de toxina Cry1Ac a algunas proteínas de linfocitos como la vimentina no depende de GalNAc	52
10.	Las inmunoglobulinas de superficie BCR son precipitadas por la tCry1Ac	53
11.	La unión de la tCry1Ac requiere que la Ig se presenta en forma nativa, además la unión se presenta en Ig's de distintas especies animales, incluida la humana	54
12.	La IgM de suero y de superficie es precipitada por la tCry1Ac	54
13.	La tCry1Ac se une a diferentes isotipos, como IgG e IgM	55

Agradecimientos institucionales

Agradezco al Posgrado de Ciencias Bioquímicas de la UNAM por abrirme las puertas y apoyarme durante la realización de mis estudios de maestría, por su comprensión y amabilidad al ayudarme a resolver problemas que aparecieron a lo largo de mis estudios.

Durante la realización de este trabajo de investigación se contó con el apoyo del Programa de Becas para Estudios de Posgrado del CONACYT con CVU 972564 y numero de apoyo 720811.

Este proyecto fue financiado por los siguientes apoyos:

CONACYT 283319

PAPIIT IN223319

Agradecimientos personales

A la Dra. Leticia Moreno Fierros por haberme dado la oportunidad de trabajar en su laboratorio, por su apoyo y su apertura, por haberme aceptado sin algún prejuicio y haber confiado en que lograría esto. Si logro la mitad de lo que usted en mi carrera profesional, ya estoy del otro lado. A mis cotutores Rosales y Ortega, porque lo exigente que fueron sus comentarios hizo que refinara mi conocimiento

A mi familia, por haberme apoyado aun cuando no entendían bien de que trataba estas cosas de los posgrados, costó trabajo pero se cumplió, ahora a lo que sigue.

A mis amigos, por siempre escucharme y aconsejarme sobre como no tronar en el posgrado, no los nombraré porque ustedes saben quienes son y después de años de amistad no es necesario mencionarlos, he tratado de hacérselos saber desde que inicié esto. < tres

A Sharon, porqué llegó en el momento indicado, por preocuparse y desvelarse conmigo, por ser mi soporte cuando más lo necesitaba. Prácticamente, esto es tanto tuyo como mío. Te amo.

Al laboratorio, porque siempre hay un ambiente de risas y plática, hasta que nos toca sacar resultados. Siempre que hay una duda, alguien esta dispuesto a contestarla. De ahí también obtuve grandes amistades que me guiaron sobre este camino . Gracias a todos y cada uno de ustedes por hacerme sentir en casa.

Honestamente, no soy bueno para expresarme, por algo tuve como 11 revisiones de la tesis así que si olvido a alguien:

Gracias a _____ . No lo habría logrado sin ti.

(escribe tu nombre)

Abreviaturas

ABTS: Ácido 2,2'-azino-bis 3-ethylbenzotiazolona-6-sulfónico.

BALT: Tejido linfóide asociado bronquial.

CCL2: Ligando de quimiocina 2.

CCL3: Ligando de quimiocina 3.

CCL5: Ligando de quimiocinas 5.

CXCL8: Interleucina 8.

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

ELISA: Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas.

ERK: Kinasa regulada por señalización extracelular.

Fab: Fracción de reconocimiento de epítipo.

Fc: Fracción Cristalizable.

FITC: Isotiocianato de fluoresceína.

GalNAc: N-Acetil-Galactosamina.

GALT: Tejido linfóide asociado intestinal.

GlcNAc: N-Acetil-Glucosamina.

HSP 70: Proteína de choque térmico 70.

IFN- γ : Interferón gamma.

IgG: Inmunoglobulina A.

IgG: Inmunoglobulina G.

IgG: Inmunoglobulina M.

IL-1: Interleucina 1.

IL-6: Interleucina 6.

IL-10: Interleucina 10.

IL12: Interleucina 12.

IL-18: Interleucina 18.

IPTG: Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido.

LP: Lámina Propia.

MALT: Tejido linfoide asociado a la mucosa.

MAPK: Proteína cinasa activada por mitógeno.

MCP-1: Proteína quimiotáctica de monocitos 1.

MHC 1: Complejo mayor de histocompatibilidad 1.

MHC 2: Complejo mayor de histocompatibilidad 2.

mLN: Ganglios linfáticos mesentéricos.

NADPH: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato.

NLR: Receptor tipo Nod.

p38: Proteína cinasa activada por mitógeno p 38.

PAMP: Patrones moleculares asociados a daños.

pCry1Ac: Protoxina cry1Ac.

PI3K: Fosfoinositol 3-cinasa.

PMCA: Ca²⁺ ATPasa de membrana plasmática.

PMSF: Fluoruro de fenilmetilsulfonilo.

PP: Placas de Peyer.

PVDF: Fluoruro de polivinilideno.

RIPA: Buffer de ensayo de Radioinmunoprecipitación.

SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida dodecil sulfato de sodio.

tCry1Ac: Toxina Cry1Ac.

TLR: receptor tipo Toll.

TNF- α : Factor de Necrosis Tumoral alfa.

VALT: Tejido linfoide asociado a la vagina.

Resumen

Los efectos inmunológicos de las proteínas protoxina y toxina Cry1Ac de *Bacillus thuringiensis* han sido ampliamente estudiados en nuestro laboratorio. En particular, la protoxina misma que tiene un efecto adyuvante protector en diferentes modelos de infección, pero ambas proteínas tienen la capacidad de activar macrófagos vía MAPKs; asimismo se han identificado algunas proteínas de unión en macrófagos. Los efectos de las proteínas Cry1Ac en linfocitos han sido menos estudiados, pero existe evidencia de su unión e inducción de activación.

En el presente estudio se identificaron varias proteínas de unión a toxina y protoxina Cry1Ac en linfocitos T y B murinos; los resultados del análisis indican que la primera presenta un mayor repertorio de interacción en linfocitos B. Por otra parte, al realizar inmunoprecipitaciones de linfocitos el análisis por *Western Blot* de proteínas de unión a toxina y protoxina Cry1Ac identificadas previamente en macrófagos, de manera sorprendente detectamos que las inmunoglobulinas normalmente utilizadas para marcaje fluorescente de distintas especies como conejo o cabra se unían a la toxina Cry1Ac. A partir de estos hallazgos nos enfocamos a estudiar la unión de la toxina a linfocitos B y en particular a la unión de la toxina Cry1Ac a inmunoglobulinas. Al consultar la bibliografía se encontraron reportes en los que se demostró la participación de la O-glicosilación de la N-Acetil-Galactosamina (GalNAc) en la unión de la toxina a las células epiteliales de intestino de insectos blanco y considerando que este tipo glicosilaciones están presentes en mamíferos y en particular en las inmunoglobulinas; decidí evaluar si la unión de la toxina Cry1Ac a proteínas de linfocitos dependía de este tipo de glicosilación.

Los resultados mostraron que efectivamente la unión entre la toxina Cry1Ac y las inmunoglobulinas es dependiente de GalNAc. Corroboré por *Western Blot* que, en diversas inmunoglobulinas ricas en este tipo de glicosilaciones, se preservó la afinidad entre distintos isotipos (Inmunoglobulina G y M) en especies como burro, chivo, conejo, ratón y humano. La unión específica de la toxina Cry1Ac a GalNAc se demostró mediante ensayos de inhibición donde la unión disminuyó significativamente en presencia de la GalNAc mas no así en presencia de diversos glicósidos como el isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) y la N-Acetil-glucosamina (GlcNAc). Los hallazgos más relevantes de este estudio fueron las diferencias encontradas entre protoxina y toxina en su capacidad de unión a inmunoglobulinas. Asimismo, se observó que la toxina presenta dos tipos de unión, una dependiente de glicosilación como fue el caso de las inmunoglobulinas y otro donde la glicosilación puede estar ausente. Por otro lado, los resultados de la identificación de proteínas de linfocitos que interaccionan con la protoxina y toxina Cry1Ac, también mostraron afinidad por las histonas, un grupo de proteínas nucleares altamente alcalinas

que pueden presentar muchos y variados tipos de modificaciones postransduccionales como las glicosilaciones anteriormente mencionadas.

Se identificaron entre las proteínas de unión a integrantes de las 4 familias de histonas. Además, entre las proteínas de unión a Cry1Ac, se presentaron diversas proteínas de señalización intracelular como la GIMAP-4, SORC3, S100A o DOCK9, junto a proteínas de remodelación y estructura celular, tal como la coronina 1A, vimentina y actina. La identificación de todas estas proteínas podría evidenciar los mecanismos de señalización y reestructuración celular, que ocurren después de la unión de las proteínas Cry1Ac a los linfocitos T y B. Como conclusión se propone al grupo de las inmunoglobulinas como posibles receptores, específicamente a la IgM, debido a su abundancia en la superficie de linfocitos B. Los resultados que se reportan en esta investigación señalan hallazgos sobre los que se debe continuar profundizando a fin de entender el mecanismo de los efectos inmunoestimulantes de la toxina Cry1Ac sobre linfocitos B.

Introducción

Sistema inmunitario mucosal

Los tejidos mucosales del tracto gastrointestinal, genitourinario y respiratorio, son la vía principal de entrada de patógenos al organismo. Se considera que cerca de 70% de los agentes infecciosos entran a través de mucosas¹. Estos sitios forman en conjunto una de las superficies de contacto más grandes en el cuerpo humano; en el caso de tracto gastrointestinal se ha estimado que el área es cercana a 400m² y cuenta con el 80% de los linfocitos de todo el cuerpo. El sistema inmunitario mucosal contiene una gran variedad de células, y está compuesto de epitelios, células linfoides y no linfoides, así como de moléculas efectoras las cuales destacan anticuerpos, quimiocinas y citocinas².

El sistema inmunitario de mucosas desempeña un papel vital en el mantenimiento de la homeostasis, así como en la vigilancia constante de posibles agentes dañinos. El sistema inmune de la mucosa se divide esencialmente en 2 compartimentos conocidos como sitios inductivos y efectores, que trabajan juntos para mantener la barrera de la mucosa. Los sitios inductivos consisten principalmente en tejido linfoide asociado a la mucosa (MALT) que dependiendo de la localización sistémica puede referirse en forma abreviada (por sus siglas en inglés) como GALT, BALT, VALT, los cuales son tejidos linfoides asociado intestinal, bronquial o vaginal, respectivamente. El sistema inmune intestinal puede dividirse en sitios inductores y efectores. Los sitios inductores incluyen los tejidos linfoides asociados al intestino (GALT), como las placas de Peyer (PP) y los folículos linfoides aislados y los ganglios linfáticos mesentéricos que drenan el intestino (mLN); mientras que la lámina propia (LP) y el epitelio constituyen los principales sitios efectores. Los sitios efectores están conformados del compartimiento intraepitelial en el que predominan linfocitos CD8+, y la lámina propia que es el tejido conectivo debajo del epitelio en el que predominan los linfocitos T- CD4+(respecto a los CD8+), los linfocitos B y células plasmáticas²

Se considera que las estructuras organizadas del GALT (PP y folículos linfoides aislados) son fundamentales para el reconocimiento inmune de antígenos particulados como bacterias y virus. Esto refleja la capacidad especial de las llamadas células "*microfold*" (células M) presentes en el epitelio de las PP o de folículos linfoides aislados para transportar activamente material desde la luz intestinal hacia las áreas linfoides de la GALT. En resumen, se puede considerar, en los sitios inductores, se produce el muestreo de los antígenos y se estimula a los linfocitos T y B vírgenes afines, mientras que, en los sitios efectores, es donde los anticuerpos específicos y las células inmunes realizan sus acciones protectoras³.

¹ Lamichhane et al, 2014

² Woodrow et al, 2012

³ Shakya et al, 2016

Los tejidos linfoides de la mucosa son diferentes de los ganglios linfáticos periféricos en sus conexiones anatómicas y orientación, composición celular y contribución a las respuestas inmunes, además, los diferentes sitios de la mucosa tienen patrones de organización distintivos con respecto a las células inmunes, las superficies de la mucosa generalmente se clasifican como mucosa Tipo I o Tipo II; las mucosas de Tipo I incluyen las superficies del pulmón y el intestino, mientras que las mucosas de Tipo II incluyen las superficies de la boca, el esófago y la córnea⁴.

⁴ Aoshi, 2017

Adyuvantes Mucosales

Las vacunas parenterales a menudo no confieren protección en las superficies de las mucosas y las respuestas inmunitarias locales son esenciales para la protección contra enfermedades que ocurren principalmente por la vía de la mucosa⁵. La vacunación mucosal presenta retos como: la gran dificultad que presenta superar la tolerancia oral, este fenómeno es la baja respuesta que puede tener el sistema inmune a antígenos ingeridos oralmente. Para lograr esto se requieren adyuvantes mucosales que mejora la respuesta del sistema inmune y favorecen la inducción de memoria⁶.

La administración de algunas vacunas en una superficie localizada de la mucosa provoca la protección inmune en casi todas las superficies de manera general en la mucosa, así como potencialmente la inducción de la inmunidad sistémica. Además, la aplicación de las vacunas en la mucosa ofrecen varias ventajas; en particular, la administración oral es un enfoque simple y económico para administrar una vacuna en masa, sin embargo, los antígenos administrados por esta vía podrían ser sometidos a proteólisis dentro del estómago, por lo que resulta natural, el interés en el desarrollo de vacunas mucosales; apoyándonos en esta técnica, el estudio de adyuvantes en el sistema mucosal puede conferir una ventaja frente a vacunas sistémicas, al inducir respuestas como sIgA, dificultando la entrada a patógeno, o aumentando la inmunovigilancia en estos tejidos, además de las respuestas que una vacuna sistémica puede conferir⁷.

Los adyuvantes, por su parte, pueden disminuir la cantidad de antígeno requerido, aumentando la inmunogenicidad de éste, además, que los adyuvantes pueden ser usados en distintas formulaciones como es el caso de las sales de aluminio, por lo que el éxito de una vacuna depende en gran parte del compuesto que se coadministre como adyuvante. Un adyuvante ideal debe presentar las siguientes propiedades: 1) No debe ser tóxico dentro del rango de la dosis administrada. 2) Debe estimular una fuerte respuesta inmune humoral y/o celular. 3) Debe proveer buena memoria inmunológica. 4) No debe inducir hipersensibilidad o autoinmunidad. 5) No debe ser mutagénico, carcinogénico o teratogénico. 6) No debe ser pirogénico. 7) Debe ser estable dentro de amplios rangos de temperatura, pH y tiempo de almacenamiento⁸. Todas estas características impulsan la investigación de nuevas moléculas adyuvantes que debe considerar diversos parámetros: La promoción de una respuesta suficiente para desarrollar o activar al sistema inmune innato e inducir un efecto en el sistema adaptativo de manera duradera, evitando efectos adversos como la toxicidad, el desarrollo de alergias y enfermedades autoinmunes.

⁵ Vela et al, 2017

⁶ Zeng, 2016

⁷ Iyano & Zegami, 2015

⁸ Rhee, 2012

Diversos esfuerzos se han hecho en el desarrollo de adyuvantes mucosales para permanecer en este estrecho margen, entre este repertorio se encuentran las toxinas bacterianas como la toxina de cólera (CT) y la toxina termolábil (LT) de manera recombinante, se disminuye su toxicidad junto a su efecto inmunogénico además que pueden causar diarrea en humanos⁹. Los adyuvantes tienen un efecto amplio en distintos tipos celulares, lo que causa liberación y aumento de citocinas y anticuerpos, así como inducción de respuestas en Linfocitos Th1 o Th2, Citolíticos (CTL) y B¹⁰.

Por mucho tiempo el efecto de los adyuvantes fue elusivo, recientemente se han encontrado las vías de activación que tienen por medio de los receptores a los cuales se unen distintos tipos de adyuvantes, podemos distinguir algunos de ellos como agonistas del sistema inmune innato¹¹ y funcionan como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP). Son reconocidos directamente por distintos receptores, como los receptores Toll-like (TLR), los receptores tipo RIG-I (RLR), los receptores tipo Nod (NLR), los receptores tipo C de lectina, entre otros e inducen respuestas proinflamatorias de citocinas, denominadas colectivamente "respuestas inmunes innatas"¹².

Los adyuvantes también pueden aumentar la producción de citocinas y quimiocinas como CCL2, CCL3, CCL5, CXCL8, además de IL-1, IL-6, IL12, IL-18 y TNF- α aumentando el reclutamiento celular por el efecto proinflamatorio, estos efectos pueden favorecer la presentación de antígeno, o la proliferación celular de linfocitos. Los efectos celulares se deben a vías de señalización activadas como MyD88, IRAK y TRAF-6, siendo dependientes de estimulación por TLR, así como otras vías de señalización independientes, como MAPK, en específico las vías de ERK y p38¹³.

⁹ Lycke, 2012

¹⁰ Cox & Coulter, 1997

¹¹ Lamichhane et al., 2014

¹² Srivastava et al, 2015

¹³ Awate et al, 2013

Proteína Cry1Ac

La bacteria Gram- positiva *Bacillus thuringiensis* produce en su fase de esporulación, proteínas inactivas que tienen su efecto en diversos tipos de insectos, estas proteínas paraesporales se cristalizan, formando cuerpos de inclusión que al ingerirse por sujetos susceptibles son tóxicos; entre las proteínas que producen *B. thuringiensis* destacan las familias de proteínas Cyt y Cry, siendo estas últimas ampliamente usadas como bioinsecticidas en la agricultura. Hay cerca de 74 tipos de proteínas Cry descritas, las cuales en su forma toxina, tiene 3 dominios (3d-Cry), estas son moléculas globulares que se denominan toxinas formadoras de poro (PFT) y tiene como mecanismo de acción general la formación de canales debido a la unión de sitios con alta afinidad, que causan la muerte del insecto de 1 a 2 días después¹⁴.

La proteína Cry1Ac pertenece a la familia de las proteínas Cry, de la clase de las δ -endotoxinas, en su forma protoxina, tiene 7 dominios con una secuencia de 1178 aminoácidos y peso de 130 kDa, al ser ingerida, se activa en el intestino por medio de proteasas y se solubiliza debido al pH alcalino, como toxina es altamente resistente a proteólisis, teniendo afinidad por receptores específicos en invertebrados. Estas toxinas son consideradas inocuas para insectos no blancos y vertebrados, de ahí su uso como bioinsecticidas. Al solubilizarse, las proteínas tienen afinidad por receptores en la parte apical de las células intestinales de los insectos blancos, como la aminopeptidasa-N (APN) y la fosfatasa alcalina (ALP) que, al unirse a estos permite la localización y concentración de la toxina Cry, formando poros y lisis celular causando la muerte del insecto. El dominio I de esta proteína tiene 7 hélices α antiparalelas y es el responsable de la formación del poro y la oligomerización en el insecto blanco. El dominio II se caracteriza por 3 estructuras β plegadas, este dominio interactúa con los receptores putativos de las células epiteliales confiriendo especificidad. El dominio III también muestra importancia en la especificidad, unión al receptor y estabilidad, su estructura se describe como 2 estructuras β - plegadas antiparalelas en forma de sándwich¹⁵.

La toxina Cry1Ac tiene un mecanismo de inserción en varios pasos, como es una pequeña proteólisis en el extremo amino terminal, el cual facilita la formación de un tetrámero que se inserta en la membrana y forma el poro, por medio de la unión a APN, la cual está anclada en zonas ricas en colesterol y fosfolípidos, conocidos como balsas lipídicas, estos sitios flexibles facilitan la inserción de los oligómeros de Cry1Ac, al formar los poros, permiten el paso de agua y iones, causando lisis osmótica de las células epiteliales¹⁶. Parte fundamental del efecto tóxico es la unión de tipo lectina que presenta la toxina Cry1Ac, esta región reconoce N-Acetil Glucosamina (GalNAc), que es necesaria para la unión a proteínas como

¹⁴ Xu et al., 2014

¹⁵ Minghui Jin & Chongyu Liao, 2019

¹⁶ Heckel, D.G 2020

se ha reportado en 2 receptores conocidos en insectos, los cuales son Aminopeptidasa N (APN), y Fosfatasa Alcalina (ALP)¹⁷.

La unión de la toxina a los receptores por medio del GalNAc, es el primer paso para la formación del poro y el efecto lítico, ya que, en diversos estudios la administración de GalNAc, disminuye la unión y la permeabilidad de la membrana celular en aislados intestinales. Esto no sucede con análogos glucosídicos como sería la Galactosa (Gal) o la N-Acetil Glucosamina (GlcNAc) los cuales al administrarse en las mismas condiciones no afectan a la unión y permeabilidad, esto muestra la selectividad a la unión de proteínas que tienen este monosacárido. El efecto de unión se debe principalmente a 5 aminoácidos localizados en el dominio III, los cuales son Q509, N510, R511, Y513 y W545, que al mutarse disminuyeron significativamente la unión y toxicidad de la Cry1Ac en insectos¹⁸.

Por otro lado, es de interés considerar que GalNAc se expresa ubicuamente en mamíferos además de insectos, específicamente, en eritrocitos; como parte importante de los antígenos ABO al formar parte integral de la estructura del antígeno. En un estudio, Mezzomo y colaboradores reportaron, al administrar Cry1Ac *in vivo* a ratones de manera intraperitoneal y oral con la intención de simular las vías parenterales y mucosales, se favoreció la lisis celular de eritrocitos, además se indujo la formación de micronúcleos en el linaje eritroide al obtenerse muestra de medula ósea¹⁹. Aunque la toxina Cry1Ac no ha mostrado toxicidad en mamíferos, es pertinente el estudiar el efecto de las proteínas Cry1Ac en estas células, mostrando relación sobre la activación y proliferación celular antes mencionados, de manera que los mecanismos moleculares que se presentan en insectos pueden compartirse en modelos animales.

¹⁷ Burton et al, 1999

¹⁸ Sengupta et al, 2013

¹⁹ Mezzomo et al, 2015

Glicosilación proteica

La glicosilación es una modificación post-transduccional que se puede presentar en proteínas o también en lípidos y tiene diversas funciones, como la estabilidad estructural una vez doblada correctamente la proteína o como marcador para proteínas chaperonas que pliegan estas una vez sintetizadas de manera que funciona como un control de calidad del retículo endoplásmico, esto a nivel celular; por otro lado, también tiene gran importancia a nivel fisiológico, ya que favorece la adhesión celular, especialmente en el sistema inmune, mediante proteínas afines a azúcares llamadas lectinas²⁰. Por otro lado, el sistema ABO de grupos sanguíneos depende de esta modificación, así como la antigenicidad de proteínas, esto puede apreciarse, por ejemplo, como los virus cubren su cápside por medio de carbohidratos, tal sea el caso del VIH. La alteración al proceso de glicosilación puede ser de importancia clínica, por ejemplo: muchas toxinas tienen como blanco la unión a glicanos, una muestra es la toxina de cólera al tener afinidad por un glicolípido sialilado en el epitelio intestinal²¹. En enfermedades crónicas como el cáncer o autoinmunitarias, la glicosilación aberrante, además de ser un biomarcador temprano, puede tener un papel importante en el desarrollo de la afección.

La glicosilación de los dominios Fc en inmunoglobulinas, específicamente DE la IgG, es un mecanismo importante en la diversificación de la función del anticuerpo. Las modificaciones a la función del anticuerpo actúan al cambiar la afinidad a los receptores específicos²². Mientras que el dominio variable del anticuerpo facilita la unión del anticuerpo y el bloqueo de la infección, el dominio constante Fc media la conversación cruzada con el sistema inmune innato, la actividad biológica de la región Fc se controla genéticamente mediante la recombinación de cambio de clase, lo que resulta en la selección de distintos isotipos y subclases de anticuerpos. Por ejemplo, en el caso de la IgG, la N-glicosilación con GlcNAc en N-297 favorece la conformación abierta del Fc, promoviendo la interacción de los receptores Fc con la parte Fc de la IgG o la galactosilación medía efectos proinflamatorios. Además que la falta de fucosa o galactosa en la región Fc, aumenta la severidad de la infección por Dengue o la persistencia del VIH en centros germinales a pesar de haber un control sistémico en la infección²³. La unión también puede ser modificada por medio de la glicosilación en la región F(ab) en diferentes subregiones tanto en la parte constante como en la variable, lo cual podría modificar la afinidad de unión de antígeno, considerando esto, es importante estudiar el efecto de la unión de la toxina en los diferentes sitios de glicosilación que presenta en su totalidad la familia de las inmunoglobulinas²⁴.

²⁰ Walski et al, 2017

²¹ Cutillo et al,2020

²² Wang, 2019

²³ Irvine & Alter, 2020

²⁴ Fleur et al,2020

Antecedentes

En vertebrados, el mecanismo de acción de las proteínas Cry1Ac no ha sido completamente dilucidado, se sabe que tanto la toxina como protoxina son inmunogénicas, y que la protoxina tiene efecto adyuvante²⁵. El efecto adyuvante de la protoxina Cry1Ac se ha asociado con su capacidad de activar células presentadoras de antígeno. En un estudio *in vitro* e *in vivo* se demostró que la protoxina promueve la expresión de moléculas coestimuladoras CD80/CD86 en líneas celulares de macrófagos RAW 264.7, así como en cultivos primarios de macrófagos de diversas zonas anatómicas como peritoneo, lavados bronco-alveolares, bazo, ganglios linfáticos mesentéricos y pulmones. Además, induce la sobreexpresión de MHC II y CD40, y la presentación de antígeno, ya que la activación *ex vivo* de macrófagos inducida por Cry1Ac es capaz de inducir la activación y proliferación de linfocitos T CD4 naive. Asimismo, se ha caracterizado con detalle la activación de macrófagos inducida por estas proteínas Cry1Ac evidenciando el incremento en la fosforilación de MAPKs como MEK, JNK y p38, además de aumentar la producción de citocinas como TNF- α , IL-6, MCP-1 e IL-10, atribuyendo el efecto adyuvante por medio de su capacidad de inducir las vías de fosforilación antes mencionadas.²⁶

Posteriormente fueron identificadas diversas proteínas que podrían proponerse como receptores ya que fueron inmunoprecipitadas con la protoxina y la toxina en macrófagos. Se identificaron en diversas proteínas de unión de la protoxina Cry1Ac como son HSP70 de superficie, vimentina, α -enolasa y actina. La HSP70 es un candidato a receptor por su asociación a la membrana extracelular, por ser inmunoprecipitada por la protoxina, además de confirmar por ensayos de Blot ligado el reconocimiento de HSP70. Además, se confirmó la localización de HSP70 en membrana plasmática por medio de la biotilación previa de proteínas extracelulares. Asimismo, se mostró evidencia de que participa directamente en algunos de los efectos de activación inducidos por Cry1Ac en macrófagos, por ejemplo, en la señalización de ERK y la producción de MCP1. De igual forma, la inhibición selectiva por medio de PES (un inhibidor funcional de HSP70), disminuye algunos de los efectos relacionados inducidos con Cry1Ac como es el reclutamiento de macrófagos peritoneales proponiendo entonces una asociación directa a las vías de MAPK. Por otra parte, se ha reportado que la HSP70 puede actuar como un receptor que favorece la activación y la presentación de antígenos en DCs. También se observó que Cry1Ac que puede ser internalizada en macrófagos de manera dependiente de Clatrina, ya que al inhibirse este proceso por monodansilcadaverina se bloqueó su internalización, además de evidenciar la colocalización de Cry1Ac por microscopía confocal con Rab7 y Rab 5. La participación de

²⁵ Ibarra-Moreno, S et al 2014; Moreno-Fierros, L et al 2013; Rubio-Infante, N et al 2018; Torres-Martínez et al, 2016; Vázquez, R. I et al, 1999

²⁶ Moreno-Fierros et al, 2013.

HSP70 en los efectos inducidos por la protoxina Cry1Ac en macrófagos se confirmó al observar que el pretratamiento con anticuerpos anti HSP70 inhibe la fosforilación de ERK1/2 y la producción de MCP 1 inducida por Cry1Ac en macrófagos. Es importante mencionar que no todos los efectos de activación inducidos por Cry1Ac dependen de su unión a HSP70, asimismo hay otras respuestas que no se asocian directamente a activación de MAPk y que se identificaron otras proteínas de unión a Cry1Ac que aún no se han caracterizado con respecto a los efectos inducidos. Por lo tanto, el mecanismo de los efectos inmunopotenciadores de la protoxina aún falta por ser dilucidado, lo que sugiere que los efectos en macrófagos son mediados por varios receptores que aún no han sido identificados²⁷.

Aunque la toxina también es inmunogénica, su potencial adyuvante no es claro, sin embargo, presenta algunos efectos parecidos a los presentados con la protoxina sobre macrófagos, ya que es capaz de activar a las MAPKs, inducir la sobreexpresión de CD80, CD86 e ICOS-L, inducir la producción de citocinas proinflamatorias e inducir la translocación al núcleo de las subunidades p65 y p50 de NF- κ B. Estos resultados sugieren un mecanismo de acción compartido de estas proteínas (toxina y protoxina) en macrófagos²⁸.

Las proteínas Cry1Ac también tienen efectos en otros tipos celulares como linfocitos; en un estudio previo se observó que la aplicación intranasal de protoxina Cry1Ac indujo respuestas de células productoras de anticuerpos IgA e IgG en tejido nasal (en NALT y pasajes nasales), y además indujo un incremento en la proporción de linfocitos T y B activados en estos sitios, que fue medido por la expresión de las moléculas de activación CD25 y CD69. Además, se encontró un incremento en la proporción de linfocitos T productores de citocinas IL-4, IL5, IL-10, IFN- γ y TNF- α predominando el perfil Th2²⁹. Por otro lado, la toxina también ha mostrado efectos en la activación de linfocitos B y T-CD4 en cinéticas cortas de activación, evaluados a un tiempo máximo de 3 horas, sin embargo, los mecanismos moleculares de estos efectos todavía quedan por ser resueltos³⁰.

Las proteínas Cry1Ac también pueden inducir la activación de linfocitos *in vitro*, particularmente la toxina presenta un efecto mitogénico en linfocitos B lo que sugiere ha sugerido la existencia de receptores, sin embargo, esta caracterización se ha realizado de forma preliminar en tesis de licenciatura³¹, mismas que tanto pCry1Ac como tCry1Ac, tienen capacidad de unión a los Linfocitos T y B, además que pueden activarlos, esto se analizó por citometría de flujo utilizando a las proteínas Cry1Ac acopladas al Fluoróforo FITC y la activación evaluando la expresión de CD69. En ensayos preliminares de inmunoprecipitación con protoxina y toxina Cry1Ac en linfocitos se detectaron algunas proteínas, pero no se realizó su identificación. Los pesos moleculares de las principales proteínas precipitadas en linfocitos con la protoxina fueron de 72 y 58 kDa y para la toxina

²⁷ Rubio-Infante et al, 2018

²⁸ Torres-Martínez et al 2016

²⁹ M. A. Rodríguez-Monroy, 2010

³⁰ Torres-Martínez, 2017

³¹ Camargo-Tiburcio. S, 2013, Ortega-Chávez, E, 2014

fueron de 150, 68,63 y 45kDa; mientras que en linfocitos B, al realizar inmunoprecipitaciones con la toxina se encontraron bandas con peso molecular de 68, 58 y 47 kDa, por otro lado, con la protoxina se obtienen proteínas de pesos similares, además de una banda con 37 kDa, mismo que indica que algunas de estas proteínas pudieran ser posibles receptores para la toxina y protoxina Cry1Ac en linfocitos T y B, que posiblemente participen en los efectos de activación de linfocitos, siendo de interés para un estudio más profundo del efecto de esta proteína en células no adherentes.

Estos resultados sugieren que el efecto activador de las proteínas Cry1Ac no son exclusivas para macrófagos, por lo que el efecto inmunopotenciador se puede presentar en distintos tipos celulares del sistema inmune. De esta forma el estudio del posible efecto directo en Linfocitos T y B contribuye a conocer un panorama general en el mecanismo de acción de este adyuvante.

Los efectos que tienen en común la protoxina y toxina se explican debido a que la toxina deriva de la activación proteolítica de la protoxina y corresponde aproximadamente a la mitad de la región aminoterminal. Los resultados que hemos encontrado en el laboratorio muestran que la inmunogenicidad de la protoxina depende de la región amino terminal (toxina)³², aunque otros resultados muestran que solo la protoxina tiene actividad adyuvante significativa. Los ensayos preliminares sugieren que la activación en linfocitos muestra que la magnitud del efecto es distinta entre toxina y protoxina, la toxina presenta el mayor efecto de activación tanto en linfocitos T como en B, además, de tener una cinética de activación más pronunciada y una unión mayor. Esto muestra la importancia del estudio de ambas proteínas, con la intención de identificar las diferencias de los efectos entre estas proteínas al administrarse en linfocitos.

³² Guerrero. G, et al, 2004

Planteamiento de Problema y Justificación

Debido a su amplio uso en agricultura como insecticidas, además de las cualidades adyuvantes con potencial utilidad en el campo de la vacunación, es importante continuar caracterizando los efectos inmunológicos de las proteínas Cry1Ac. Considerando los antecedentes presentados sobre la interacción y mecanismo del efecto inmunoestimulador de las proteínas Cry1Ac, sobre todo en macrófagos, pero con evidencia preliminar de efectos activadores en linfocitos, es de interés estudiar las posibles proteínas que unen a la toxina y la protoxina Cry1Ac en linfocitos T y B, y con ello contribuir a entender el mecanismo responsable de los efectos que se observan sobre estas células inmunes.

Hipótesis

Los efectos de activación en linfocitos B y T inducidos por las proteínas Cry1Ac, toxina y protoxina, se deben a la unión a proteínas de superficie que actúan como receptores e inducen activación de vías de señalización.

Objetivos

Objetivo General:

Identificar los posibles receptores de pCry1Ac y tCry1Ac, en linfocitos T y B *in vitro*.

Particulares:

Obtener las proteínas de linfocitos con mayor afinidad a la toxina y la protoxina Cry1Ac por medio de la técnica de inmunoprecipitación e identificación proteica MALDI TOF.

Identificar las proteínas de linfocitos T y B precipitadas por Cry1Ac por medio de la técnica de inmunoprecipitación y MALDI TOF.

Determinar la localización celular de las proteínas precipitadas por Cry1Ac.

Analizar por Blot ligando en las proteínas precipitadas que presentaron unión a Cry1Ac.

Determinar por Western Blot si la identidad de algunas proteínas precipitadas es similar a las identificadas en macrófagos.

Determinar si la unión de la toxina Cry1Ac a proteínas de linfocitos T y B fue dependiente de glicosilación como ha sido reportado en insectos y en particular de la N-Acetil-Galactosamina.

Determinar si la IgG puede unirse a la toxina Cry1Ac.

Determinar si la unión de toxina Cry1Ac a inmunoglobulinas es dependiente de la N-Acetil-Galactosamina.

Determinar que isotipos de inmunoglobulinas pueden unirse a la toxina Cry1Ac.

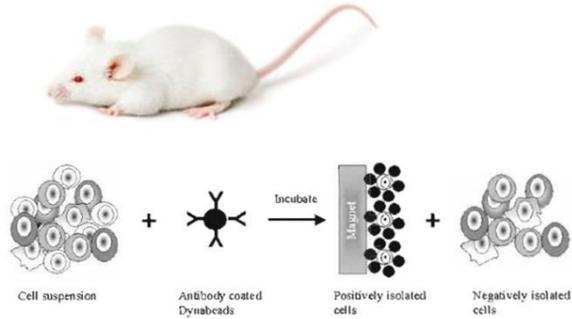
Determinar si la toxina Cry1Ac puede precipitar inmunoglobulinas de suero.

Determinar si la IgG puede unirse a Cry1Ac en condiciones nativas y desnaturalizadas.

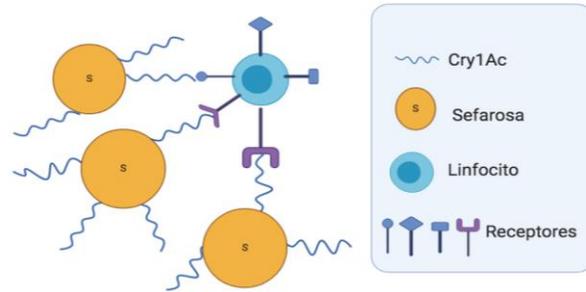
Estrategia Experimental

Identificación de los posibles receptores de las proteínas Cry1Ac (Toxina y Protoxina) en linfocitos.

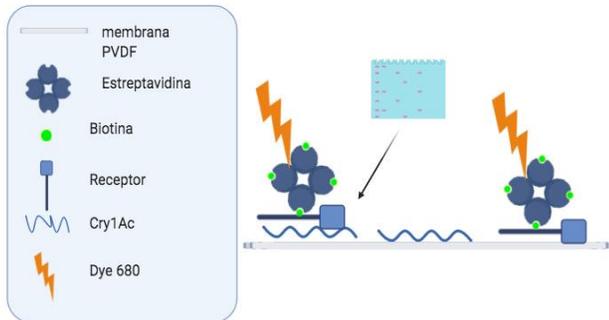
Obtención de células no adherentes, linfocitos T y B totales o separados por selección positiva a CD19+ por medio de perlas magnéticas *in vitro*.



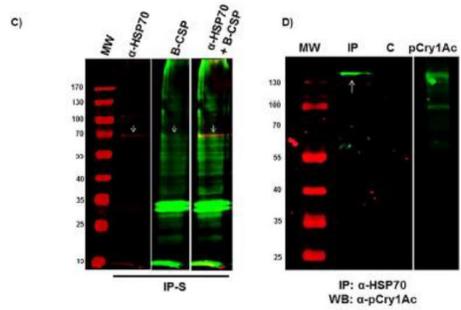
Inmunoprecipitación de proteínas afines a la toxina o protoxina, por medio de enriquecimiento mediante la interacción de Sefarosa(S) conjugada a las proteínas Cry1Ac con proteínas extracelulares de linfocitos T y B.



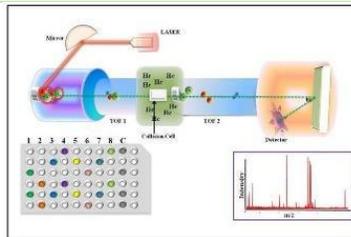
Detección de proteínas de membrana biotiniladas que fueron precipitadas con Cry1Ac por medio de electroforesis y ensayos de Western Blot que posteriormente fueron revelados como Blot ligando, usando el sistema de marcaje celular (biotina-streptavidina/Dye680).



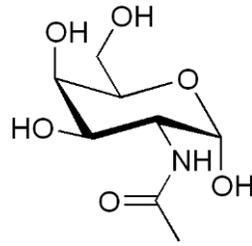
Determinar por Western Blot si la identidad de algunas proteínas precipitadas es similar a las proteínas previamente identificadas en macrófagos usando anticuerpos para receptores identificados, anteriormente (Hsp 70/Vimentina/ α enolasa).



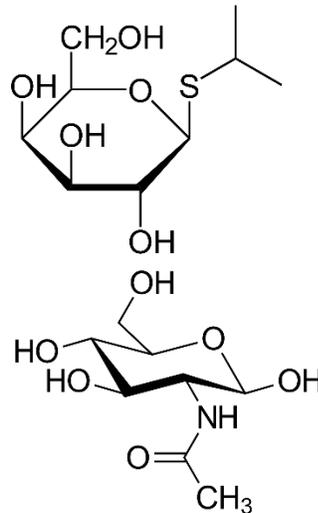
Identificación de proteínas precipitadas en linfocitos T y B, de manera total (los dos tipos celulares simultáneamente o por selección positiva). La identificación se realizó por medio de secuenciación de receptor por medio de MALDI-TOF



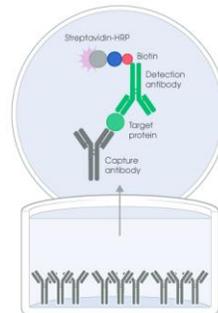
Determinación la afinidad de unión de uno de los posibles sitios de unión específicos de las proteínas Cry1Ac a las proteínas detectadas mediante el uso de inhibidores estructurales como la N-Acetil-Glucosamina (GalNAc) como ha sido reportado en la literatura, por medio de la técnica de Blot ligando



Evaluación de la inhibición de moléculas parecidas a la GalNAc como el isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) y la N-Acetil-glucosamina (GlcNAc), determinando la especificidad de la modificación postraduccional de glicósido, por medio de Blot ligando.



Evaluación de la unión de proteínas detectadas *in vitro* con las proteínas Cry1Ac, por medio de la técnica de ELISA.
Por medio de la evaluación de unión de las proteínas candidatas a receptores.



Materiales y Métodos

Cultivo Celular de Linfocitos y Separación de células T y B.

Los linfocitos se obtuvieron de bazo de ratones macho Balb/c con entre 6 a 8 semanas de gestación, a partir de esplenocitos que se sembraron en cajas de 6 pozos a 1×10^6 células/ml y se incubaron durante 24 horas con medio DMEM suplementado de 10% en volumen de Suero Fetal Bovino (Invitrogen, GIBCO, Rockville, EUA) y antibióticos (100 U/mL penicilina, 100 mg/mL estreptomina) a 37 °C con 5% de CO₂. Las células no adherentes se recuperaron con una pipeta Pasteur, se lavaron y resuspendieron en buffer de fosfatos y se centrifugaron a 1500 rpm por 5 minutos, el procedimiento se repitió 3 veces, posteriormente se resembraron bajo las mismas condiciones. Para separar las células se utilizó el kit de separación con anticuerpos CD19+ de Miltenyi Biotec (código 130-050-301), las células se incubaron en 1 mL de una solución de buffer de fosfatos con BSA al 0.5%, y EDTA 2 mM mezclada con la solución del kit en una proporción 1:20 y se dejaron en agitación constante a 4 °C durante 1 hora, posteriormente la suspensión se pasó por las columnas de separación MACS, previamente hidratada con la solución PBS-BSA y se eluyeron las células con 10 volúmenes, se obtuvieron dos alícuotas, la primera esto será negativa a CD19 (Linfocitos T) y la positiva (Linfocitos B). Las precipitaciones con las proteínas Cry1Ac en linfocitos aislados se realizaron siguiendo el mismo procedimiento usado en linfocitos totales con la diferencia que se usaron 3×10^7 células, debido a la posible lisis e inviabilidad de las células al pasarse por las columnas de separación.

Obtención de la Protoxina y Toxina Cry1Ac.

La protoxina Cry1Ac se obtuvo de *Escherichia Coli* JM103 descrita en (Ge et al, 1990) inducida por isopropil- β -D-tiogalactopiranosido, con modificaciones (Rojas Hernandez et al, 2004). Para obtener la toxina, se incubaron 20 mg de PCry1Ac en una proporción 1:50 con tripsina durante 3 horas a 37 °C, se inactivó el efecto proteolítico con fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), posteriormente se analizaron tanto la protoxina y toxina por medio de un gel de electroforesis SDS-PAGE, para corroborar la pureza de las proteínas.

Conjugación de Perlas de Sefarosa a toxina o protoxina Cry1Ac.

Las proteínas purificadas se resuspendieron en buffer de carbonatos pH=9.2 por separado y se agregan a la matriz de Sefarosa 4B activada (Sigma Aldrich 24873317) para su conjugación covalente, la Sefarosa fue hidratada previamente con una solución de HCl 1mM por medio de 20 lavados de 10 mL en columnas de filtración, con la intención de eliminar la lactosa que se usa para conservación, después fue lavada con buffer de carbonatos 5 veces

para equilibrar el pH, a una concentración de 20mg de proteína por mL de Sefarosa hidratada, esta suspensión se dejó toda la noche a una temperatura de 4 °C en movimiento continuo, al día siguiente se lavó el exceso de proteína con alícuotas de PBS en columnas de filtración. Para bloquear los posibles sitios que aún quedaron reactivos se resuspendió en una solución de glicina 0.2M toda la noche en las mismas condiciones. Para confirmar la conjugación se corrió un gel de electroforesis SDS-PAGE y se reveló con Coomassie.

Precipitación de proteínas de unión a proteínas Cry1Ac en linfocitos.

Para la identificación de los posibles receptores de Cry1Ac en linfocitos se realizó la interacción de las proteínas Cry1Ac (Toxina y Protoxina) conjugadas a sefarosa con linfocitos, presumiendo la preferente interacción con las proteínas extracelulares de los linfocitos a las proteínas Cry1Ac en una proporción de 250 μ L (100 μ g) por cada 2×10^8 células.

Para obtener a los posibles receptores de la proteína, se incubaron las células no adherentes, ésta se considera la fracción enriquecida de linfocitos de ahora en adelante nombrada linfocitos, que fueron tres veces pre lavadas con PBS por medio de centrifugación, con la intención de eliminar las proteínas presentes en el suero del medio de cultivo.

Los linfocitos lavados, se resuspendieron de forma delicada en 1 ml de PBS junto con la Sefarosa-tCry1Ac o Sefarosa-pCry1Ac en agitación continua por 3 horas a 4 °C, con la finalidad de obtener la interacción de proteínas extracelulares. Concluidas las 3 horas la suspensión se centrifugó a 1500 rpm por 5 minutos, lavando con PBS como se describió previamente, descartando el sobrenadante. Después se le agregó 1 mL de buffer de Lisis (RIPA) (Tris 50 mM, NaCl 150mM, EDTA 1 mM, Tritón 100x 1%), se sonicó la pastilla en 3 ciclos de 10 segundos cada uno, este sobrenadante se recupera como un control positivo de referencia de proteínas totales de linfocitos no precipitadas con Cry1Ac-sefarosa. Para eliminar los residuos celulares y sólo obtener la sefarosa conjugada a Cry1Ac que interactuó con las proteínas de linfocitos se lavó por medio de centrifugaciones seriadas con PBS PMSF 50mM con Tritón 0.1% y se leyeron los sobrenadantes a una DO de 280 nm para confirmar la eliminación de proteínas. Después de eliminar completamente el sobrenadante, se le agregó 80 μ L de buffer RIPA y 40 μ L de buffer de carga, hasta llegar a hervir a 96°C por 5 minutos y se centrifugó a 3000 rpm por 5 minutos, se colectó el sobrenadante alicuotando en tubos con 40 μ L, posteriormente se refrigeró a -80°C. En algunos experimentos a la fracción de sefarosa se le agregó nuevamente buffer de carga, se hirvió y se corrió esta fracción que contenía preferentemente proteína Cry1Ac despegada de la sefarosa y algunas proteínas de fuerte interacción con Cry1Ac. Para confirmar que no hubo degradación se corrieron electroforesis de alícuotas que serían el patrón de proteínas precipitadas con Cry1Ac sefarosa y no precipitadas.

Para obtener las proteínas extracelulares, las células se trataron previamente con el reactivo EZ Link Sulfo-NHS-LC-Biotinylation Kit incubando un vial con el mismo número de células que se usó en experimentos anteriores, se dejó incubar por 1 hora a agitación constante a 4 °C, se lavó 3 veces con PBS, debido a que la biotina no es permeable al interior de las células, solamente las proteínas extracelulares se marcan con biotina, posteriormente se realiza la precipitación como se describió anteriormente, se separaron las proteínas por electroforesis y se transfirieron a una membrana de PVDF, se incubó con avidina conjugada al fluorocromo Dye 800, se analizó con un escáner infrarrojo (Odyssey) revelándose así las proteínas de membrana precipitadas que tuvieron interacción con la tCry1Ac

Ensayos de Blot Ligando

Se usaron ensayos de Blot ligando para determinar si las proteínas tCry1Ac y pCry1Ac mantenían su capacidad de unión hacia las proteínas de linfocitos precipitadas aún estando estas últimas desnaturalizadas. Las alícuotas de precipitaciones y de lisados celulares fueron separadas por medio de electroforesis SDS-PAGE y transferidos a membranas de PVDF. Las membranas fueron bloqueadas con albúmina sérica bovina, (particularmente con la toxina no se debe usar leche descremada como bloqueador ya que puede dar un fondo muy marcado, debido a la interacción con carbohidratos que tienen estas proteínas). Después de incubar toda la noche, las membranas fueron lavadas con PBS Tween 0.05% y se pusieron a interactuar las proteínas Cry1Ac, ahora conjugadas a biotina por medio del kit EZ-Link (Thermo Fisher Scientific) a una concentración de 5µL de biotina(20 µL de proteína) con la misma cantidad de células por 2 horas, después se lavó y agregó streptavidina que contiene el fluorocromo Dye 680 o Dye 800. Finalmente, las proteínas fueron escaneadas en infrarrojo para revelar las proteínas precipitadas que mantienen afinidad hacia las proteínas Cry1Ac. Estos ensayos tienen la misma base que las pruebas de Western Blot, con la diferencia que no son usados anticuerpos si no las proteínas acopladas a algún cromóforo, directa o indirectamente.

Ensayos de ELISA para evaluar interacción de Cry1Ac con inmunoglobulinas

Para determinar si las proteínas Cry1Ac interactuaban con inmunoglobulinas se realizaron ensayos de ELISA en cajas Maxisorp de 96 pozos, se depositaron 100 µL iniciando con 10 µg de toxina Cry1Ac realizando diluciones seriadas 1:2, se dejaron incubando 24 horas a 4°C, se lavaron varias veces con PBS Tween 0.05%, después se bloquearon con una solución de 3% de albúmina sérica bovina por otras 24 horas a la misma temperatura; posteriormente, se agregaron diferentes tipos de inmunoglobulinas (IgA, IgG, IgM) de distintas especies (ratón y humano) para confirmar la interacción entre estas y la proteína Cry1Ac, se incubaron por 2 horas y se lavaron con de la misma forma con PBS Tween, se incubaron con

anticuerpos conjugados a peroxidasa o biotina específicos hacia el isotipo correspondiente (anti-IgA, anti-IgG, anti-IgM), en una dilución 1:10000; como consecuente se lavaron y se agregó streptavidina marcada con peroxidasa en el caso de anticuerpos biotinilados y finalmente se agregó la solución de sustrato H₂O₂ ABTS se estuvo leyendo las placas cada 10 minutos en un lector de multiplacas a 280 nm.

Resultados

Obtención e identificación de proteínas precipitadas por la Toxina Cry1Ac en linfocitos totales

Se obtuvieron proteínas precipitadas por la interacción de la toxina Cry1Ac conjugada a sefarosa con poblaciones de linfocitos (1×10^6) (fracción de células no adherentes de bazo que en su mayoría se componen de linfocitos T y linfocitos B). En la figura 1 se muestra el patrón de proteínas de linfocitos precipitadas por la interacción con la toxina Cry1Ac, se distinguen 14 bandas o grupos de bandas (marcadas con flechas y números en la primera columna de la figura 1), que aumentaron en intensidad comparándose con la segunda columna que es el patrón característico de lisado celular. Podemos destacar algunas bandas características que, por su peso molecular o intensidad de tinte podrían ser prospectos a receptores de la toxina, por ejemplo: las bandas ABC por su alto peso molecular ≈ 180 kDa o mayor, las bandas que contrastaron con mayor intensidad tienen pesos de 70, 55 y 30 kDa.

Estas bandas posteriormente se mandaron a secuenciar al departamento de proteómica del Instituto de Biotecnología de la UNAM, arrojando los resultados mostrados en las siguientes tablas 1 y 2. En las tablas se ordenan las bandas identificadas en orden de mayor a menor peso molecular. Las flechas señalan las principales proteínas precipitadas. Las letras indican la clave asignada a cada banda.

Banda	Inmunoprecipitación de proteína	Lisado celular	Marcador de P.M.
-------	---------------------------------	----------------	------------------

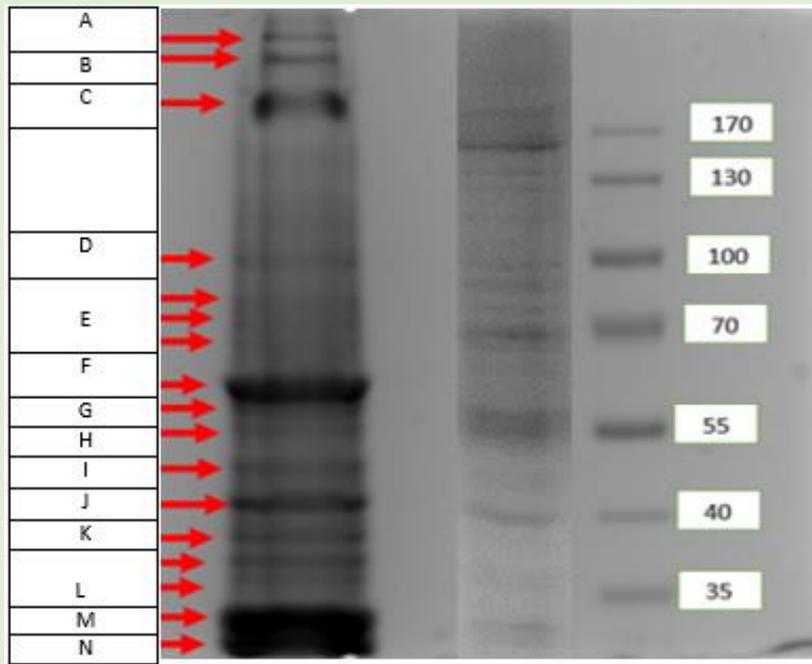


Figura 1. Proteínas de linfocitos precipitadas por la interacción con la toxina Cry1Ac.

Se muestra de izquierda a derecha, la clave asignada con letras a las bandas precipitadas. Los patrones de corrida por medio de electroforesis SDS-PAGE muestran primero a las proteínas enriquecidas por la interacción de la sefarosa-tCry1Ac (inmunoprecipitación de proteína). En el segundo carril se muestra el patrón de proteínas en los linfocitos T y B de bazo. En el tercer carril se muestran los marcadores de peso molecular. Se señalan por medio de flechas y letras en orden descendente, en total 14 bandas (o grupos de bandas) que se consideraron para su posterior identificación

En la tabla 1 se aprecia que dentro de las bandas precipitadas con la toxina Cry1Ac que fueron identificadas con amplio porcentaje de cobertura, destacan varias proteínas nucleares como histonas, ribonucleoproteínas y otras proteínas nucleares, que por su ubicación es poco probable que participen como receptores.

La Hemoglobina y Betaglobina fueron proteínas identificadas con alto porcentaje de cobertura, cuya función se asocia con células hematopoyéticas, pero no con linfocitos. La actina es una proteína del citoesqueleto anteriormente como una proteína de unión a Cry1Ac y fue identificada con amplia cobertura³³, se identificó a la coronina 1 conocida como coronina 1 A, Por otro lado, también se encontró SORCS3. Otra proteína identificada de interés es la Ca²⁺ ATPasa de membrana plasmática (PMCA), la cual se ha reportado como un importante factor en la activación de linfocitos T mediada por TCR³⁴. La Tubulina fue también identificada con cobertura moderada, importante para procesos de remodelación y señalización celular³⁵. La transcetolasa, otra proteína identificada, también es importante en el sistema inmune, debido a que es parte integral de la activación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la formación de trampas extracelulares de neutrófilos (NETs), por medio de la generación de NADPH³⁶. Otra proteína de interés encontrada es parte de la familia GIMAP, la proteína GTPasa IMAP 4, también conocida como familia de proteínas de unión a nucleótidos asociadas al sistema inmune (IANs), tienen como actividad el intercambio de GTP, con un comportamiento parecido a las GTPasas tipo Ras, que regulan funciones celulares claves en todos los organismos vivos³⁷. Por último, la proteína TAP2, conocida como proteína transportadora asociada al procesamiento antigénico, es una familia que se especializa en la entrega de péptidos citosólicos a moléculas de histocompatibilidad de clase 1 (MHC1) en el retículo endoplásmico³⁸.

³³ Rubio-Infante et al, 2016

³⁴ Hermey, 2014

³⁵ Wolff, 2009

³⁶ Riyapa et al., 2019

³⁷ Fil & Lahesmaa, 2010

³⁸ Mccluskey et al, 2004

Tabla 1. Identificación de proteínas afines a la toxina Cry1Ac de linfocitos T y B precipitadas e identificadas por MALDI TOF:

Banda	Proteína identificada	Código de acceso	Peso Molecular	% de Cobertura
C	VPS10 domain-containing receptor SorCS3	SORC3_MOUSE	136 kDa	1.39%
C	Plasma membrane calcium-transporting ATPase 1	AT2B1_MOUSE (+1)	135 kDa	1.39%
C	Mybbp1a protein	A0JLT5_MOUSE (+2)	134 kDa	1.11%
C	Keratin 78	E9Q0F0_MOUSE (+4)	112 kDa	1.31%
D	Elongation factor 2	EF2_MOUSE (+12)	95 kDa	5.01%
D	Nucleolar RNA helicase	DDX21_MOUSE (+3)	94 kDa	2.59%
E	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U	HNRPU_MOUSE (+5)	88 kDa	5.12%
E	Nucleolin	NUCL_MOUSE (+6)	77 kDa	2.97%
E	Transporter 2 ATP-binding cassette sub-family B	A0A068BGU5_MOUSE (+8)	77 kDa	2.42%
E	Ddx3x protein	B7ZWF1_MOUSE (+2)	73 kDa	3.33%
E	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit, mitochondrial	SDHA_MOUSE	73 kDa	2.11%
E	Serum albumin	ALBU_MOUSE	69 kDa	6.41%
E	Pre-mRNA-splicing factor ATP-dependent RNA helicase DHX15	A0A0G2JG10_MOUSE (+5)	69 kDa	1.97%
F	Bile salt-activated lipase	CEL_MOUSE	66 kDa	3.84%
E	Nucleolar protein 56	NOP56_MOUSE (+2)	64 kDa	3.28%
E	Heterochromatin protein 1-binding protein 3	HP1B3_MOUSE (+2)	61 kDa	8.84%
G	Keratin, type II cytoskeletal 1b	K2C1B_MOUSE (+1)	61 kDa	4.20%
G	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	ATPA_MOUSE (+1)	60 kDa	3.98%
G	Pyruvate kinase PKM	KPYM_MOUSE	58 kDa	8.47%
G	Keratin, type II cytoskeletal 79	K2C79_MOUSE	58 kDa	2.26%
G	Predicted pseudogene 5478	A0A2R8VHP3_MOUSE (+9)	58 kDa	2.24%
F	Keratin 90	E9Q1Z0_MOUSE (+6)	58 kDa	2.04%
H	Pancreatic alpha-amylase	AMYP_MOUSE (+1)	57 kDa	12.60%
H	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	ATPB_MOUSE	56 kDa	12.50%
F	Polypyrimidine tract-binding protein 1	PTBP1_MOUSE (+11)	56 kDa	8.35%

G	Non-POU domain-containing octamer-binding protein	NONO_MOUSE (+5)	55 kDa	4.86%
H	Keratin, type II cytoskeletal 8	K2C8_MOUSE	55 kDa	2.86%
H	Transketolase (Fragment)	A0A286YE28_MOUSE (+1)	54 kDa	5.18%
H	CDP-diacylglycerol--glycerol-3-phosphate 3-phosphatidyltransferase	F8WI04_MOUSE (+1)	54 kDa	3.78%
H	Tubulin alpha chain (Fragment)	A0A0A0MQA5_MOUSE (+1)	53 kDa	17.00%
H	Coronin-1 ^a	COR1A_MOUSE (+2)	51 kDa	18.00%
H	Uncharacterized protein	Q3TL71_MOUSE	51 kDa	11.20%
J	Pancreatic triacylglycerol lipase	LIPP_MOUSE	51 kDa	7.96%
H	Tubulin alpha-1B chain	TBA1B_MOUSE (+3)	50 kDa	18.00%
I	Tubulin beta-5 chain	TBB5_MOUSE (+4)	50 kDa	16.40%
H	Elongation factor 1-alpha 1	EF1A1_MOUSE (+2)	50 kDa	13.00%
J	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H	HNRH1_MOUSE (+1)	49 kDa	7.57%
I	Keratin 15, isoform CRA_a	B1AQ77_MOUSE (+1)	49 kDa	3.95%
J	Alpha-enolase	ENOA_MOUSE (+1)	47 kDa	5.99%
J	Uncharacterized protein	Q3T9U9_MOUSE (+5)	46 kDa	11.90%
I	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F	HNRPF_MOUSE	46 kDa	8.19%
J	Actin, cytoplasmic 1	ACTB_MOUSE (+19)	42 kDa	54.40%
I	Actin, alpha cardiac muscle 1	ACTC_MOUSE (+34)	42 kDa	26.50%
J	Core histone macro-H2A	Q9D3V6_MOUSE	41 kDa	4.45%
J	Core histone macro-H2A.1	H2AY_MOUSE	40 kDa	37.10%
L	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	A0A0A0MQF6_MOUSE (+3)	39 kDa	5.85%
M	GTPase IMAP family member 4	D3YTNA_MOUSE (+1)	38 kDa	6.10%
N	Actin-related protein 2/3 complex subunit 2	ARPC2_MOUSE (+3)	34 kDa	9.33%
L	60S acidic ribosomal protein P0	Q5FWB6_MOUSE (+2)	34 kDa	7.89%
N	60S ribosomal protein L6	Q3UF14_MOUSE (+1)	34 kDa	5.07%
M	Nucleophosmin	NPM_MOUSE (+8)	33 kDa	7.19%
N	Chymotrypsin-like elastase family member 2A	CEL2A_MOUSE	29 kDa	9.23%
M	Chymotrypsin-like elastase family member 3B	CEL3B_MOUSE	29 kDa	8.18%
M	40S ribosomal protein S2 (Fragment)	D3YVC1_MOUSE (+9)	29 kDa	4.83%
L	Chymotrypsinogen B	CTRB1_MOUSE	28 kDa	13.70%
M	Uncharacterized protein (Fragment)	Q3TZL2_MOUSE (+1)	28 kDa	8.88%

M	MCG124046	Q9Z1R9_MOUSE	26 kDa	8.13%
M	RIKEN cDNA	Q9CPN9_MOUSE (+1)	26 kDa	8.10%
N	Protein disulfide-isomerase A2 (Fragment)	F6S5U2_MOUSE (+1)	25 kDa	7.14%
N	Actin-related protein 3 (Fragment)	A0A087WRA1_MOUSE (+5)	24 kDa	5.09%
N	Histone H1.5	H15_MOUSE (+1)	23 kDa	11.70%
M	Lamin-B receptor (Fragment)	A0A0A6YY12_MOUSE	23 kDa	9.41%
N	TAR DNA-binding protein 43 (Fragment)	A0A087WQA5_MOUSE (+12)	23 kDa	6.00%
N	Histone H1.4	H14_MOUSE	22 kDa	23.30%
N	Histone H1.3	H13_MOUSE (+1)	22 kDa	23.10%
N	Histone H1.1	H11_MOUSE	22 kDa	14.10%
N	Uncharacterized protein (Fragment)	Q8BUF4_MOUSE	22 kDa	3.94%
M	Histone H1.2	H12_MOUSE (+2)	21 kDa	30.20%
M	Lupus La protein homolog	A2AR07_MOUSE (+5)	21 kDa	7.61%
N	Histone H3.2	A0A1W2P768_MOUSE (+2)	20 kDa	17.70%
N	Chymotrypsin-like elastase family member 1 (Fragment)	A0A2R8VK43_MOUSE	17 kDa	9.74%
N	Beta-globin	A8DUP5_MOUSE (+8)	16 kDa	73.50%
N	Beta-globin	D0U293_MOUSE (+3)	16 kDa	32.70%
N	Peroxiredoxin-2 (Fragment)	D3Z4A4_MOUSE (+1)	16 kDa	11.60%
N	Hemoglobin subunit alpha	HBA_MOUSE (+1)	15 kDa	78.90%
N	Histone H2AX	H2AX_MOUSE (+11)	15 kDa	52.40%
N	Histone H2A type 2-A	H2A2A_MOUSE (+1)	14 kDa	52.30%
N	Histone H2A.V	H2AV_MOUSE (+1)	14 kDa	29.70%
N	Histone H2B (Fragment)	A0JLV3_MOUSE (+15)	14 kDa	19.50%
N	Histone H4	H4_MOUSE	11 kDa	17.50%

Obtención e identificación de proteínas precipitadas por la protoxina Cry1Ac en linfocitos

Se obtuvieron proteínas enriquecidas en poblaciones de células no adherentes (1×10^6) de bazo por la interacción de la protoxina Cry1Ac conjugada a sefarosa con poblaciones de linfocitos (fracción de células no adherentes de bazo que en su mayoría se componen de linfocitos T y linfocitos B). En la figura 2. se muestra el patrón de proteínas de linfocitos precipitadas por la interacción con la protoxina Cry1Ac. Se distinguen 8 bandas o grupos de bandas (marcadas con flechas y letras en el panel), que aumentaron en concentración comparándose con el patrón característico de lisado celular. Podemos destacar algunas bandas características, que por su peso molecular o intensidad de tinte podrían ser prospectos a receptores de la toxina, por ejemplo: las bandas ABC por su alto peso molecular ≈ 130 kDa o mayor, o las bandas con mayor contraste en 30, 70 y 180 kDa.

Estas bandas posteriormente se enviaron a identificar al departamento de proteómica del Instituto de Biotecnología de la UNAM, con los siguientes resultados presentados en la tabla 2:

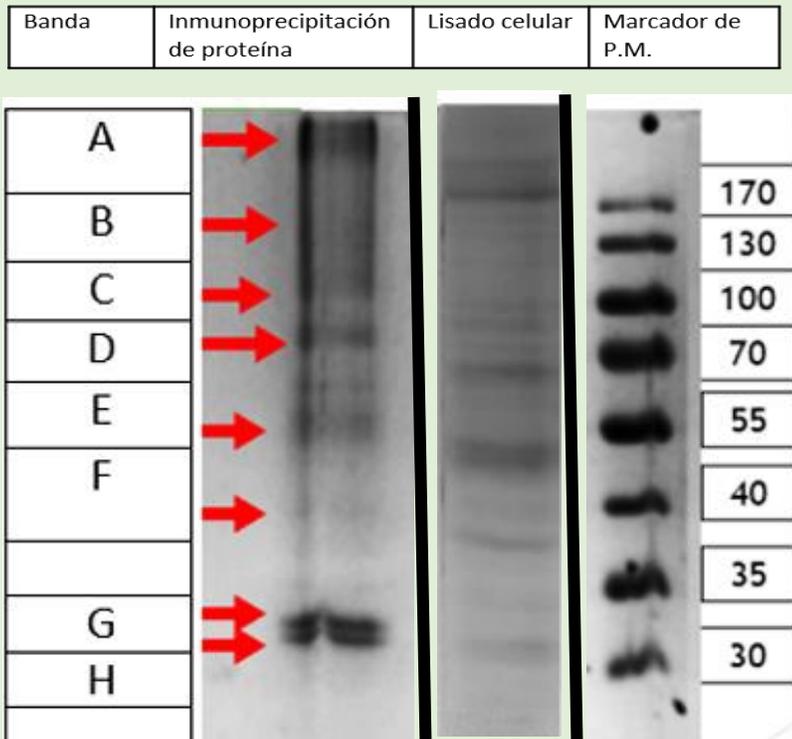


Figura 2. Proteínas de linfocitos precipitadas por la interacción con la protoxina Cry1Ac.

Se muestra de izquierda a derecha, los patrones de corrida por medio de electroforesis. En el primero se presentan las proteínas enriquecidas por la interacción de la sefarosa-Pcry1Ac. En el segundo carril se muestra el patrón de proteínas de un de lisado linfocitos T y B. En el tercer carril se muestran los marcadores de peso molecular (PM) los números indican el valor en kDa. Se señalan por medio de flechas y letras en orden descendente en peso molecular, un total 8 bandas (grupo de bandas) se consideraron para su posterior identificación

En la tabla 2 se aprecia que dentro de las bandas precipitadas con la protoxina Cry1Ac que fueron identificadas, también se encuentran las histonas, ribonucleoproteínas y otras proteínas nucleares, podrían compartir los mecanismos de unión entre protoxina y toxina, aunque es poco probable que participen específicamente como receptores, la fuerte afinidad de las proteínas Cry1Ac es relevante para otros procesos celulares, como lo que podría ocurrir si la proteína es internalizada después de unirse al receptor.

Una proteína de interés es DOCK9, también conocida como zizimina 1, parte de una familia de 11 homólogos que sirven como factores intercambiadores de nucleótidos para GTPasas, se expresa predominantemente en linfocitos T, pero no en B, estas proteínas son importantes en la dinámica de la actina en el citoesqueleto, adhesión celular y movimiento³⁹. También fue identificada la prohibitina, las cuales tienen papel importante en el desarrollo y establecimiento del cáncer, esta proteína tiene importancia en la homeostasis mitocondrial y supervivencia de linfocitos humanos normales⁴⁰. Se identificó también un integrante de la familia de proteínas S100, consisten en 24 miembros con 3 grupos que se dividen en el efecto regulatorio compartimentalizado, por su efecto intracelular, efecto extracelular o por tener efectos en los dos sitios antes mencionados⁴¹.

³⁹ Ruiz-lafuente, et al, 2018

⁴⁰ Ross et al, 2017

⁴¹ Donato & Cannon, 2013

Tabla 2. Identificación de proteínas de linfocitos T y B precipitados con la protoxina Cry1Ac y analizadas por MALDI TOF:

Banda	Proteína identificada	Código de acceso	Peso Molecular	% de Cobertura
A	Dedicator of cytokinesis protein 9	A0A1D5RLE0_MOUSE (+7)	234 kDa	0.78%
C	Keratin 78	E9Q0F0_MOUSE (+4)	112 kDa	1.31%
D	Serum albumin	ALBU_MOUSE	69 kDa	2.14%
E	Keratin, type II cytoskeletal 1b	K2C1B_MOUSE (+1)	61 kDa	4.20%
E	Keratin 90	E9Q1Z0_MOUSE (+6)	58 kDa	4.28%
E	Keratin, type II cytoskeletal 79	K2C79_MOUSE	58 kDa	2.26%
F	Predicted pseudogene 5478	A0A2R8VHP3_MOUSE (+9)	58 kDa	2.24%
F	Actin, cytoplasmic 1	ACTB_MOUSE (+19)	42 kDa	9.07%
G	Prohibitin	PHB_MOUSE (+2)	30 kDa	8.82%
H	MCG124046	Q9Z1R9_MOUSE	26 kDa	8.13%
H	Histone H1.3	H13_MOUSE (+1)	22 kDa	15.40%
H	Histone H1.4	H14_MOUSE	22 kDa	15.10%
H	Histone H1.1	H11_MOUSE	22 kDa	14.10%
H	Histone H3.2	A0A1W2P768_MOUSE (+2)	20 kDa	26.50%
H	Myosin light polypeptide 6	A0A1W2P6F6_MOUSE (+5)	17 kDa	10.50%
H	Beta-globin	A8DUP5_MOUSE (+8)	16 kDa	16.30%
H	Histone H2AX	H2AX_MOUSE (+11)	15 kDa	47.60%
H	Histone H3	A1L0V4_MOUSE (+1)	15 kDa	35.60%
H	Histone H3.3C	H3C_MOUSE (+2)	15 kDa	35.30%
H	Hemoglobin subunit alpha	HBA_MOUSE (+1)	15 kDa	20.40%
H	Histone H2A	A0A0N4SV66_MOUSE (+7)	14 kDa	59.50%
H	Histone H2A	Q8CGP4_MOUSE	14 kDa	58.10%
H	Histone H2A	H2A2B_MOUSE	14 kDa	46.90%
H	Histone H2B (Fragment)	A0JLV3_MOUSE (+14)	14 kDa	42.30%
H	Histone H2A.V	H2AV_MOUSE (+1)	14 kDa	35.20%
H	Protein S100-A9	S10A9_MOUSE	13 kDa	12.40%
H	Histone H4	H4-_MOUSE	11 kDa	52.40%

Obtención de Proteínas Precipitadas en Linfocitos aislados, T y B

Después de obtener los patrones de proteínas precipitadas por Cry1Ac en linfocitos totales, se decidió realizar las precipitaciones en linfocitos T y B aislados por selección positiva a Linfocitos CD19, usando el método de separación magnética siguiendo las especificaciones del fabricante. Se obtuvieron dos grupos de células CD19+ y CD19-, los cuales se componen principalmente de linfocitos B y linfocitos TCD4/TCD8 respectivamente. Mostró que los patrones de proteínas precipitadas son muy similares entre sí, para ser precisos en el peso de 55 y un doblete 30 kDa. La única diferencia notable, es una banda mayor a 170 kDa en el carril de proteínas de linfocitos B CD19+, lo cual podría indicar una selectividad diferencial, en la afinidad de la toxina a los dos tipos de linfocitos principales. En estos ensayos el resto de las bandas se detectaron en baja intensidad y se marcan con flechas los pesos moleculares relativos que coinciden con los detectados en linfocitos totales y presentan un patrón similar en ambos tipos de linfocitos.

Linfocitos B	Linfocitos T	Lisado celular	Marcador de P.M.
--------------	--------------	----------------	------------------

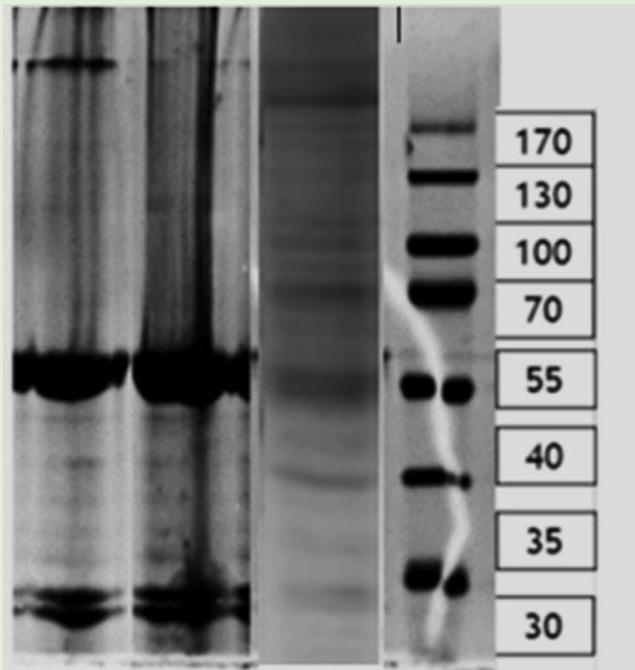


Figura 3. Proteínas de linfocitos T y B aislados, precipitadas por la interacción con la toxina Cry1Ac. Se muestra de izquierda a derecha, los patrones de corrida por medio de electroforesis. En el primero se presentan las proteínas enriquecidas por la interacción de la sefarosa-tCry1Ac, en linfocitos B seleccionados positivamente por perlas magnéticas CD19+. En el segundo carril se muestran las proteínas que interactúan con tCry1Ac en linfocitos T seleccionados negativamente por perlas magnéticas CD19+. En el tercer carril se muestra el patrón de proteínas en los linfocitos T y B. Debido a la disminución del número de bandas, no fue necesario indicar con letras las bandas obtenidas.

Una proteína de interés que se encontró exclusivamente en células B, es la CCT-1 con 3.95% de cobertura, esta proteína pertenece a un complejo de chaperonas llamado TRiC con un peso cercano a 900 kDa.⁴² Por otro lado, en linfocitos T se identificó la Neurexofilina 1, la cual es parte de una familia de glicoproteínas con comportamiento de neuropéptido⁴³.

⁴² Dunn et al, 2001

⁴³ Missler & Su, 1998

Tabla 3. Identificación de proteínas de linfocitos B precipitadas con la toxina Cry1Ac y analizadas por MALDI TOF:

Proteína identificada	Código de acceso	Peso Molecular	% de Cobertura
Zinc finger, MYM-type 6	A2A7U2_MOUSE (+3)	129 kDa	1.12%
T-complex protein 1 subunit zeta	Q3TI62_MOUSE (+5)	58 kDa	3.95%
Keratin, type II cytoskeletal 79	K2C79_MOUSE	58 kDa	2.26%
Predicted pseudogene 5478	A0A2R8VHP3_MOUSE (+9)	58 kDa	2.24%
Tubulin alpha-1B chain	TBA1B_MOUSE (+3)	50 kDa	7.76%
Tubulin beta-5 chain	TBB5_MOUSE (+4)	50 kDa	3.15%
Actin, alpha cardiac muscle 1	ACTC_MOUSE (+34)	42 kDa	4.24%
Trypsin	Q9Z1R9_MOUSE	26 kDa	8.13%
Histone H1.5	H15_MOUSE (+1)	23 kDa	11.70%
Histone H1.4	H14_MOUSE	22 kDa	24.20%
Histone H1.3	H13_MOUSE (+1)	22 kDa	23.50%
Histone H1.1	H11_MOUSE	22 kDa	15.00%
Uncharacterized protein (Fragment)	Q8BUF4_MOUSE	22 kDa	3.94%
Histone H3.2	A0A1W2P768_MOUSE (+2)	20 kDa	17.70%
Uncharacterized protein	Q8BIL4_MOUSE	20 kDa	12.40%
Histone H3.3C	H3C_MOUSE (+2)	15 kDa	23.50%
Histone H2AX	H2AX_MOUSE (+11)	15 kDa	13.30%

Tabla 4. Identificación de proteínas de linfocitos T precipitados con la toxina Cry1Ac y analizadas por MALDI TOF:

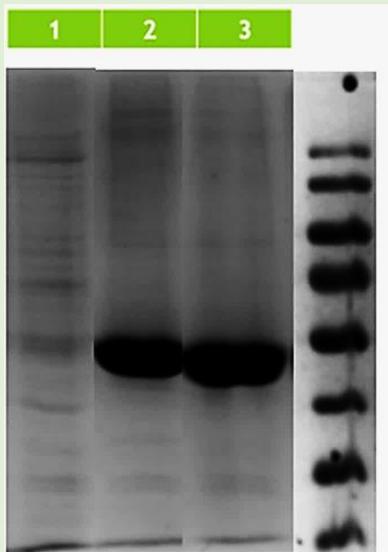
Proteína identificada	Código de acceso	Peso Molecular	% de Cobertura
Neurexophilin	B9EKK6_MOUSE	64 kDa	1.43%
Actin, cytoplasmic 1	ACTB_MOUSE (+19)	42 kDa	4.27%
Vimentin	A0A0A6YWC8_MOUSE	49 kDa	0.01%
MCG124046	Q9Z1R9_MOUSE	26 kDa	8.13%
Uncharacterized protein (Fragment)	Q8BUF4_MOUSE	22 kDa	3.94%
Histone H1.2	H12_MOUSE (+2)	21 kDa	10.40%
Histone H3.2	A0A1W2P768_MOUSE (+2)	20 kDa	17.70%
Histone H2A type 2-A	H2A2A_MOUSE (+1)	14 kDa	36.90%
Histone H2B (Fragment)	A0JLV3_MOUSE (+14)	14 kDa	12.20%

Ubicación de las proteínas de superficie precipitadas por la Toxina Cry1Ac

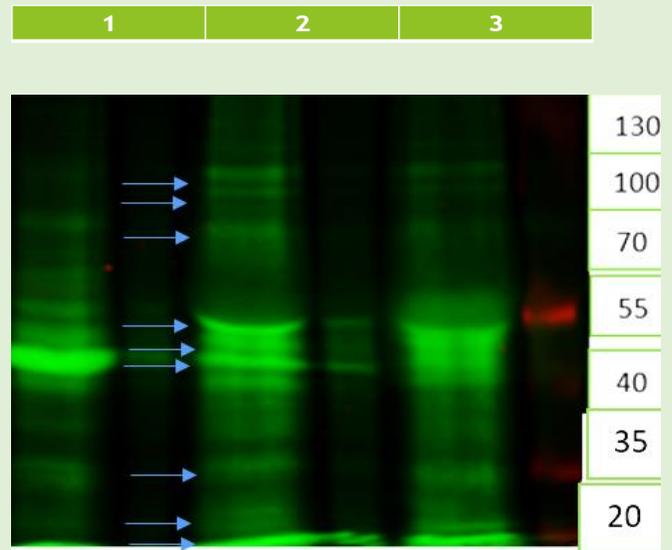
Debido a la mayor concentración y marcaje de proteínas que interactuaron con la toxina en relación con la protoxina, además de la mayor magnitud del efecto de activación y proliferativo que la primera tenía en linfocitos, se priorizó el estudio en la tCry1Ac. Con la intención de determinar las proteínas de superficie que interactúan con la toxina, se marcaron las proteínas de superficie de linfocitos totales por medio de biotina y posteriormente se incubaron las células con Sefarosa-tCry1Ac. En la primera imagen de la figura 4A, se muestra en el carril 1 las proteínas de membrana no precipitadas con tCry1Ac, en el carril 2 se marcan las proteínas de membrana precipitadas con tCry1Ac, por último en el carril 3 se muestra también proteínas de membrana precipitadas con toxina Cry1Ac que no se despegaron de la sefarosa conjugada a Cry1Ac, revelado por azul de Coomassie, al realizar el siguiente procedimiento: agregar buffer de muestra, hervir recolectar sobrenadante, es decir, en este carril se cargó como muestra la sefarosa que volvió a hervirse, éste es un control que muestra las proteínas más afines a Cry1Ac que sólo se despegan por ebullición. Se aprecia la toxina como la banda más fuerte alrededor de los 70kDa, indicativo que mediante la ebullición parte de la toxina conjugada a la sefarosa se desprende, por lo que hay proteínas con mayor afinidad y mantienen la unión a la tCry1Ac inclusive en condiciones desnaturizantes, pudiendo ser candidatos a receptor por esta alta capacidad de unión. En la segunda imagen (4B), se muestra el patrón de proteínas de linfocitos precipitadas con toxina Cry1Ac reveladas por fluorescencia. Las flechas azules marcan las proteínas precipitadas que fueron identificadas en membrana, los pesos moleculares relativos de las proteínas de membrana que se unen a toxina Cry1Ac se muestran debajo. En la tercera imagen (4C), se muestra el Western Blot en la membrana de PVDF, donde encontramos todas las proteínas que han sido biotiniladas que fluorescen en verde, la disposición de los carriles es exactamente el mismo de la imagen anterior, mostrando 9 flechas con pesos en orden descendente de 100, 90, 75, 55, 50, 45, 35, 30, 20 kDa. Estas 9 bandas también se identificaron en el gel de la figura anterior, notando que hay proteínas concordantes con cada uno de los pesos que se encuentran en membrana o citosol, tomando en cuenta la localización celular según la bibliografía reportada, por lo que estas proteínas son fuertes candidatos como receptores específicos. Dentro de las proteínas identificadas se proponen las candidatas que pudieron haber sido biotiniladas, considerando que la mayoría de las proteínas son de naturaleza nuclear, se consideró a cualquier proteína que se encuentre en membrana celular o citosol dentro de la literatura, por lo que las proteínas que se presume, fueron biotiniladas son las siguientes: PMCA, (Plasma membrane calcium-transporting ATPase 1), Keratina, TAP2, Trancetolasa, Alfa-enolasa, Actina, las proteínas ribosomales 60s P0/L6, la proteína ribosomal 40S S2 y el receptor Laminina B, en orden de peso molecular descendiente.

Figura 4.

A



B



C

Banda	Pesos Moleculares	Posible banda
A	100 kDa	PMCA
B	90 kDa	Keratina
C	75 kDa	TAP2
D	55 kDa	Transcetolasa
E	50 kDa	Alfa-enolasa
F	45 kDa	Actina
G	35 kDa	60S proteina ribosomal P0/L6
H	30 kDa	40S proteina ribosomal S2
I	20 kDa	Receptor Laminina B

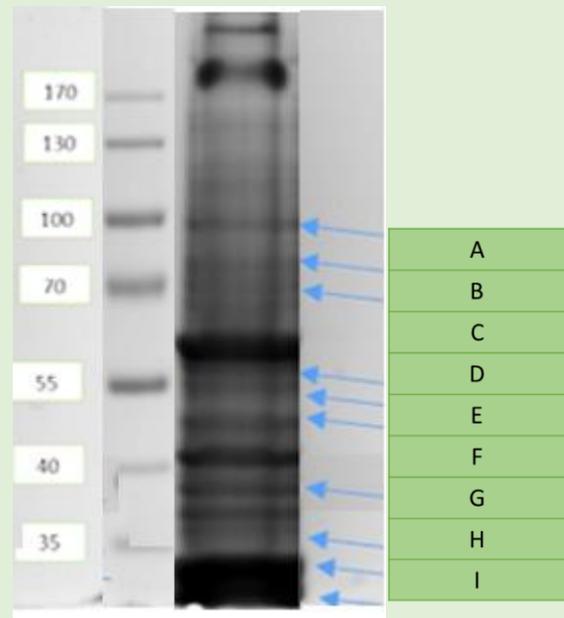


Figura 4: Proteínas de superficie Inmunoprecipitadas por toxina Cry1Ac en linfocitos.

Para identificar a las proteínas de superficie precipitadas con la toxina Cry1Ac las células se biotinilaron primero, se realizó la precipitación con toxina Cry1Ac conjugada a sefarosa, las proteínas de superficie se revelaron con streptavidina-Dye 680 como se describe en la metodología. En los carriles 1-3 de los experimentos de A y B se muestran: un sobrenadante de lisado celular del ensayo de precipitación con toxina Cry1Ac (1), un patrón de proteínas precipitadas con toxina (sobrenadante de la precipitación) (2) y proteínas precipitadas con Cry1Ac recuperadas después de la ebullición de la sefarosa conjugada a la toxina (botón de sefarosa) (3). Este último ensayo se realizó para confirmar que después del tratamiento las proteínas precipitadas a la toxina hay proteínas que permanecen unidas a la sefarosa, indicando muy alta afinidad. En los carriles del panel A se muestran los resultados de las inmunoprecipitaciones de linfocitos de bazo con toxina Cry1Ac teñidos con azul de Coomassie. Se aprecia que el patrón de bandas en el sobrenadante difiere del de las precipitaciones. La banda gruesa intensa en los carriles 2 y 3 alrededor de 60 a 70 kDa son por la marca de la toxina Cry1Ac.

Panel B: Se muestra una membrana de PVDF con la transferencia de proteínas del experimento anterior, la membrana fue incubada con Streptavidina Dye-680 y revelada en el escáner Odyssey, el color verde muestra las proteínas que fueron teñidas y se presentan en superficie, notándose una diferencia de intensidad entre las proteínas del lisado (1) y las precipitadas (2 y 3). Los carriles tienen la misma disposición que el Panel A, con la diferencia que hay carriles de espacio entre carriles de muestra.

Panel C. Patrón de proteínas precipitadas con toxina Cry1Ac la imagen muestra la disposición de las bandas, ordenándolas alfabéticamente de manera descendente al peso molecular, además muestra el marcador de peso molecular para comparar con el peso aproximado.

Identificación de proteínas precipitadas con Cry1Ac en linfocitos previamente descritas en macrófagos

Las proteínas que fueron previamente identificadas como proteínas de unión a protoxina y toxina Cry1Ac en otros tipos celulares⁴⁴, tanto en la línea celular de macrófagos RAW 264.7, como en macrófagos de cultivos celulares primarios, se consideraron como posibles proteínas de unión a toxina y protoxina Cry1Ac en linfocitos, por lo tanto fueron evaluadas por Western Blot. Estos candidatos a receptores se compartían en los linfocitos T y B, debido a que detectamos bandas de proteínas precipitadas que coincidían con los pesos moleculares relativos de proteínas identificadas por secuenciación y análisis MALDI TOF realizado en macrófagos, además que ya se contaba con anticuerpos hacia algunas de estos. Se analizaron cuatro candidatos, los cuales son HSP70, alfa-enolasa, Vimentina y Galectina-3, con pesos esperados en 70 kDa, 48 kDa, 57kDa y 32 kDa, respectivamente, todos se realizaron en el mismo experimento, considerando la diferencia en como afecta el peso molecular durante la electroforesis, se confió en que las proteínas no se traslaparan en su posible marcaje.

Al realizar los ensayos por Western Blot, solamente se detectó marcaje positivo para vimentina en linfocitos T y B, además cuando posteriormente se realizó la identificación de proteínas de unión a Cry1Ac en linfocitos se detectó a la vimentina en la secuenciación, aunque con un nivel de cobertura bajo. La vimentina por ser una proteína de citoesqueleto, regularmente no está presente en membrana salvo en algunas condiciones patológicas como en el cáncer⁴⁵. Además, no se ha evaluado su participación funcional en los efectos de activación inducidos por Cry1Ac en linfocitos, por lo que no se puede confirmar o descartar aún, la participación directa como receptor.

Por otro lado, un resultado inesperado que merece destacarse es el hecho de encontrar que la banda de tCry1Ac se revelaba con los distintos tipos de anticuerpos utilizados para revelar los ensayos de Western Blot, independientemente de su especificidad, por ejemplo, al revelar sólo con anticuerpo secundario de conejo o de chivo. Este hallazgo nos causó interés de caracterizarse por las posibles implicaciones de la unión de la toxina a las inmunoglobulinas. Al estudiar la posible razón de este efecto, se revisó el mecanismo del cual depende la unión de la tCry1Ac en las proteínas de los insectos, como cadherina y N-Aminopeptidasa⁴⁶, encontrando que esta unión depende de las glicosilaciones de las proteínas, en específico por la N-Acetilgalactosamina (GalNAc) en todas las proteínas de insectos; interesantemente esta característica se comparte con las inmunoglobulinas, las cuales también tienen sitios de glicosilación tanto en su fracción cristalizable (Fc), como en la región de bisagra (Hinge) que da movilidad a la fracción de unión (ab)⁴⁷. Por lo tanto decidimos evaluar si la unión de IgG a la toxina Cry1Ac es dependiente de la unión a N-Acetilgalactosamina.

⁴⁴ Marilu Torres- Martinez, et al., 2016; Rubio-Infante et al., 2018

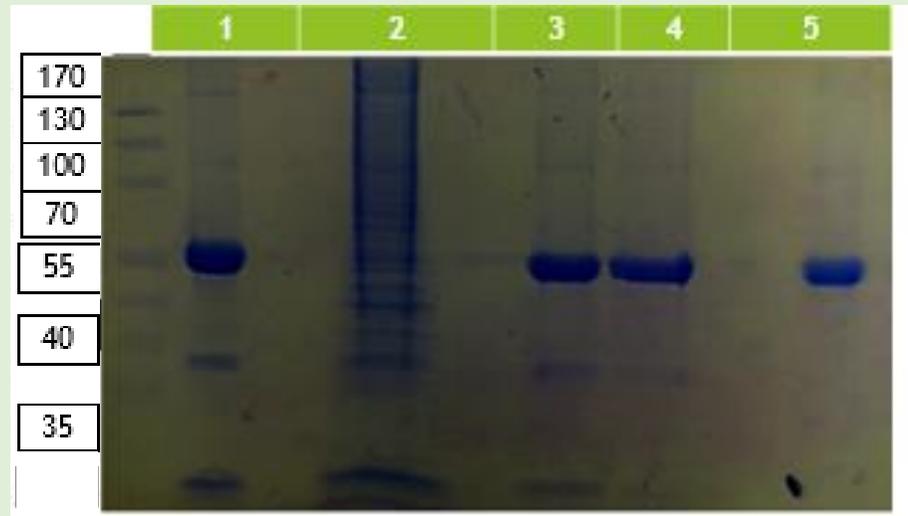
⁴⁵ Satelli & Shunlin, 2012

⁴⁶ Burton et al., 1999

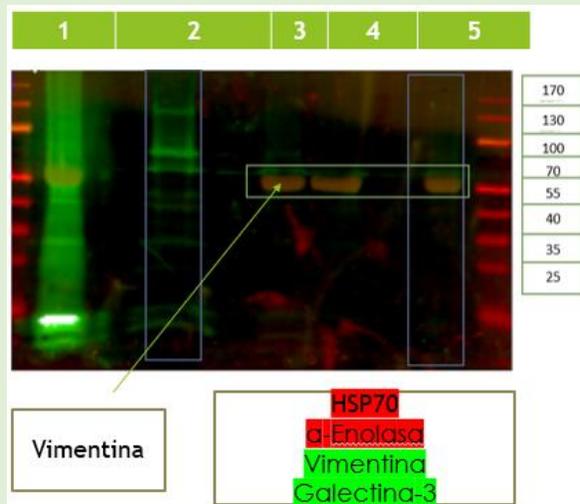
⁴⁷ Hayes et al., 2014

Figura 5

A



B



C

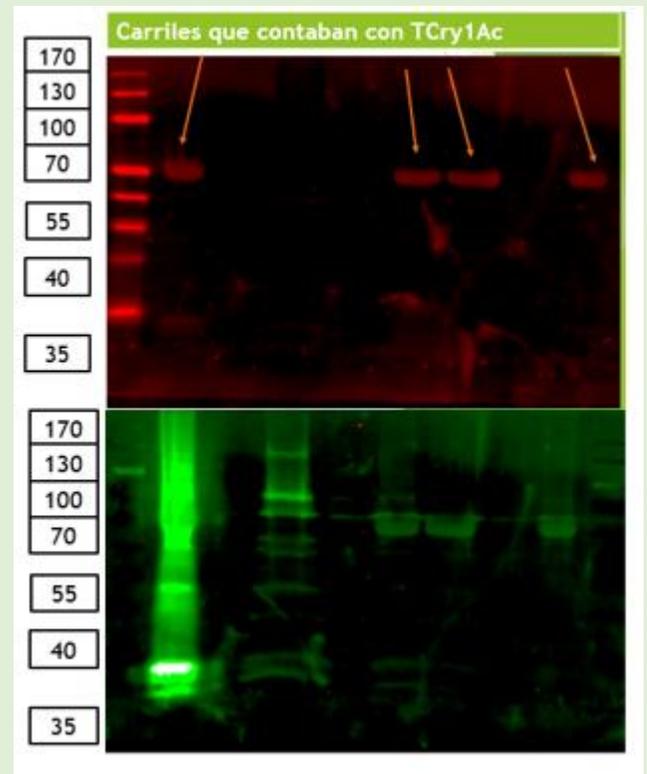


Figura 5. Inmunoprecipitación de proteínas identificadas previamente en macrófagos e identificación de la unión de inmunoglobulina G a la toxina Cry1Ac

En el Panel A de la figura 5 se muestra el gel de electroforesis teñido con coomassie 5 carriles, el carril 1 muestra una inmunoprecipitación con linfocitos biotinilados, por el procedimiento antes mencionado, en el carril 2 muestra un lisado celular como patrón de referencial, el carril 3 y 4 son inmunoprecipitaciones que fueron previamente incubados con una solución 1 molar de GalNAc que se describirá más adelante. Por último, el carril 5 es una inmunoprecipitación ordinaria, como se ha realizado normalmente.

El Panel B muestra el Western Blot realizado con el gel anterior, se utilizaron 4 anticuerpos, que por su detección se organizaron en 2 grupos, HSP70 y alfa-enolasa, con pesos moleculares aproximados de 47 kDa y 70 kDa, respectivamente, marcados por anticuerpos secundarios anti-chivo, que se fluoresce en rojo al detectarse por medio del escáner Odyssey a 680 nm. El segundo grupo, compuesto por los anticuerpos específicos a Vimentina y Galectina-3, con pesos aproximados de 54 y 30 kDa respectivamente, estos fluorescen en verde a 800nm debido al anticuerpo antiburro utilizado.

El panel C muestra la unión inespecífica de los anticuerpos anti-chivo a la toxina Cry1Ac adherida, estas 4 marcas aparecen a la altura del marcador de peso de 70 kDa, cabe destacar que este resultado también aparece con los anticuerpos anti-burro, de manera idéntica en el peso y la forma de la toxina Cry1Ac.

La unión de la tCry1Ac es dependiente de la N-Acetilgalactosamina (GalNAc)

Para confirmar la interacción de la GalNAc con la tCry1Ac, se corrieron alícuotas de tCry1Ac por electroforesis en distintos carriles con la misma concentración (40 µg), se transfirieron a membranas de PVDF, se bloquearon con albúmina toda la noche, se lavaron e incubaron por 24 horas con concentraciones ascendentes de este glucósido (1, 5, 20, 1000 mM, este último con la intención de bloquear completamente la unión) se lavaron y revelaron con anticuerpos secundarios de marcaje hechos en chivo que fluoresce en verde, los cuales no tienen especificidad a la toxina. En la figura 6 se puede apreciar de izquierda a derecha la disminución gradual de la fluorescencia a concentraciones mayores del glucósido, desde 1 hasta 1000 mM. Lo anterior indica que la interacción de IgG con toxina se debe directamente a la presencia de GalNAc. Además, este efecto de interacción ocurre al evaluar anticuerpos de diversas especies, como se aprecia en los resultados obtenidos con anticuerpos secundarios de conejo revelados por quimioluminiscencia en la figura 7 esta característica se evaluó como se describe más adelante al comparar inmunoglobulinas de diversas especies.

Figura 6

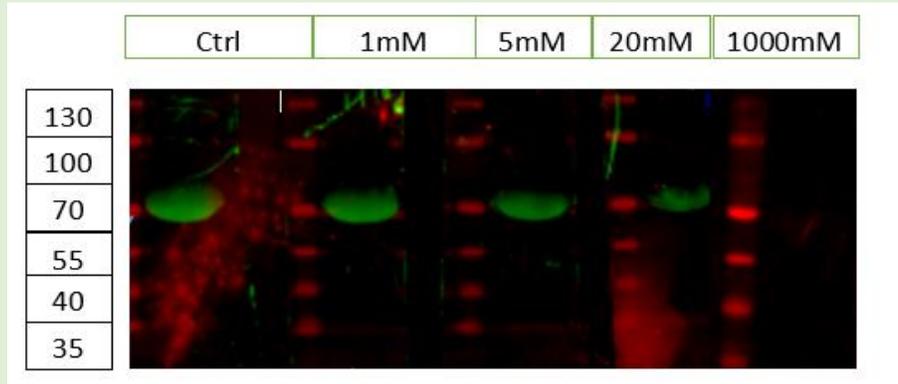


Figura 6. La unión de la tCry1Ac a las inmunoglobulinas se inhibe ante la saturación de GalNAc. Western Blot de proteínas de tCry1Ac (40µg) al incubarse con diversas concentraciones de GalNAc (1,5,20,1000mM) y posteriormente revelada con anticuerpo de burro anti IgG de conejo (1:1000ml).

Las tiras se incubaron por separado, durante 24 horas a 4 °C, con la finalidad de saturar las proteínas, posteriormente se lavaron 3 veces con PBS e inmediatamente se incubaron con los anticuerpos de manera convencional. Las tiras se analizaron en el mismo tiempo en el escáner Odyssey. Se nota la disminución gradual dependiente de la concentración siendo ausente el marcaje en la tira incubada 1 Molar lo cual muestra que inclusive con lavados posteriores, la unión tCry1Ac-GalNAc se mantiene estable, además de ser el sitio específico de unión a la inmunoglobulina fluorescente.

Figura 7

Peso Molecular	Western Blot
----------------	--------------

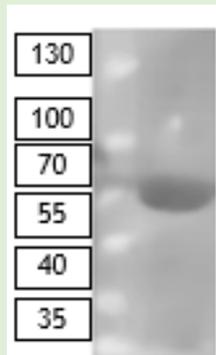


Figura 7. La IgG de conejo tiene afinidad por la toxina Cry1Ac.

En la figura 7 se presenta un Western Blot de tCry1Ac (30mg) revelada por anticuerpo de conejo anti IgG de ratón, por quimioluminiscencia. Al obtener los resultados de la disminución de la unión entre IgG y tCry1Ac se decidió analizar si otra especie de anticuerpos además de chivo u burro tenían este efecto, por lo que se usó un anticuerpo de una especie separada filogenéticamente como sería el conejo, al resultar positivo se consideró que este fenómeno se conservaría en otras especies de interés científico y clínico, como lo es el ratón o el humano.

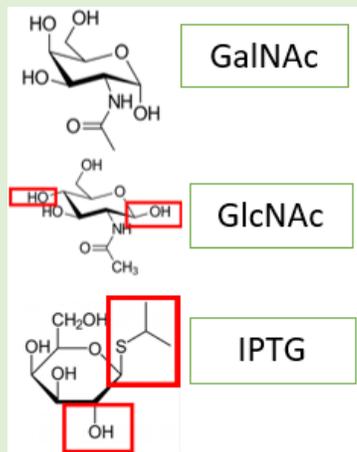
La interacción tCry1Ac-GalNac es específica y no se comparte con otros carbohidratos modificados

Para saber si la unión de IgG a toxina Cry1Ac solamente se debe a la GalNac, una glicosilación que en inmunoglobulinas es menos ubicua⁴⁸, se utilizaron otros carbohidratos que tuvieran modificaciones, pero en general una estructura parecida. En esta se usaron 2 carbohidratos parecidos, el isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) y la N-Acetil-glucosamina (GlcNAc), de interés por su relevancia biológica⁴⁹, a concentraciones de saturación (250mM o 1000mM), el primero tiene la estructura de la galactosa con modificaciones y el segundo tiene la misma orientación que la N-Acetilación en la GalNac (Figura 8A). Los resultados indican que la unión de IgG a toxina Cry1Ac es específica de la interacción con GalNac de la IgG ya que no se inhibe la unión al competir con otros carbohidratos como IPTG (Figura 8 B) o GlcNAc (Figura 8 C).

⁴⁸ Steen et al., 2008

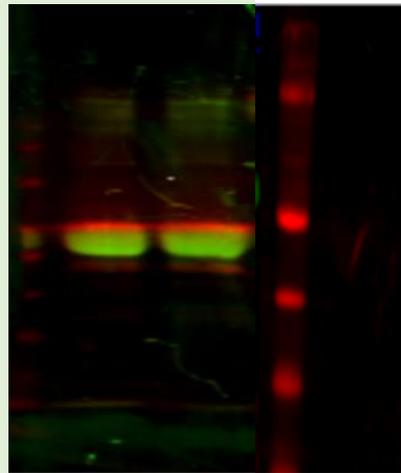
⁴⁹ Kukuruzinska & Lennon, 1996

Figura 8



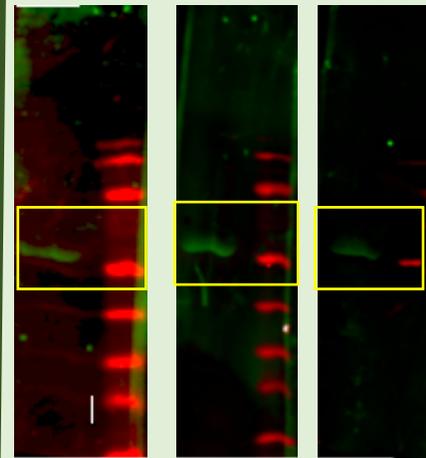
A

Control GlcNAc 1M GalNAc 1M



B

Control IPTG 0.25M GlcNAc 0.25M



C

Figura 8. La unión específica de la tCry1Ac a Inmunoglobulina G (IgG) es mediada únicamente por la GalNAc.

En A se muestra la estructura de las moléculas parecidas a la GalNAc. En B se muestra un ensayo de Western Blot donde se corrieron 2 alicuotas de tCry1Ac (40µg), una de estas fue incubada previamente con GlcNAc. Esto debido a que esta glicosilación también se presenta en gran medida en inmunoglobulinas (Kukuruzinska & Lennon, 1996) por lo que se podría esperar afinidad con la tCry1Ac, este se incubó durante 2 horas a 4 °C con anticuerpo de burro anti IgG de conejo y anticuerpo de chivo anti IgG de burro, en condiciones análogas al ensayo realizado con GalNAc de y no se encontró diferencia a la inhibición de unión por parte de anticuerpos de chivo y burro, por lo que se podría descartar a la GlcNAc como parte fundamental de la unión de la tCry1Ac a anticuerpos. En C, considerando que la estructura de galactosa podría ser el factor específico de unión de la toxina a los anticuerpos, se evaluó la inhibición de la unión de IgG a toxina Cry1Ac compitiendo con IPTG, el cuál cuenta con un anillo de galactosa como estructura principal. En este experimento no se mostró algún efecto de inhibición de tCry1Ac por la IPTG, además que se muestra una mayor intensidad de marcaje que la referencia positiva de GalNAc, utilizando la misma molaridad, por lo que se podría considerar que tanto el IPTG ni la GlcNAc, son inhibidores de esta unión, sugiriendo que la unión es completamente específica.

La toxina precipita a proteínas de linfocitos de manera dependiente e independiente a la GalNAc

Dada la relevancia en este estudio que ha mostrado el carbohidrato GalNAc en la unión de IgG a la toxina Cry1Ac, se deseó estudiar la participación de esta glicosilación en la unión de la toxina Cry1Ac a proteínas de superficie en linfocitos. Para determinar a cuales proteínas de linfocitos se unía Cry1Ac de forma dependiente de GalNAc se realizó una precipitación con la toxina Cry1Ac de la siguiente forma. Se incubó previamente la tCry1Ac-Sefarosa con una solución 1 M de GalNAc por 24 horas, se lavó sucesivamente y se incubó con las células (linfocitos), a la par se realizó otra precipitación convencional con la finalidad de obtener un patrón de referencia. Se obtuvieron las proteínas de linfocitos T y B que dependían de la unión del glucósido, al separar las proteínas obtenidas por electroforesis, no se observó un gran cambio como se esperaría, al considerar que gran parte de las proteínas tanto extra como intracelulares tienen glicosilaciones. En la figura se puede apreciar que de manera cualitativa solo hubo un cambio en cuanto a concentración de proteínas que dependieran de la GalNAc y sólo se detectó un cambio significativo fue sobre una proteína con un peso mayor a 180 kDa lo cual podría sugerir que también la(s) inmunoglobulina(s) de superficie presente en los linfocitos B de ratón pueden tener afinidad como las inmunoglobulinas de conejo y chivo. Por otro lado en este mismo ensayo de precipitación de precipitación de proteínas de unión a toxina Cry1Ac competido con exceso de GalNAc decidimos realizar Western Blot buscando identificar la presencia de algunas proteínas previamente identificadas en macrófagos como proteínas de unión a Cry1Ac tales como vimentina, hsp70 etc. Entre las proteínas que precipitaron independientemente de la glicosilación, se identificó únicamente la vimentina, por medio de Western Blot, lo que concuerda con la literatura, por la baja concentración de glicosilaciones en esta proteína⁵⁰, además que solo se ha reportado N-Acetil-Glucosamina como modificación de esta proteína, por lo que no se considera un sitio de unión específico para la toxina Cry1Ac acorde a los resultados antes mostrados.

⁵⁰ Snider et al, 2018

Figura 9

Vimentina

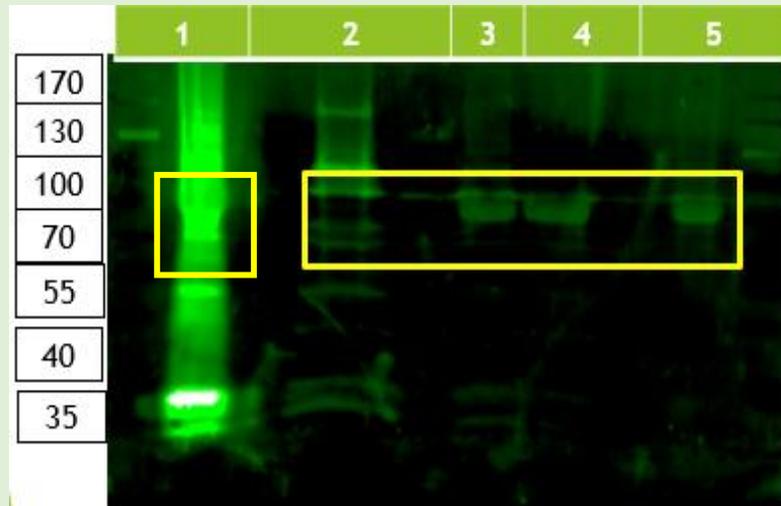


Figura 9 La unión de toxina Cry1Ac a algunas proteínas de linfocitos como la vimentina no depende de GalNAc.

En el gel se pueden apreciar 5 carriles con el siguiente orden. El primer carril muestra la inmunoprecipitación en linfocitos con toxina Cry1Ac de las proteínas que fueron biotiniladas en superficie (como se describió anteriormente), en el segundo carril se presenta un lisado de linfocitos como control positivo a vimentina, está presente en el tipo celular, en el tercer y cuarto carril se muestran precipitaciones tratadas previamente con GalNAc, en el tercero se muestra la inmunoprecipitación previamente inhibida con GalNAc 1000 mM, en el cuarto se muestra el botón con proteínas que fueron previamente hervidas y mantuvieron la unión a la toxina. Por último, en el quinto carril, se muestra la inmunoprecipitación control. Se realizaron ensayos de Western Blot para corroborar que las proteínas a evaluar (HSP70, alfa-enolasa, galectina-3 y vimentina) son proteínas expuestas a la parte extracelular. Los resultados muestran que, de las cuatro posibles proteínas, solamente la vimentina, fue marcada en las 5 bandas, siendo el primer carril cuestionable debido a la sobresaturación de señal. Los siguientes carriles indican que la vimentina se adhiere de manera independiente a la GalNAc, por lo que se podría considerar que este no es el único mecanismo de unión de proteínas de linfocitos a la Toxina Cry1Ac.

La Toxina Cry1Ac precipita a las inmunoglobulinas M en suero e inmunoglobulinas de superficie (BCR) en linfocitos B de diversas especies

Dada la característica de unión a anticuerpos secundarios, se considera posible la interacción directa de la inmunoglobulina soluble de ratón, además que se presenta unión entre diversos anticuerpos de diferentes especies. Se corroboró de manera cualitativa la inhibición de la unión a inmunoglobulinas que se caracterizan por un peso molecular alto⁵¹, por medio de inmunoprecipitaciones, mostrando una disminución a las proteínas precipitadas. Considerando la diversidad que tiene la tCry1Ac a la unión de diversos anticuerpos se evaluó la interacción entre la toxina y sueros de distintas especies, los cuales son de ratón conejo y humano. Al incubarse diluciones de suero 1:10, se hicieron precipitaciones de proteína con tCry1Ac-Sefarosa, se separaron por electroforesis y se transfirieron a una membrana PVDF para incubarse con anticuerpos anti-IgM total de ratón. Sorprendentemente se detectaron las inmunoglobulinas en el peso esperado ≥ 180 kDa. Además, al repetir las precipitaciones de linfocitos totales de ratón y suero de ratón, que posteriormente se separaron y transfirieron, al incubarse con anticuerpos anti-IgM, dieron positivo al marcaje de esta inmunoglobulina, por lo que podríamos considerar a la inmunoglobulina como un posible receptor o proteína de interacción directa con la toxina Cry1Ac, aunque no aparece en los resultados de secuenciación la evidencia que se ha presentado, es un posible receptor a la toxina. Las Inmunoglobulinas son candidatas a receptor por características tales como tener alto peso molecular, además de presentar glicosilaciones. Solamente hay 2 Igs que se presentan en superficie, la IgM e IgG, las dos con PM superiores a 180 kDa⁵². Al incubar con GalNAc sería notable la disminución de la concentración de la supuesta proteína en el gel al revelar con Azul de Coomassie, siendo un primer abordaje para la identificación, es importante considerar que en la secuenciación por masas no aparece ningún integrante de esta familia. Esta banda, por su peso molecular indica la posibilidad de pertenecer a las inmunoglobulinas, lo cual fue analizado en experimentos posteriores.

Figura 10

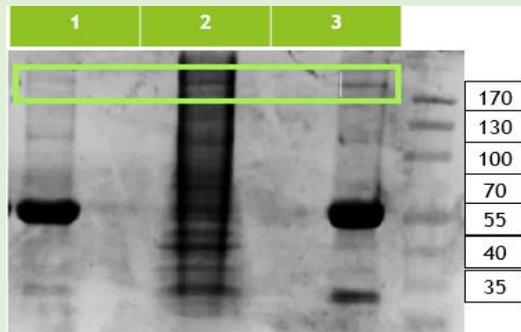


Figura 10. Las inmunoglobulinas de superficie BCR son precipitadas por la tCry1Ac. En el primer carril se muestra una inmunoprecipitación inhibida con GalNAc 1000 mM, en el segundo carril el lisado celular de linfocitos de T y B, con las proteínas posibles a detectar, por último, en el tercer carril se tiene una inmunoprecipitación control de linfocitos que no fue competida con GAINAc. El recuadro verde muestra una disminución en el primer carril, comparando con el segundo y tercer carril por lo que se puede suponer que la banda de alto peso molecular, presuntamente inmunoglobulinas de superficie en linfocitos B, disminuyen su marcaje al ser bloqueadas con GalNAc.

Figura 11

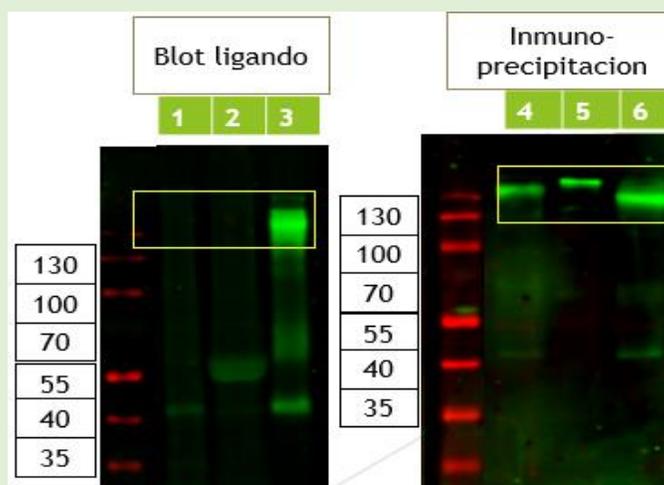


Figura 11. La unión de la tCry1Ac requiere que la Ig se presente en forma nativa, además la unión se presenta en Ig's de distintas especies animales, incluida la humana.

Al confirmar parcialmente la unión de tCry1Ac a inmunoglobulinas, se cuestionó si la unión se mantiene en condiciones nativas o desnaturizantes como las que puede ocasionar la corrida de un gel de electroforesis, por lo que se realizaron ensayos de Blot ligando y de inmunoprecipitación. En el primer carril se corrió un lisado de linfocitos, se reveló con toxina biotinilada y posteriormente con anticuerpo anti IgM rico en inmunoglobulinas, en el segundo carril se realizó una inmunoprecipitación de suero de ratón revelada con toxina biotinilada, y posteriormente fue incubada con inmunoglobulina anti IgM. En el tercer carril, se realizó una inmunoprecipitación ordinaria con toxina Cry1Ac, pero con suero de humano, en vez de linfocitos y se reveló con anticuerpo anti IgM. En los carriles 4 y 6, se realizaron inmunoprecipitaciones con sueros de diferentes especies, de humano, ratón y conejo, respectivamente. En los primeros 2 carriles se muestra que las inmunoglobulinas de suero no tienen afinidad a las toxinas cuando se desnaturizan por medio de electroforesis, siendo el tercero el control positivo de unión, lo cual sugiere que solamente hay afinidad a la inmunoglobulina en su conformación nativa, esto se puede deber al empaquetamiento que aparece al correr el gel, lo cual puede cubrir los sitios de unión, mientras que los siguientes 3 carriles (4,5,6) muestran que la proteína tCry1Ac puede precipitar a IgGs y, por ende, interactuar directamente con anticuerpos de diversas especies en el suero.

Figura 12

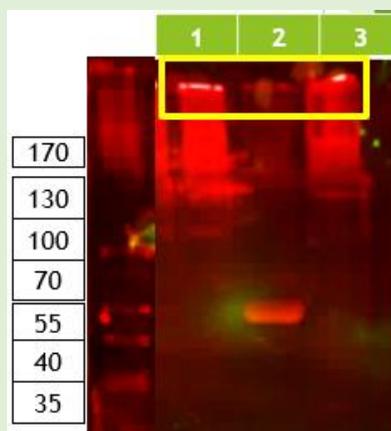


Figura 12. La IgM de suero y de superficie es precipitada por la tCry1Ac.

Para corroborar que las proteínas que inmunoprecipitan y también disminuyen en marcaje cuando son incubadas en saturación de GalNAc son específicamente inmunoglobulinas, independientemente de falta de aparición en las proteínas identificadas por MALDI-TOF, se decidió realizar una inmunoprecipitación de linfocitos y suero (carriles 1 y 2, respectivamente), teniendo como control positivo el suero de ratón positivo, (carril 3), esto se reveló con anticuerpo anti-IgG. Se muestra que en los tres carriles hubo marcaje positivo con diferencia de intensidad, por lo que se podría considerar con cierta seguridad que la inmunoglobulina G es una proteína afín a la toxina Cry1Ac

La Toxina Cry1Ac interactúa de manera dosis dependiente con las inmunoglobulinas de suero y lavados intestinales

Con la intención de evaluar ahora, si el efecto de unión es específico a un isotipo de inmunoglobulina se realizó una prueba de ELISA previamente descrita, con diluciones desde 1:50 hasta 1 en 1:3200 para IgM e IgG, y 1:2 hasta 1:256 para IgA, esta última con una concentración mayor debido a la baja concentración que puede presentar por provenir de lavados intestinales. En el caso de la IgG e IgM se puede observar una curva de concentración que disminuye cuando aumentan las diluciones, mientras que en la IgA se mantienen constantes, esto puede deberse a la inespecificidad que confiere el lavado intestinal.

Los valores que se muestran fueron mayores a 0.05 de absorbancia, considerándose negativos todos los valores de las diluciones que fueron menores a este umbral.

Figura 13

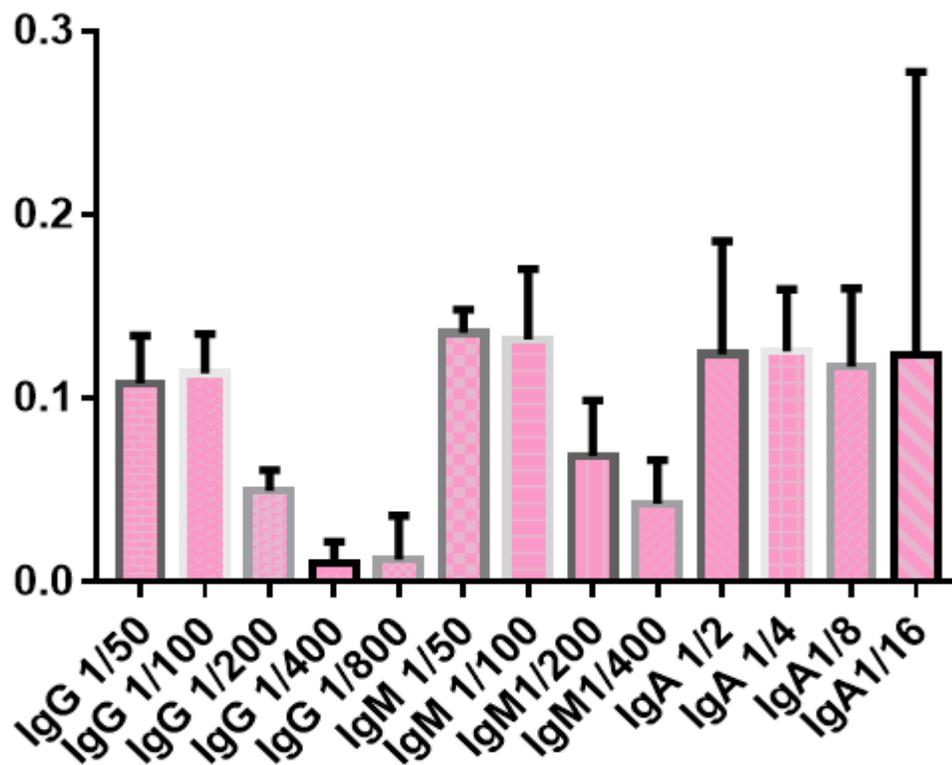


Figura 13. La tCry1Ac se une a diferentes isotipos, como IgG e IgM. Se realizaron pruebas Elisa tipo directo con 3 tipos de inmunoglobulinas (G,M y A). En las inmunoglobulinas G y M se utilizaron diluciones desde 50 a 400, las cuales aumentaban duplicándose, estas inmunoglobulinas se obtuvieron de suero de ratón, mientras que la inmunoglobulina A fue utilizada a diluciones menores, de 2 a 16, con igual factor de duplicación. Esta última proteína fue evaluada así, debido a que proviene de lavados intestinales, los cuales pueden dar un marcaje erróneo, así como la alta labilidad de la IgA, comparada con la IgG e IgM. Se puede apreciar una tendencia por parte de la IgG y la IgM a disminuir, conforme a la dilución lo cual indica una curva de saturación que indicaría que tanto la IgG como IgM son afines a la toxina, dado que la IgM es el isotipo predominante en linfocitos B, se propone como un fuerte candidato a receptor. Por otro lado, la dilución de la IgA no mostró la tendencia de las proteínas anteriores, esto posiblemente a la impureza de la muestra de donde se obtuvo, por lo que se optaría por analizarla con IgA's purificadas para confirmar también afinidad a la toxina, como se ha conservado de manera interespecie.

Discusión

Diversos estudios de las proteínas Cry1Ac han mostrado su efecto inmunógeno y adyuvante⁵³, como ejemplo: el efecto de la protoxina puede aumentar la producción de anticuerpos o citocinas, producidos principalmente por linfocitos B y T *in vivo*⁵⁴, respectivamente, o activación y migración *in vitro e in vivo*⁵⁵. Considerando estos efectos y su posible utilidad, era pertinente el estudio de las proteínas, enfocándonos en el aspecto molecular al identificar los receptores que causan estos efectos.

Los resultados de este estudio muestran que la toxina y protoxina Cry1Ac tienen afinidad por diversas proteínas de linfocitos T y B que muestran patrones establecidos de bandas, que al identificarse, arrojaron resultados de proteínas tanto extra como intracelulares, teniendo un gran repertorio de unión, una de las proteínas más abundantes que se reportaron son las histonas, las cuales tuvieron valores mayores a 30% en cobertura, esto indica una alta afinidad a esta familia de proteínas intranucleares que por su naturaleza, no podrían considerarse como posibles receptores de manera específica, aunque sería de interés su estudio a nivel nuclear como futura investigación. El posible mecanismo de unión podría deberse a que algunas de estas proteínas tienen una alta carga de glicosilación por N-Acetil-Glucosamina y en menor grado N-Acetil-Galactosamina (GalNAc)⁵⁶, siendo este último el glucósido que ha sido estudiado ampliamente, se puede considerar que la GalNAc participa de manera directa en la unión con proteínas de mamífero. Cabe reconocer que varias de las proteínas que precipitan con Cry1ac podrían no ser proteínas de unión y éstas solamente precipitan por ser complejos proteicos, esto se podría corroborar al estudiar la unión de las diferentes proteínas purificadas que fueron identificadas.

En el caso de las proteínas precipitadas por la tCry1Ac en linfocitos totales, fueron identificadas proteínas como: la Hemoglobina y Betaglobina mismas proteínas identificadas con alto porcentaje de cobertura, cuya función se asocia con células hematopoyéticas, pero no con linfocitos.

La actina es una proteína del citoesqueleto anteriormente como una proteína de unión a Cry1Ac y fue identificada con amplia cobertura⁵⁷. La Tubulina fue también identificada con cobertura moderada, esta proteína de microtúbulos ha sido identificada asociada a membrana como α y β tubulina, principalmente como parte de las balsas lipídicas, las cuales son conocidas por ser sitios privilegiados de señalización celular, también podemos encontrar en superficie la γ - tubulina que está asociada a señalización por medio de cinasas como Fyn-K y PI3K, que están íntimamente relacionados en señalización de linfocitos T y B, que aunque aparece en linfocitos, estos debieron haber sido transformados previamente, por lo que la aparición en superficie en condiciones

⁵³ Gonzalez Gonzalez et al, 2015; Moreno-Fierros et al, 2000; Rodriguez Monroy, et al, 2010; Rojas Hernandez et al., 2004; Ibarra Moreno, 2014; Vazquez et al 1999

⁵⁴ Ibarra Moreno, 2019

⁵⁵ Rubio Infante et al, 2018; Torres Martinez et al, 2016

⁵⁶ Dehennaut et al, 2014

⁵⁷ Rubio-Infante et al, 2016

normales sería improbable⁵⁸. Se identificó a la Coronina 1 conocida como Coronina 1A, esta se expresa exclusivamente en leucocitos de mamíferos, sin conocerse expresión en cualquier otro tipo de célula en el cuerpo. La coronina tiene un sitio de unión a actina F la cual previene la apoptosis, además de favorece procesos como la fosforilación de la PKC, la activación de calcineurina y la unión a membrana, así como remodelación citoesquelética y dinámica de filamentos. Es un importante inhibidor de fagosomas en macrófagos infectados de micobacterias, aunque su participación en células sanas es todavía desconocido o inconcluso⁵⁹.

Por otro lado, también se encontró SORCS3 es parte de una familia de proteínas conocidas como VPS10p, que comparten homología entre Sortilina, SorCS1, SorCS2, SorCS3, y SorLA, con dominios extracelulares, transmembranales e intracelulares que pueden dar pie a activación metabólica secundaria tal como las vías de señalización intracelular. Esta proteína tiene importancia a nivel neuronal debido a procesos pró-apotóticos y de plasticidad neuronal, los cuales son procesos un tanto antagónicos que se deben a la señalización celular derivada, aunque principalmente, su aparición es primordialmente en neuronas y células secundarias del sistema nervioso⁶⁰.

Otra proteína identificada de interés es la Ca²⁺ ATPasa de membrana plasmática (PMCA), la cual se ha reportado como un importante factor en la activación de linfocitos T mediada por TCR, esta proteína junto a la neuroplastina, favorecen el aumento de la concentración intracelular de Ca²⁺, así como el incremento nuclear del factor nuclear de activación de células T activadas (NFAT), esto a partir de la liberación de este catión desde el retículo endoplásmico y la apertura de los canales de calcio dependientes de calcio, además de la transcripción de genes de activación específicos de linfocitos T⁶¹.

La transcetolasa también es importante en el sistema inmune, debido a que es parte integral de la activación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la formación de trampas extracelulares de neutrófilos (NETs), por medio de la generación de NADPH. El proceso conocido como NETosis el cual se caracteriza en la extrusión de cromatina o ADN con proteínas citoplásmicas que ayudan a atrapar patógenos, aunque solo se conoce como una proteína⁶². Otra proteína de interés encontrada es parte de la familia GIMAP, la proteína GTPasa IMAP 4, también conocida como familia de proteínas de unión a nucleótidos asociadas al sistema inmune (IANs), tienen como actividad el intercambio de GTP, con un comportamiento parecido a las GTPasas tipo Ras, que regulan funciones celulares claves en todos los organismos vivos. Esta familia de proteínas ha sido asociada a procesos como el desarrollo del timo y la regulación apoptótica de linfocitos, en específico la GIMAP 4 se expresa en esplenocitos, linfocitos T/B y timocitos, en humanos se ha caracterizado a la GIMAP 4 como una proteína de actividad GTPasa intrínseca, que se une a calmodulina además de tener sitios ricos de fosforilación, además que la regulación de los genes GIMAP es altamente regulada durante el

⁵⁸ Wolff, 2009

⁵⁹ Robin Harris, 2008

⁶⁰ Hermey, 2014

⁶¹ Korthals et al., 2017

⁶² Riyapa et al., 2019

desarrollo de los linfocitos T en el timo, por ejemplo, GIMAP 4 cascada debajo de la caspasa 3, una conocida proteína pro-apoptótica, además de interactuar con la proteína Bax, de la familia Bcl2⁶³.

Por último, fue identificada la proteína TAP2, mejor conocida como proteína transportadora asociada al procesamiento antigénico, misma que es parte de una familia que se especializa en la entrega de péptidos citosólicos a moléculas de histocompatibilidad de clase 1 (MHC1) en el retículo endoplásmico. Esta proteína se caracteriza por ser un heterodímero TAP1/TAP2 que contienen múltiples segmentos transmembranales y un sitio de unión a nucleótidos localizado en el citoplasma, la función canónica es la óptima presentación de antígenos propios a los linfocitos CD8+ o por medio de la presentación cruzada a partir de fagosomas, este último proceso es importante para la presentación de antígeno no mediado por células dendríticas, ya que estas son las principales células para iniciar inmunidad⁶⁴.

Las proteínas antes mencionadas son las que se han encontrado dentro de la bibliografía como claves en algún proceso de activación, proliferación, señalización o inhibición de la apoptosis, por lo que se tendría que analizar por medio de otras técnicas para encontrar el o los posibles receptores para linfocitos T y B, es decir, determinar la participación de las proteínas anteriores como receptores de la toxina Cry1Ac lo cual podría lograrse por medio de bloqueo de la actividad de las antes mencionadas, por medio de inhibidores farmacológicos, anticuerpos específicos o interferencia de la transcripción del gen, por medio de RNA interferente.

Entre las proteínas de unión de tCry1Ac a linfocitos identificadas destacan varias proteínas de interés para estudios posteriores que podrían explicar los efectos de activación inducidos por la estimulación, ya que son parte de mecanismos de señalización o ensamblaje proteico, tal como PMCA, GIMAP4, Transcetolasa, Coronina 1A y TAP2. En el caso de GIMAP4, TAP2 y PMCA se pueden considerar como proteínas que participan en la activación o maduración de células del sistema inmune casi exclusivamente, siendo GIMAP4 una proteína de interés para la evaluación de la activación debido a que es un intercambiador de GTP⁶⁵, lo cual podría indicar que la activación celular se debe a proteínas G, por otro lado, PMCA sería un posible participante en señalización mediada por flujos de calcio⁶⁶. Mientras que la transcetolasa, una proteína de ciclo metabólico con actividades "*moonlight*", como la traslocación de citosol a núcleo y factor de transcripción, podría interactuar directamente con la toxina en superficie⁶⁷.

Otro tipo de proteínas estructurales y motoras que fueron determinadas como proteínas de unión a tCry1Ac en linfocitos son: actina, vimentina, miosina y tubulina. Estas proteínas son conocidas por remodelarse para facilitar la internalización de proteínas o como segundos mensajeros⁶⁸, en el caso de la vimentina, como se mencionó anteriormente, carece de glicosilaciones importantes, lo cual indica, un mecanismo de unión independiente a GalNAc, además por su naturaleza estructural, las funciones como receptores de las proteínas antes mencionadas, serían cuestionables además que el porcentaje de cobertura no excede de 30% excepto en la actina. Algo que fue sorprendente dentro

⁶³ Fil & Lahesmaa, 2010

⁶⁴ Mccluskey et al, 2004

⁶⁵ Moulder et al., 2009

⁶⁶ Burette, et al, 2007

⁶⁷ Jeffery, 2019

⁶⁸ Biskou et al., 2019; Tang et al., 2018

de nuestros posibles candidatos a receptor de la toxina Cry1Ac, fue que la familia de las inmunoglobulinas/receptores de células B(BCR) aparecieron como posibles candidatos. Tomando en cuenta la importancia de la glicosilación en los efectos de la toxina Cry1Ac en insectos blanco y que la GalNAc es una de las glicosilaciones más comunes también en mamíferos, la unión y efectos biológicos potenciales en células de mamífero podrían esperarse⁶⁹ a través de estas glicosilaciones, de hecho, GalNAc se expresa en eritrocitos como parte de los antígenos ABO, lo cual podría explicar los efectos hemotóxicos reportados en un estudio *in vitro* donde al administrarse Cry1Ac se favoreció la lisis celular de eritrocitos y además se indujo la formación de micronúcleos⁷⁰.

Además de en los antígenos sanguíneos, la presencia de la glicosilación GalNAc aparece en otro tipo celular como en linfocitos, específicamente en los receptores BCR que al tener contacto con un antígeno favorecen la activación y proliferación celular, esto podría explicar parcialmente el efecto de la toxina Cry1Ac de inducir la proliferación policlonal de linfocitos B y el efecto inesperado observado después de la administración oral de la toxina Cry1Ac en un estudio antes mencionado, enfocado a evaluar su potencial alergénico en ratones, ya que se observaron hiperplasias linfoides en el colon, además de aumento en poblaciones de linfocitos B IgE+, por lo que el mecanismo de unión a proteínas de insectos, podría compartirse con mamíferos⁷¹.

La unión de la toxina Cry1Ac al BCR podría explicar sus efectos estimuladores en linfocitos B, ya que la estimulación del receptor activa varias vías de señalización intracelular que se ejecutan mediante una interacción coordinada de varias clases de enzimas y proteínas adaptadoras que han sido ampliamente estudiadas. Una vía de señalización clave que es utilizada, no sólo por el BCR sino por muchos receptores diferentes para controlar la proliferación celular, la supervivencia y la diferenciación es la activación de ERK, que forma parte de las vías MAPK⁷². En las células B, se ha demostrado que la ruta de ERK es necesaria para la progresión del desarrollo temprano de las células B, además del establecimiento y mantenimiento de las células B de memoria⁷³.

En el caso de las proteínas obtenidas por la precipitación de proteínas mediante la pCry1c se obtuvieron: proteínas de interés como la DOCK9, también conocida como zizimina 1, parte de una familia de 11 homólogos que sirven como factores intercambiadores de nucleótidos para GTPasas, se expresa predominantemente en linfocitos T, pero no en B, estas proteínas son importantes en la dinámica de la actina en el citoesqueleto, adhesión celular y movimiento. Esta proteína interactúa con Rac1 y Cdc42, los cuales regulan el ciclo celular, por medio de la señalización de proteínas G⁷⁴.

También fue identificada la prohibitina, misma que tiene un papel importante en el desarrollo y establecimiento del cáncer, esta proteína tiene importancia en la homeostasis mitocondrial y supervivencia de linfocitos humanos normales. Además que parte de sus funciones incluyen: transcripción nuclear, proteína de andamiaje lipídica en la membrana plasmática, regulador apoptótico y de morfogénesis mitocondrial, mientras que su inhibición altera la vía de Raf/MEK/ERK,

⁶⁹ Arnold et al, 2007

⁷⁰ Mezzomo et al., 2015

⁷¹ Moreno-Fierros et al, 2000; Santos-Vigil et al, 2018)

⁷² Nagaoka et al., 2000

⁷³ Scott & Pawson, 2013

⁷⁴ Ruiz-lafuente, Minguela, & Parrado, 2018

AKT/PI3K y la inducción de apoptosis, la disminución de especies reactivas de oxígeno, por mencionar algunas⁷⁵.

También se identificaron proteínas S100. La familia de proteínas S100 consisten en 24 miembros con 3 grupos que se dividen en el efecto regulatorio compartimentalizado, por su efecto intracelular, efecto extracelular o por tener efectos en los dos sitios antes mencionados, las proteínas S100 tienen alta afinidad al calcio, de manera que regulan los niveles intracelulares y las vías dependientes de Ca^{2+} , aunque normalmente las proteínas de homeostasis del calcio son bombas de gradiente o estructuras con gran capacidad de unión al ion, las proteínas S100 tienen participación en la proliferación, diferenciación, apoptosis, homeostasis del calcio, metabolismo, inflamación y migración. Las proteínas S100 extracelulares funcionan de manera autocrina o paracrina, como señales entre células, de manera que pueden ser específicas a factores de crecimiento, citocinas y receptores tipo toll (TLRs). En específico, la proteína S100-A9, tiene efecto inhibitorio en la diferenciación mieloide, acumulando células supresoras derivadas mieloides, además que los macrófagos pierden la expresión de S100-A9 al madurar, las células dendríticas producen más citocinas al ser deficientes de esta, por otro lado, es un blanco en la vía de señalización de p38 MAPK⁷⁶.

En resumen, podría considerarse a la proteína S100-A9 como un buen candidato a receptor o a proteína de interacción con la protoxina Cry1Ac, la cual no se presentó en los resultados obtenidos en toxina, pudiendo ser la posible explicación a la diferencia en efectos entre toxina y protoxina en diversos modelos estudiados en este laboratorio.

Por último, las proteínas obtenidas de tCry1Ac en linfocitos aislados por selección positiva arrojaron resultados como: Una proteína de interés que se encontró exclusivamente en células B, es la CCT-1, esta proteína pertenece a un complejo de chaperonas llamado TRiC con un peso cercano a 900 kDa. Este complejo favorece el plegamiento de proteínas en el citosol, de manera parecida al sistema de Hsp70, esto favorecido por ATP. El sistema TRiC, interactúa con proteínas como actina, tubulina, Ciclina E, el sistema Von Hippel Lindau/HIF1-alfa, o inclusive las chaperonas Hsc/Hsp70. Cabe destacar que las proteínas sustrato a las que se une el sistema TRiC tienen un espectro de peso molecular entre 40 y 70 kDa⁷⁷. Esta es la proteína más interesante dentro de los resultados obtenidos por toxina en linfocitos B purificados, ya que las otras proteínas siguen siendo de naturaleza nuclear, como se han repetido a lo largo de los experimentos de identificación.

Por otro lado, en linfocitos T se identificó la Neurexofilina 1, misma que es parte de una familia de glicoproteínas con comportamiento de neuropéptido. Esta fue descubierta como parte de una co-inmunoprecipitación, con la neurexina, proteínas con características de receptores de superficie celular siendo la familia de las neurexofilinas, proteínas parácrinas o autócrinas. Esta familia sido principalmente estudiada por sus efectos en el sistema nervioso, como que un integrante de la

⁷⁵ Ross et al, 2017

⁷⁶ Donato & Cannon, 2013

⁷⁷ Dunn et al, 2001

familia, la Neurexofilina 3 que favorece la supervivencia de células pluripotenciales madre inducidas, además de que esta familia de proteínas es favorable para la sinaptogénesis y supervivencia neuronal. Aunque no hay información relacionada sobre su aparición en células del sistema inmune, fuera de estos resultados, por lo que no se podría considerar un serio candidato a receptor o a proteína de unión con relevancia para este estudio⁷⁸.

La ruta de MAPK-ERK está controlada por la actividad de la proteína G y de Ras. Ras está bajo un estricto control y las mutaciones que causan su activación continua se encuentran entre las mutaciones más frecuentes en muchos tipos de cánceres, lo que demuestra el impacto de esta vía en la proliferación celular⁷⁹. Esta vía fue caracterizada como parte de la forma de activación de la protoxina y toxina en estudios hechos en macrófagos, como fue mencionado anteriormente, por lo que podría dar una idea sobre la vía de señalización que activaría a los linfocitos, tanto T como B. Estas vías tienen un papel importante en la mediación de las señales activadas por las citocinas, factores de crecimiento y estrés ambiental, y están involucrados en la proliferación celular, la diferenciación y la muerte celulares⁸⁰. Por ejemplo, la función efectora de las células T CD4 + está regulada por JNK así como la diferenciación Th1⁸¹. Mientras que la ruta ERK en las células T CD8 + es necesaria para la actividad citotóxica, además p38 regula la producción de IFN- γ en las células T CD8 +, como lo hace en las células T CD4+. Sin embargo, la activación de la ruta p38 in vivo induce apoptosis en las células T CD8 +, pero no en las células T CD4 +, lo que demuestra que la activación de la misma ruta de señalización específica puede tener resultados diferentes en los dos subconjuntos de células T⁸². Por parte de los linfocitos B, la activación de la ruta p38 MAPK favorece la expresión génica y la proliferación de células B, al menos en parte para la activación de NF-kB inducida por CD40 y que la inducción de genes dependientes a CD40 se produce a través de rutas dependientes e independientes de p38 MAPK. Además se identificó un papel para la ruta p38 MAPK utilizando inhibidores en diversos procesos celulares como la producción de citocinas inducida por LPS y TNF y se considera que CD40 desempeña un papel positivo en la activación, proliferación y rescate apoptótico de células B mediado por estas proteínas⁸³.

Los linfocitos pueden ser modulados mediante el TCR y BCR por medio de la glicosilación, ya que la adición de una diversidad de estructuras de carbohidratos (glicanos) se presenta prácticamente en todos los receptores de células inmunes. Las glicosilaciones pueden dividirse en 2 tipos, las O-glicosilaciones y las N-glicosilaciones, en las primeras, la glicosilación predominante es GalNAc⁸⁴, en la segunda es GlcNAc⁸⁵, por lo que se decidió estudiar ese glucósido, además se utilizó el IPTG debido a su parecido al anillo de galactosa A pesar de una relativa ignorancia en la comprensión de la importancia de los glicanos en el sistema inmune, debido a su complejidad inherente, los hallazgos notables han resaltado las contribuciones esenciales de la glucosilación en la regulación de las

⁷⁸ Missler & Su, 1998

⁷⁹ Vanshylla et al, 2018

⁸⁰ Sabapathy et al., 1999

⁸¹ Yang et al., 1998

⁸² Kulig et al, 1999

⁸³ Craxton et al., 2020

⁸⁴ Steen et al., 2008

⁸⁵ Kukuruzinska & Lennon, 1996

respuestas inmunes innatas y adaptativas con importantes implicaciones en la patogénesis de las principales enfermedades. como la autoinmunidad y el cáncer⁸⁶. Los glicanos están implicados en procesos celulares y moleculares fundamentales que regulan tanto las vías inmunes estimuladoras como las inhibitoras. Además de participar activamente en el reconocimiento de patógenos a través de la interacción con proteínas de unión a glicanos (como las lectinas de tipo C), también se ha demostrado que los glicanos regulan los pasos fisiopatológicos clave dentro de la biología de las células T, como el desarrollo de células T y la selección de timocitos, actividad y señalización de células T, así como diferenciación y proliferación de células T^{87,88}. Mientras que por parte de los linfocitos B, la importancia de la glicosilación se presenta desde los centros germinales. los centros germinales (GC) son nichos microanatómicos en los que las células B proliferan, experimentan la maduración por afinidad de anticuerpos y se diferencian en células B de memoria de larga duración y células plasmáticas secretoras de anticuerpos, en específico la glicosilación de CD45 es crucial para la activación en los linfocitos B, que después de varias rondas de proliferación y selección, las células B en los GCs se diferencian y salen de la GC como células B de memoria de larga vida o células secretoras de anticuerpos, ambas de las cuales eliminan el patógeno de forma inmediata y proporcionan inmunidad profiláctica duradera contra el encuentro antigénico secundario⁸⁹.

Tomando en cuenta lo anterior, podría especularse con cierta confianza que la unión de la toxina Cry1Ac puede aparecer en los complejos BCR y TCR, esto, debido al tipo de glicosilaciones que presentan, además de que se confirmó en linfocitos B, con anticuerpo anti-IgM; se descubrió que la lectina de unión a galactosa de macrófagos (MGL) es capaz de reconocer el antígeno Tn y los residuos de N-acetilgalactosamina (GalNAc), lo que resulta en un mayor reconocimiento por el receptor 2 tipo Toll, lo que finalmente resulta en la secreción de citocinas (IL-10 y TNF - α)⁹⁰. Su interacción con los residuos terminales de GalNAc en la glucoproteína CD45 regula negativamente la señalización de TCR, con la consiguiente disminución de la proliferación de células T y el aumento de la muerte de las células T⁹¹. Por lo que se podría considerar que la activación mediante TCR/BCR no es la única forma de señalización celular en linfocitos, entonces el efecto de las proteínas Cry1Ac se daría en concierto junto con otras vías de señalización, como sucede con la estimulación tardía de la protoxina con JNK y la disminución parcial del efecto de la protoxina Cry1Ac en ERK1, pero la inhibición de ERK-2 cuando se bloquea con anticuerpos anti-HSP70⁹².

Considerando estos antecedentes, podemos estimar la importancia de las vías de señalización y la glicosilación en TCR y BCR, podemos especular con cierta seguridad, que la activación y proliferación celular es debido a la unión de la tCry1Ac a las inmunoglobulinas. La posible unión de las proteínas Cry1Ac al BCR, con menor seguridad al TCR y en menor medida a otras proteínas identificadas podría activar a las MAPk que sería dependiente de la glicosilación de estos receptores, dado que se han estudiado ampliamente la señalización por medio de estas proteínas, sería la esperada a la forma de activación y proliferación de estas células, explicando de manera amplia y congruente con los

⁸⁶ Lella et al., 2011

⁸⁷ Vasta et al., 2017

⁸⁸ Brown et al, 2018

⁸⁹ Giovannone et al., 2018

⁹⁰ Vliet et al, 2013

⁹¹ Vliet et al, 2006

⁹² Rubio-infante et al, 2018

resultados los efectos *in vivo e in vitro* que las proteínas Cry1Ac ejercen sobre linfocitos. No obstante, cabe destacar que falta aún experimentos y preguntas por contestar, como las distintas formas en como se puede unir la tCry1Ac, de manera dependiente e independiente a GalNAc, la alta heterogeneidad de proteínas a las que se unen las proteínas Cry1Ac, además de las posibles vías de señalización que las proteínas Cry1Ac activan al ser administradas. Un gran número de proteínas (algunos estiman del 50% al 70%) pueden presentar algún tipo de glicosilación, entre ellas se encuentra la GalNAc, por lo que este fenómeno puede contribuir a la diversidad de proteínas de unión, (Reily et al, 2019) aunque también los resultados muestran que las proteínas Cry1Ac tienen en general, mecanismo de unión de manera independiente a la glicosilación, lo cual amplía el repertorio, esto aunado a que la precipitación de proteínas, obtiene complejos y no solamente proteínas aisladas, por lo que varias de estas proteínas se unirían de manera indirecta, además que las inmunoglobulinas presentan una gran variedad de estructuras glicosiladas, lo cual puede influir sobre el tipo de inmunoglobulina así como la intensidad con la que se unen. Recapitulando, es importante seguir estudiando estas proteínas para proponerlas como inmunoestimulantes y posibles adyuvantes que ejerzan su efecto, comprobado sobre los linfocitos T y B.

Conclusión

La toxina y protoxina Cry1Ac interactúan directamente con diversas proteínas en linfocitos T y B, entre ellas la vimentina y las inmunoglobulinas. Estos últimos, tienen especial afinidad por la toxina, lo que sugiere que los efectos mitogénicos y de activación podrían deberse a la interacción directa, mediada por la presencia del glucósido N-Acetil-Galactosamina, que se presenta en inmunoglobulinas y que es el sitio de unión conocido en insectos, además que la glicosilación no es la única característica que facilita la unión de las proteínas de linfocitos a las proteínas Cry1Ac, tal como se demostró con la vimentina, una proteína pobre en carbohidratos .

Bibliografía

1. Aoshi, T. (2017). Modes of Action for Mucosal Vaccine Adjuvants. *Viral Immunology*, 30(6), 463-470. doi:10.1089/vim.2017.0026
2. Arnold, J. N., Wormald, M. R., Sim, R. B., Rudd, P. M., & Dwek, R. A. (2007). The Impact of Glycosylation on the Biological Function and Structure of Human Immunoglobulins. *Annual Review of Immunology*, 25(1), 21-50. doi:10.1146/annurev.immunol.25.022106.141702
3. Awate, S., Babiuk, L. A., & Mutwiri, G. (2013). Mechanisms of Action of Adjuvants. *Frontiers in Immunology*, 4. doi:10.3389/fimmu.2013.00114
4. Biskou, O., Casanova, V., Hooper, K. M., Kemp, S., Wright, G. P., Satsangi, J.,... Stevens, C. (2019). The type III intermediate filament vimentin regulates organelle distribution and modulates autophagy. *Plos One*, 14(1). doi:10.1371/journal.pone.0209665
5. Brown, G. D., Willment, J. A., & Whitehead, L. (2018). C-type lectins in immunity and homeostasis. *Nature Reviews Immunology*, 18(6), 374-389. doi:10.1038/s41577-018-0004-8
6. Burette, A., & Weinberg, R. J. (2006). Perisynaptic organization of plasma membrane calcium pumps in cerebellar cortex. *The Journal of Comparative Neurology*, 500(6), 1127-1135. doi:10.1002/cne.21237
7. Burton, S. L., Ellar, D. J., Li, J., & Derbyshire, D. J. (1999). N-acetylgalactosamine on the putative insect receptor aminopeptidase N is recognised by a site on the domain III lectin-like fold of a *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxin. *Journal of Molecular Biology*, 287(5), 1011-1022. doi:10.1006/jmbi.1999.2649
8. Conze, D., Krahl, T., Kennedy, N., Weiss, L., Lumsden, J., Hess, P., ... Rincón, M. (2002). c-Jun NH 2 -Terminal Kinase (JNK) 1 and JNK2 Have Distinct Roles in CD8 α T Cell Activation. *Journal of Experimental Medicine*, 195(7), 1004-1200. doi:10.1038/s41577-018-0004-8
9. Conze, D. (2000). Activation of p38 MAP kinase in T cells facilitates the immune response to the influenza virus. *Molecular Immunology*, 37(9), 503-513. doi:10.1016/s0161-5890(00)00078-x
10. Cox, J. C., & Coulter, A. R. (1997). Adjuvants—a classification and review of their modes of action. *Vaccine*, 15(3), 248-256. doi:10.1016/s0264-410x(96)00183-1
11. Craxton, A., Shu, G., Graves, J. D., Krebs, E. G., Clark, E. A., Craxton, A., ... Clark, E. A. (2020). p38 MAPK Is Required for CD40-Induced Gene Expression and Proliferation in B Lymphocytes. *The Journal of Immunology*, 161(1), 3225–3236.
12. Cutillo, G., Saariaho, A., & Meri, S. (2020). Physiology of gangliosides and the role of antiganglioside antibodies in human diseases. *Cellular & Molecular Immunology*, 17(4), 313-322. doi:10.1038/s41423-020-0388-9
13. Dehennaut, V., Leprince, D., & Lefebvre, T. (2014). O-GlcNAcylation, an Epigenetic Mark. Focus on the Histone Code, TET Family Proteins, and Polycomb Group Proteins. *Frontiers in Endocrinology*, 5. doi:10.3389/fendo.2014.00155
14. Diehl, N., Conze, D., Merritt, C., Davis, R. J., & Rinco, M. (2000). Activation of p38 Mitogen-Activated Protein Kinase In Vivo Selectively Induces Apoptosis of CD8 α but Not CD4 α T Cells. *Molecular and Cellular Bio*, 20(3), 936–946.

15. Dunn, A. Y., Melville, M. W., & Frydman, J. (2001). Review: Cellular Substrates of the Eukaryotic Chaperonin TRiC/CCT. *Journal of Structural Biology*, 135(2), 176-184. doi:10.1006/jsbi.2001.4380
16. Filén, S., & Lahesmaa, R. (2010). GIMAP Proteins in T-Lymphocytes. *Journal of Signal Transduction*, 2010, 1-10. doi:10.1155/2010/268589
17. Fleur S. van de Bovenkamp, Ninotska I. L. Derksen, Pleuni Ooijevaar-de Heer, Karin A. van Schie, Simone Kruithof, Magdalena A. Berkowska, C. Ellen van der Schoot, Hanna IJspeert, Mirjam van der Burg, Ann Gils, Lise Hafkenscheid, René E. M. Toes, View ORCID Profile Yoann Rombouts, Rosina Plomp, Manfred Wuhrer, S. Marieke van Ham, Gestur Vidarsson, and Theo Rispen. (February 20, 2018). Adaptive antibody diversification through N-linked glycosylation of the immunoglobulin variable region. *PNAS*, 8, 1901-1906. , D
18. Ge, A. Z., Pfister, R. M., & Dean, D. H. (1990). Hyperexpression of a *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin-encoding gene in *Escherichia coli*: Properties of the product. *Gene*, 93(1), 49-54. doi:10.1016/0378-1119(90)90134-d
19. Giovannone, N., Antonopoulos, A., Liang, J., Sweeney, J. G., Kudelka, M. R., King, S. L.,... Dimitroff, C. J. (2018). Human B Cell Differentiation Is Characterized by Progressive Remodeling of O-Linked Glycans. *Frontiers in Immunology*, 9. doi:10.3389/fimmu.2018.02857
20. González-González, E., García-Hernández, A. L., Flores-Mejía, R., López-Santiago, R., & Moreno-Fierros, L. (2015). The protoxin Cry1Ac of *Bacillus thuringiensis* improves the protection conferred by intranasal immunization with *Brucella abortus* RB51 in a mouse model. *Veterinary Microbiology*, 175(2-4), 382-388. doi:10.1016/j.vetmic.2014.11.021
21. Grochulski, P., Masson, L., Borisova, S., Pusztai-Carey, M., Schwartz, J., Brousseau, R., & Cygler, M. (1995). *Bacillus thuringiensis* CryIA(a) Insecticidal Toxin: Crystal Structure and Channel Formation. *Journal of Molecular Biology*, 254(3), 447-464. doi:10.1006/jmbi.1995.0630
22. Guerrero, G. G., Dean, D. H., & Moreno-Fierros, L. (2004). Structural implication of the induced immune response by *Bacillus thuringiensis* Cry proteins: Role of the N-terminal region. *Molecular Immunology*, 41(12), 1177-1183. doi:10.1016/j.molimm.2004.06.026
23. Harry, S., Cavacini, L. Structure and function of immunoglobulins. (2010). *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125(2). doi:10.1016/j.jaci.2009.10.003
24. Hayes, J. M., Cosgrave, E. F., Struwe, W. B., Wormald, M., Davey, G. P., Jefferis, R., & Rudd, P. M. (2014). Glycosylation and Fc Receptors. *Fc Receptors Current Topics in Microbiology and Immunology*, 165-199. doi:10.1007/978-3-319-07911-0_8
25. Heckel, D. G. (2020). How do toxins from *Bacillus thuringiensis* kill insects? An evolutionary perspective. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 104(2). doi:10.1002/arch.21673
26. Hermey, G. (2009). The Vps10p-domain receptor family. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 66(16), 2677-2689. doi:10.1007/s00018-009-0043-1
27. Ibarra Moreno, C. D. (2019). Evaluación de la activación in vivo de células dendríticas y linfocitos inducida por la protoxina y toxina Cry1Ac (Licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de México.

28. Ibarra-Moreno, S., García-Hernández, A. L., & Moreno-Fierros, L. (2014). Coadministration of protoxin Cry1Ac from *Bacillus thuringiensis* with metacestode extract confers protective immunity to murine cysticercosis. *Parasite Immunology*, 36(6), 266-270. doi:10.1111/pim.12103
29. Ikeda, H., Zheng, W., & Li, B. (2000). Role of the Guanosine Triphosphatase Rac2 in T Helper 1 Cell Differentiation. *Science*, 288(5474), 2219-2222. doi:10.1126/science.288.5474.2219
30. Irvine, E. B., & Alter, G. (2020). Understanding the role of antibody glycosylation through the lens of severe viral and bacterial diseases. *Glycobiology*, 30(4), 241-253. doi:10.1093/glycob/cwaa018
31. Iyono, H., Lamichhane, A., Azegami, T., & (2014). The mucosal immune system for vaccine development. *Vaccine*, 32(49), 6711-6723. doi:10.1016/j.vaccine.2014.08.089
32. J. Robin, Clemen, C. S., Rybakin, V., & Eichinger, L. (2008). The Coronin Family of Proteins. *Subcellular Biochemistry The Coronin Family of Proteins*, 1-5. doi:10.1007/978-0-387-09595-0_1
33. Jarillo-Luna, A., Moreno-Fierros, L., Campos-Rodríguez, R., Rodríguez-Monroy, M. A., Lara-Padilla, E., & Rojas-Hernández, S. (2007). Intranasal immunization with *Naegleria fowleri* lysates and Cry1Ac induces metaplasia in the olfactory epithelium and increases IgA secretion. *Parasite Immunology*, 30(1), 31-38. doi:10.1111/j.1365-3024.2007.00999.x
34. Jeffery, C. J. (2019). Intracellular/surface moonlighting proteins that aid in the attachment of gut microbiota to the host. *AIMS Microbiology*, 5(1), 77-86. doi:10.3934/microbiol.2019.1.77
35. Korthals, M., Langnaese, K., Smalla, K., Kähne, T., Herrera-Molina, R., Handschuh, J.,... Thomas, U. (2017). A complex of Neuroplastin and Plasma Membrane Ca²⁺ ATPase controls T cell activation. *Scientific Reports*, 7(1). doi:10.1038/s41598-017-08519-4
36. Kukuruzinska, M., & Lennon, K. (1998). Protein N-Glycosylation: Molecular Genetics and Functional Significance. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, 9(4), 415-448. doi:10.1177/10454411980090040301
37. Kulig, K., Lilić, M., Messaoudi, I., Remus, K., Janković, M., Nikolić-Žugić, J., & Vukmanović, S. (1999). CD8 T cell cytolytic activity independent of mitogen-activated protein kinase / extracellular regulatory kinase signaling (MAP kinase / ERK). *European Journal of Immunology*, 29(12), 3971-3977. doi:10.1002/(sici)1521-4141(199912)29:123.0.co;2-5
38. Lamichhane, A., Azegami, T., & Kiyono, H. (2014). The mucosal immune system for vaccine development. *Vaccine*, 32(49), 6711-6723. doi:10.1016/j.vaccine.2014.08.089
39. Lella, S. D., Sundblad, V., Cerliani, J. P., Guardia, C. M., Estrin, D. A., Vasta, G. R., & Rabinovich, G. A. (2011). When Galectins Recognize Glycans: From Biochemistry to Physiology and Back Again. *Biochemistry*, 50(37), 7842-7857. doi:10.1021/bi201121m
40. Lycke, N. (2012). Recent progress in mucosal vaccine development: Potential and limitations. *Nature Reviews Immunology*, 12(8), 592-605. doi:10.1038/nri3251
41. McCluskey, J., Rossjohn, J., & Purcell, A. W. (2004). TAP genes and immunity. *Current Opinion in Immunology*, 16(5), 651-659. doi:10.1016/j.coi.2004.07.016

42. Mezzomo, B., Miranda-Vilela, A., & Grisolia, C. (2015). Toxicological Evaluation of a Potential Immunosensitizer for Use as a Mucosal Adjuvant—*Bacillus thuringiensis* Cry1Ac Spore-Crystals: A Possible Inverse Agonist that Deserves Further Investigation. *Toxins*, 7(12), 5348-5358. doi:10.3390/toxins7124881
43. Minghui, J., Liao, C., Chakrabarty, S., Wu, K., & Xiao, Y. (2019). Comparative Proteomics of Peritrophic Matrix Provides an Insight into its Role in Cry1Ac Resistance of Cotton Bollworm *Helicoverpa armigera*. *Toxins*, 11(2), 92. doi:10.3390/toxins11020092
44. Missler, M., & Südhof, T. C. (1998). Neurexophilins Form a Conserved Family of Neuropeptide-Like Glycoproteins. *The Journal of Neuroscience*, 18(10), 3630-3638. doi:10.1523/jneurosci.18-10-03630.1998
45. Moreno-Fierros, L., García, N., Gutiérrez, R., López-Revilla, R., & Vázquez-Padrón, R. I. (2000). Intranasal, rectal and intraperitoneal immunization with protoxin Cry1Ac from *Bacillus thuringiensis* induces compartmentalized serum, intestinal, vaginal and pulmonary immune responses in Balb/c mice. *Microbes and Infection*, 2(8), 885-890. doi:10.1016/s1286-4579(00)00398-1
46. Moreno-Fierros, L., García-Hernández, A. L., Ilhuicatzí-Alvarado, D., Rivera-Santiago, L., Torres-Martínez, M., Rubio-Infante, N., & Legorreta-Herrera, M. (2013). Cry1Ac protoxin from *Bacillus thuringiensis* promotes macrophage activation by upregulating CD80 and CD86 and by inducing IL-6, MCP-1 and TNF- α cytokines. *International Immunopharmacology*, 17(4), 1051-1066. doi:10.1016/j.intimp.2013.10.005
47. Moulder, R., Tuomela, S., Ahlfors, H., West, A., Kouvonen, P., Kantola, S., & Bjo, M. (2009). Proteins 1 and 4 to Be Differentially Regulated during Human T Helper Cell Differentiation. *Molecular & Cellular Proteomics*, 8(1), 32–44. <https://doi.org/10.1074/mcp.M800139-MCP200>
48. Nagaoka, H., Takahashi, Y., Hayashi, R., Nakamura, T., Ishii, K., Matsuda, J.,... Takemori, T. (2000). Ras Mediates Effector Pathways Responsible for Pre-B Cell Survival, Which Is Essential for the Developmental Progression to the Late Pre-B Cell Stage. *The Journal of Experimental Medicine*, 192(2), 171-182. doi:10.1084/jem.192.2.171
49. R.Donato., Cannon, B. R., Sorci, G., Riuzzi, F., Hsu, K., Weber, D. J., & Geczy, C. L. (2012). Functions of S100 Proteins. *Current Molecular Medicine*, 13(1), 24-57. doi:10.2174/1566524011307010024
50. Rajamohan, F., Lee, M. K., & Dean, D. H. (1998). *Bacillus thuringiensis* Insecticidal Proteins: Molecular Mode of Action. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, 1-27. doi:10.1016/s0079-6603(08)60887-9
51. Reily, C., Stewart, T. J., Renfrow, M. B., & Novak, J. (2019). Glycosylation in health and disease. *Nature Reviews Nephrology*, 15(6), 346-366. doi:10.1038/s41581-019-0129-43
52. Rhee, J. H., Lee, S. E., & Kim, S. Y. (2012). Mucosal vaccine adjuvants update. *Clinical and Experimental Vaccine Research*, 1(1), 50. doi:10.7774/cevr.2012.1.1.50
53. Riyapa, D., Rinchai, D., Muangsombut, V., Wuttinontanachai, C., Toufiq, M., Chaussabel, D.,... Korbsrisate, S. (2019). Transketolase and vitamin B1 influence on

- ROS-dependent neutrophil extracellular traps (NETs) formation. *Plos One*, 14(8). doi:10.1371/journal.pone.0221016
54. Rojas-Hernández, S., Rodríguez-Monroy, M. A., López-Revilla, R., Reséndiz-Albor, A. A., & Moreno-Fierros, L. (2004). Intranasal Coadministration of the Cry1Ac Protoxin with Amoebal Lysates Increases Protection against *Naegleria fowleri* Meningoencephalitis. *Infection and Immunity*, 72(8), 4368-4375. doi:10.1128/iai.72.8.4368-4375.2004
 55. Ross, J. A., Robles-Escajeda, E., Oaxaca, D. M., Padilla, D. L., & Kirken, R. A. (2017). The prohibitin protein complex promotes mitochondrial stabilization and cell survival in hematologic malignancies. *Oncotarget*, 8(39), 65445-65456. doi:10.18632/oncotarget.18920
 56. Rubio-Infante, N., Ilhuicatzí-Alvarado, D., Torres-Martínez, M., Reyes-Grajeda, J. P., Nava-Acosta, R., González-González, E., & Moreno-Fierros, L. (2017). The Macrophage Activation Induced by *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac Protoxin Involves ERK1/2 and p38 Pathways and the Interaction with Cell-Surface-HSP70. *Journal of Cellular Biochemistry*, 119(1), 580-598. doi:10.1002/jcb.26216
 57. Ruiz-Lafuente, N., Minguela, A., & Parrado, A. (2018). DOCK9 induces membrane ruffles and Rac1 activity in cancer HeLa epithelial cells. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 14, 178-181. doi:10.1016/j.bbrep.2018.05.004
 58. Sabapathy, K., Hu, Y., Kallunki, T., Schreiber, M., David, J., Jochum, W.,... Karin, M. (1999). JNK2 is required for efficient T-cell activation and apoptosis but not for normal lymphocyte development. *Current Biology*, 9(3), 116-125. doi:10.1016/s0960-9822(99)80065-7
 59. Santos-Vigil, K. I., Ilhuicatzí-Alvarado, D., & 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. *International Immunopharmacology*, 61(5), 185–196. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2018.05.029>
 60. Satelli, A., & Li, S. (2011). Vimentin in cancer and its potential as a molecular target for cancer therapy. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 68(18), 3033-3046. doi:10.1007/s00018-011-0735-1
 61. Scott, J. D., & Pawson, T. (2013). Cell Signaling in Space and Time: Where Proteins Come Together and When They're Apart. *Science*, 1220(2009), 1220–1224. <https://doi.org/10.1126/science.1175668>
 62. Sengupta, A., Sarkar, A., Priya, P., Dastidar, S. G., & Das, S. (2013). New Insight to Structure-Function Relationship of GalNAc Mediated Primary Interaction between Insecticidal Cry1Ac Toxin and HaALP Receptor of *Helicoverpa armigera*, 8(10), 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0078249>
 63. Shakya, A. K., Chowdhury, M. Y. E., Tao, W., & Gill, H. S. (2016). Mucosal vaccine delivery : Current state and a pediatric perspective. *Journal of Controlled Release*, 240, 394–413. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.02.014>
 64. Snider, N. T., Ku, N., & Omary, M. B. (2018). The sweet side of vimentin. *ELife*, 7. doi:10.7554/elife.35336
 65. Srivastava, A., Gowda, D. V., Madhunapantula, S. V., Shinde, C. G., & Iyer, M. (2015). Mucosal vaccines: A paradigm shift in the development of mucosal adjuvants and delivery vehicles. *Apmis*, 123(4), 275–288. <https://doi.org/10.1111/apm.12351>

66. Steen, P. Van Den, Rudd, P. M., Dwek, R. A., Steen, P. Van Den, Rudd, P. M., Dwek, R. A., & Opdenakker, G. (2008). Concepts and Principles of O-Linked Glycosylation. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 9238, 151–208. <https://doi.org/10.1080/10409239891204198>
67. Tang, L., Dai, F., Liu, Y., Yu, X., Huang, C., Wang, Y., & Yao, W. (2018). RhoA/ROCK signaling regulates smooth muscle phenotypic modulation and vascular remodeling via the JNK pathway and vimentin cytoskeleton. *Pharmacological Research*, 18(3), 1–40. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2018.05.011>
68. 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. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 78, 106–115. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2016.06.022>
69. Torres Martinez, M. (2017). Caracterización de los efectos inducidos por la toxina Cry1Ac en macrófagos : activación y vías de señalización (Doctorado). Universidad Nacional Autónoma de México.
70. Vanshylla, K., Bartsch, C., Hitzing, C., Krümpelmann, L., & Wienands, J. (2018). Grb2 and GRAP connect the B cell antigen receptor to Erk MAP kinase activation in human B cells, 12(2), 1–17. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-22544-x>
71. Vasta, G. R., Feng, C., Gonz, N., Mancini, J., Yang, L., Abernathy, K., & Frost, G. (2017). Functions of galectins as ‘ self / non-self ’ -recognition and effector factors. *Pathogens and Disease*, 75(5), 1–12. <https://doi.org/10.1093/femspd/ftx046>
72. Vázquez, R.I. Moreno-Fierros, L, Neri-Bazán, Riva, D. L., & López-Revilla. (1999). Bacillus thuringiensis Cry1Ac Protoxin is a Potent Systemic and Mucosal Adjuvant. *Scandinavian Journal of Immunology*, 49(6), 578-584. doi:10.1046/j.1365-3083.1999.00534.x
73. Vela, J. E., Sharpe, L. A., & Peppas, N. A. (2017). Current state and challenges in developing oral vaccines ☆. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 114, 116–131. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2017.04.008>
74. Vliet, S. J. Van, Bay, S., Vuist, I. M., Kalay, H., & García-vallejo, J. J. (2013). MGL signaling augments TLR2-mediated responses for enhanced IL-10 and TNF-secretion. *Journal of Leucocyte Biology*, 94(8), 1–9. <https://doi.org/10.1189/jlb.1012520>
75. Vliet, S. J. Van, Gringhuis, S. I., Geijtenbeek, T. B. H., & Kooyk, Y. Van. (2006). Regulation of effector T cells by antigen-presenting cells via interaction of the C-type lectin MGL with CD45. *Nature Immunology*, 7(11), 1200–1208. <https://doi.org/10.1038/ni1390>
76. Walski, T., Schutter, K. D., Damme, E. J., & Smagghe, G. (2017). Diversity and functions of protein glycosylation in insects. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 83, 21-34. doi:10.1016/j.ibmb.2017.02.005
77. Wang, T. T. (2019). IgG Fc Glycosylation in Human Immunity. *Current Topics in Microbiology and Immunology Fc Mediated Activity of Antibodies*, 63-75. doi:10.1007/82_2019_152
78. Wolff, J. (2009). Plasma membrane tubulin. *Biochimica et Biophysica Acta Journal*, 1788(7), 1415–1433. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2009.03.013>

79. Woodrow, K. A., Bennett, K. M., & Lo, D. D. (2012). Mucosal Vaccine Design and Delivery. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 14(1), 17–46.
<https://doi.org/10.1146/annurev-bioeng-071811-150054>
80. Yang, D. D., Conze, D., Whitmarsh, A. J., Barrett, T., Davis, R. J., Rincón, M., & Flavell, R. A. (1998). Differentiation of CD4 T Cells to Th1 Cells Requires MAP Kinase JNK2. *Immunity*, 9(4), 575-585. doi:10.1016/s1074-7613(00)80640-8
81. Xu, C., Wang, B., Yu, Z., & Sun, M. (2014). Structural Insights into *Bacillus thuringiensis* Cry, Cyt and Parasporin Toxins. *Toxins*, 6(9), 2732-2770.
doi:10.3390/toxins6092732
82. Zeng, L. (2016). Mucosal adjuvants: Opportunities and challenges. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 12(9), 2456-2458.
doi:10.1080/21645515.2016.1181236