



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**ESTUDIO SOBRE EL EFECTO DE LA TOXINA Y
PROTOXINA Cry1Ac DE *Bacillus thuringiensis* EN
LA ACTIVACIÓN DE LINFOCITOS T**

TESIS

Presenta

ESTEFANÍA SCARLETT ORTEGA CHÁVEZ

Para obtener el grado de:

Biólogo

Directora de Tesis:

Dra. Leticia Moreno Fierros



México, D.F. 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos

A la Dra. Leticia Moreno Fierros por su apoyo en la realización de la presente tesis y servicio social, por la confianza que día a día depositó en mí, por sus enseñanzas, experiencia, conocimientos y consejos para enriquecer este trabajo, así como en mi desarrollo profesional y personal.

A la Dra. Ana Lilia García Hernández, por su enseñanza de técnicas y uso del equipo de laboratorio, por ayudar en mi formación académica, por su paciencia, por compartir conmigo sus conocimientos y experiencia, sobre todo por su pasión por el trabajo que fomentó en mí.

A la M. en C. Damaris Ilhuicatzí, por el apoyo en la enseñanza de técnicas, por sus consejos y conocimientos para mejorar mi trabajo, sobre todo por su amistad.

A Saúl Camargo Tiburcio por su gran apoyo durante la realización de experimentos, por su disposición de ayudarme siempre, por todos los momentos que pasamos durante las horas de trabajo y porque en ti, encontré a un amigo.

A mis compañeros del laboratorio 9 de Inmunidad de Mucosas de la UBIMED: Néstor, Juan, Roberto, Marilú, Karla, Dra. Marissa Calderón, Luis, Itzel, Sandra y Miguel, por sus comentarios y conocimientos para mejorar mi trabajo, por su ayuda en todo momento, por su amistad, bromas y por hacer que el laboratorio sea muy agradable.

A mis profesores de la carrera de Biología por sus conocimientos y experiencia, por ser parte fundamental en mi formación profesional.

A mis sinodales por enriquecer mi trabajo y consejos:

Dr. Luis Arturo Baiza Gutman

Dra. Emma Berta Gutiérrez-Cirlos Madrid

Dra. Leticia Moreno Fierros

Dra. Ana Lilia García Hernández

Dra. Gloria Luz Paniagua Contreras

Este proyecto fue desarrollado en la UBIMED-FES Iztacala-UNAM y fue apoyado por:

UNAM-PAPIIT IN219013

SEP-CONACYT CB177612

Dedicatoria

A Dios por ayudarme y apoyarme durante toda mi vida, por ser parte fundamental de mí, por todas sus bendiciones y por esta siempre conmigo.

A mis padres Julio Ortega Ortiz y María de Lourdes Chávez Carrillo, por su apoyo durante toda mi vida escolar, por apoyarme a llegar hasta aquí, por creer en mí, por su motivación para siempre querer más y hacer bien las cosas, por fomentar en mí respeto, por sus consejos, por su ejemplo, sabiduría, experiencia, educación, valores, enseñanzas y paciencia, entre mucho más, porque gracias a ello soy esta persona. Por su inmenso amor, cuidado y dedicación durante toda mi vida, por siempre estar conmigo en todo momento, les agradezco infinitamente, me enorgullece mucho ser su hija. Los amo mucho.

A mis hermanos Tania, Jonathan y Erick, por sus consejos, enseñanzas y ejemplo en mi vida, por su amor y por consentirme siempre. En especial, a mi hermana por ayudarme siempre y estar dispuesta a desvelarse conmigo siempre, por ser mi amiga y lo mejor de mi vida.

A mis amigos de la carrera Lulú, Hugo, Zaira, Karina, Carlos, Abraham, Mayte y Joali, por su amistad, por su tiempo, por siempre ayudarme y escucharme, por tantas experiencias, por hacerme reír tanto. A Luis por ser un gran apoyo en mi vida, por tu ayuda, mi tesis no sería la misma sin ti, por quererme tanto, por hacerme feliz y por llegar a mi vida. A todos por ser parte de lo que amo.

A mis amigas Andrea, Sandra, Fernanda, Norma e Ivonne, por su apoyo durante casi toda mi vida, por ser mis amigas de verdad, por todo, las quiero mucho locas. A Mauricio por su apoyo incondicional, tiempo y por estar en mi vida.

Índice general

Agradecimientos	I
Dedicatoria	II
Índice general	III
Índice de figuras	V
Abreviaturas	VIVIII
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	3
SISTEMA INMUNE.....	3
ADYUVANTES VACUNALES.....	4
ADYUVANTES DE MUCOSAS.....	5
PROTEÍNAS CRY	6
<i>Modo de acción:</i>	6
PROTOXINA CRY1AC.....	7
TOXINA CRY1AC.....	8
ANTECEDENTES	10
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	13
JUSTIFICACIÓN	13
HIPÓTESIS	13
OBJETIVO GENERAL	14
OBJETIVOS PARTICULARES	14
ESTRATEGÍA EXPERIMENTAL	15
MATERIALES Y MÉTODO	18
PRODUCCIÓN Y OBTENCIÓN DE LA PROTOXINA Y TOXINA CRY1AC.....	18
CONJUGADO DE LAS PROTEÍNAS CRY1AC.....	18
OBTENCIÓN DE CÉLULAS LINFOIDES DE BAZO.....	20
PURIFICACIÓN DE POBLACIONES DE LINFOCITOS T CD4 Y CD8	20
INCUBACIÓN DE LA PROTOXINA Y TOXINA CRY1AC-FITC CON CÉLULAS LINFOIDES TOTALES Y CON POBLACIONES PURIFICADAS DE LINFOCITOS T CD4 Y CD8	21
ACTIVACIÓN DE LINFOCITOS T POR PMA/IONOMICINA.....	22
LOCALIZACIÓN DE LA UNIÓN DE LA PROTOXINA Y TOXINA CRY1AC-FITC A CÉLULAS LINFOIDES DE BAZO	22
IDENTIFICACIÓN DE LOS POSIBLES RECEPTORES PARA LA PROTOXINA Y TOXINA CRY1AC ...	23
OBTENCIÓN DE SUERO ANTI-PROTOXINA Y ANTI-TOXINA CRY1AC.....	23
LISADO DE LINFOCITOS.....	23
INMUNOPRECIPITACIÓN DE TOXINA Y PROTOXINA CRY1AC.....	24

TRANSFERENCIA DE GELES A MEMBRANAS DE PVDF.....	26
“BLOT” LIGANDO.....	26
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	27
RESULTADOS	28
OBTENCIÓN DE LAS PROTEÍNAS CRY1AC.....	28
CONJUGADO DE TOXINA CRY1AC-FITC.....	29
ACTIVACIÓN DE LINFOCITOS T.....	29
UNIÓN DE LAS PROTEÍNAS CRY1AC A LINFOCITOS T.....	37
CINÉTICA DE UNIÓN MEDIANTE MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA Y CONFOCAL	43
<i>Microscopia de Fluorescencia</i>	43
<i>Microscopia Confocal</i>	46
RELACIÓN DEL ESTADO DE ACTIVACIÓN DE LINFOCITOS T CON LA UNIÓN DE LAS PROTEÍNAS CRY1AC.....	49
IDENTIFICACIÓN DEL POSIBLE RECEPTOR DE LAS PROTEÍNAS CRY1AC.....	54
<i>Blot ligando de la protoxina Cry1Ac</i>	55
<i>Blot ligando de la toxina Cry1Ac</i>	56
DISCUSIÓN.....	58
CONCLUSIONES.....	63
REFERENCIAS	64

Índice de figuras

Figura 1. Diagrama de flujo de la estrategia experimental.....	17
Figura 2. Aislamiento de linfocitos T CD4 y CD8 por selección positiva.....	21
Figura 3. Grafico del procedimiento de inmunoprecipitación.....	25
Figura 4. Gel SDS-PAGE y conjugación de las proteínas Cry1Ac con FITC.....	28
Figura 5. Las proteínas Cry1Ac inducen activación en linfocitos totales T CD4.....	31
Figura 6. Las proteínas Cry1Ac activan a linfocitos CD8 de poblaciones totales.....	33
Figura 7. Las proteínas Cry1Ac activan a linfocitos purificados CD4.....	34
Figura 8. Las proteínas Cry1Ac activan a linfocitos purificados CD8.....	36
Figura 9. Unión de las proteínas Cry1Ac a linfocitos T CD4 de poblaciones totales.....	38
Figura 10. Unión de las proteínas Cry1Ac a linfocitos T CD8 de poblaciones totales.....	39
Figura 11. Unión de las proteínas Cry1Ac a linfocitos T CD4 purificados.....	41
Figura 12. Unión de las proteínas Cry1Ac a linfocitos T CD8 de poblaciones purificadas.....	42
Figura 13. Cinética de unión de las proteínas Cry1Ac a linfocitos T, microscopía de fluorescencia.....	45
Figura 14. Cinética de unión de las proteínas Cry1Ac a linfocitos T CD8, microscopia confocal.....	47
Figura 15. Cinética de unión de las proteínas Cry1Ac a linfocitos T CD4, microscopia confocal.....	48
Figura 16. La unión de las proteínas Cry1Ac, se favorece con la activación artificial de linfocitos T totales.....	50
Figura 17. La unión de las proteínas Cry1Ac, se favorece con la activación artificial de linfocitos T purificados.....	51
Figura 18. Imágenes de microscopia de fluorescencia, donde la activación artificial favorece la unión de la protoxina Cry1Ac a linfocitos T.....	52
Figura 19. Imágenes de microscopia de fluorescencia, donde la activación artificial favorece la unión de la toxina Cry1Ac a linfocitos T.....	53
Figura 20. Inmunoblot que muestra la especificidad de los anticuerpos generados hacia las proteínas Cry1Ac.....	54
Figura 21. Identificación de posibles receptores para la protoxina Cry1Ac.....	56

Figura 22. Identificación de posibles receptores para la toxina Cry1Ac.....57

Abreviaturas

ABREVIATURA	
°C	Grados Celsius
µg	Microgramos
µl	Microlitros
ALP	Fosfatasa alcalina
APC	Aloficocianina
APC	Antigen presenting cells (células presentadoras de antígeno)
APN	N-Aminopeptidasa
BSA	Bovine serum albumin (albúmina de suero bovino)
BT	<i>Bacillus thuringiensis</i>
CT	Toxina de cólera
DTT	Ditriotreitol
DMF	Dimetilformamida
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ácido etilen diamino tetracético
FITC	Isotiocinato de fluoresceína
GalNac	N-acetil-d-galactosamina
GM1	Receptor gangliósido
GPI	Glicofosfatidil inositol
h	Hora
IFN γ	Interferón γ
IL	Interleucina
kDa	Kilo Daltones
LT	Linfocitos T
LT	Toxina termolábil de <i>E. coli</i>
M	Molar
min	Minutos
ml	Mililitro
mM	Milimolar

NALT	Tejidos linfoides relacionados con la mucosa nasal
ng	Nanogramos
PBA	PBS con BSA 1%
PBS	Phosphate buffered saline (Solución amortiguada con fosfatos)
PCry1Ac	Protoxina Cry1Ac
PE	Ficoeritrina
PECy5	Ficoeritrina cianina 5
pH	Potencial de hidrógeno
PKC	Proteína Cinasa C
PM	Peso molecular
PMA	Phorbol myristate acetate (Acetato y miristato de forbol)
PVDF	Polidifenilo
RIPA	Radio-immunoprecipitation assay buffer (Solución de ensayo de radio-inmunoprecipitación)
rpm	Revoluciones por minuto
RPMI	Medio de cultivo celular, por Roswell en el Park Memorial Institute.
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
T.A.	Temperatura ambiente
TCry1Ac	Toxina Cry1Ac
TH1	Son un subgrupo de células T CD4, participan principalmente en la activación de macrófagos y a veces se denominan células T CD4 inflamatorias.
TH2	Son un subgrupo de células T CD4, participan principalmente en la estimulación de células B para que produzcan anticuerpos y a menudo se llaman células T CD4 auxiliares.
TNF	Factor de necrosis tumoral

RESUMEN

Se han evaluado una gran variedad de estrategias para incrementar la respuesta inmune en mucosas, entre las que se incluye el uso de adyuvantes mucosales, como toxinas bacterianas. Las más estudiadas son la toxina de cólera (CT) y la toxina termolábil *E. coli* (LT), sin embargo, a pesar de su potente actividad como adyuvante en mucosas, el uso de CT y LT en humanos no es factible por su toxicidad; por lo que es muy importante desarrollar y encontrar nuevos adyuvantes que sean eficaces y seguros. Se ha reportado que las proteínas Cry1Ac de *Bacillus thuringiensis*, tienen una actividad potente como inmunógeno y adyuvante mucosal, se ha observado que son capaces de unirse y activar poblaciones de leucocitos totales de bazo, sin embargo, en la actualidad se desconocen las bases celulares y moleculares del mecanismo adyuvante e inmunogénico de las proteínas Cry1Ac en poblaciones aisladas de linfocitos T. Por lo tanto el objetivo del presente trabajo fue determinar si las proteínas Cry1Ac, toxina y protoxina tienen la capacidad de unirse y activar linfocitos T. Se realizaron ensayos *in vitro* en linfocitos totales y en poblaciones de linfocitos T aislados de bazo, se estudió la cinética de unión y activación de linfocitos y se analizó por citometría de flujo. Se evaluó también, el efecto de la activación en la unión de Cry1Ac a linfocitos T, se corroboró la unión por microscopía de fluorescencia y confocal y finalmente se realizaron ensayos de inmunoprecipitación y “blot” ligando para determinar la presencia de posibles receptores para las proteínas Cry1Ac en linfocitos T.

Nuestros resultados muestran que las proteínas Cry1Ac (toxina y protoxina) tienen la capacidad de inducir expresión CD69 en linfocitos T, indicando que pueden activar a células T CD4 y CD8, además se observó que las proteínas Cry1Ac se unen presumiblemente a la membrana plasmática de los linfocitos T de poblaciones CD4 y CD8. El estado de activación de los linfocitos T, está directamente relacionado con la unión de las proteínas Cry1Ac, ya que la unión de las proteínas Cry1Ac tanto protoxina como toxina, se favorece cuando las células T están activadas. Estos resultados nos sugirieron la existencia de un posible receptor de las proteínas Cry1Ac en células T, por lo que se realizaron ensayos de “Blot” ligando, en donde para la protoxina Cry1Ac se encontraron 4 bandas de 150, 68, 63 y 45 kDa, mientras que para la toxina Cry1Ac se encontraron 3 bandas con pesos moleculares de 68, 62 y 45 kDa.

En este trabajo se encontró que las proteínas Cry1Ac inducen activación de linfocitos T CD4 y CD8, de manera gradual respecto al tiempo; la toxina presenta un mayor porcentaje de activación en comparación con la protoxina. De igual forma, las proteínas Cry1Ac se unen a las subpoblaciones de linfocitos T de manera gradual, la protoxina se une en menor proporción en relación a la toxina. La activación de las subpoblaciones de linfocitos T (CD4 y CD8) favorece la unión de las proteínas Cry1Ac y se encontraron evidencias de un posible receptor para las proteínas Cry1Ac en linfocitos T.

INTRODUCCIÓN

Sistema inmune

La respuesta inmune innata es la primera línea de defensa contra los microorganismos y está compuesta principalmente de barreras físicas y químicas, como epitelios; también se conforma de células fagocíticas como macrófagos, granulocitos (neutrófilos, eosinófilos y basófilos) y linfocitos citolíticos naturales (NK), además de proteínas sanguíneas como las del complemento y otros mediadores de la inflamación (Abbas, 2006).

Una respuesta inmunitaria específica, que confiere inmunidad protectora de por vida a reinfecciones por el mismo agente patógeno (memoria inmunitaria) se conoce como una respuesta inmunitaria adaptativa. Los linfocitos son las células que reconocen los antígenos extraños de manera específica y responden contra ellos, por lo que constituyen los mediadores de la respuesta inmunitaria humoral y celular. Los linfocitos B son las únicas células capaces de generar anticuerpos, reconocen a los microorganismos extracelulares. Se diferencian en células plasmáticas secretoras de anticuerpos, por lo que actúan como mediadores de la inmunidad humoral. Los linfocitos T, son las células de la inmunidad celular, reconocen a los antígenos de microorganismos intracelulares y sirven para destruir estos microorganismos o las células infectadas. Los linfocitos T constan de distintas subpoblaciones desde el punto de vista funcional, los cooperadores (CD4) y los citotóxicos (CD8). A raíz de la estimulación antigénica, los linfocitos cooperadores segregan unas proteínas llamadas citocinas, cuyas funciones consisten en poner en marcha la proliferación y la diferenciación de los propios linfocitos T y de activar otras células como linfocitos B, macrófagos y otros leucocitos. Los linfocitos citotóxicos destruyen células infectadas por virus y otros microorganismos intracelulares (Abbas, *et al.*, 2006).

La principal ruta de entrada de patógenos al organismo ocurre a través de mucosas tales como las vías respiratorias, genitourinarias y gastrointestinales, por ello se busca hacer más eficiente la respuesta en el sistema inmune de mucosas (Neutra y Kozlowski, 2006).

El sistema inmune de mucosas tiene tres principales funciones: proteger las mucosas contra invasiones potencialmente peligrosas, evitar la absorción de antígenos incluyendo proteínas extrañas derivadas de los alimentos ingeridos y microorganismos comensales, y para prevenir el desarrollo de las respuestas inmunes potencialmente dañinas a estos antígenos (Holmgren y Czerkinsky, 2005).

Adyuvantes vacunales

Para incrementar las respuestas inmunes en mucosas, se han evaluado una gran variedad de estrategias entre las que se incluyen el uso de diferentes sistemas de entrega de antígeno (Eldridge, *et al.*, 1991, Michalek *et al.*, 1994; Ryan *et al.*, 2001; Eriksson *et al.*, 2002; Kang, *et al.*, 2003) y el uso adyuvantes (Ryan *et al.*, 2001 & O'Hagan 2001).

Los adyuvantes son sustancias que al ser coadministradas con un antígeno, aumentan la magnitud de la respuesta inmune contra éste, respecto a aquella que se obtendría cuando el antígeno se administra sólo. La mayoría de los antígenos ocasionan respuestas muy pobres cuando se administran solos, el descubrimiento y obtención de nuevos adyuvantes, como proteínas recombinantes y péptidos provenientes de patógenos, es un área de creciente interés en el desarrollo de vacunas eficaces y particularmente en las destinadas para uso humano (Hooper, 1991). Si bien, muchos adyuvantes han sido eficaces para potenciar respuestas humorales, solo unos pocos adyuvantes han mostrado ser buenos inductores de inmunidad celular (Elson y Ealding, 1984).

Los mecanismos generales de acción de los adyuvantes son: liberación prolongada del antígeno en semanas y meses; la generación de inflamación y activación de células presentadoras de antígeno como macrófagos; localización selectiva del antígeno en áreas timo dependientes; incremento de la captura y presentación del antígeno por células accesorias; estimulación de células T cooperadoras, inespecíficas o específicas, Th1 o Th2; estimulación de la producción de citocinas; estimulación del cambio de isotipo de inmunoglobulinas por linfocitos B; aumento de la maduración de precursores de linfocitos B o T y la eliminación de células supresores (Elson y Dertzbaugh, 1994).

Adyuvantes de mucosas

Los adyuvantes de mucosas son sustancias que tienen la capacidad de ser inmunomoduladores, poseen como característica fundamental: la potenciación de la inmunogenicidad. Los adyuvantes, incorporados al antígeno, hacen más efectiva la respuesta inmune. Con su empleo se logra economía de antígeno y de tiempo, así como una producción mayor de anticuerpos específicos (Morris *et al.*, 1999). El uso de adyuvantes es una estrategia para mejorar la inducción de respuestas inmunes en mucosas. Existen pocos adyuvantes mucosos efectivos descritos, incluyendo el uso de algunas toxinas bacterianas, DNA conteniendo CpG y diferentes citocinas y quimocinas (Ryan *et al.*, 2001; Holmgren *et al.*, 2003).

Entre las toxinas bacterianas con actividad adyuvante en mucosas más estudiadas, se encuentran la toxina de cólera (CT) y la toxina termolábil de *E. coli* (LT) (Lycke *et al.*, 1986,1991). Tanto CT como LT (Clements *et al.*, 1988) tienen potentes efectos adyuvantes en mucosas, cuando se coadministran o se conjugan con proteínas solubles que no son inmunogénicas. Sin embargo, a pesar de su potente actividad como adyuvante en mucosas, el uso de CT y LT en humanos no es factible por su toxicidad y altos costos de producción. Recientemente se han desarrollado mutantes no tóxicas que mantienen parcialmente la adyuvanticidad por la ruta intranasal (Dickinson *et al.*, 1995, Yamamoto *et al.*, 1997). Sin embargo, existe preocupación acerca de la seguridad de la aplicación; ya que estas proteínas mantienen su capacidad de unirse a su receptor gangliósido GM1, lo cual podría facilitar que las vacunas causarán daño a los tejidos neuronales. De hecho, se ha reportado que CT puede redirigir a las proteínas vacunales hacia los tejidos neuronales mediante el bulbo olfatorio (Van Ginkel 2001).

En el desarrollo de vacunas mucosas e inmunoterapias, el enfoque actual está dirigido a encontrar formas más eficaces de entrega de antígenos al sistema inmune de mucosas y hacia el descubrimiento de adyuvantes de mucosas y sistémicos seguros, que provean inmunidad protectora en estos sitios mucosos. En la actualidad, existen pocas sustancias capaces de ejercer un potente efecto adyuvante en mucosas que sean seguras para el humano. La obtención de adyuvantes mucosales beneficiaría al manejo de infecciones y en el diseño de vacunas (Rodríguez-Orozco 2003).

Proteínas Cry

Un buen adyuvante mucoso es la protoxina y toxina Cry1Ac de *Bacillus thuringiensis* (Bt). Bt es una bacteria Gram-positiva, aerobia estricta, que durante su ciclo de vida presenta dos fases principales: la primera, crecimiento vegetativo, donde las bacterias se duplican por bipartición, y la segunda, la fase de esporulación, que consiste en la diferenciación de la bacteria a espora (Soberón, *et al.*, 2007). A Bt se le caracteriza por producir un cuerpo paraesporal conocido como cristal, durante su fase de esporulación, el cual es de naturaleza proteínica y tiene propiedades insecticidas. El cristal proteínico está constituido por proteínas denominadas δ -endotoxinas también conocidas como proteínas Cry (Soberón, *et al.*, 2007). Las principales características de las proteínas Cry de Bt, son su alta resistencia a la proteólisis, su alto peso molecular, su estabilidad en pH alcalino y el hecho de no ser tóxicas para vertebrados e insectos no blanco (Cote, *et al.*, 1993).

Las proteínas Cry han sido utilizadas como plaguicidas biológicos de forma masiva desde hace muchos años (Höfte, *et al.*, 1989). Una característica que distingue a las toxinas Cry es su notable especificidad, y por lo tanto, son inofensivos para insectos no blanco y vertebrados. Las toxinas Cry se utilizan en todo el mundo, para el control de vectores de enfermedades humanas, control de plagas de insectos agrícolas o en plantas transgénicas (Bravo *et al.*, 2005). Las proteínas Cry, son tóxicas especialmente para los siguientes órdenes de insectos: Lepidóptera, Coleóptera, Himenóptera y Díptera (Bravo *et al.*, 2005; Schnepf *et al.*, 1998).

Modo de acción:

Las toxinas Cry pertenecen al grupo de toxinas formadoras de poros y es ampliamente aceptado que su efecto tóxico (en insectos blanco), es debido a la formación de poros iónicos en la membrana de células epiteliales del intestino medio de insectos, lo que conlleva a inflamación y muerte celular. Estas proteínas son producidas como protoxinas cristalinas (130 kDa) en los cuerpos paraesporales de BT, después de la ingestión por las larvas de insectos susceptibles, los cristales de la protoxina Cry son solubilizados y activados en el intestino medio del insecto, siendo procesadas proteolíticamente por tripsina, generándose las toxinas de 65 kDa. Estas toxinas reconocen proteínas receptoras en la membrana de células epiteliales del borde del

intestino medio de los insectos (Hofmann *et al.*, 1988; Van Rie *et al.*, 1989; Van Rie, Jansens *et al.*, 1990). La unión con el receptor desencadena un cambio conformacional en la toxina (Li *et al.*, 1991), lo que le permite insertarse en la membrana de células del intestino medio de insectos y formar poros líticos, que conduce finalmente a la muerte del insecto (Knowles y Ellar, 1986).

Diferentes proteínas tales como cadherinas, N-aminopeptidasa (APN), y fosfatasa alcalina (ALP) se han caracterizado como receptores de Cry en diferentes especies de insectos (Jurat-Fuentes *et al.*, 2004 y 2006; Knight *et al.*, 1994; Vadlamudi *et al.*, 1995). Por lo tanto, la comprensión de las bases moleculares de la interacción de las toxinas Cry con moléculas receptoras sería útil no sólo para determinar su actividad como insecticida, sino también para comprender las bases celulares y moleculares por las que ejercen un efecto inmunogénico y adyuvante.

Las δ -endotoxinas de Cry1Ac, es la única familia de al menos 73 miembros de las proteínas Cry, para las que se ha descrito tanto un receptor de membrana y su ligando. Se ha identificado el receptor de Cry1Ac en el insecto *Manduca sexta*, como una glicoproteína de 120 kDa que es una APN, y su ligando glicosilfosfatidil-inositol (GPI) (Knight *et al.*, 1994). Receptores de Cry1Ac en varios otros insectos lepidópteros también se han demostrado ser aminopeptidasas N (Gill *et al.*, 1995; Valaitis *et al.*, 1995). Sin embargo, hasta la fecha, no se han reportado receptores para las proteínas Cry1Ac en vertebrados.

Protoxina Cry1Ac

Se ha reportado un aumento de la respuesta inmune contra hematíes de carnero provocado por cristales insecticidas de *Bt* (Prasad y Shetna, 1975), un año más tarde estos mismos autores demostraron que estos cristales tenían actividad antitumoral en el sarcoma ascítico de Yoshida, debido probablemente a un aumento de la respuesta de defensa inespecífica en ratas tratadas con estos cristales. Se ha descrito, que la protoxina Cry1Ac es un potente inmunógeno (Moreno-Fierros *et al.*, 2000, 2002; Vázquez-Padrón *et al.*, 1999a) y adyuvante mucosal, tan potente como la toxina de cólera (Vázquez-Padrón *et al.*, 1999b, Moreno-Fierros *et al.*, 2003). Luego de coadministrar Cry1Ac con albúmina bobina y antígeno de superficie de hepatitis B se obtuvieron mayores títulos de

anticuerpo IgA, IgG e IgM contra albúmina bovina y contra antígeno de superficie de Hepatitis B que cuando estos antígenos se administraron sin Cry1Ac, este efecto adyuvante fue tan potente como el reportado para la toxina de cólera. (Vázquez-Padrón, *et al.*, 1999b). Los efectos inmunomoduladores de la protoxina Cry1Ac varían dependiendo del compartimiento mucosal analizado, en general, se inducen respuestas mezcladas Th1/Th2. La aplicación intranasal de Cry1Ac favorece la inducción de respuestas de citocinas tipo Th2 en linfocitos nasales (obtenidos del NALT y de pasajes nasales) (Rodríguez-Monroy, 2008). Debido a estas propiedades se considera a la protoxina Cry1Ac como un adyuvante por su capacidad de reforzar la respuesta inmune. La protoxina Cry1Ac como adyuvante incrementa considerablemente la protección ante la infección por *Naegleria fowleri*, (Rojas *et al.*, 2004, 2007; Jarillo *et al.*, 2008) y además, la administración de la protoxina Cry1Ac sola, también confiere protección en este modelo de infección, sugiriendo que la protoxina tiene la capacidad de activar la respuesta inmune innata como se ha descrito para otros adyuvantes (Lavelle 2005; Bromader 1991; Cox y Coulter 1997).

Toxina Cry1Ac

La toxina Cry1Ac contiene ~1175 aminoácidos, está compuesta de una región NH₂-terminal, la región tóxica y la región COOH. La región N-terminal está organizada en tres dominios que ha sido determinada por cristalografía de difracción de rayos-X (Grochulski *et al.*, 1995; Galitsky *et al.*, 2001). El dominio I, es un paquete de siete alfa hélices, involucrado en la formación del poro. El dominio II, formado por tres láminas beta antiparalelas y representa la parte más variable de la estructura en las toxinas Cry (Sanankaranarayanan *et al.*, 1996; Shimizu, 1996). El dominio III, está formado por una β -plegada y dos laminas β -antiparalelas. Los dominios II y III están involucrados en la unión con el receptor (Burton *et al.*, 1999). Cinco regiones muy conservadas, en la región central de cada dominio, han sido identificado (Hofte, 1989). No hay duda, de que estos motivos conservados juegan un papel importante en la función biológica de estas proteínas; ya que las toxinas de diferente especificidad de insectos (Cry1Aa frente Cry3A) comparten una conformación similar (Li *et al.*, 1991; Grochulski *et al.*, 1995).

Para definir la utilidad de la toxina y protoxina Cry1Ac como adyuvantes vacunales, es necesario comprender las bases celulares y moleculares del mecanismo inmunogénico y adyuvante. En células de vertebrado no se ha descrito la existencia de un receptor para las proteínas Cry1Ac. Sin embargo, en base a los resultados en los que se ha encontrado que la proteínas Cry1Ac *in vitro* son capaces de activar a macrófagos induciendo expresión de moléculas coestimuladoras y citocinas proinflamatorias (Moreno-Fierros *et al.*, 2013) y a resultados en los que se ha observado que la estimulación de leucocitos induce la activación de linfocitos en tiempos cortos (3 hrs), se ha sugerido que un receptor pudiera estar involucrado en el reconocimiento de las proteínas Cry1Ac por estos tipos celulares.

ANTECEDENTES

En reportes previos, se demostró que la protoxina Cry1Ac de *Bacillus thuringiensis* es un potente inmunógeno (Moreno–Fierros *et al.*, 2000, 2002; Vázquez-Padrón *et al.*, 1999a) y adyuvante mucosal (Vázquez-Padrón *et al.*, 1999b; Moreno-Fierros *et al.*, 2003). Previamente se evaluó la inmunogenicidad mucosa y sistémica de la protoxina Cry1Ac utilizando diferentes rutas de inmunización (oral, intranasal, rectal, vaginal, e intraperitoneal) y se analizaron las respuestas en diferentes mucosas (intestinos, pulmón, vagina) (Moreno-Fierros *et al.*, 2000). Se ha comparado la inmunogenicidad de diferentes protoxinas y toxinas Cry de la familia Cry1 (Aa, Ab y Ac) y a la Cry3A, y se demostró que la inmunogenicidad de las proteínas Cry depende de la mitad amino terminal correspondiente a la toxina (Guerrero *et al.*, 2004, 2007; Guerrero and Moreno-Fierros 2007). Posteriormente se caracterizaron las propiedades inmunomoduladoras particularmente de la protoxina Cry1Ac debido a que encontramos que resultó ser más inmunogénica que las otras proteínas (Guerrero *et al.*, 2004).

Igualmente se han encontrado efectos adyuvantes protectores de la protoxina Cry1Ac en tres modelos de infecciones parasitarias. Primero en un modelo murino de meningoencefalitis amibiana primaria, encontramos que la protoxina Cry1Ac como adyuvante, incrementa considerablemente la protección ante la infección por *Naegleria fowleri* (Rojas *et al.*, 2004, 2007; Jarillo *et al.*, 2008; Carrasco-Yeppez *et al.*, 2010). En virtud de que la administración de la proteína Cry1Ac sola también confiere protección en este modelo de infección, se sugiere que esta proteína tiene la capacidad de activar la respuesta inmune innata. Hemos encontrado que el pretratamiento con Cry1Ac incrementa la sobrevivencia ante la infección en un modelo de malaria murino. (Legorreta-Herrera *et al.*, 2010).

En cuanto al efecto adyuvante de la protoxina Cry1Ac, en la respuesta de anticuerpos hacia diferentes antígenos de diferente naturaleza (proteínas y polisacáridos), se encontraron efectos adyuvantes en la respuesta de anticuerpos hacia el antígeno de superficie de hepatitis B (Vázquez-Padrón *et al.*, 1999^a), péptidos de VIH (Esquivel y Moreno-Fierros, 2005) y polisacáridos de pneumococos (Moreno-Fierros *et al.*, 2003). Sin embargo, no se ha estudiado si la toxina, al igual que la protoxina Cry1Ac funciona también como adyuvante. De igual forma, se evaluó si Cry1Ac tenía la capacidad de

activar macrófagos y de estimular la producción de citocinas; ya que uno de los mecanismos por el que otras moléculas de origen microbiano ejercen su actividad adyuvante, es induciendo la expresión de moléculas coestimuladoras en células presentadoras de antígeno (Lavelle 2005; Bromader 1991; Cox and Coulter, 2001). Los resultados sugieren que la actividad adyuvante que confiere esta proteína, podría explicarse por su capacidad de incrementar la expresión de moléculas coestimuladoras B7-1 y B7-2 en macrófagos, así como de inducir la producción de citocinas como TNF, IL6, IFN γ (Moreno-Fierros *et al.*, 2013).

Los resultados y efectos anteriormente descritos, sugieren la existencia de posibles receptores para las proteínas Cry1Ac en células de vertebrados, sin embargo, en la actualidad sólo se han reportado receptores para las proteínas Cry1Ac en insectos. Se han reportado diferentes proteínas tales como cadherinas, APN, y ALP como receptores de Cry en diferentes especies de insectos (Jurat-Fuentes *et al.*, 2004 y 2006; Knight *et al.*, 1994; Vadlamudi *et al.*, 1995).

Hasta el momento se desconocen las bases del mecanismo adyuvante e inmunogénico de las proteínas Cry1Ac. En una tesis de licenciatura de 2011, Medina mostró la unión de las proteínas Cry1Ac a posibles receptores en un extracto de leucocitos totales, menciona que la unión de los posibles receptores depende de carbohidratos (N-acetil galactosamina y N-acetil glucosamina). En este estudio, se encontró que al estimular leucocitos totales de bazo con las proteínas Cry1Ac (protoxina y toxina) se activa a diferentes proporciones de linfocitos T, B y macrófagos, sin embargo, se desconoce si las proteínas Cry1Ac pueden activar de forma directa a poblaciones purificadas de linfocitos T, es decir, en ausencia de células presentadoras de antígeno. No se sabe si la unión de las proteínas Cry1Ac es dependiente de la activación de estas células o si son las proteínas Cry1Ac quienes las activan de forma directa.

En este trabajo se determinó si la activación de los linfocitos T ocurre de forma directa por efecto de las proteínas Cry1Ac o sólo a través de una célula presentadora de antígeno; ya que los estudios que se han realizado, fueron en leucocitos totales de bazo. Así mismo, se caracterizó la cinética de unión y de activación de los linfocitos T por efecto de las proteínas Cry1Ac, se realizaron ensayos *in vitro* en linfocitos totales y en linfocitos T purificados de bazo y se analizó por citometría de flujo. Se analizó también, el efecto de

la activación en la unión de Cry1Ac a linfocitos T, se corroboró la unión por microscopía de fluorescencia y finalmente se realizaron ensayos de inmunoprecipitación y “Blot” ligado para determinar la presencia de posibles receptores de estas proteínas en linfocitos T.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los enfoques actuales para desarrollar vacunas efectivas están dirigidos a encontrar formas más eficientes de administración de antígenos al sistema inmune y hacia el descubrimiento de adyuvantes seguros que provean inmunidad. Los resultados de las investigaciones indican que la protoxina Cry1Ac de *Bacillus thuringiensis* es una proteína inmunogénica y adyuvante, que puede funcionar como acarreador vacunal y usada como adyuvante puede incrementar la protección en contra de tres modelos de infecciones parasitarias; además, que en poblaciones de leucocitos totales ejerce efectos inmunomoduladores en linfocitos y macrófagos (en linfocitos induce activación, e induce y/o modifica la expresión de citocinas; en macrófagos incrementa la expresión de moléculas coestimuladoras). Además, se ha reportado que las proteínas Cry1Ac son seguras, no son tóxicas para vertebrados; ya que no forma poros líticos como lo hace en insectos blanco lo que finalmente conduce a la muerte del insecto, por lo tanto, la administración de las proteínas Cry1Ac en vertebrados es segura y son excelentes candidatas para ser utilizadas como adyuvantes. Sin embargo, en la actualidad se desconocen las bases celulares y moleculares del mecanismo adyuvante e inmunogénico de las proteínas Cry1Ac en poblaciones purificadas de linfocitos T, no se sabe si la unión de las proteínas Cry1Ac es dependiente de la activación de estas células o si son las proteínas Cry1Ac quienes las activan. En este trabajo se determinó si la activación de los linfocitos T ocurre de forma directa por efecto de las proteínas Cry1Ac o sólo a través de una célula presentadora de antígeno; ya que los estudios que se habían realizado, fueron en leucocitos totales de bazo.

JUSTIFICACIÓN

Entre las propiedades que tienen las proteínas Cry1Ac, se ha reportado su capacidad como adyuvante, sin embargo, no se ha caracterizado su mecanismo de acción. Estudios previos indican que las proteínas Cry1Ac tienen la capacidad de activar y unirse a linfocitos T, dichos estudios fueron realizados in vitro en suspensiones de leucocitos totales de bazo. Por lo que, para caracterizar mejor los efectos y estudiar el mecanismo de acción de la protoxina y toxina Cry1Ac, así como para facilitar la identificación del posible receptor, es necesario determinar si la activación de los linfocitos T ocurre de forma directa por efecto de las proteínas Cry1Ac o sólo a través de una célula presentadora de antígeno, caracterizar la cinética de unión y de activación, determinar si la unión de la proteína Cry1Ac se favorece por la activación de linfocitos T, así como identificar al posible o los posibles receptores de las proteínas Cry1Ac en células T.

HIPÓTESIS

Nuestro grupo de investigación demostró en trabajos previos, que las proteínas Cry1Ac tienen la capacidad de activar y unirse a células T en extractos de leucocitos totales, sin embargo, dicha unión es aparentemente diferente entre la protoxina y toxina Cry1Ac en subpoblaciones de linfocitos T, además se ha visto que ésta unión sólo ocurre parcialmente en poblaciones de linfocitos T, no en su totalidad. Estos datos sugieren, que el estado de activación de los linfocitos T influye en la unión de las proteínas Cry1Ac, por lo tanto nos planteamos las siguientes hipótesis:

- I. La unión de las proteínas Cry1Ac es dependiente del estado de activación de los linfocitos T.
- II. La protoxina y toxina Cry1Ac son capaces de activar de forma directa a linfocitos T.
- III. La protoxina y toxina Cry1Ac activan en diferente proporción a linfocitos T CD4 y CD8.

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar el efecto de la toxina y protoxina Cry1Ac en la activación de linfocitos T.

Objetivos particulares

- I. Caracterizar la cinética de:
 - Activación de linfocitos T por efecto de las proteínas Cry1Ac
 - Unión de linfocitos T por efecto de las proteínas Cry1Ac.

- II. Determinar si las proteínas Cry1Ac inducen la activación de linfocitos T de forma directa.

- III. Determinar si las proteínas Cry1Ac se unen a linfocitos T, mediante microscopia confocal y de fluorescencia.

- IV. Determinar si la unión de las proteínas Cry1Ac se favorece con la activación de los linfocitos T.

- V. Identificar en linfocitos T el posible receptor de la toxina y la protoxina Cry1Ac por ensayo de "Blot" ligado.

ESTRATEGÍA EXPERIMENTAL

Estrategia experimental para determinar el efecto de las proteínas Cry1Ac en la activación y unión de linfocitos T, se presenta un diagrama de flujo (figura 1) que se describe a continuación:

- I. Obtención y purificación de las proteínas Cry1Ac de una cepa recombinante de *E.coli*. Para los ensayos de citometría de flujo y microscopia de fluorescencia y confocal, las proteínas fueron conjugadas con fluoresceína (FITC).

- II. Para determinar si las proteínas Cry1Ac tienen la capacidad de activar de forma directa a linfocitos T y unirse a la superficie celular de las mismas, se obtuvieron las células T de un bazo de ratón Balb/c, se incubó la suspensión celular ajustada a 1×10^6 células por ml, con las proteínas Cry1Ac (a una concentración de 10 μg /millón de células/ml); teniendo 3 grupos experimentales: control (1×10^6 células por ml), PCry1Ac-FITC y TCry1Ac-FITC, estos 3 grupos se incubaron a distintos tiempos: 10 minutos, 1 hora y 3 horas, para obtener una cinética de activación y unión; tanto de linfocitos totales, como de poblaciones aisladas de linfocitos T CD4 y T CD8. Transcurridos los distintos tiempos de incubación, se cosecharon las células y se incubaron con anticuerpos anti CD16/32 y se realizaron tinciones de superficie celular con anticuerpos marcados con fluorocromos distintos a FITC (anti CD4-PECy5, anti CD8-APC y anti CD69-PE). Las muestras fueron lavadas, fijadas y posteriormente se analizaron mediante citometría de flujo para identificar si las proteínas Cry1Ac tienen la capacidad para unirse y activar a poblaciones totales de linfocitos totales y de poblaciones aisladas de linfocitos T CD4 y T CD8.

- III. Para analizar si las proteínas Cry1Ac se unen a linfocitos T, se obtuvieron linfocitos de bazo de ratón, la suspensión celular se ajustó a 1×10^6 células por ml y se incubaron con las proteínas Cry1Ac conjugadas con FITC (a una concentración de 10 μg /millón de células/ml) teniendo el grupo control, PCry1Ac-FITC y TCry1Ac-FITC; se incubaron durante 10 minutos, 1 hora y 3 horas. Transcurrido los distintos tiempos de incubación, se cosecharon las células y se incubaron con anticuerpos anti CD16/32 y se realizaron tinciones de superficie celular con anticuerpos con fluorocromos anti CD4-PECy5, anti CD8-APC y anti

CD69-PE). Las muestras fueron lavadas, deshidratadas y montadas en portaobjetos y posteriormente se analizaron por microscopia de fluorescencia y confocal.

- IV. Para determinar si la unión de las proteínas Cry1Ac tiene relación con el estado de activación en los linfocitos T; se obtuvieron células de bazo de ratón, primero se obtuvieron linfocitos totales y una porción de ellas se aisló con perlas magnéticas para obtener poblaciones de linfocitos T CD4 y T CD8 aisladas, las suspensiones celulares se ajustaron a 1×10^6 células por ml y se incubaron con PMA – Ionomicina a una concentración de 20 ng/ml y 1 mM respectivamente, que activan de manera artificial a las células T, se dejaron incubar durante 3 horas. Transcurrido el tiempo de incubación se agregaron las proteínas Cry1Ac-FITC (10 $\mu\text{g}/\text{millón}/\text{ml}$) y se incubó por 10 minutos, teniendo como grupos experimentales: grupo control PMA – Ionomicina, PCry1Ac-FITC/PMA – Ionomicina y TCry1Ac-FITC/PMA – Ionomicina con linfocitos totales y con poblaciones aisladas de linfocitos T respectivamente. Se incubaron con anticuerpos anti CD16/32 y se realizaron tinciones de superficie celular con anticuerpos con fluorocromos anti CD4-PECy5, anti CD8-APC y anti CD69-PE). Las muestras fueron lavadas, fijadas y posteriormente se analizaron mediante citometría de flujo para identificar si la activación de las células T favorece la unión de las proteínas Cry1Ac. Este procedimiento también se utilizó para analizar estas muestras mediante microscopia de fluorescencia.
- V. Para identificar al posible receptor al que se unen las proteínas Cry1Ac en los linfocitos T, se hicieron ensayos de inmunoprecipitación. Se obtuvieron los linfocitos T y se aislaron con perlas magnéticas, la suspensión celular se ajustó a 10 000 000 cel/100 μl y se incubó con las proteínas Cry1Ac (20 $\mu\text{g}/\text{millón}$) durante 1 hora; las células fueron lisadas con un detergente no iónico. Una vez rotas las células se pusieron a interactuar durante 1 hora con la proteína A (sefariosa) unida a un anticuerpo IgG anti Cry1Ac, se hicieron diversos lavados para eliminar restos celulares no precipitados. Al precipitado se le agregó amortiguador de carga 6X-DTT y se corrieron por electroforesis SDS-PAGE. Estos geles se transfirieron a membranas de nitrocelulosa para realizar ensayos de “Blot” ligado. Las proteínas obtenidas por inmunoprecipitación (posible receptor) se incubaron con las

proteínas Cry1Ac (5 µg/µl), después se incubaron con suero de conejo anti toxina y protoxina Cry1Ac durante 2 horas, y posteriormente se incuban con proteína A peroxidada 1 hora, se revelan con sustrato de peróxido de hidrógeno con 4 cloronaftol, que revelaran las bandas y pesos moleculares del posible receptor.

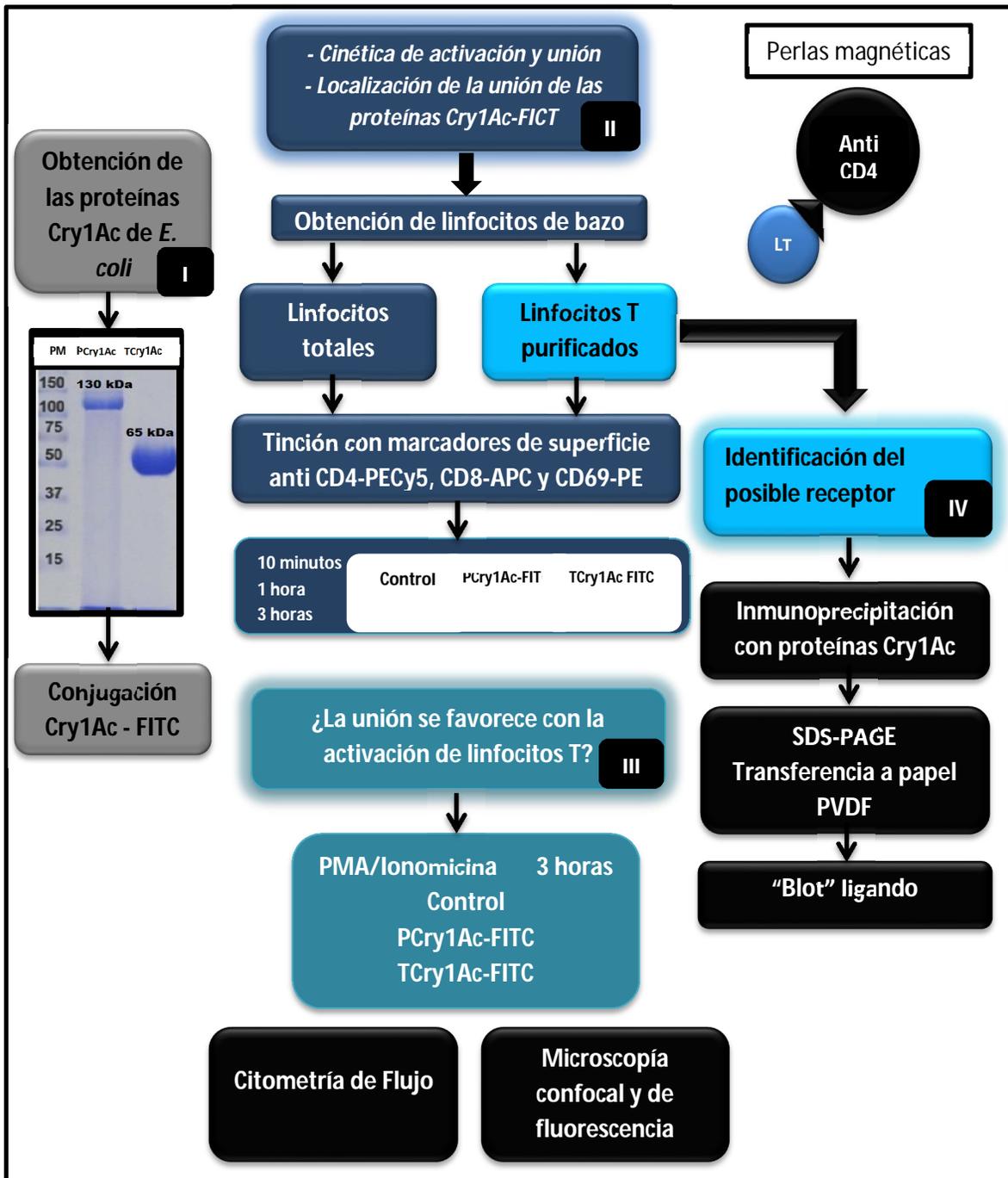


Figura 1. Diagrama de flujo de la estrategia experimental.

MATERIALES Y MÉTODO

Producción y obtención de la protoxina y toxina Cry1Ac

La protoxina Cry1Ac se obtuvo de una cepa recombinante de *E. coli* JM103, donada por el Dr. Donald Dean de la Universidad Estatal de Ohio (Columbus, EEUU), ésta bacteria posee un plásmido que incluye el gen que codifica para la protoxina Cry1Ac. *E. coli* fue crecida en 500 ml de medio Luria-Broth suplementado con antibiótico (ampicilina 100 µg/ml) a 37°C durante 48 h en agitación constante (250 rpm), se centrifugó a 10 000 rpm durante 15 min a 4°C, las bacterias sedimentadas fueron resuspendidas en amortiguador de lisis (Tris 50 mM pH 8.0, EDTA 1 mM, adicionado con sacarosa al 15% y lisozima 2 mg/ml) durante 1h A 37°C. Los cristales de protoxina Cry1Ac se obtuvieron al sonicar 5 ciclos de 5 min a 100 de amplitud en hielo, entre 17-20 Watts (se verificó al microscopia que las bacterias estuvieran rotas). Los cristales de la protoxina Cry1Ac se solubilizaron en amortiguador de carbonatos 0.1M pH 9.6 más DTT (10mM), se centrifugó a 10 000 rpm durante 10 min a 4°C para eliminar los restos celulares y se recuperó el sobrenadante (protoxina Cry1Ac). La purificación de la protoxina Cry1Ac se llevó a cabo mediante centrifugación con filtros de exclusión molecular de 100 kDa.

Para la obtención de la toxina a partir de la protoxina, se llevó a cabo una digestión con tripsina en una relación de 1:20, se incubó durante 1 h a 37°C en agitación (Burton, 1999), se inhibió la acción de proteasas con p-hidroximercurobenzoico (PMSF) 50 mM (Research Organics). Los posibles remanentes de endotoxina contenidos en las proteínas purificadas, se eliminan al pasar a las proteínas por una columna de polimixina (antibiótico), la cual tiene la capacidad de unión a la endotoxina de 5 mg/ml. Mediante SDS-PAGE se verificó la pureza de las proteínas Cry1Ac y su concentración se determinó utilizando el método de Bradford (Bradford, 1976).

Conjugado de las proteínas Cry1Ac

Se conjugaron las proteínas de Cry1Ac (toxina y protoxina) con FITC, para esto se debió de tomar en cuenta la concentración de la proteína, los mmol de las proteínas y de FITC. Las cantidades requeridas para la conjugación se calcularon con las siguientes fórmulas:

1. Calcular los mmol de FITC a conjugar para agregar a la reacción:

$$\text{mmol de FITC} = (\text{ml de proteína}) \frac{(\text{mg de proteína})(\text{mmol de proteína})(24 \text{ mmol de FITC})}{(\text{ml de proteína})(\text{mg de proteína})(\text{mmol de proteína})}$$

Ejemplo: Partiendo de una solución de TCry1Ac a una concentración de 8.65 mg/ml tomando en cuenta el peso molecular de TCry y el volumen se calcularon los milimoles de FITC que deberíamos agregar a la solución de proteína para realizar una conjugación eficiente.

$$(1 \text{ ml TCry}) \frac{(8.65 \text{ mg de TCry})(1 \text{ mmol de TCry})(24 \text{ mmol de FITC})}{(1 \text{ ml TCry})(70000 \text{ kDa})(1 \text{ mmol de TCry})} = 2.96 \times 10^{-3} \text{ mmol de FITC}$$

24 = Exceso molar recomendado de FITC para la proteína.

2. Cálculo de μl de FITC para agregar a la solución:

$$\mu\text{l de FITC} = (\text{mmol FITC}) \frac{(389 \text{ mg})(100 \mu\text{l})}{(1 \text{ mmol FITC})(1 \text{ mg})}$$

$$(2.96 \times 10^{-3} \text{ mmol de FITC}) \frac{(389 \text{ mg})(100 \mu\text{l})}{(1 \text{ mmol de FITC})(1 \text{ mg})} = 115.36 \mu\text{l de FITC}$$

389 = PM de FITC

Se agregó FITC a la toxina y protoxina Cry1Ac y la mezcla de reacción se incubó durante 60 min a T.A. para cada proteína. En oscuridad total se removi6 el exceso de fluorescencia en una columna de desalinización de Dextran, reconstituida con 25 ml de PBS, se adicion6 la proteína conjugada con FITC en la columna y se dej6 fluir en ella para posteriormente recolectar las proteínas conjugadas con FITC en tubos de ensayo en porciones de 0.5 ml. Se monitore6 el contenido de proteína midiendo la absorbancia, para cada fracción a 280 nm. Para comprobar la conjugación de la protoxina y toxina Cry1Ac-FITC, se corri6 el conjugado en SDS-PAGE y se verific6 en un transiluminador UV la banda de fluorescencia, y se verific6 que coincidiera con el PM esperado de 65 kDa para toxina Cry1Ac-FITC y 130 kDa para protoxina Cry1Ac-FITC.

Obtención de células linfoides de bazo

Para cada ensayo se obtuvo el bazo de un ratón Balb/c, el bazo se maceró sobre organza con émbolos de plástico en 2 ml de RPMI adicionado con 10% de suero fetal bovino, esta suspensión celular se colocó en un tubo cónico de 15 ml, se llevó a un volumen de 12 ml de RPMI, se centrifugó 10 min a 1500 rpm a 4°C y se recuperó la pastilla. Para lisar las células eritroides, se agregaron 3 ml de amortiguador de lisis a 4°C (cloruro de amonio 8.3 g/l en 0.01 M Tris-HCL) y se dejó incubar 7 min a T.A., cumplido el tiempo de lisis, se llevó a un volumen de 12 ml con PBS estéril frío a 4°C, se centrifugó 10 min a 1500 rpm a 4°C, y se recuperó la pastilla. La pastilla se llevó a un volumen de 10 ml de RPMI y se resuspendió. Para aislar las células adherentes (macrófagos) de linfocitos, se colocó la muestra celular en una placa de cultivo de 12 pozos, 1 ml por pozo y se dejó incubar por 30 min a 37°C en una atmosfera de CO₂ al 5%. Transcurrida la incubación se recuperó el sobrenadante y se centrifugó 10 min a 1500 rpm a 4°C, se recuperó la pastilla y se resuspendió en 3 ml de RPMI, se diluyó 1:10 para conteo de células.

Purificación de las poblaciones de linfocitos T CD4 y CD8

Se obtuvieron células linfoides del bazo (como anteriormente se describió) y se centrifugaron por 10 min a 1500 rpm a 4°C, se hizo una selección positiva para el aislamiento de linfocitos T CD4, por lo que a la pastilla se le agregó 160 µl de amortiguador de separación de linfocitos (amortiguador de fosfatos salino 0.5% BSA pH 7.2) más 40 µl de suspensión de microperlas Microbeads MACS CD4 (Miltenyi Biotec), se resuspendió y se incubó a 4°C durante 15 min, transcurrida la incubación se agregó 10 ml de amortiguador de separación de linfocitos, se centrifugó por 10 min a 1500 rpm a 4°C, se decantó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 1 ml de amortiguador de separación. Se preparó el kit de aislamiento celular (MiniMACS), se puso la columna sobre el imán (figura 2-a) y se lavó 3 veces con 3 volúmenes con amortiguador de separación, posteriormente se le agregó la suspensión celular a la columna y se recolectaron en tubos cónicos de 15 ml linfocitos T CD8 y B (figura 2-c). Para recuperar a linfocitos T CD4 se quitó la columna del imán y se le agregó 3 volúmenes de 3 ml, cada muestra se diluyó 1:10 para el conteo celular.

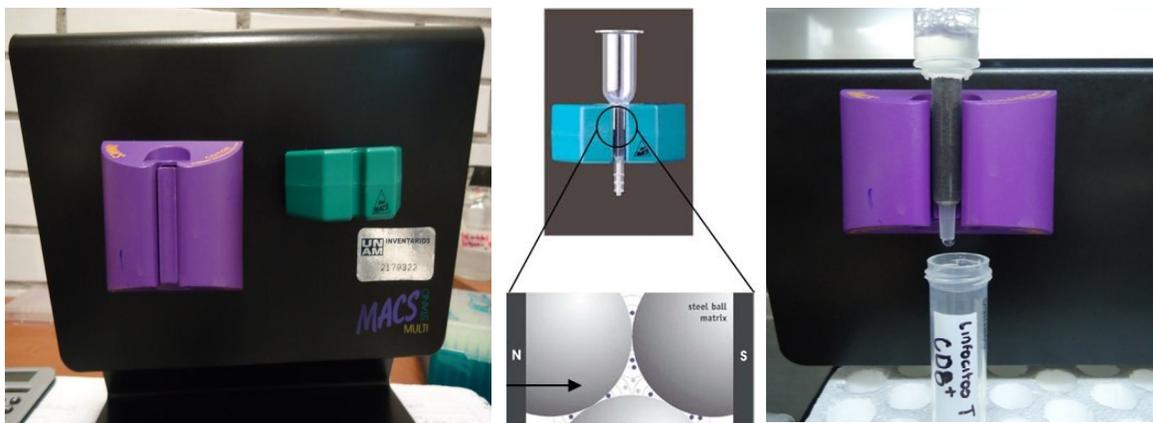


Figura 2. Aislamiento de linfocitos por selección positiva, usando perlas magnéticas conjugadas a anticuerpos anti CD4. A) Montaje del equipo de aislamiento celular MiniMACS. B) Esquema del proceso de aislamiento celular mediante selección positiva. C) Recuperación de linfocitos T CD8.

Para el aislamiento de linfocitos CD8 de los linfocitos B se eliminan los linfocitos B por selección positiva. Se centrifugó el tubo que contiene a linfocitos T CD8 y B, durante 10 minutos a 1500 rpm a 4°C, se decantó y se agregaron 10 µl de suspensión de microperlas MACS CD19 por cada 10 000 000 de células, más 90 µl de amortiguador de separación de linfocitos por cada 10 millones de células, se dejó incubar a 4°C durante 15 minutos, transcurrida la incubación se agregó 10 ml de amortiguador de separación de linfocitos, se centrifugó por 10 min a 1500 rpm a 4°C, se resuspendió la pastilla en 1 ml de amortiguador de separación. Se lavó 3 veces con 3 volúmenes con amortiguador de separación, posteriormente se le agregó la suspensión celular y se recolectaron los linfocitos T CD8.

Incubación de la protoxina y toxina Cry1Ac-FITC con células linfoides totales y con poblaciones purificadas de linfocitos T CD4 y CD8

Las células linfoides de bazo (linfocitos totales) y los linfocitos purificados (poblaciones aisladas de linfocitos T CD4 y CD8), en el grupo control se incubaron únicamente suspensiones celulares ajustadas a 1×10^6 cel/ml, en los grupos experimentales, suspensiones ajustadas a 1×10^6 cel/ml se incubaron con la protoxina y toxina Cry1Ac marcadas con FITC (10 µg/millón cel/ml). Los tres grupos se incubaron durante 10 min, 1 h y 3 h. Después de cada incubación, se cosecharon las células, se les

agregó anti CD16/32 (1:100) y posteriormente se realizó la tinción de superficie con anticuerpos marcados con fluorocromos distintos a FITC, anti CD69-PE (marcador de activación), anti CD4-PECy5 y anti CD8-APC con una dilución 1:100. Se lavó y se fijaron con paraformaldehído al 1%, se analizó por citometría de flujo para caracterizar la cinética de activación y unión de los linfocitos T, por las proteínas Cry1Ac.

Activación de linfocitos T por PMA/Ionomicina

Para determinar si el estado de activación en linfocitos T influye en la unión de las proteínas Cry1Ac, los linfocitos T CD4 y T CD8 se incubaron en suspensiones ajustadas a 1×10^6 cel/ml con ionomicina ($1 \mu\text{M}$) y PMA (20 ng/ml), durante 3 h. Posterior a la incubación se les agregó la protoxina y toxina Cry1Ac marcadas con FITC (10 μg /millón cel/ml) y se dejó incubar por 10 min. Se cosecharon las células, se les agregó anti CD16/32 (1:100) y posteriormente se realizó la tinción de superficie con anticuerpos anti CD69-PE (marcador de activación), anti CD4-PECy5 y anti CD8-APC dilución 1:100. Se lavaron, se fijó con paraformaldehído al 1% y se analizaron por citometría de flujo para determinar si la unión de las proteínas Cry1Ac se favorece con la activación de los linfocitos T.

Localización de la unión de la protoxina y toxina Cry1Ac-FITC a células linfoides de bazo

Se obtuvo una suspensión de células linfoides de bazo (método anteriormente descrito), se incubaron en suspensiones ajustadas a 1×10^6 cel/ml con la protoxina y toxina Cry1Ac marcadas con FITC (10 μg /millón cel/ml) durante 10 min, 1 h y 3 h. Se realizaron también, grupos experimentales que fueron activados de forma artificial (método anteriormente descrito), con ionomicina ($1 \mu\text{M}$) y PMA (20 ng/ml) adicionados con las proteínas Cry1Ac-FITC para determinar si la unión de Cry1Ac se favorece con la activación de los linfocitos, que se incubaron únicamente durante 3 h. Las células se cosecharon después de cada incubación, se les agregó anti CD16/32 (1:100) para bloquear los receptores Fc gamma II y III; posteriormente se realizó la tinción de superficie con anticuerpos marcados con fluorocromos distintos a FITC, anti CD4-PECy5 y anti CD8-APC con una dilución 1:100 y se dejó incubar durante 30 min a 4°C , se lavó con PBA y se

centrifugó 5 minutos a 1500 rpm a 4°C; se decantó y a la pastilla se le agregaron 300 µl de paraformaldehído al 1%. Se hicieron 2 lavados con 1 ml de PBS y se centrifugó durante 5 min a 1500 rpm a 4°C, después se hicieron 3 lavados con 1 ml de agua bidestilada, en el último lavado se decantó y se adicionaron 100 µl de agua peroxidada se homogenizó, se colocaron 30 µl en un porta objeto y se dejó secar. Posteriormente se cubrieron con tinción de Coplin por 3 min y 3 minutos más con xilol, después se fijaron con resina entellan, se guardaron en oscuridad a -20°C hasta su análisis en microscopia confocal y de fluorescencia.

Identificación de los posibles receptores para la protoxina y toxina Cry1Ac

Obtención de suero anti-protoxina y anti-toxina Cry1Ac

Se inmunizó un conejo para obtener anticuerpos específicos anti-PCry1Ac y anti-TCry1Ac, con una mezcla de protoxina y toxina Cry1Ac (500 µg) en 500 µl de adyuvante completo de Freund en relación 1:1 la primera aplicación se distribuyó en distintas partes del cuerpo. Se inyectaron 5 inmunizaciones como refuerzos con adyuvante incompleto de Freund utilizando la misma cantidad de las proteínas Cry1Ac en relación 1:1. Los últimos 3 refuerzos se realizaron con 300 µg de la protoxina y toxina Cry1Ac en una relación de 1:1 con adyuvante incompleto de Freund.

Para la obtención del suero de conejo, se realizaron dos sangrados en la oreja, calentando con un foco de 100 Watts hasta dilatar las venas, posteriormente se realizó un corte transversal vertiendo la sangre en un tubo cónico de 15 ml. En el primer sangrado se obtuvo 1 tubo de 10 ml y en el segundo sangrado se obtuvieron 2 tubos para un total de 30 ml de sangre, la cual se dejó coagular a temperatura ambiente, se despegó el coágulo de las paredes del tubo, se colectó el suero y se congeló a -70 °C. Se probó la especificidad realizando un "blot" ligando con toxina y protoxina para constatar la presencia de los anticuerpos anti toxina Cry1Ac y anti protoxina Cry1Ac (figura 20).

Lisado de linfocitos

Linfocitos T CD4 y CD8 se lisaron para tener un patrón general de proteínas a las que se les pudiera unir las proteínas Cry1Ac. Se obtuvieron poblaciones purificadas de

linfocitos TCD4 y CD8, se ajustaron suspensiones de 1×10^6 células/ml de cada tipo celular. Se calculó el volumen de la pastilla y se hizo una relación de 1:2, a la pastilla se le agregó el doble de su volumen de inhibidor de proteasa Minicomplete 7X, se mezcló homogéneamente y en seguida se agregó amortiguador de lisis RIPA (Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, Tritón 100X 1%) en una relación de 1:2, mezclar. Las suspensiones celulares se sonicaron 3 ciclos de 10 seg en hielo, se verificó al microscopio que las células se hayan roto, siendo así, se centrifugó durante 5 min a 10 000 rpm a 4°C, se recuperó el sobrenadante y se agregó amortiguador de carga 6X. Se corrió un gel SDS-PAGE, con los lisados de los linfocitos T CD4 y CD8, se tiñó el gel con azul Coomassie para revelar el patrón de bandas de proteínas, producto de la lisis celular.

Inmunoprecipitación de toxina y protoxina Cry1Ac

El procedimiento de inmunoprecipitación se muestra en la figura 3 y se describe a continuación:

1. Se obtuvieron poblaciones aisladas de linfocitos T CD4 y CD8.
2. A cada tipo celular se le agregó protoxina y, por otro lado toxina Cry1Ac en una concentración de $10 \mu\text{g}/1 \times 10^6$ de células en 100 μl de RPMI y se incubó durante 1 hora a 37°C. Transcurrida la incubación, se les agregó 1 ml de PBS 1X estéril y se centrifugó durante 5 min a 1500 rpm a 4°C, se decantó y se agregaron 100 μl de inhibidor de proteasas (Mini complete 7X) mezclando cuidadosamente.
3. Posteriormente se le agregaron 100 μl de amortiguador RIPA (Tris HCl 50 mM, NaCl 150 mM, EDTA 1mM, Tritón 100X 1%) y se mezcló cuidadosamente. Se sonicó 5 ciclos de 10 seg cada uno y se verificó al microscopio que las células estén rotas.
4. Previamente se puso a interactuar en agitación moderada durante 20 min, al anticuerpo específico de la protoxina y toxina Cry1Ac (por separado) en una dilución de 1:100 en PBS 1X con 300 μl de la proteína A (resina).
5. Una vez rotas las células, se le agregó la suspensión que contenía al anticuerpo específico de las proteínas Cry1Ac con la proteína A al tubo que contiene los restos celulares.
6. Ésta suspensión se incubó en agitación moderada durante 1 hora a 4°C, se agregaron 100 μl de PBS 1X y se centrifugó por 1 min a 3000 rpm a 4°C, se

recolectó el sobrenadante (primer lavado) y a la pastilla (precipitado = posible receptor) se le agregó 1 ml de PBS 1X. Proceso de lavado: Se realizó con la finalidad de eliminar los restos celulares.

7. Se centrifugó en las mismas condiciones el tubo que contiene la pastilla con el posible receptor (1 min a 3000 rpm a 4°C), se recolectó el sobrenadante (lavado 2) y la pastilla se le agregó 1 ml de PBS 1X. Se realizaron los lavados necesarios hasta que la lectura de los mismos en un espectrofotómetro a 280 nm fue igual o menor a 0.005 de absorbancia, esto nos asegura la eliminación de restos celulares de la pastilla que contiene a nuestro receptor.
8. Para obtener las proteínas precipitadas se eluyó la pastilla con un amortiguador de glicina-HCL pH 2.8, inmediatamente se le adicionó TRIS 100 mM para neutralizar y se dializó. Las proteínas precipitadas pueden procesarse directamente de la siguiente manera: a la pastilla (precipitado), se le agregó 220 µl de PBS 1X y 80 µl de amortiguador de carga 6X-DTT, se hirvieron las muestras a baño maría durante 5 minutos, posteriormente se agitaron las muestras en un vortex 10 segundos y se colocaron en hielo por 3 minutos, posteriormente se centrifugó durante 5 min a 1500 rpm a 4°C, se recolectó el sobrenadante cuidadosamente y se almacenó a -80°C.

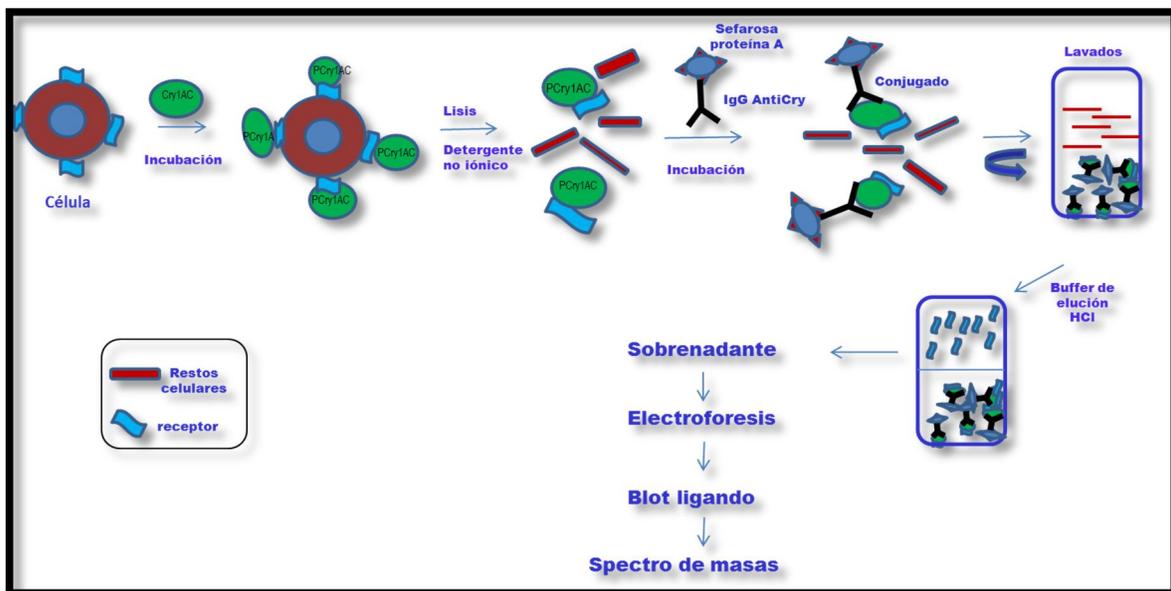


Figura 3. Representación gráfica del procedimiento de inmunoprecipitación, que se utilizó en la búsqueda del o de los posibles receptores para las proteínas Cry1Ac en linfocitos T.

Transferencia de geles a membranas de PVDF

Se corrieron las muestras del extracto de linfocitos purificados T CD4 y CD8 en geles SDS-PAGE, se corrieron 2 geles con muestras iguales, uno de ellos se tiñó con azul de Coomassie para verificar el patrón de proteínas era adecuado; el otro, se utilizó para la transferencia de las proteínas a papel polidifenilo (PDVF) para realizar posteriormente el “blot” ligado. En el cassette de transferencia se colocó como base una 1 fibra Scotch-Brite, seguida de papel cartoncillo, papel filtro grueso Watman #3 doble, papel PDVF hidratado con metanol, el gel SDS-PAGE, papel filtro, papel cartoncillo y por último 1 fibra y se cerró el cassette de transferencia. Se colocó el cassette en el equipo para transferencia y se dejó correr a 100 volts, 400 miliamperes durante 1 hora. Transcurrido el tiempo de corrida, se colocó el papel de PDVF en colorante de rojo Ponceau (Rojo Ponceau al 0.1%, ácido acético al 5%) en agitación ligera hasta que empiecen a teñirse bandas (para verificar que haya ocurrido la transferencia), el papel PDVF se dejó secar a temperatura ambiente y se cortaron los carriles en una tira, una vez que se tuvieron las tiras, se destiñeron con agua destilada y se realizó la inmunodetección mediante “Blot” ligado.

“Blot” ligado

Se saturó el papel de PVDF transferido, que contenía las proteínas inmunoprecipitadas y de lisados totales de linfocitos CD4 o CD8, con 3 ml de leche al 6% para los ensayos con PCry1Ac y con 3 ml de albúmina al 3% para ensayos con TCry1Ac en PBS-Tween 0.05%, toda la noche a 4°C. Al día siguiente, se lavó 5 veces con PBS-Tween, a las tiras se les agregó protoxina o toxina Cry1Ac en una concentración de 5 µg/µl por tira y se dejó incubar durante 2 horas a 4°C en agitación, se lavó 5 veces con PBS-Tween, durante 2 horas se incubó con el anticuerpo primario (que obtuvimos del suero de conejo, con anticuerpos anti protoxina y anti toxina Cry1Ac) en agitación, se lavó 5 veces con PBS-Tween, se incubó con proteína A peroxidada 1:10000 en PBS-Tween por 1 hora a 4°C, se lavó 5 veces con PBS-Tween, se reveló con solución sustrato de cromógeno (4-cloronaftol y agua peroxidada), hasta que aparecieron las bandas y se detuvo la reacción con PBS 1X.

Análisis estadístico

Los datos fueron analizados usando el análisis de varianza de dos factores (ANOVA) seguida por la prueba estadística de T de Student. Se compararon los porcentajes de activación y unión de células linfoides por las proteínas Cry1Ac. Los datos fueron expresados como la media \pm el error estándar. Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas a $p \leq 0.01$.

RESULTADOS

Obtención de las proteínas Cry1Ac

Se obtuvo una producción de protoxina y toxina Cry1Ac pura, esta pureza se corroboró al correr un gel SDS-PAGE de acrilamida al 10% (figura 4-A) y se verificó que las proteínas estuvieran libres de impurezas y con el peso molecular anteriormente establecido de 130 kDa para la protoxina Cry1AC y de 65 kDa para la toxina Cry1Ac (Bravo *et al.*, 2007).

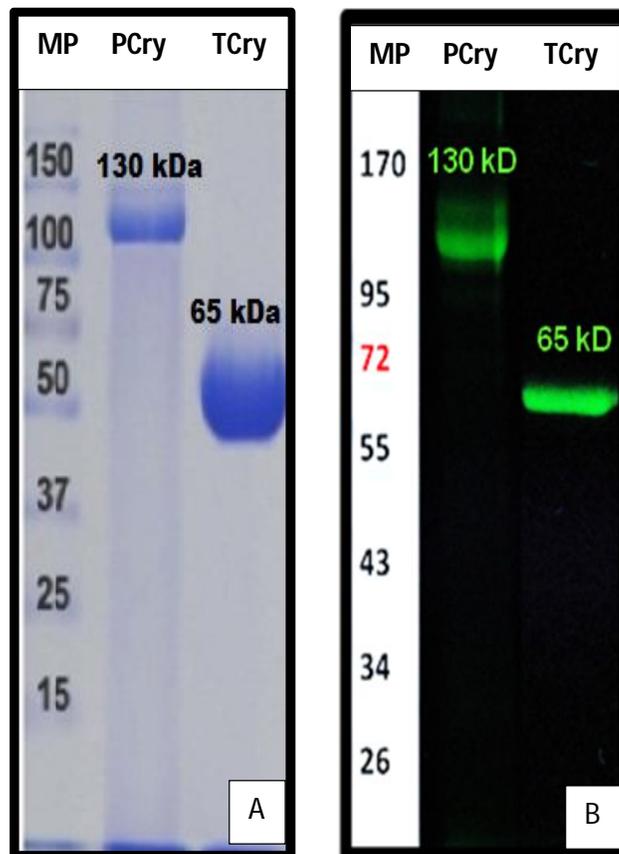


Figura 4. A) Gel SDS-PAGE de acrilamida al 10% teñido con azul de Coomassie, donde se muestra la pureza de las proteínas Cry1Ac obtenidas. B) Proteínas Cry1Ac conjugadas con FITC, gel de poli-acrilamida iluminada con luz ultravioleta.

En ambas imágenes de izquierda a derecha: Marcador de peso molecular (MP), protoxina Cry1Ac de 130kDa (PCry) y toxina Cry1Ac de 65 kDa (TCry).

Conjugado de toxina Cry1Ac-FITC

Se conjugaron las proteínas Cry1Ac, con el fluorocromo fluoresceína (FITC), para confirmar que dicha conjugación se realizó adecuadamente, se corrieron los conjugados en un gel SDS-PAGE de acrilamida al 10%, se obtuvo la imagen en un fotodocumentador de iluminación ultravioleta (figura 4-B), dicha luz excita a FITC y la emisión de luz es visible, para poder comprobar que la conjugación fue apropiada.

NOTA: Desde este momento, nos referiremos como **“Población de linfocitos totales”** a la población de linfocitos mezclados (linfocitos T CD4, CD8 y linfocitos B) de bazo y como **“Poblaciones de linfocitos T purificados”** a las poblaciones de linfocitos T CD4 y CD8, que fueron separadas con perlas magnéticas.

Activación de linfocitos T

Las proteínas Cry1Ac inducen activación en linfocitos T

Para cuantificar la activación en linfocitos se utilizó el marcador CD69. La molécula CD69 es una lectina tipo C, es un marcador de activación temprana en linfocitos, está involucrada en la proliferación de linfocitos y en la expresión de diferentes moléculas de superficie (Janeway *et al.*, 2000). En nuestros resultados observamos que, tanto la protoxina como la toxina Cry1Ac, tienen la capacidad de activar a linfocitos T CD4 y CD8 tanto en poblaciones totales como en poblaciones purificadas, ya que se incrementó la expresión de CD69 (figura 5, 6, 7 y 8), estos resultados sugieren que las proteínas Cry1Ac si tienen la capacidad de activar a linfocitos T de forma directa. Sin embargo, existen diferencias entre los efectos de la estimulación con toxina y protoxina, siendo en general mayores los efectos de la toxina Cry1Ac, estos efectos se muestran desde la figura 5 a la 8.

Activación en poblaciones totales de linfocitos T

Tanto la protoxina como la toxina Cry1Ac, tienen la capacidad de incrementar la expresión de CD69 en linfocitos CD4 de poblaciones totales de linfocitos T, las proteínas Cry1Ac aumentan la expresión de CD69 de manera gradual respecto al tiempo, siendo la toxina Cry1Ac la que presenta mayores porcentajes de activación comparada con la protoxina Cry1Ac, estos resultados se muestran en la figura 5.

En la figura 5-A se muestran las gráficas representativas de la activación en linfocitos T CD4, donde se observó que ocurre de manera gradual respecto al tiempo, a las 3 horas se ve el mayor porcentaje de activación tanto para la toxina como para la protoxina, sin embargo, la toxina mostró mayor activación comparada con la protoxina.

NOTA: En los “plots” en el eje X en este caso tenemos el marcador CD69 que nos indica activación, en el eje Y tenemos en el caso de la figura 5-A el marcador para células CD4. La región R7 nos indica que es positivo para células T CD4 pero negativo para el marcador CD69, la región R8 indica que es positiva para células T CD4 y para CD69, es decir, que los linfocitos T CD4 de esa región están activados, la región R9 indica que son células negativas para CD4 y negativas para CD69, células que no son CD4 y no están activadas y la región R10, indica que son células negativas para células T CD4 pero positivas para CD69.

En la figura 5-B se muestra una gráfica de barras confirmando las diferencias en la activación de las proteínas Cry1Ac respecto al control, la activación es gradual respecto al tiempo y la toxina tiene mayor efecto en la activación. La figura 5-C muestra estos mismos resultados graficados mediante la intensidad media de fluorescencia (IMF) indica las células positivas para CD69, los resultados por IMF corroboran los resultados anteriormente mencionados, donde la toxina presentó mayor activación comparada con la protoxina y la activación es gradual.

Activación de poblaciones totales CD4

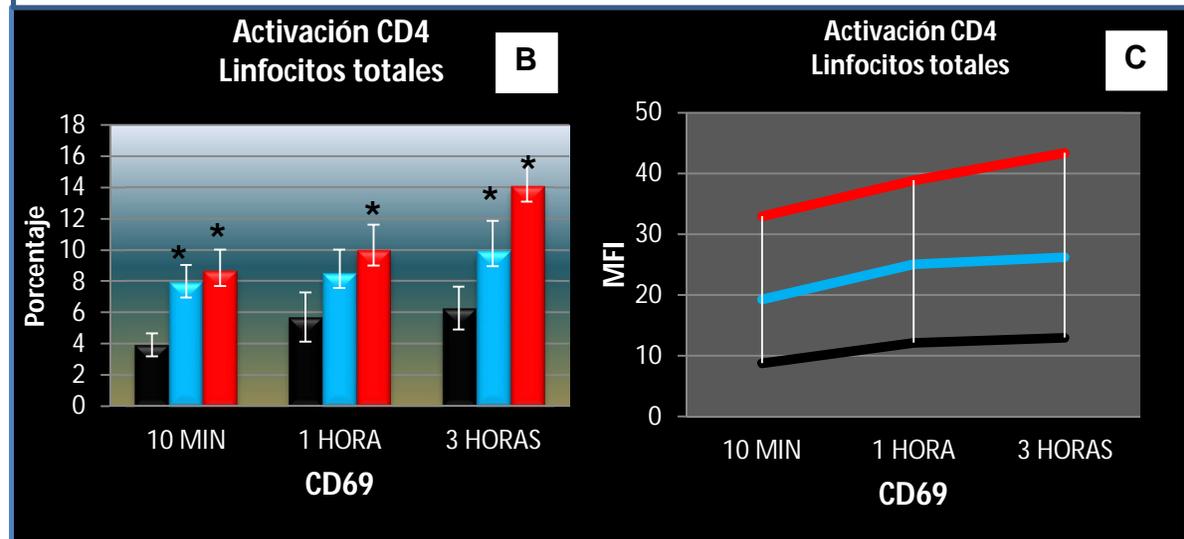
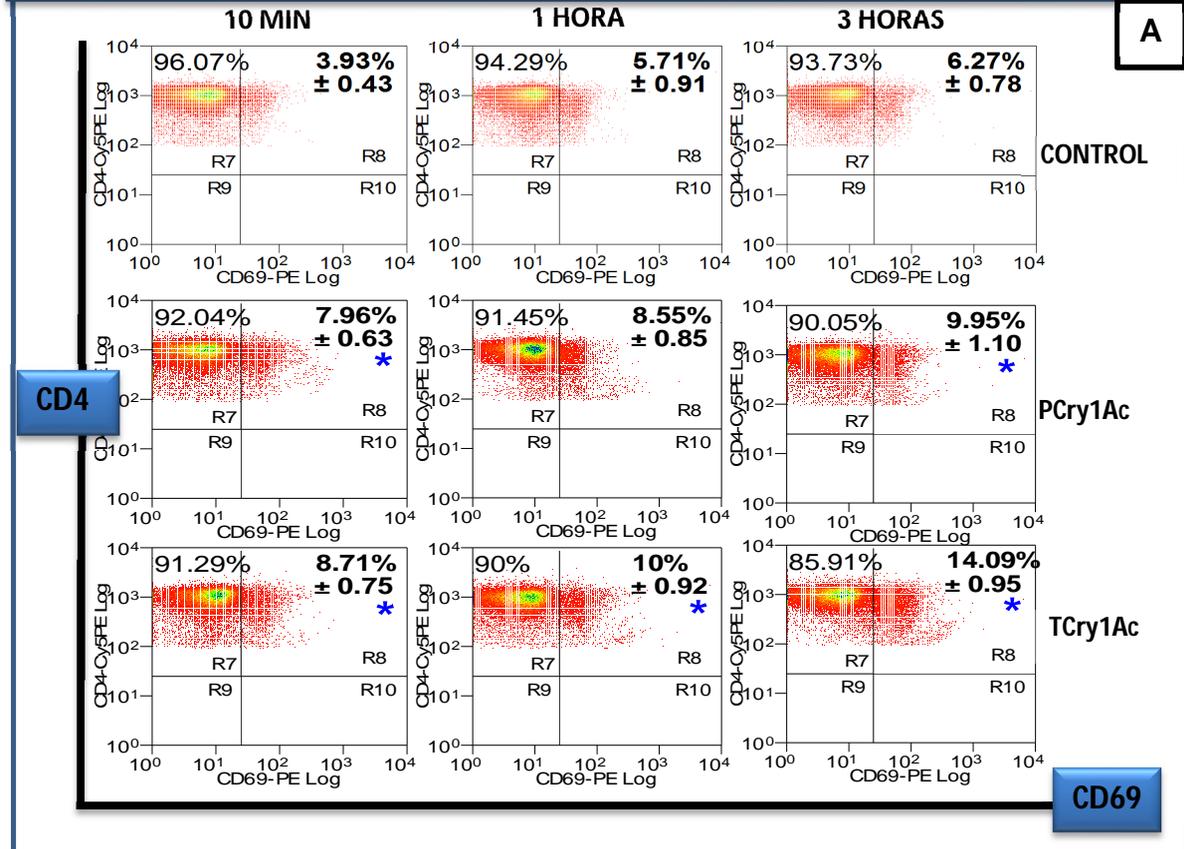
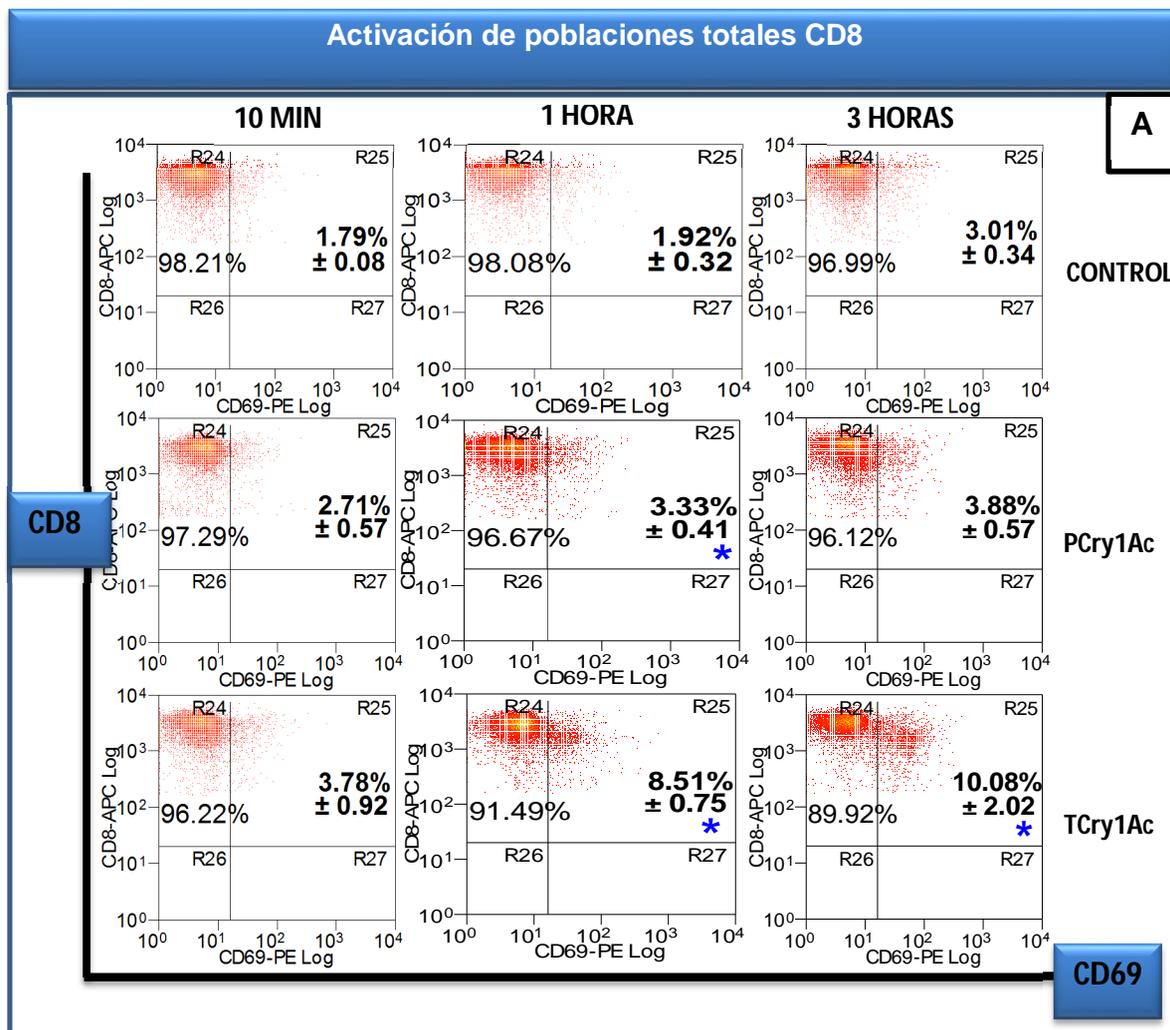


Figura 5. Las proteínas Cry1Ac inducen activación en linfocitos totales T CD4. A) Cinética de activación de linfocitos T CD4 por las proteínas Cry1Ac. * Diferencia estadísticamente significativa respecto al control. B) Gráfica comparativa de los porcentajes de activación y tiempo, negro = control, azul = PCry1Ac, rojo = TCry1Ac. C) Gráfica representativa de los índices medios de fluorescencia en la activación.

En los ensayos realizados con las poblaciones de linfocitos T totales, también se observó que tanto la protoxina como la toxina Cry1Ac, tienen la capacidad de incrementar la expresión CD69 en linfocitos CD8 (figura 6-A). Las proteínas Cry1Ac aumentaron la expresión de CD69 de manera gradual respecto al tiempo (figura 6-B), esto nos indicó que, la activación se da de manera gradual, siendo la toxina Cry1Ac la que induce mayores porcentajes de activación comparada con la protoxina Cry1Ac, los resultados se muestran en la figura 6. Estos resultados mostraron una tendencia similar a la observada en linfocitos CD4, aunque la activación en linfocitos CD8 presentó porcentajes menores en la expresión CD69, comparados con los obtenidos en linfocitos T CD4.



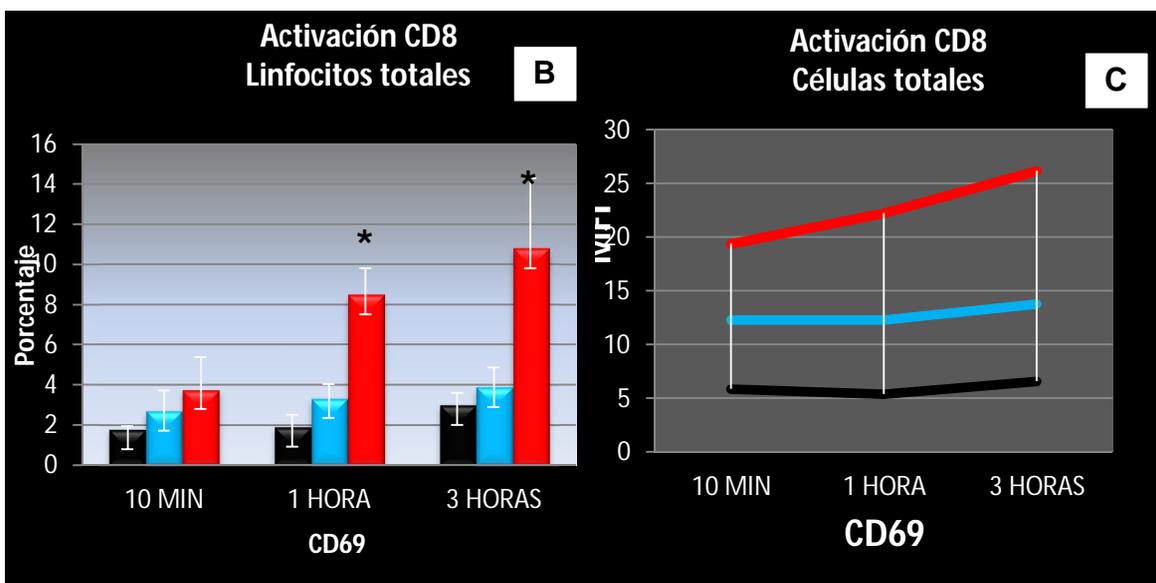


Figura 6. Las proteínas Cry1Ac activan a linfocitos CD8 de poblaciones totales. A) Cinética de activación de linfocitos T CD8 por las proteínas Cry1Ac * Diferencia estadísticamente significativa respecto al control. B) Gráfica que muestra los porcentajes de activación de células CD8, negro= control, azul = PCry1Ac, rojo = TCry1Ac. C) Gráfica que indica el índice medio de fluorescencia (MFI) en la activación.

Activación en poblaciones purificadas de linfocitos T CD4

En poblaciones purificadas de linfocitos T CD4 también hubo un aumento en la expresión CD69 por efecto de las proteínas Cry1Ac, (figura 7). Aunque se observa que la TCry1Ac, presenta porcentajes mayores en la activación respecto a los que obtuvo la PCry1Ac. Sin embargo, el efecto de activación en linfocitos T purificados inducidos por PCryAc y TCry1Ac fue menor que en los totales.

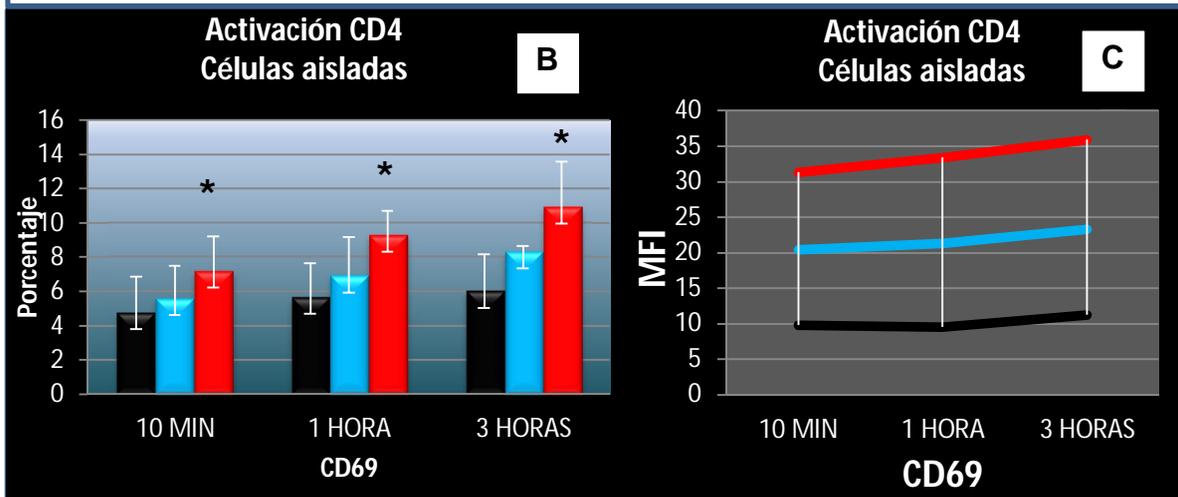
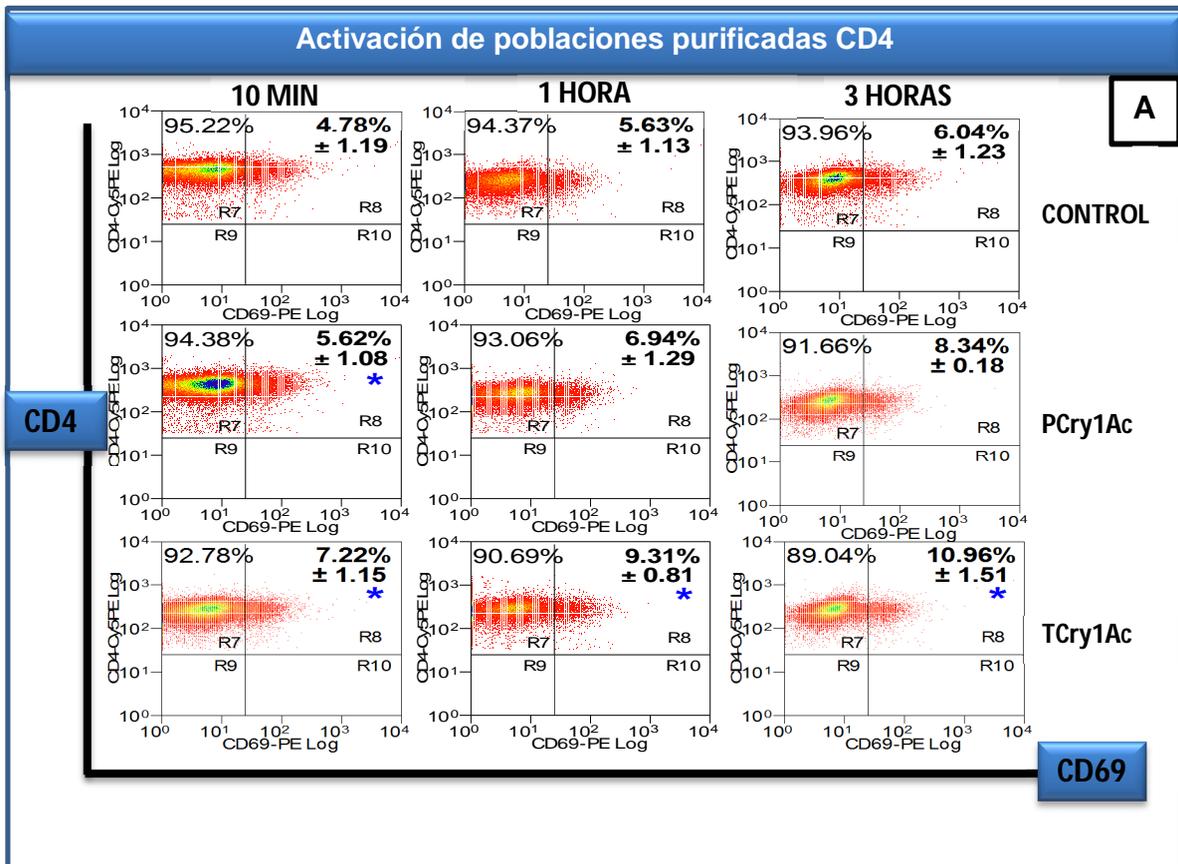
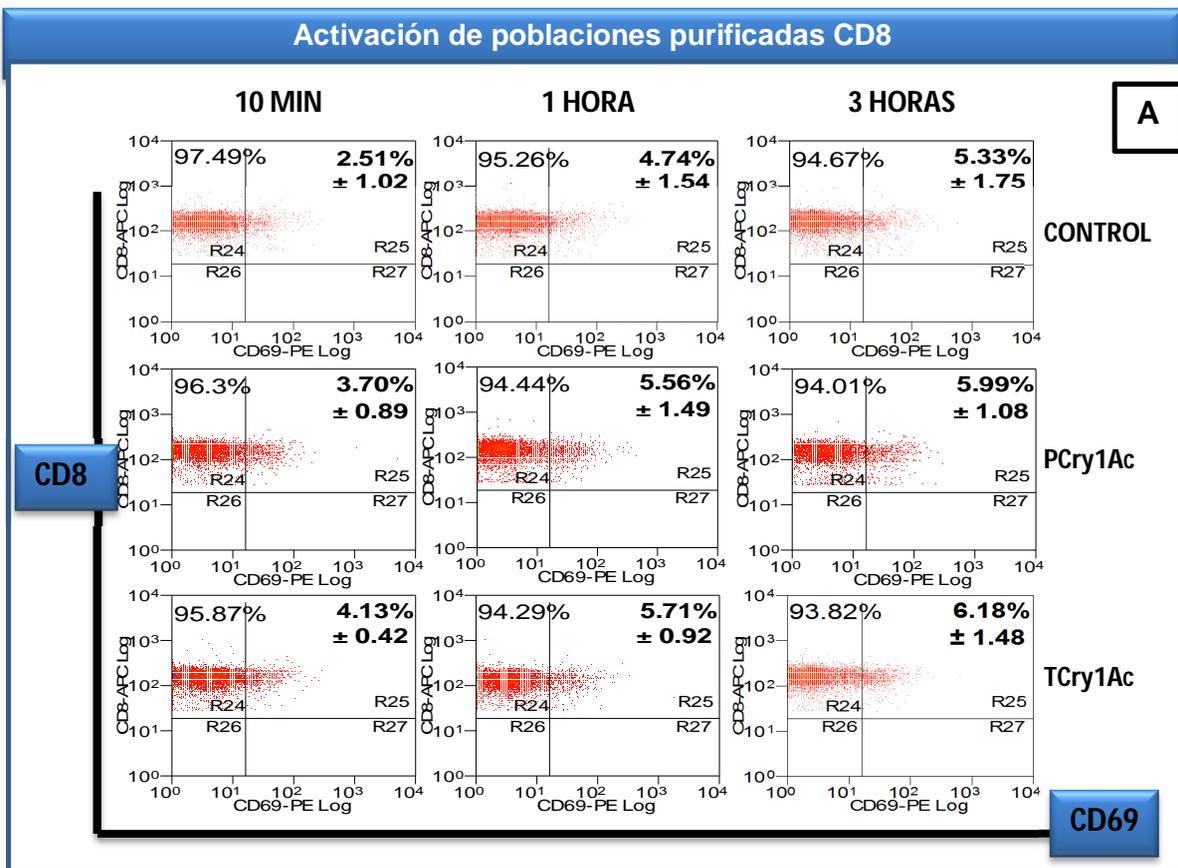


Figura 7. Las proteínas Cry1Ac activan a linfocitos purificados CD4. A) Cinética de activación de linfocitos aislados con perlas magnéticas T CD4 por las proteínas Cry1Ac *Diferencia estadísticamente significativa respecto al control. B) Gráfica que muestra los porcentajes de activación de células CD4 purificadas, negro = control, azul = PCry1Ac, rojo = TCry1Ac. C) Gráfica representativa que indica el índice medio de fluorescencia en la activación CD4.

Poblaciones de Linfocitos T CD8 purificados

En poblaciones de linfocitos T CD8 purificados, se observó un discreto aumento en la expresión CD69 con respecto al control (figura 8), por efecto de las proteínas Cry1Ac. Sin embargo, existe un mayor porcentaje de activación en los tratamientos con TCry1Ac en comparación con la PCry1Ac, este efecto se observó en linfocitos T CD4; aunque los porcentajes de activación son menores en linfocitos T CD8. El índice media de fluorescencia (MFI) muestra la intensidad de FITC que se une a una célula T (figura 8-C).



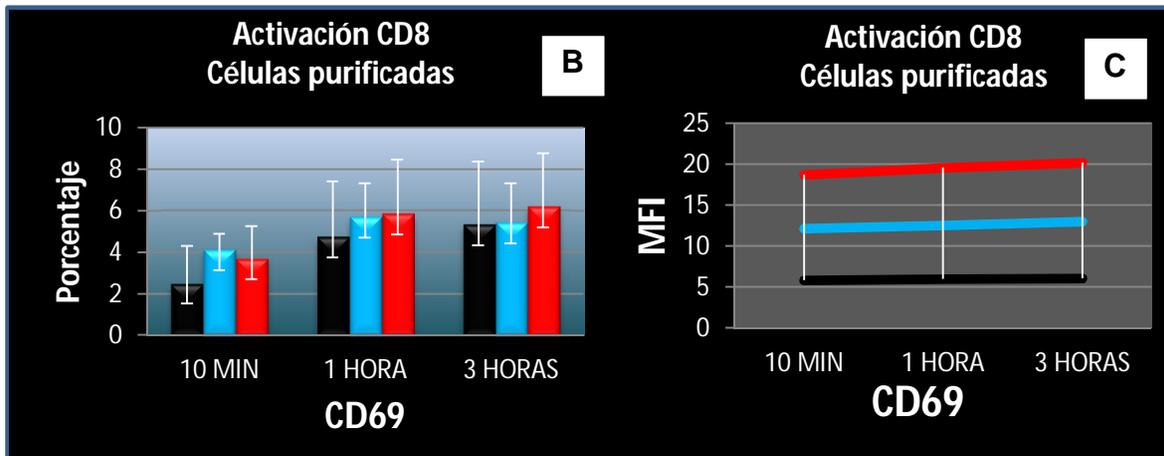


Figura 8. Las proteínas Cry1Ac activan a linfocitos purificados CD8. A) Cinética de activación de linfocitos aislados con perlas magnéticas T CD8 por las proteínas Cry1Ac. * Diferencia estadísticamente significativa respecto al control. B) Gráfica que muestra los porcentajes de activación de células CD8, negro = control, azul = PCry1Ac, rojo = TCry1Ac. C) Gráfica que indica el índice medio de fluorescencia en la activación CD8.

Resumiendo los resultados obtenidos en la activación de linfocitos, tenemos que:

- Las proteínas Cry1Ac tienen la capacidad de activar a poblaciones de linfocitos T CD4 y la activación en CD8 es muy discreta (no significativa) de manera gradual conforme al tiempo. Esto pudiera sugerir que las proteínas Cry1Ac necesiten células presentadoras de antígeno para inducir una mayor activación.
- La TCry1Ac incrementó en mayor medida los porcentajes de expresión CD69 comparados con los obtenidos con la PCry1Ac.
- Los efectos en la activación, se observaron de manera similar tanto en poblaciones totales de linfocitos, como en poblaciones purificadas, sin embargo, en estas últimas los porcentajes de activación fueron ligeramente menores comparados con los obtenidos en las poblaciones totales de linfocitos.

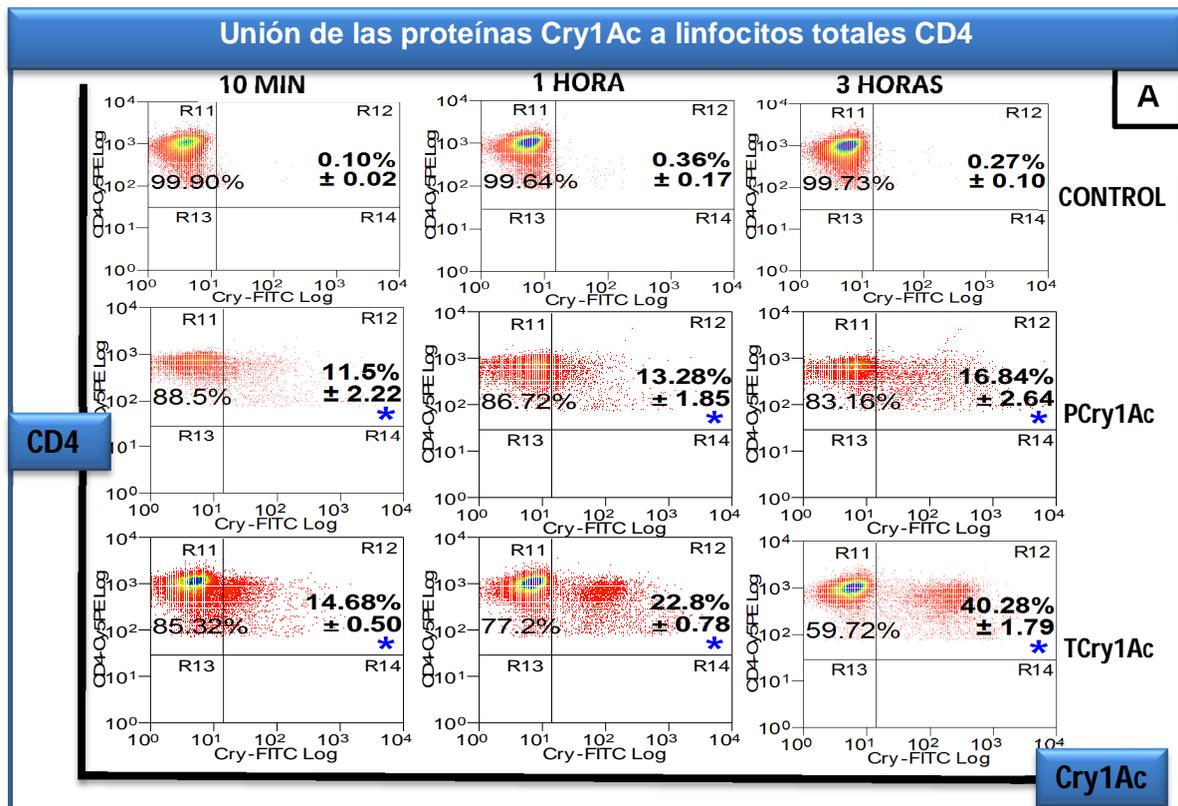
Unión de las proteínas Cry1Ac a linfocitos T

Las proteínas Cry1Ac se unen a poblaciones de linfocitos T

Anteriormente se ha descrito que las proteínas Cry1Ac tienen la capacidad de unirse a poblaciones de leucocitos totales, por lo que, decidimos caracterizar la cinética de unión de estas proteínas a poblaciones de linfocitos T aislados y poblaciones de linfocitos totales.

Unión de las proteínas Cry1Ac a poblaciones de linfocitos totales

Las proteínas Cry1Ac se unieron a poblaciones totales de linfocitos T CD4, la unión ocurrió de manera gradual respecto al tiempo, siendo la TCry1Ac la que presentó mayores porcentajes de unión (10 minutos - 14.68%; 1 hora - 22.8% y 3 horas - 40.28%) en comparación con la unión obtenida con la PCry1Ac (10 minutos - 11.5%; 1 hora - 13.28% y 3 horas - 16.84%), estos datos se muestran en la figura 9-A. En la figura 9-B se muestran los histogramas de la figura 9-A, el desplazamiento a la derecha indica un incremento en la activación. La toxina muestra mayor efecto en la activación comparada con la protoxina.



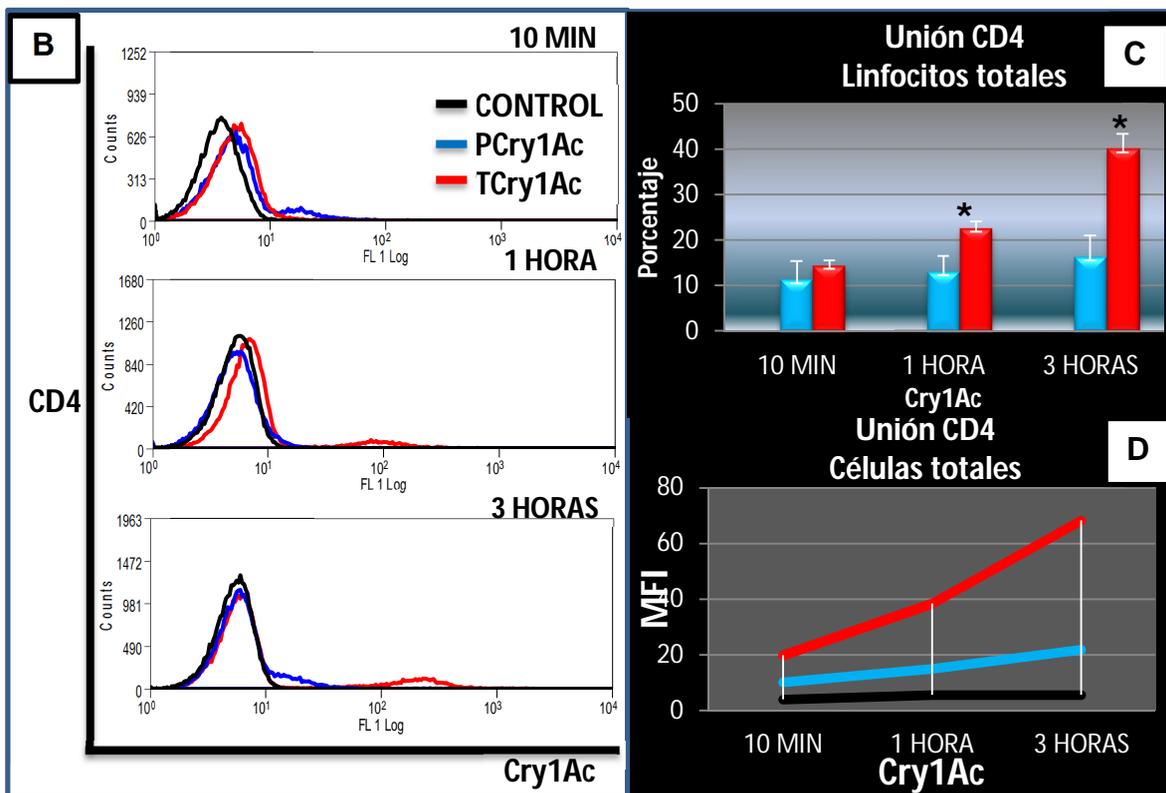


Figura 9. Unión de las proteínas Cry1Ac a linfocitos T CD4 de poblaciones totales. A) Cinética de unión de las proteínas Cry1Ac a linfocitos CD4 * Diferencia estadísticamente significativa respecto al control. B) Histogramas representativos de la unión de linfocitos T CD4, la unión de TCry1Ac se une en mayor porcentaje comparada con PCry1Ac. C) Gráfica que muestra los porcentajes de unión de células CD4, negro = control, azul = PCry1Ac, rojo = TCry1Ac. D) Gráfica que indica el índice medio de fluorescencia en la unión CD4.

Linfocitos T CD8

En poblaciones totales de linfocitos, las proteínas Cry1Ac tuvieron la capacidad de unirse a linfocitos T CD8, la cinética de unión mostró, que esta última, ocurre de manera gradual respecto al tiempo tanto con la protoxina (porcentajes de unión. 10 min: 10.9%, 1 hora: 13.67%, 3 horas: 23.15%) como con la toxina Cry1Ac (porcentajes de unión. 10 min: 16.75%, 1 hora: 23.08%, 3 horas: 51.89%) se muestra en la figura 10-A. La TCry1Ac presenta mayores porcentajes de unión comparados con los obtenidos con la PCry1Ac (figura 10-B).

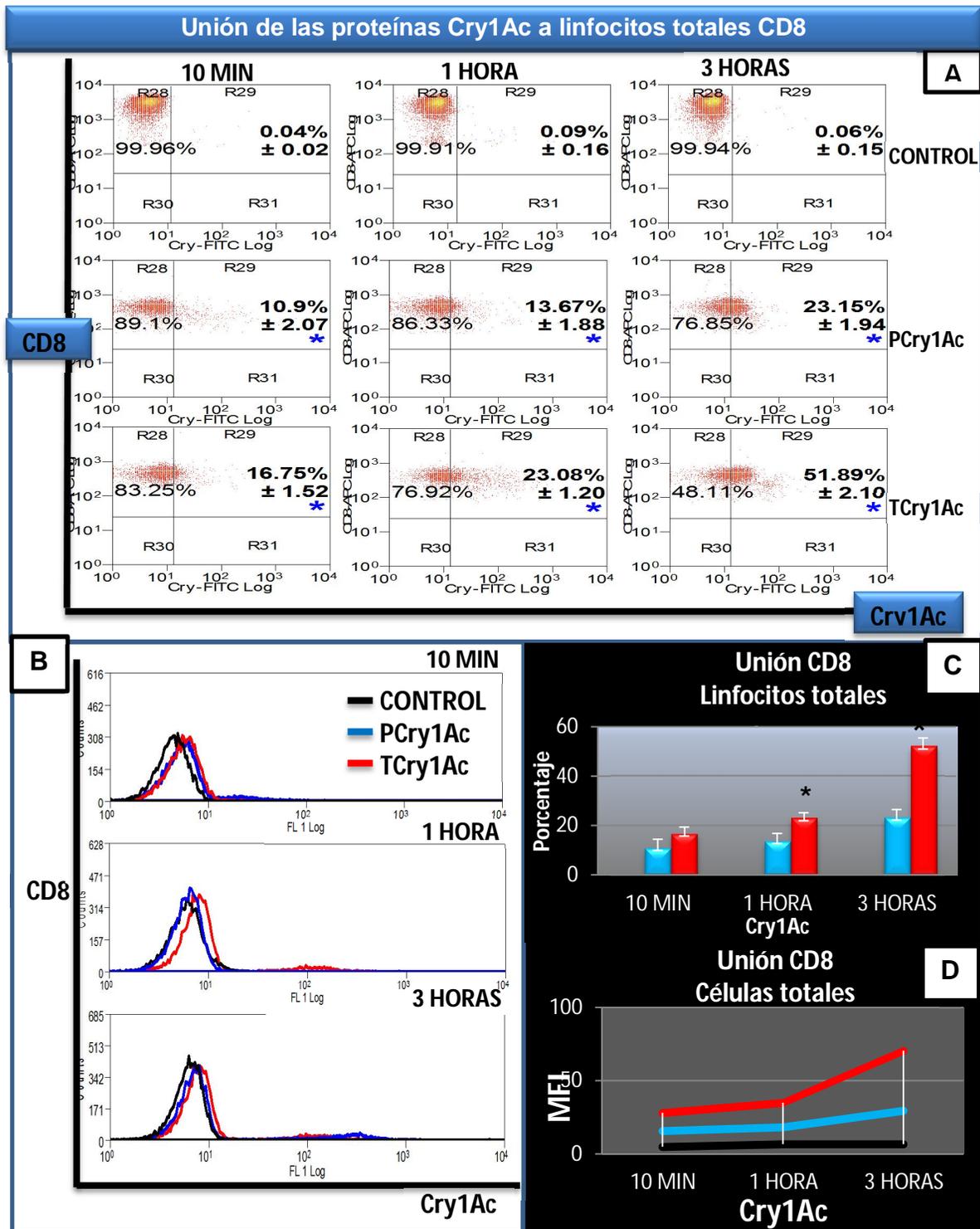


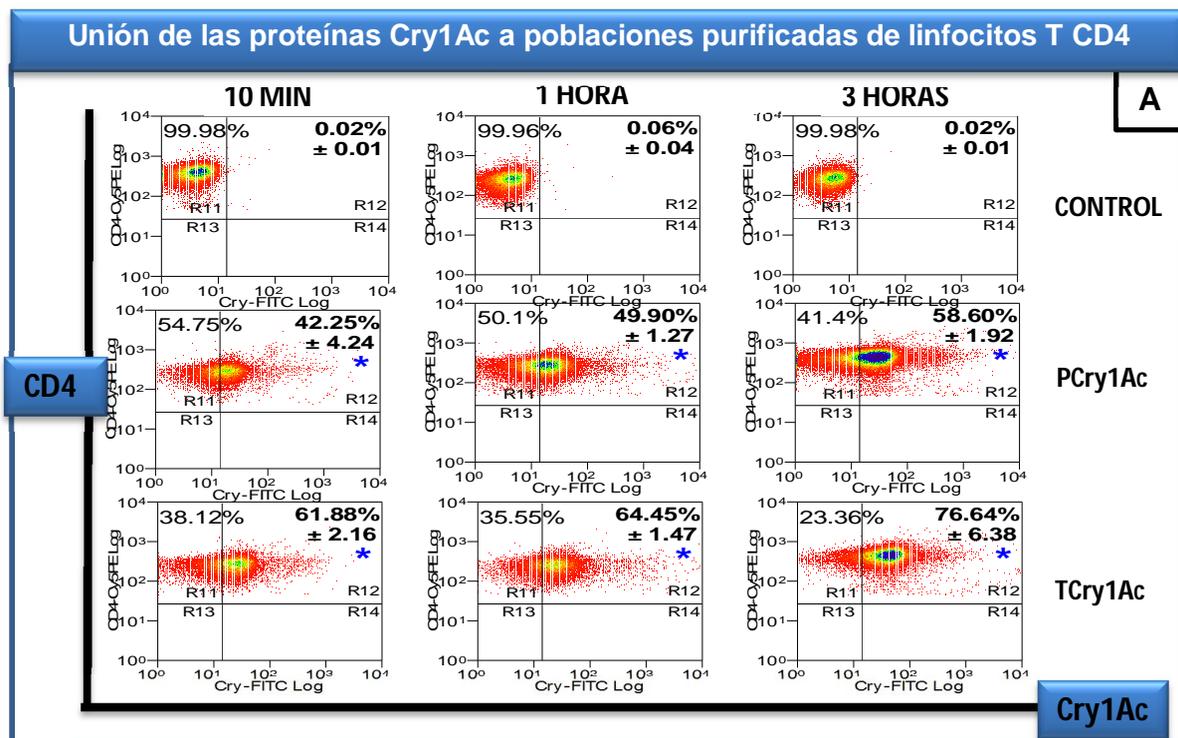
Figura 10. Unión de las proteínas Cry1Ac a linfocitos T CD8 de poblaciones totales. A) Cinética de unión de las proteínas Cry1Ac a linfocitos CD8 * Diferencia estadísticamente significativa respecto al control. B) Histogramas representativos de la unión de linfocitos T CD8, la unión de TCry1Ac se une en mayor porcentaje comparada con PCry1Ac. C) Gráfica que muestra los porcentajes de unión de células CD8, negro = control, azul = PCry1Ac, rojo = TCry1Ac. D) Gráfica que indica el índice medio de fluorescencia en la unión CD8.

En poblaciones totales de linfocitos, las proteínas Cry1Ac tanto la protoxina como la toxina, se unieron de manera gradual respecto al tiempo a poblaciones de linfocitos T CD4 como CD8, siendo la toxina Cry1Ac la que presenta mayores porcentajes de unión en las 2 poblaciones celulares (T CD4 y CD8), en comparación con la PCry1Ac (figura 10-C). Cabe mencionar que, la TCry1Ac se unió preferentemente a los linfocitos CD8 que a los CD4 (figura 9-C y 10-C); ya que los primeros presentan mayores porcentajes de unión con la TCry1Ac.

Unión de las proteínas Cry1Ac a poblaciones purificadas de linfocitos

Linfocitos T CD4

Las proteínas Cry1Ac se unieron a poblaciones purificadas de linfocitos T CD4, la unión ocurre de manera gradual tanto con la PCry1Ac como con la TCry1Ac respecto al tiempo, siendo esta última la que presentó mayores porcentajes de unión en comparación con la PCry1Ac, estos resultados se muestran en la figura 11. El desplazamiento hacia la derecha en los histogramas de la figura 11-B indica la unión de las proteínas Cry1Ac a linfocitos T, de esta forma podemos corroborar los resultados de unión, donde se muestra que la unión de la toxina es mayor respecto a la protoxina en 10 min, 1 h y 3 h.



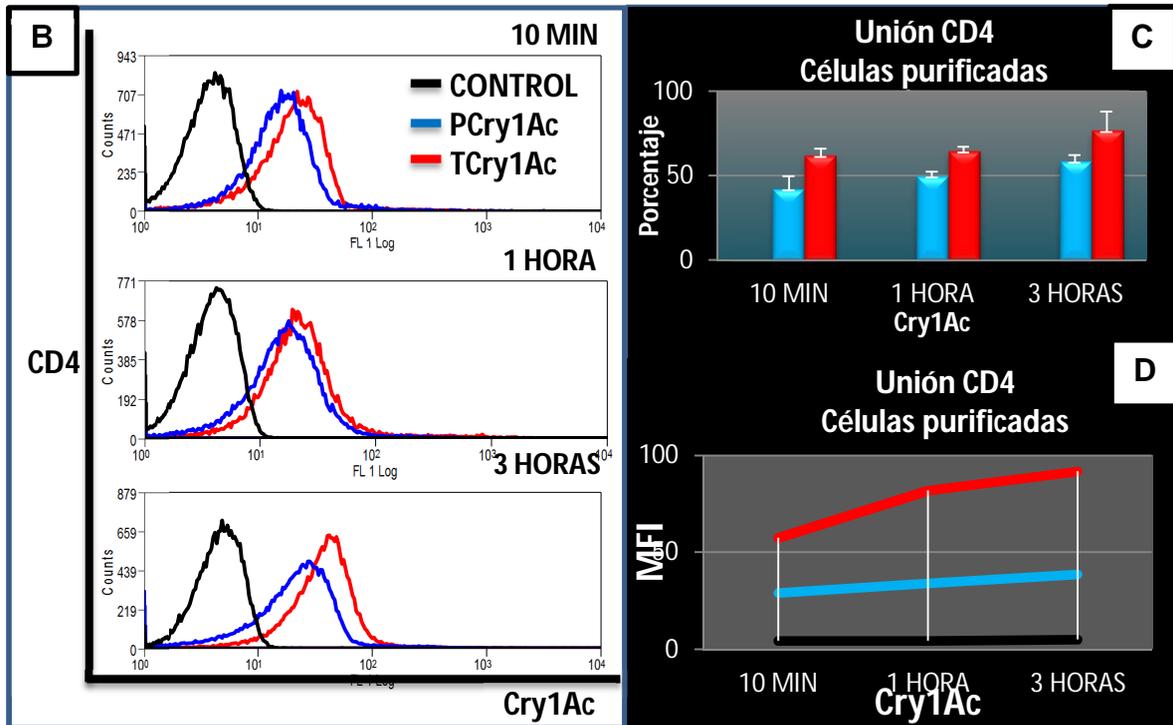


Figura 11. Unión de las proteínas Cry1Ac a linfocitos T CD4 purificados. A) Cinética de unión de las proteínas Cry1Ac a linfocitos CD4 aislados * Diferencia estadísticamente significativa respecto al control. B) Histogramas representativos de la unión de linfocitos T CD4, la unión de TCry1Ac se une en mayor porcentaje comparada con PCry1Ac. C) Gráfica que muestra los porcentajes de unión de células CD8, negro = control, azul = PCry1Ac, rojo = TCry1Ac. D) Gráfica que indica el índice medio de fluorescencia en la unión CD4.

Linfocitos T CD8

En poblaciones purificadas de linfocitos, las proteínas Cry1Ac tuvieron la capacidad de unirse a linfocitos T CD8, la cinética de unión nos mostró que esta última ocurre de manera gradual respecto al tiempo tanto con la protoxina (porcentajes de unión. 10 min: 36.81%, 1 hora: 44.11%, 3 horas: 63.24%) como con la toxina Cry1Ac (porcentajes de unión. 10 min: 39.81%, 1 hora: 59.66%, 3 horas: 80.8%) estos resultados se muestran en la figura 12-A. La TCry1Ac presentó mayores porcentajes de unión comparados con los obtenidos con la PCry1Ac (Figura 12-C). En la figura 12-B se muestra claramente el desplazamiento de la toxina y protoxina a la derecha en los histogramas, lo que indica que existe una clara unión de las proteínas Cry1Ac a células T respecto al control.

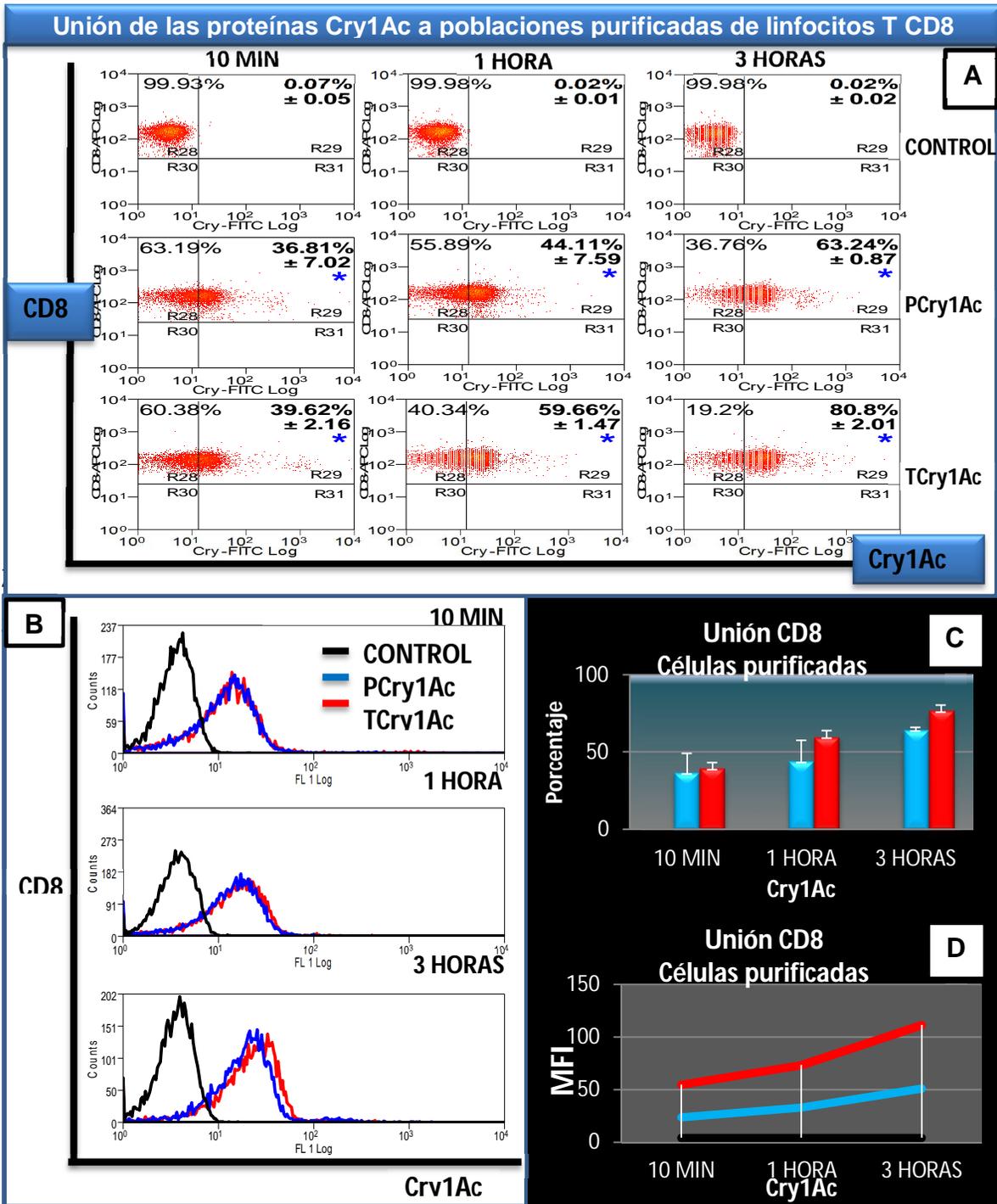


Figura 12. Unión de las proteínas Cry1Ac a linfocitos T CD8 de poblaciones purificadas. A) Cinética de unión de las proteínas Cry1Ac a linfocitos CD8 * Diferencia estadísticamente significativa respecto al control. **B)** Histogramas representativos de la unión de linfocitos T CD8, la unión de TCry1Ac se une en mayor porcentaje comparada con PCry1Ac. **C)** Gráfica que muestra los porcentajes de unión de células CD8, negro = control, azul = PCry1Ac, rojo = TCry1Ac. **D)** Gráfica que indica el índice medio de fluorescencia en la unión CD8.

En poblaciones purificadas de linfocitos T, las proteínas Cry1Ac se unieron a poblaciones de linfocitos T CD4 como CD8, siendo la toxina Cry1Ac la que presentó mayores porcentajes de unión en células T CD4 y CD8, en comparación con la PCry1Ac. Cabe mencionar que, la TCry1Ac fue más afín a los linfocitos CD8 que a los CD4, ya que los primeros presentaron mayores porcentajes de unión con la TCry1Ac.

Resumiendo los resultados obtenidos en la unión de las proteínas Cry1Ac a linfocitos T, tenemos que:

- Las proteínas Cry1Ac, tanto la protoxina como la toxina se unieron a poblaciones de linfocitos T CD4 y CD8.
- La TCry1Ac muestra porcentajes mayores de unión comparados con los obtenidos con la PCry1Ac en las 2 poblaciones de linfocitos y que, la unión de la TCry1Ac a linfocitos CD8 comparada con la unión a los CD4.
- El efecto en la unión son similares, tanto en poblaciones de linfocitos totales, como en población de linfocitos T aislados. Sin embargo, en poblaciones de linfocitos T aislados, la unión fue mayor comparada con la que se obtuvo en poblaciones de linfocitos totales.

Cinética de unión mediante microscopia de fluorescencia y confocal

Los resultados de citometría nos indicaron que las proteínas Cry1Ac fueron capaces de unirse a poblaciones de linfocitos T aislados y totales; para localizar y corroborar la unión de la toxina y la protoxina Cry1Ac a linfocitos T, realizamos el análisis por microscopía confocal y microscopia de fluorescencia, en donde se utilizó a las proteínas Cry1Ac (protoxina y toxina) marcada con FITC y marcadores de superficie de linfocitos T anti-CD4 y anti-CD8, para marcar a poblaciones de linfocitos CD4 y CD8, respectivamente durante distintos tiempos (10 min, 1 hora y 3 horas).

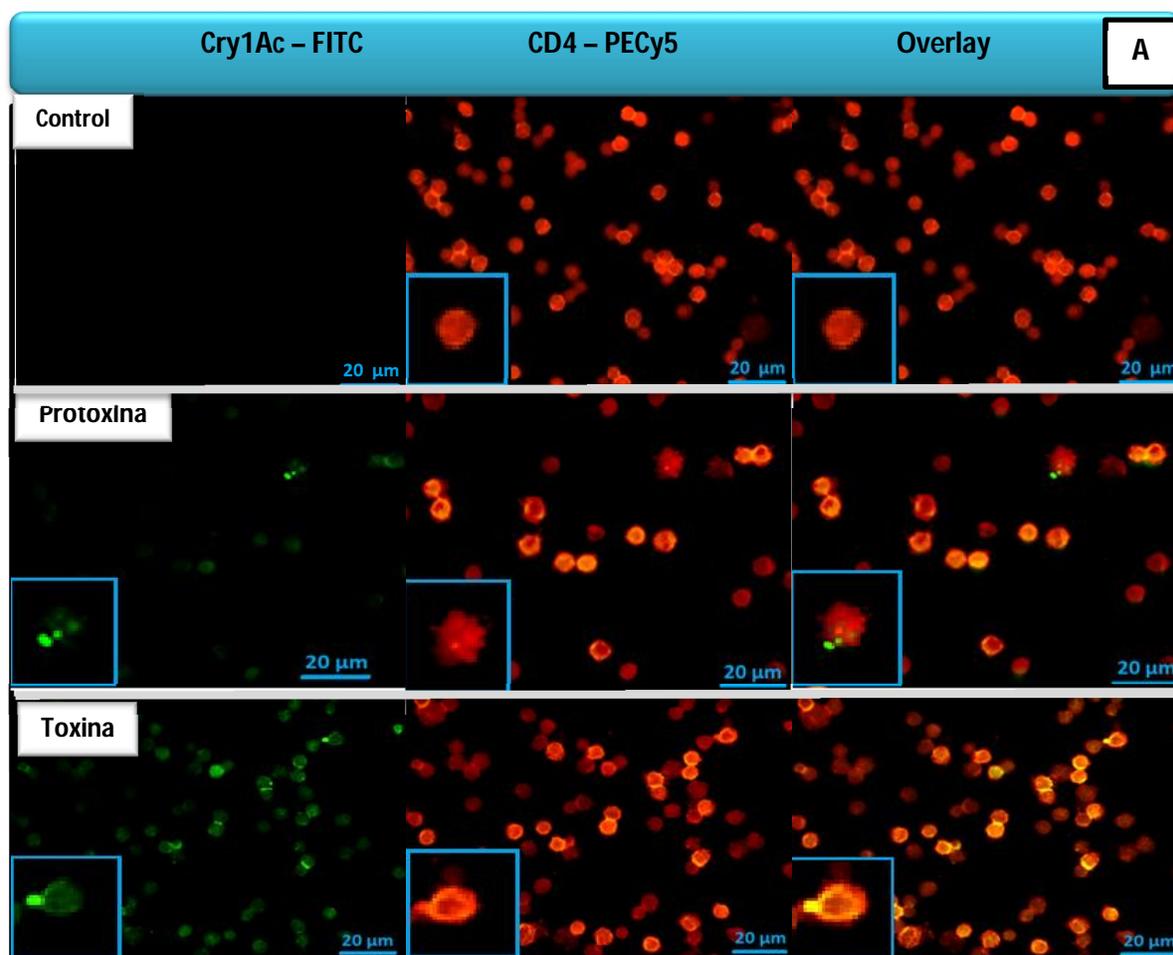
Microscopia de Fluorescencia

Las células T purificadas fueron marcadas con anti CD4-PECy5 (naranja) y las proteínas Cry1Ac con FITC (verde), durante distintos tiempos: 10 minutos, 1 hora y 3

horas; con el fin de corroborar la unión de estas proteínas a linfocitos T. En la imagen 13 podemos corroborar los resultados que obtuvimos en citometría, donde vemos que las proteínas Cry1Ac (protoxina y toxina) se unieron posiblemente a la superficie de linfocitos T; estos marcadores son marcadores de superficie, la sobreposición de fluorocromos es visible en la superficie de las células T y esta la interacción de linfocitos T con las proteínas T, aumentó gradualmente conforme el tiempo (figura 13-A, B y C).

A los 10 minutos se puede observar en la figura 13-A que la unión fue poca comparada con la que se muestra en la figura 13-C que es el tiempo de 3 horas, con este estudio pudimos corroborar la interacción de las proteínas Cry1Ac con los linfocitos T.

NOTA: Por microscopia de fluorescencia no fue posible observar la unión de las proteínas Cry1Ac a linfocitos T CD8-APC, por limitaciones técnicas del microscopio.



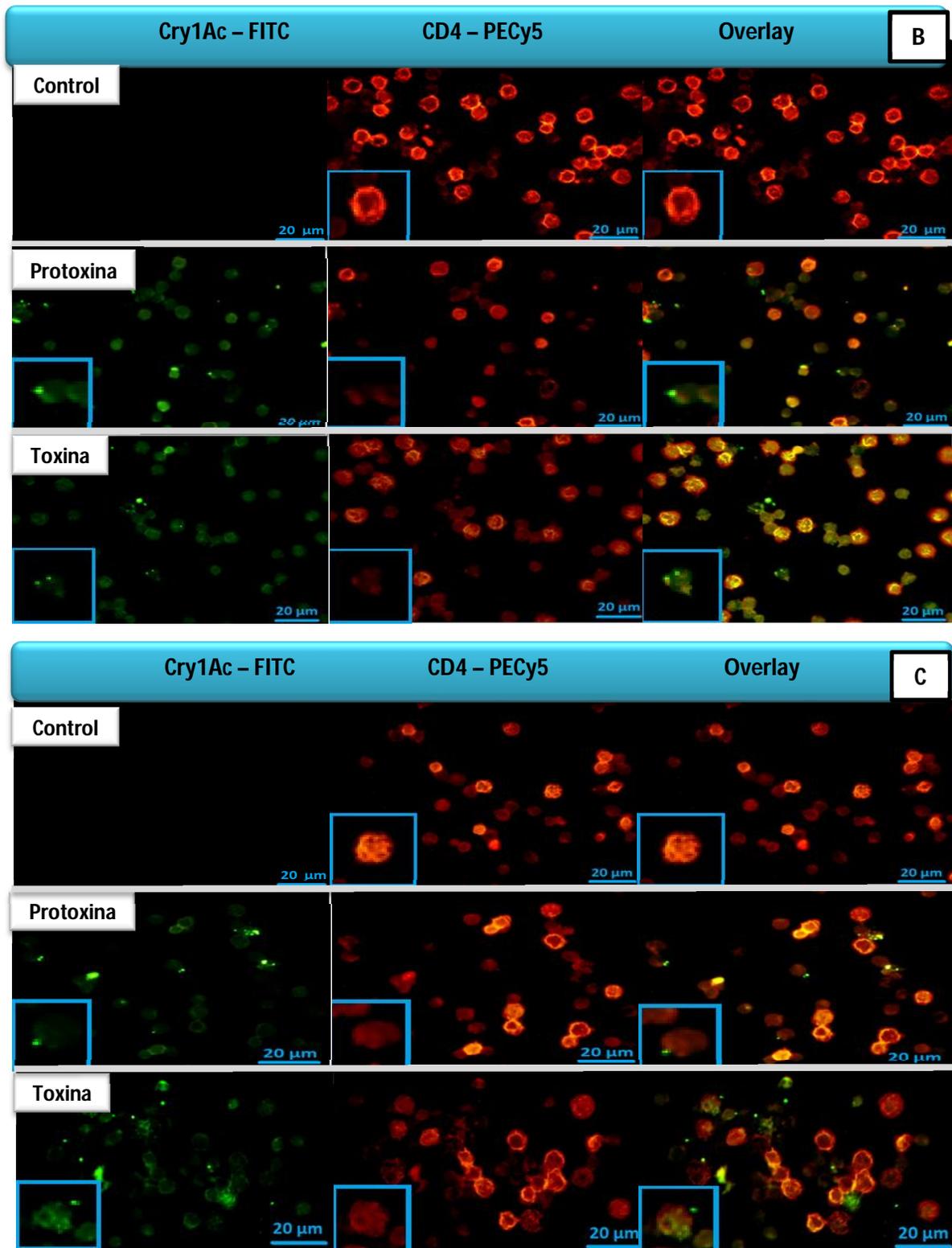


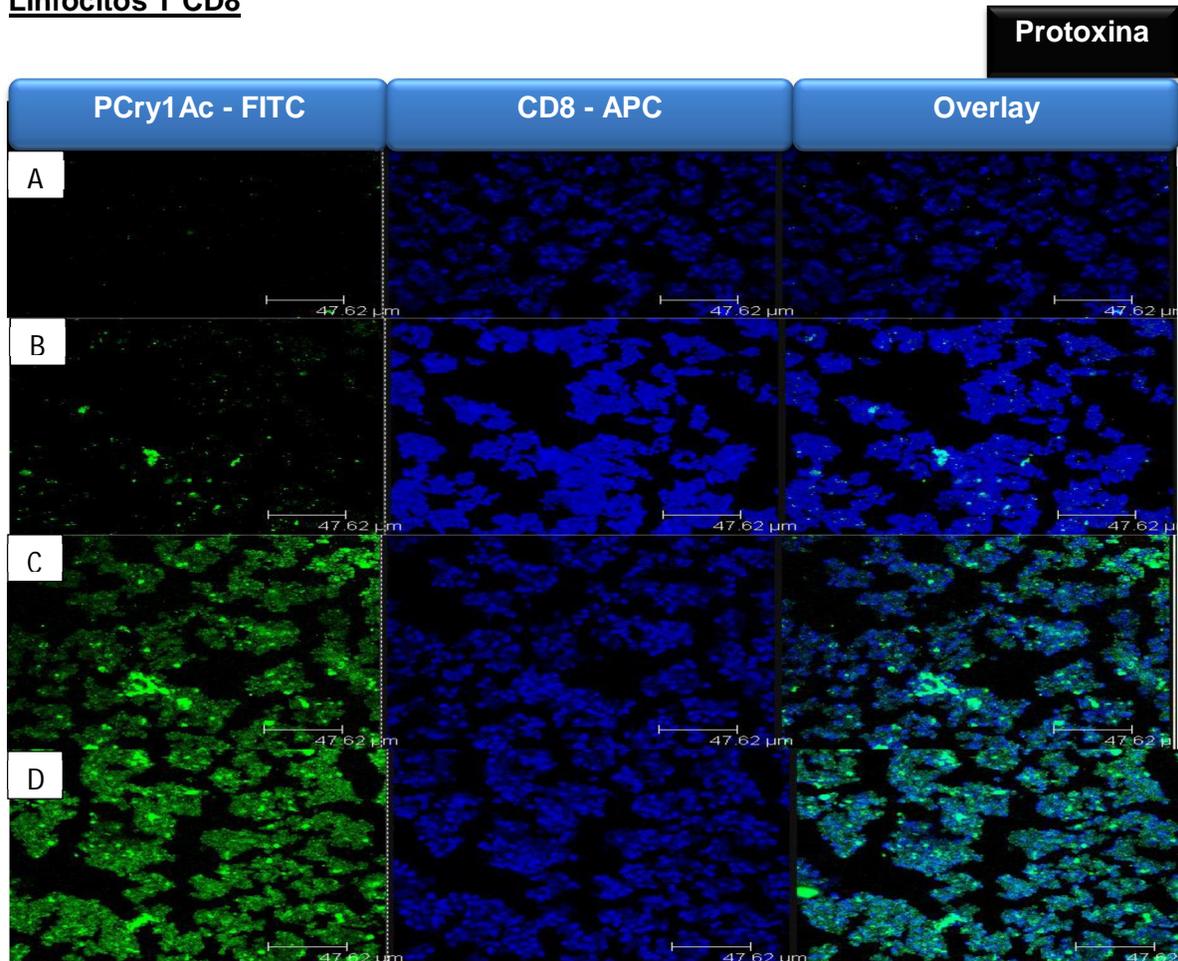
Figura 13. Interacción de las proteínas Cry1Ac con linfocitos T, microscopía confocal. A) 10 minutos. B) 1 hora. C) 3 horas. La interacción de las proteínas Cry1Ac con los linfocitos T aumentó respecto al tiempo, la TCry1Ac se unió más en comparación con la PCry1Ac. De izquierda a derecha: control y proteínas Cry1Ac marcadas con FITC en color verde, linfocitos T CD4- PECy5 en color rojo y la sobreposición (overlay) de los 2 anteriores.

Microscopia Confocal

Las proteínas Cry1Ac fueron marcadas con FITC en verde, los linfocitos T CD4 con anti CD4-PECy5 en rosa, mientras que los linfocitos CD8 con anti CD8-APC en azul. La unión ocurrió de manera gradual respecto al tiempo, tanto con la toxina como con la protoxina; en la sobreposición (overlay) estos resultados corroboran el mismo efecto que se mostró en la citometría de flujo, se muestran los dobles positivos para las 2 tinciones, donde se vió claramente la unión de las proteínas a linfocitos T, suponemos que ésta unión se dió en la superficie de linfocitos T (figura 14).

NOTA: las imágenes en el microscopio confocal muestra varios planos o cortes de la imagen (células), que nos da una imagen en 3D de las células, haciendo visible el marcador toxina Cry1Ac-FITC y protoxina Cry1Ac-FITC, adherido a su posible receptor en la superficie, no hay indicios de internalización de las proteínas Cry1Ac en las células T.

Linfocitos T CD8



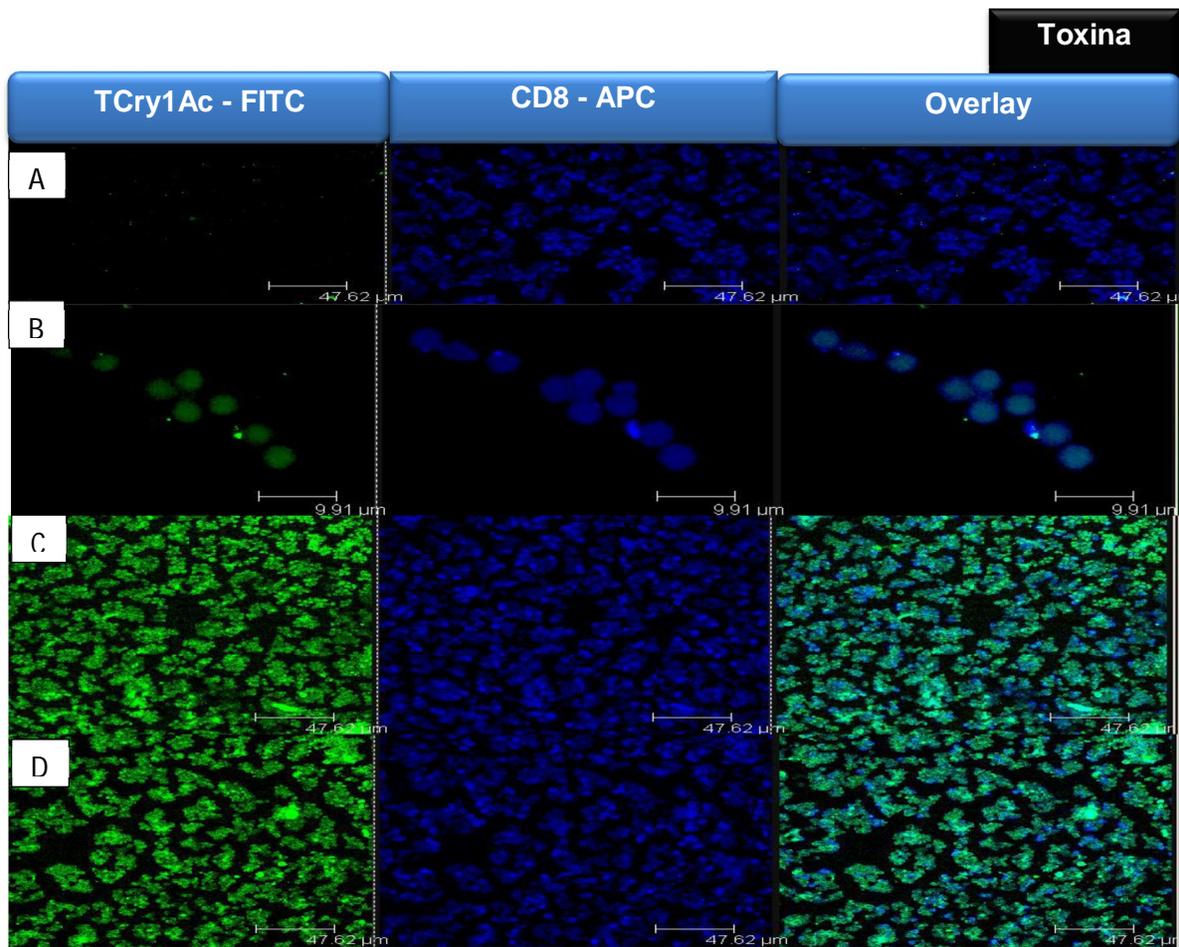


Figura 14. Imágenes de microscopía de fluorescencia en donde vemos la interacción de las proteínas Cry1Ac con linfocitos T. Las proteínas Cry1Ac interactuaron con linfocitos T CD8. A) Control B) 10 min C) 1 hora y D) 3 horas. Posiblemente esta unión se de en la superficie, corroboramos que la unión ocurrió de forma gradual respecto al tiempo y que la TCry1Ac se unió en mayor proporción a linfocitos T CD8.

Linfocitos CD4

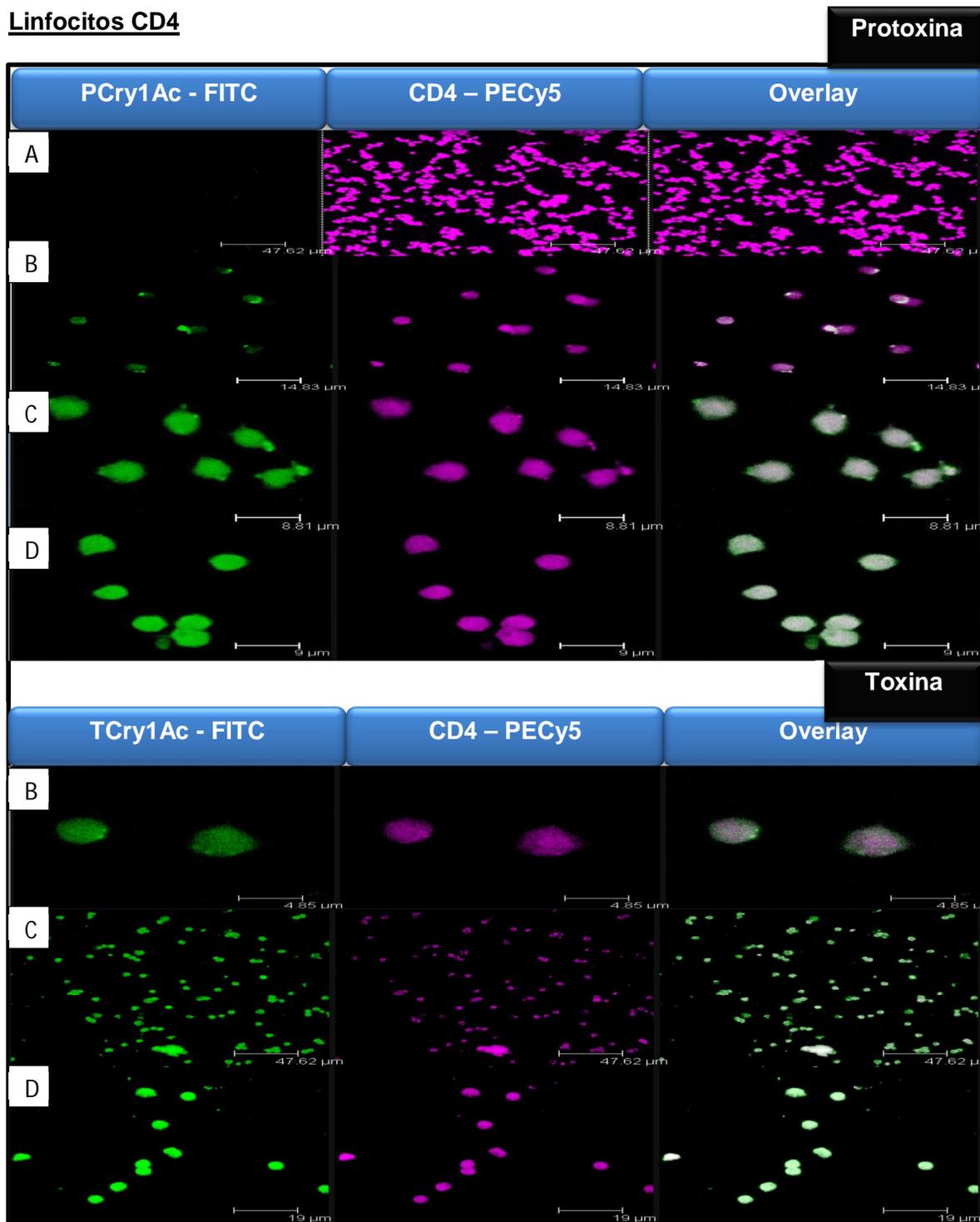


Figura 15. Imágenes de microscopía de fluorescencia en donde vemos la interacción de las proteínas Cry1Ac con linfocitos T. Las proteínas Cry1Ac interactuaron con linfocitos T CD4. A) Control B) 10 min C) 1 hora y D) 3 horas. En las imágenes de microscopía confocal pudimos corroborar que las proteínas interactúan con linfocitos T CD4 de manera gradual y la TCry1Ac se unió en mayor proporción a linfocitos T CD4.

Relación entre el estado de activación de linfocitos T con la unión de las proteínas Cry1Ac

Los resultados obtenidos hasta el momento nos indicaron que, las proteínas Cry1Ac (protoxina y toxina) fueron capaces de aumentar la expresión CD69 en células T, en general, fueron capaces de activar y de unirse a poblaciones de linfocitos T CD4 y CD8; sin embargo, no sabíamos si el estado de activación de las células tenía algún tipo de relación con la unión de las proteínas Cry1Ac. Por lo que se decidió investigar, si la activación artificial de los linfocitos T, favorecía o no, la unión de las proteínas Cry1Ac a este tipo celular.

Población de linfocitos totales

Poblaciones de linfocitos T CD4 y CD8, se activaron de forma artificial con Ionomicina y acetato y miristato de forbol (PMA) y se pusieron a incubar con las proteína Cry1Ac para poder estudiar, si la activación tiene relación con la unión de estas proteínas, tanto en poblaciones de linfocitos totales como en linfocitos T purificados, estos resultados se compararon con grupos a los que, no se les indujo activación.

En poblaciones de linfocitos totales, se vió claramente que existe una relación entre la activación de los linfocitos con la unión de las proteínas Cry1Ac, tanto en linfocitos T CD4 como CD8. Los resultados de linfocitos CD4 muestran que la Pcry1Ac se unió un 3.25% al control, mientras que al que se le indujo activación se unió en un 41.89%; la Tcry1Ac se unió un 6.24% al control, y cuando fue activado la unión aumenta a un 80.88%. Para linfocitos CD8 un proceso similar ocurrió, la PCry1Ac se unió un 4.87% al control y un 64.78% al que estaba activado; mientras que la Tcry1Ac se unió un 6.82% al control y un 87.88% al que se le activó artificialmente (figura 16).

Estos resultados indican que la activación de poblaciones de linfocitos T CD4 y CD8 favoreció la unión de las proteínas Cry1Ac (protoxina y toxina) a estos tipos celulares. Aunque cabe resaltar que, para la toxina ésta unión fue claramente más favorecida en comparación con la protoxina Cry1Ac.

La activación artificial favoreció la unión de las proteínas Cry1Ac en poblaciones totales de linfocitos

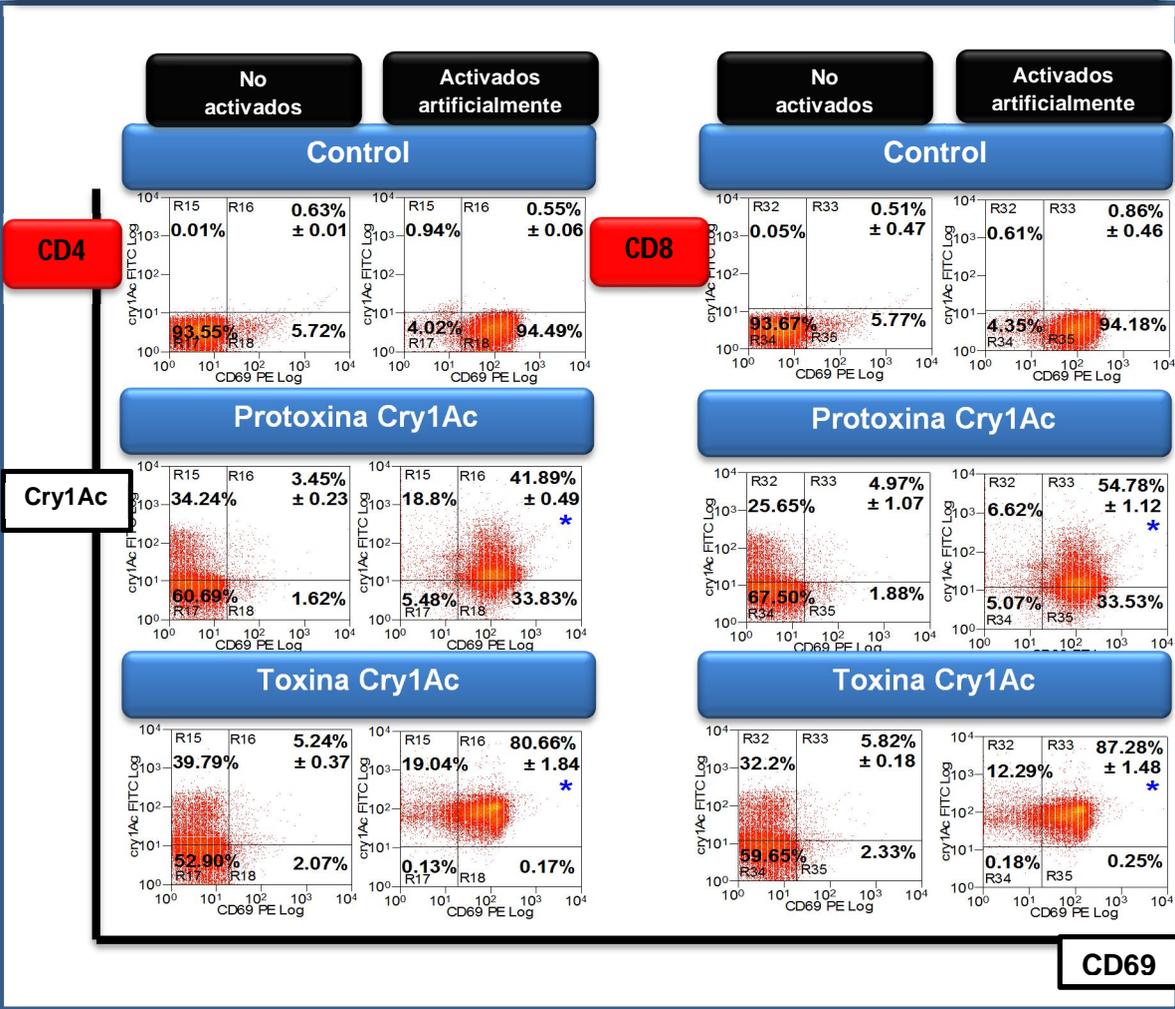


Figura 16. La unión de las proteínas Cry1Ac, se favorece con la activación artificial de linfocitos T de poblaciones totales. Linfocitos CD4 y CD8 mostraron un claro incremento en la unión de las proteínas Cry1Ac, cuando estas células fueron activadas, comparadas con la unión que se obtuvo de los grupos controles donde la activación era basal.

En poblaciones de linfocitos purificados T CD4 y CD8, se vio una clara relación entre la activación de los linfocitos con la unión de las proteínas Cry1Ac, tanto en linfocitos T CD4 como CD8. Los resultados de linfocitos CD4 muestran que la Pcry1Ac se unió un 8.30% al control, mientras que al que se le indujo activación se unió en un 49.64%; la Tcry1Ac se unió un 12.92% al control, y cuando fue activado la unión aumentó a 79.34%. mientras que para los linfocitos CD8 un proceso similar ocurrió, la PCry1Ac se unió un 13.15% al control y un 64.25% al que estaba activado; mientras que la Tcry1Ac se unió

21.71% al control y 82.44% al que se le activó artificialmente (figura 17). Estos resultados indican que la activación de poblaciones de linfocitos purificados CD4 y CD8 favoreció la unión de las proteínas Cry1Ac (protoxina y toxina) a estas poblaciones. Aunque cabe resaltar que, para la toxina esta unión fue claramente más favorecida en comparación con la protoxina Cry1Ac.

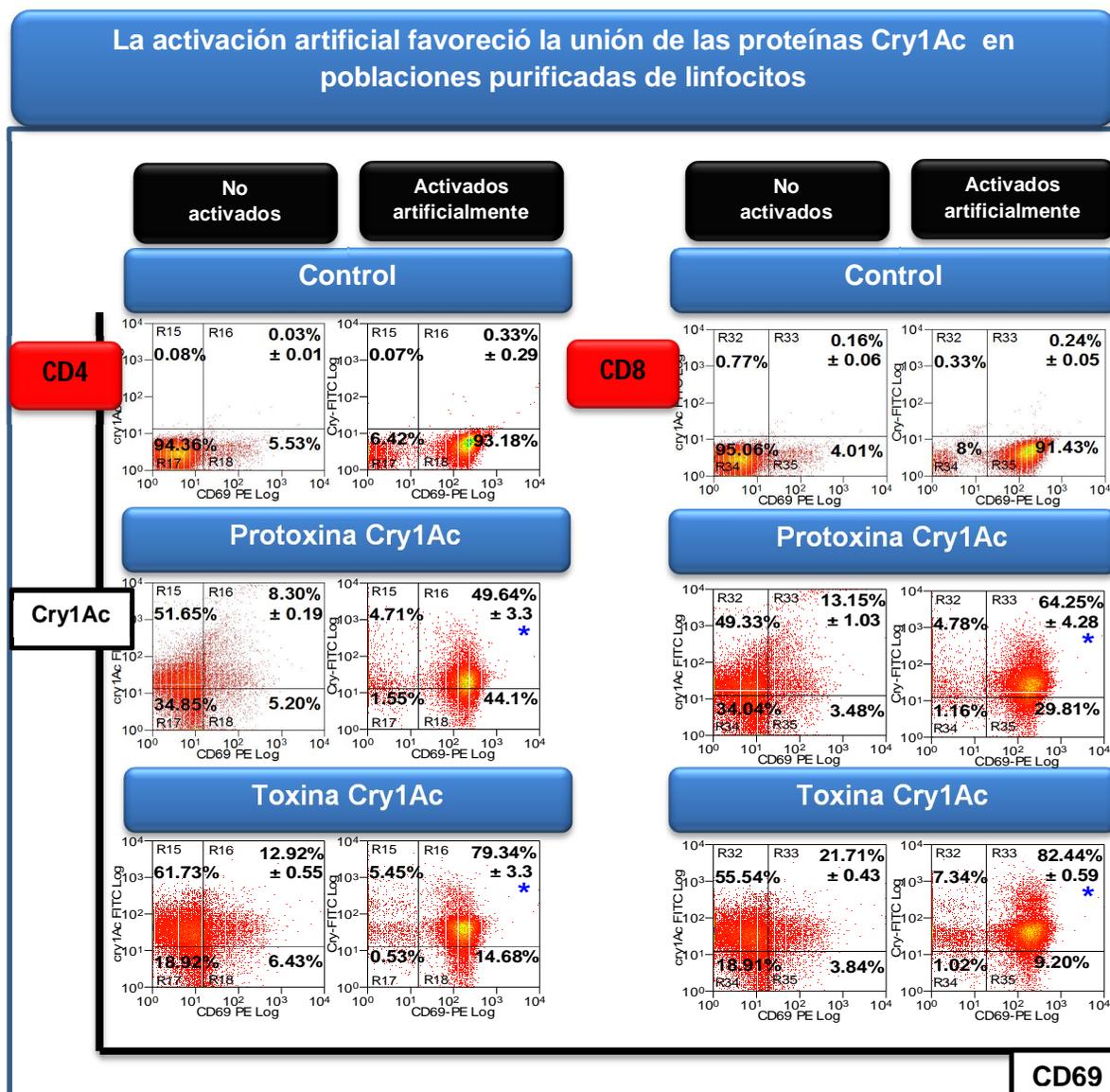


Figura 17. La unión de las proteínas Cry1Ac, se favorece con la activación de linfocitos T purificados. En el lado izquierdo se encuentran linfocitos T CD4 y en el derecho linfocitos CD8, en ambos casos, hay un grupo control que no se activó previamente (activación basal) y los grupos activados artificialmente. En la región doble positiva se muestra el porcentaje de células que están activadas y que se les unió Cry1Ac, en la comparación de cada grupo podemos ver que en los grupos no activados la unión es relativamente baja, comparada con los grupos que están activados, a los que se les unió considerablemente Cry1Ac.

Para corroborar los resultados obtenidos en los ensayos de citometría, sobre si el estado de activación en las células tiene relación con la unión de las proteínas Cry1Ac, se realizaron ensayos de microscopía de fluorescencia, en donde se confirmó, que en linfocitos T CD4 y CD8 la activación artificial de linfocitos T, favorece la unión de las proteínas Cry1Ac. En la figura 18 se muestran los resultados obtenidos para la protoxina Cry1Ac a 3 h.

La protoxina Cry1Ac se une a linfocitos T activados

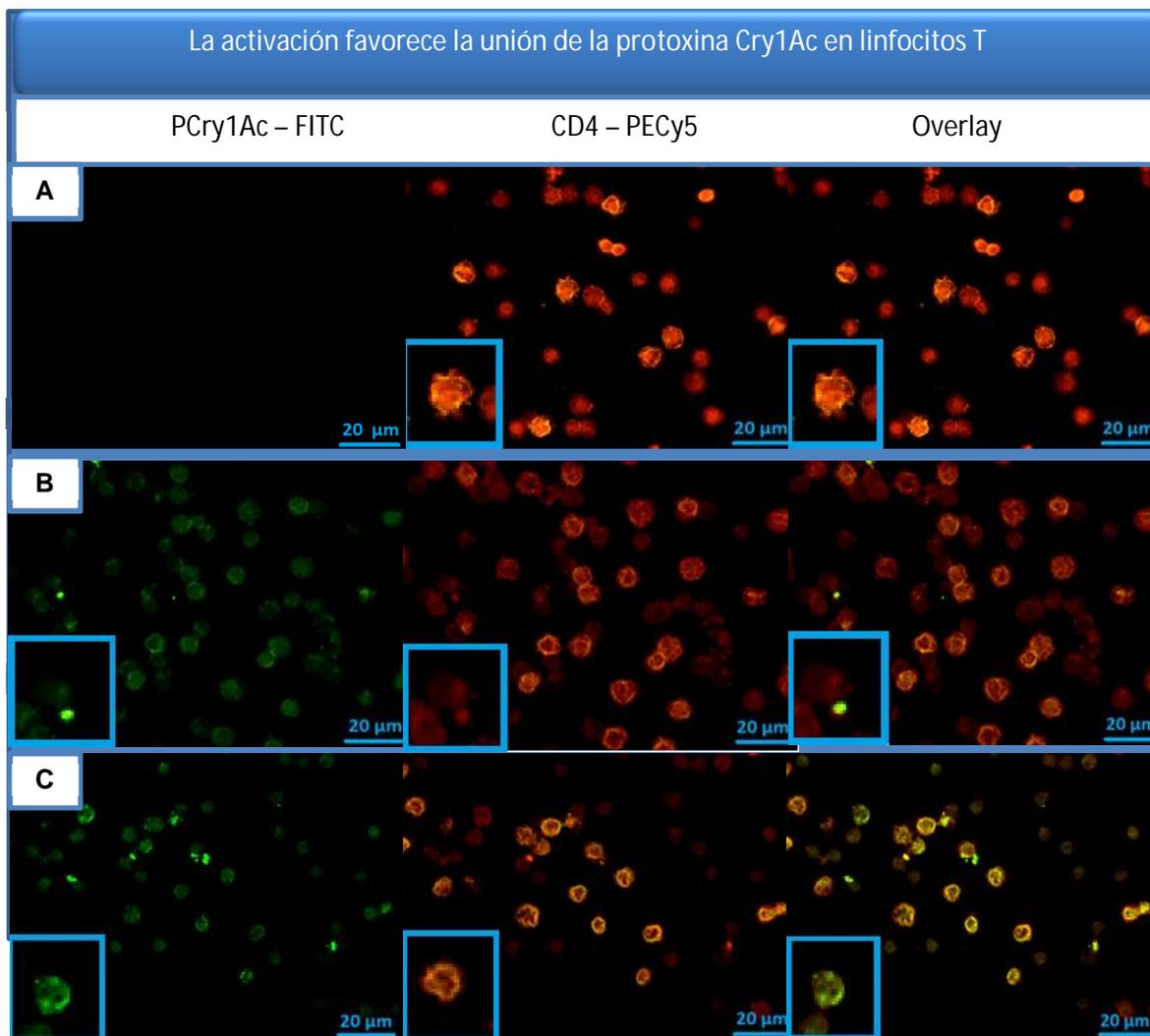


Figura 18. La activación artificial favorece la unión de la protoxina Cry1Ac a linfocitos T. de izquierda a derecha: protoxina Cry1Ac marcada con FITC en color verde, linfocitos T CD4 marcados con PEcy5 en color rojo y la sobreposición de las 2 tinciones anteriores. A) Control, células sin activar. B) Células sin activar incubadas 10 minutos con protoxina Cry1Ac, con una discreta unión. C) Células T activadas artificialmente, incubadas 10 minutos con PCry1Ac, se muestra claramente que la unión aumenta considerablemente en comparación con la unión del grupo que no fue activado.

La toxina Cry1Ac se une a linfocitos T activados

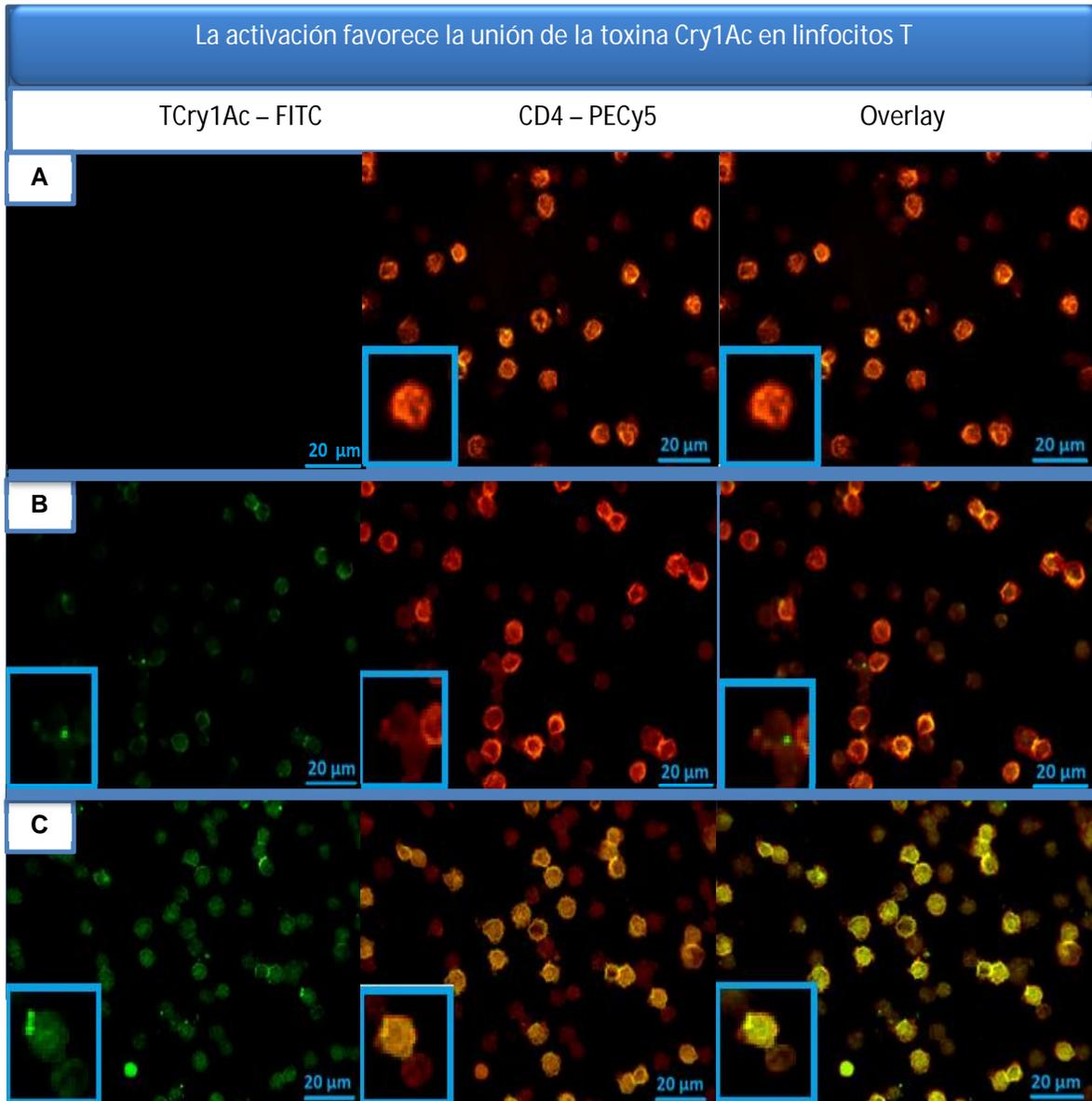


Figura 19. La activación artificial favorece la unión de la toxina Cry1Ac a linfocitos T. La toxina Cry1Ac marcada con FITC en color verde (izquierda), linfocitos T CD4 y CD8 marcados con PECy5 en color rojo (centro) y a la derecha tenemos la sobreposición de las 2 tinciones anteriores. A) Control, solo células sin activar. B) Células sin activar incubadas 10 minutos con toxina Cry1Ac, se muestra que la unión es poca cuando no están activadas. C) Células T activadas artificialmente, incubadas 10 minutos con TCry1Ac, se muestra claramente que la unión aumenta considerablemente en comparación con la unión del grupo que no fue activado (B).

Identificación del posible receptor de las proteínas Cry1Ac

Anteriormente se han descrito receptores específicos para las proteínas Cry1Ac en insectos, se sabe que estas proteínas se unen a aminopeptidasas y e-cadherinas del intestino medio de larvas de insectos Cry (Knight *et al.*, 1994), sin embargo, no se han descrito receptores de estas proteínas en mamíferos. Hasta el momento, con base a los resultados previos, hemos visto que las proteínas Cry1Ac (protoxina y toxina) ejercen efectos inmunomoduladores en linfocitos T y tienen la capacidad de unirse a este tipo celular, por lo que se sugiere que pudiera existir un receptor para las proteínas Cry1Ac en linfocitos T, y por lo cual, las proteínas pueden ejercer tales efectos.

Se obtuvieron anticuerpos específicos para las proteínas Cry1Ac, anti-toxina y anti-protoxina, los anticuerpos contenidos en el suero reconocen casi en su totalidad a sus proteínas correspondientes, dicha evaluación se puede verificar en la figura 20, donde se muestra que el anticuerpo es efectivo en el reconocimiento de las proteínas Cry1Ac, ya que se identificaron 2 bandas en el peso molecular que corresponde a la toxina de 65 kDa y protoxina de 130 kDa (figura 20).

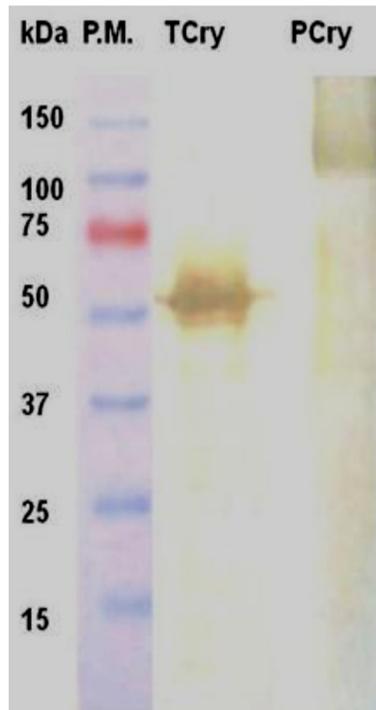


Figura 20. Immunoblot que muestra la especificidad de los anticuerpos generados hacia las proteínas Cry1Ac. De izquierda a derecha: PM = peso molecular, toxina Cry1Ac con una banda de 65 kDa, y la protoxina Cry1Ac con una banda de 130 kDa.

Blot ligando de la protoxina Cry1Ac

El lisado de linfocitos nos muestra bandas de proteínas intracelulares y extracelulares, en las que se encuentra la banda de proteína de nuestro o nuestros posibles receptores, las bandas precipitadas de los lisados de linfocitos T para la protoxina Cry1Ac se muestran en la figura 21-A; se precipitaron 2 bandas de proteínas a las que se le unió la protoxina con peso molecular de 72 y 58 kDa que se muestra en la figura 21- B.

En los ensayos de Blot ligando, se transfirió a un papel PVDF (que está cargado positivamente) el SDS-PAGE de la inmunoprecipitación, el papel con las proteínas transferidas se bloqueó con leche para evitar uniones inespecíficas, se incubó durante 2 horas con la protoxina Cry1Ac, se reveló agregando un anticuerpo anti protoxina Cry1Ac y después se le adicionó proteína A (se une a la región Fc de anticuerpos) peroxidada, la reacción colorimétrica se obtuvo al agregar el sustrato 4 cloronaftol y agua peroxidada.

En los resultados del “Blot” ligando de la protoxina Cry1Ac no se reveló ninguna banda de proteína que podría ser el receptor, estos resultados no indican la inexistencia del mismo, ya que como se mostró anteriormente en la figura 21 B se inmunoprecipitaron proteínas del posible receptor para la protoxina Cry1Ac. Debido a esto, se decidió revelar con anticuerpo anti toxina Cry1Ac, en esta ocasión, se obtuvieron bandas del posible receptor para la protoxina Cry1Ac que se muestran en la figura 21 C, donde se revelaron 4 bandas de proteína con pesos moleculares de 150, 68, 63 y 45 kDa.

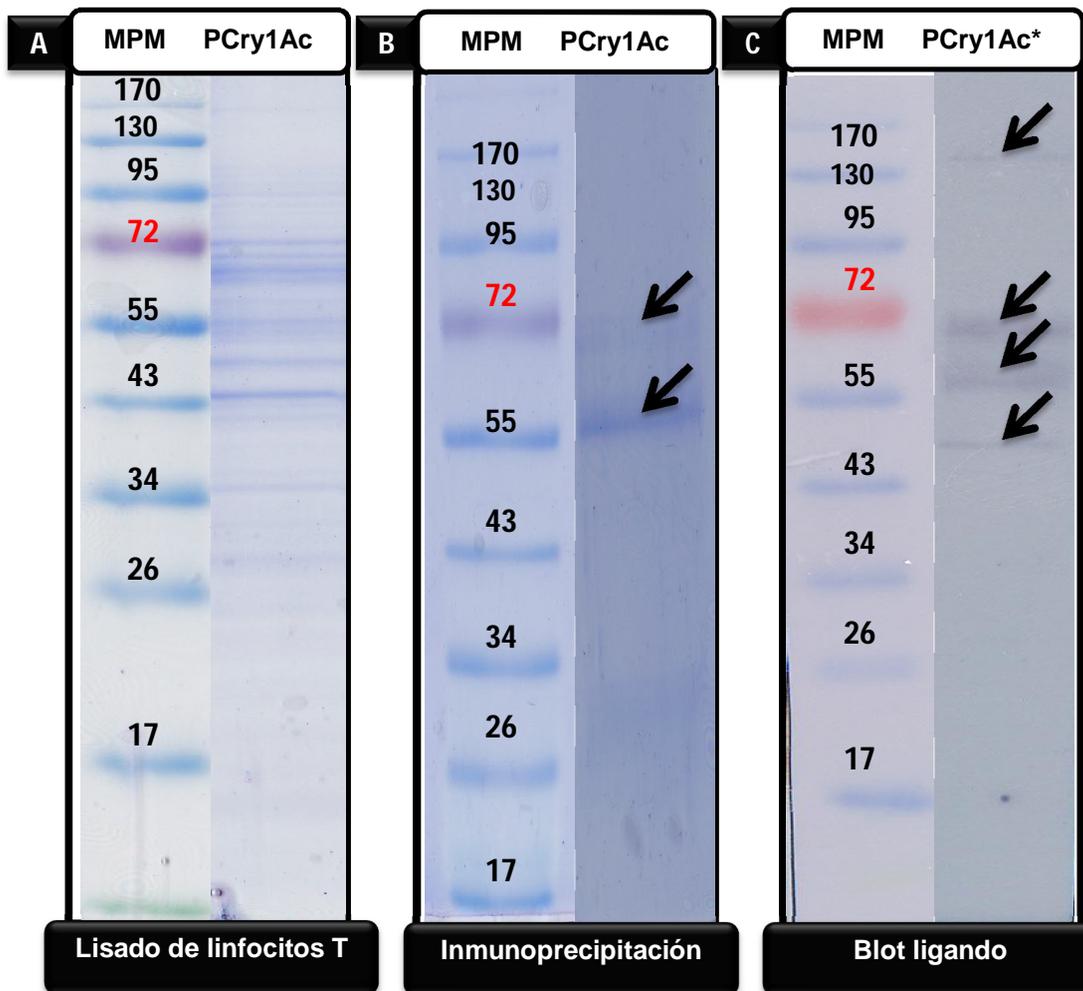


Figura 21. Identificación de posibles receptores para la Protoxina Cry1Ac. A) Lisado de linfocitos T. B) Inmunoprecipitación donde se revelaron 2 bandas con peso molecular de 72 y 58 kDa. C) Blot ligando * revelado con TCry1Ac, donde se revelaron 4 bandas de 150, 68, 63 y 45 kDa.

Blot ligando de la toxina Cry1Ac

En la figura 22-A muestra el lisado de linfocitos T, donde se observan proteínas extracelulares. En la inmunoprecipitación de linfocitos T tanto CD4 como CD8, se precipitaron 2 bandas de proteínas a las que se le unió la toxina con peso molecular de 72 y 58 kDa que se muestran en la figura 22-B.

En los ensayos de Blot ligando para la TCry1Ac se revelaron 3 bandas de proteína de los posibles receptores para la toxina Cry1Ac que se muestran en la imagen 22 C, con pesos moleculares de 68, 62 y 45 kDa

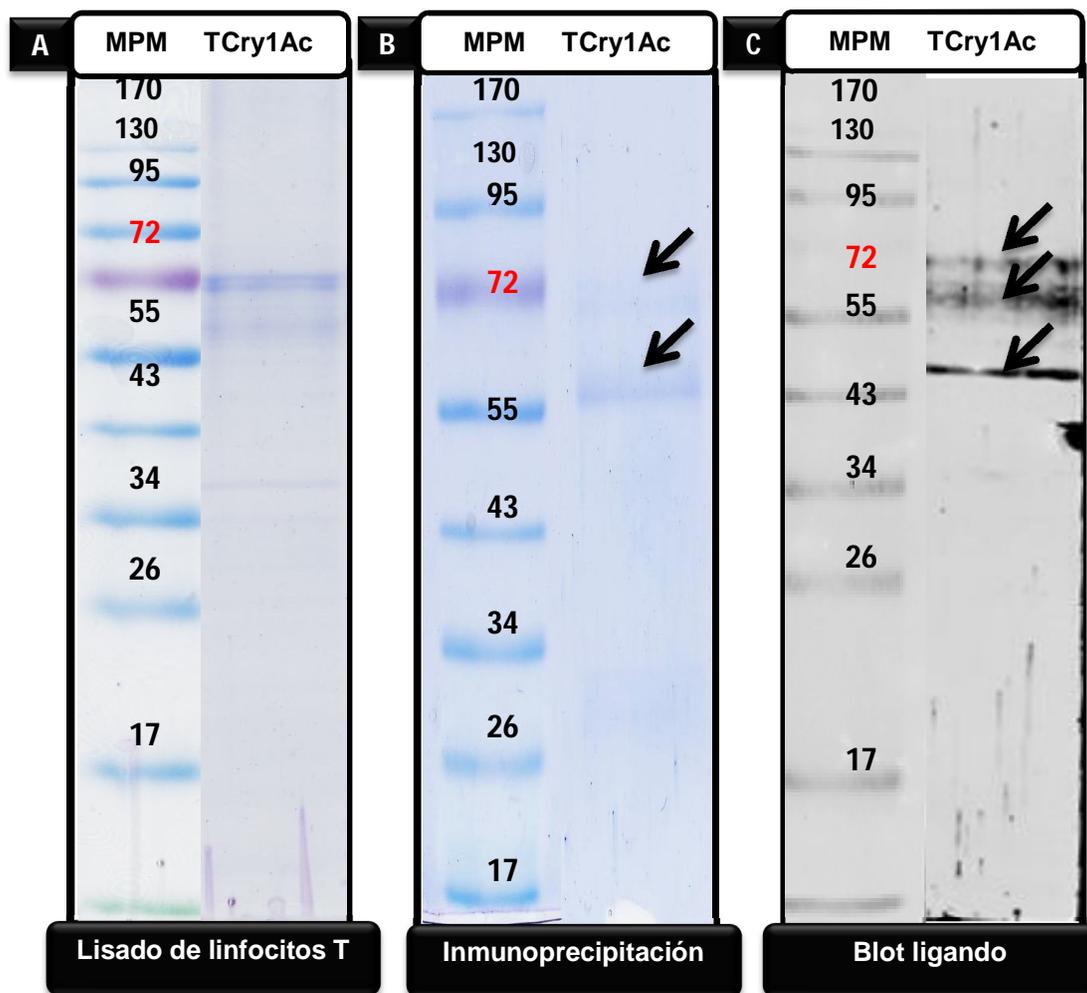


Figura 22. Identificación de posibles receptores para la Toxina Cry1Ac. A) Lisado de linfocitos T. B) Inmunoprecipitación donde se revelaron 2 bandas con peso molecular de 72 y 58 kDa. C) Blot ligando donde se revelaron 3 bandas con pesos moleculares de 68, 62 y 45 kDa.

DISCUSIÓN

En diversos estudios se ha demostrado, que la protoxina Cry1Ac es un potente adyuvante mucosal y sistémico (Vázquez-Padrón *et al* 1999 y Moreno-Fierros *et al* 2003), sin embargo, se desconocen las bases celulares e inmunomoduladoras de dichos efectos, por lo que nuestro estudio aporta una parte para dilucidar y entender mejor el mecanismo por el cual las proteínas Cry1Ac ejercen efectos inmunogénicos y adyuvantes.

En los resultados obtenidos referentes a la activación de linfocitos T por efecto de las proteínas Cry1Ac, encontramos que, tanto la toxina como la protoxina, son capaces de inducir expresión CD69 en linfocitos T CD4 y CD8 en poblaciones totales como en poblaciones purificadas. La molécula CD69 es una lectina tipo C involucrada en la proliferación de linfocitos T (Janeway *et al.*, 2000). Se encontró que en ambas poblaciones celulares de linfocitos T (CD4 y CD8), la toxina Cry1Ac induce porcentajes mayores de activación comparados con la protoxina, estos datos son similares a los encontrados anteriormente en una tesis de licenciatura (Medina, 2011), en donde la activación inducida por la toxina Cry1Ac en leucocitos totales de bazo es mayor a la activación provocada por la protoxina Cry1Ac. Datos publicados anteriormente sugieren que la habilidad inmunogénica que poseen las proteínas Cry reside y depende de la mitad NH₂-terminal (la toxina) (Guerrero *et al.*, 2004), cabe mencionar que la región NH₂-terminal de las proteínas Cry1Ac es la parte tóxica y esta suele ser resistente a la proteólisis, estos datos apoyan nuestros resultados en donde la toxina Cry1Ac presenta mayor activación que la protoxina, ya que como se demostró anteriormente esta es principalmente la región en donde reside la habilidad inmunogénica, ya que la toxina tiene más expuesta esta región que la protoxina Cry1Ac.

Anteriormente se ha reportado en distintas ocasiones el efecto inmunógeno de las proteínas Cry1Ac (Vázquez *et al.*, 1999; Moreno-Fierros *et al.*, 2000). Con el fin de caracterizar tal efecto y conocer si estas proteínas son capaces de activar de forma directa a linfocitos T, se realizaron experimentos de activación con poblaciones totales de linfocitos T y con poblaciones purificadas de linfocitos T CD4 y CD8, en ambos experimentos, las proteínas Cry1Ac indujeron expresión de CD69.

Se ha descrito que para que se dé la activación de linfocitos T, se requiere de células presentadoras de antígeno (APC), donde es necesario el despliegue del antígeno peptídico en moléculas de histocompatibilidad (MHC) que se encuentran sobre la APC y moléculas coestimuladoras (Abbas, 2006). La expresión de CD69 en células T CD4 y CD8, indican que las proteínas Cry1Ac no son capaces de activar de forma directa a linfocitos T (comparado con los resultados de activación en presencia de APC), estas proteínas necesiten de células presentadoras de antígeno para activar notablemente a células T. Estas suposiciones están apoyadas por el trabajo de Medina en 2011, ya que cuando hay una mezcla de leucocitos totales (linfocitos T y B, y células presentadoras de antígeno como macrófagos) la activación que se obtuvo fue mayor, comparada con la obtenida en este trabajo; posiblemente debido a que los macrófagos están actuando como APC, presentando como antígeno a la proteínas Cry1Ac a los linfocitos T, y como consecuencia de esta presentación y coestimulación, los linfocitos T se activaron. Se ha reportado que otras moléculas de origen microbiano ejercen su actividad adyuvante mediante la sobreexpresión de moléculas coestimuladoras en células presentadoras de antígeno (Lavelle *et al.*, 2004, Bromader *et al.*, 1991; Cox, *et al.*, 2001).

Como se mencionó anteriormente, la activación en poblaciones totales de linfocitos es ligeramente mayor que en linfocitos T purificados, posiblemente debido a que los linfocitos B estén actuando como célula presentadora de antígeno, (aunque cabe aclarar que la función principal de las células B, es la producción de anticuerpos cuando se diferencian a células plasmáticas), presentando a las proteínas Cry1Ac a los linfocitos T. En diversos estudios se ha reportado que las células dendríticas, macrófagos y linfocitos B son las principales células presentadoras de antígeno (Villadangos, *et al.*, 2001; Wang, *et al.*, 2001). Otros reportes indican que las células B, presentan antígenos a linfocitos T cooperadores (CD4), iniciado una respuesta inmune humoral (Abbas, 2006).

En cuanto a los resultados que se obtuvieron en la unión de las proteínas Cry1Ac, tenemos que, tanto la toxina como la protoxina, son capaces de unirse a linfocitos T CD4 y CD8. La toxina presenta mayor unión comparado con la protoxina Cry1Ac, tanto en células purificadas como con linfocitos totales, pero vemos que esta unión no es proporcional a la activación, es decir, las proteínas Cry1Ac se unen a linfocitos T, sin embargo, la activación por expresión CD69 es baja, por lo que sugerimos para posteriores estudios y caracterización del efecto adyuvante de las proteínas Cry1Ac, estudiar la

activación con distintos marcadores de activación para linfocitos T, como CD25, CD26, CD28 y CD30, entre otros (Janeway, 2000).

Por medio de microscopía confocal y de fluorescencia, se encontró que la toxina y la protoxina Cry1Ac, se unen a la superficie celular de linfocitos T. Las imágenes obtenidas mediante microscopía confocal a los 10 minutos, 1 hora y 3 horas, muestran que no hay internalización de las proteínas Cry1Ac. Anteriormente se ha reportado la unión de la protoxina Cry1Ac a enterocitos de ratón en cortes de intestino delgado por inmunofluorescencia (Vázquez-Padrón et al., 2000). En la tesis de Medina en 2011, se demostró que tanto la protoxina como la toxina Cry1Ac se unen a leucocitos totales de bazo (linfocitos y mielocitos) de ratón. Este es el primer reporte de la unión de las proteínas Cry1Ac a linfocitos T aislados de ratón y además se comprobó la unión específica a células de mamífero.

Los resultados indican que la unión de las proteínas Cry1Ac está relacionada directamente con el estado de activación de linfocitos T, la unión de la protoxina y toxina Cry1Ac se favorece cuando los linfocitos T están activados. Se ha reportado que la estimulación antigénica de los linfocitos T que estaban en reposo, ocasiona que entren en fase G1 del ciclo celular y se transforman en células más grandes, su tamaño oscila entre 10 y 12 μm , aumenta el número de organelos y la cantidad de ácido nucleico en el citoplasma, y comienza la división celular, esta serie de eventos es llamada transformación blástica y subsecuentes divisiones mitóticas son el resultado de la proliferación de clones celulares que reconocen al antígeno que ocasionó la activación celular (Abbas, 1994). Creemos que el proceso de activación desencadena vías alternas o existe un cambio morfológico y estructural (como lo menciona Abbas) que propician una sobreexpresión de los “posibles receptores” de las proteínas Cry1Ac.

Para posteriores estudios sobre los efectos de las proteínas Cry1Ac en linfocitos T, proponemos realizar ensayos sobre presentación de antígeno: donde se estimule previamente a células presentadoras de antígeno como macrófagos con protoxina y toxina Cry1Ac, y posteriormente se pongan a interactuar con linfocitos T, para caracterizar el proceso de la presentación de las proteínas Cry1Ac a las células T; también proponemos realizar ensayos de proliferación de linfocitos T (ensayos con radioactividad como timidina tritiada o por ensayos con fluorocromos) para evaluar si las proteínas Cry1Ac tiene efecto en su proliferación y así evaluar de una forma más completa los

efectos de las proteínas Cry1Ac en células T aisladas, así como realizar el mismo análisis que se propone en este trabajo, pero a tiempos más largos. Hemos mencionado anteriormente que la unión de las proteínas Cry1Ac está directamente relacionada con el estado de activación de los linfocitos T, por lo que, proponemos realizar ensayos con células previamente activadas por PMA/Ionomicina, para poder caracterizar mejor los efectos de las proteínas Cry1Ac en células T.

Este trabajo presenta evidencia que sugiere la presencia de receptores para la toxina y la protoxina Cry1Ac en células T de ratón, debido a que estas proteínas tienen la capacidad de inducir activación de linfocitos T *in vitro* en tiempos cortos (10 min, 1 hora y 3 hrs). Nuestros resultados demostraron que las proteínas Cry1Ac se unen a la membrana de linfocitos T, posiblemente al unirse a su receptor putativo, y por medio de este, creemos que las proteínas Cry1Ac ejercen efectos en la activación de estas células. Es importante destacar, que es el primer reporte que indica la existencia de receptores en linfocitos T. En la actualidad se han descrito receptores de superficie para toxina Cry1Ac en invertebrados. Estudios sobre el modo de acción de las toxinas Cry1Ac han revelado que los ligandos con los que interactúan son principalmente N aminopeptidasas y E cadherinas que se localizan en la membrana epitelial del intestino medio de las larvas de insectos susceptibles (Knight *et al.*, 1994, Vadlamudi *et al.*, 1995). También se ha identificado el receptor de Cry1Ac en el insecto *Manduca sexta* como una N aminopeptidasa, una glicoproteína de 120 kDa, curiosamente la unión Cry1Ac-N aminopeptidasa es inhibida por N-acetilgalactosamina (GalNAc), lo que sugiere que Cry1Ac reconoce GalNAc en la N aminopeptidasa (Knight *et al.*, 1994; Garczynski y Adang, 1995; Sangadala *et al.*, 1994). Receptores Cry1Ac en otros insectos lepidópteros también se han demostrado ser N aminopeptidasas (Gill *et al.*, 1995; Valaitis *et al.*, 1995).

Ensayos de inmunoprecipitación para la protoxina Cry1Ac, revelaron 2 bandas de proteína con pesos moleculares de 72 y 58 kDa, sin embargo, en ensayos de Blot ligando no se revelaron bandas, estos resultados no indican la inexistencia de receptores para la protoxina Cr1Ac. Posiblemente durante los procesos de inmunoprecipitación, transferencia a papel PVDF y blot ligando, los receptores putativos se desnaturalizaron, sufriendo cambios conformacionales en su forma nativa, por cambios bruscos de temperatura y pH, imposibilitando el reconocimiento de la protoxina Cry1Ac. En cambio, cuando este mismo Blot ligando se reveló con toxina Cry1Ac, se revelaron 4 bandas de

150, 68, 63 y 45 kDa, lo que pudiera sugerir que los receptores para las proteínas Cry1Ac es el mismo para las 2, ya que de no ser así, la toxina Cry1Ac no habría sido capaz de reconocer el supuesto receptor de la protoxina Cry1Ac, pero probablemente esta unión se da en distintos sitios del posible receptor. Medina sugirió que posiblemente la unión de las proteínas Cry1Ac, se lleva a cabo en regiones distintas de las moléculas que las unen, debido a que en sus resultados, ensayos de Blot ligando de leucocitos totales muestran un mismo patrón de proteínas reveladas tanto para toxina como para protoxina Cry1Ac, pero la unión de toxina es dependiente de carbohidratos mientras que para la protoxina Cry1Ac no es así.

En los ensayos de Blot ligando se revelaron 3 bandas a las que se unió la toxina Cry1Ac, con pesos moleculares de 68, 62 y 45 kDa. En un estudio en *Manduca sexta* se identificaron 4 bandas con un peso de 120 kDa que corresponde a una N aminopeptidasa, 2 bandas de 65 y 62 kDa de fosfatasa alcalina soluble y como proteína de membrana y una más de 42 kDa que corresponde a actina (McNall *et al.*, 2003). Los pesos encontrados en este estudio, son similares a los pesos moleculares reportados para fosfatasa alcalina y actina, pero sugerimos ampliar este estudio mediante un análisis de espectrometría de masas para identificar a la o las proteínas receptoras.

CONCLUSIONES

- I. Las proteínas Cry1Ac, tanto la toxina como la protoxina, inducen expresión CD69 en linfocitos T, lo que indica que estas proteínas tienen la capacidad de activar células linfoides. La toxina Cry1Ac activa en mayor proporción a los linfocitos T, comparada con la activación producida por la protoxina Cry1Ac, esta última no presenta activación significativa en linfocitos T CD8, mientras que la toxina Cry1Ac activa en mayor proporción a linfocitos T CD4 que a linfocitos T CD8.
- II. Las proteínas Cry1Ac tienen la capacidad de activar a linfocitos T CD4 y CD8, sin embargo, la activación por efecto de las proteínas Cry1Ac no es tan eficiente o es muy discreta respecto a aquella que se obtuvo en ensayos de leucocitos totales en presencia de células presentadoras de antígeno. Las proteínas Cry1Ac necesitan de células presentadoras de antígeno para lograr expresión CD69 de linfocitos T.
- III. La protoxina y toxina Cry1Ac se unen a poblaciones de linfocitos T CD4 y CD8, presumiblemente en la membrana plasmática de estas poblaciones celulares. La protoxina Cry1Ac se une en menor proporción a linfocitos T comparada con la unión que mostró la toxina Cry1Ac, esta última, se une más a linfocitos CD8 comparada con la unión a linfocitos T CD4.
- IV. La unión de las proteínas Cry1Ac se relaciona directamente con el estado de activación de linfocitos T, es decir, la unión de la toxina y protoxina Cry1Ac se favorece cuando las células T están activadas.
- V. Los resultados sugieren la existencia de receptores para las proteínas Cry1Ac en linfocitos T de bazo de ratón. Se precipitaron 2 bandas para la protoxina Cry1Ac con pesos moleculares de: 72 y 58 kDa. Mientras que para la toxina Cry1Ac se revelaron 3 bandas con pesos moleculares de: 68, 62 y 45 kDa.

REFERENCIAS

1. Abbas, A. K., Litchman, H. A., Pillai, S. 2006. Inmunología molecular y celular. Elsevier Saunders. Estados Unidos.
2. Bradford, M. M. *Anal. Biochem.* 72 (1976): 248–254.
3. Bravo, A., Gill, S.S., Soberón, M. *Bacillus thuringiensis* mechanisms and use. Comprehensive molecular insect science. Elsevier B.V. (2005): 175–206.
4. Bravo, A. Gill, S. S. Soberón, M. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. Elsevier. *Toxicon* 49 (2007): 423-435.
5. Bromader, A., J. Holmgren, and N. Lykle. Cholera toxin stimulates IL-1 production and enhanced antigen presentation by macrophages in vitro. *J. Immunol.* 146 (1991): 2908.
6. Burton, S.L., Ellar, D.J., Li, J., Derbyshire, D.J. N-acetylgalactosamine on the putative insect receptor aminopeptidase N is recognised by a site on the domain III lectin-like fold of a *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxin. *J. Mol. Biol.* 287 (1999): 1011–1022.
7. Carrasco M, Rojas S, Rodríguez MA, Terrazas LI, **Moreno-Fierros L**. Protection against naegleria fowleri infection in mice immunized with Cry1Ac plus amebic lysates is dependent on STAT-6 induced Th-2 response. *Parasite Immunology* 32 (2003): 664-670.
8. Clements, J.D., N.M. Hartzog, and F.L. Lyon. Adjuvant activity of *Escherichia coli* heat labile enterotoxin and effect on the induction of oral tolerance in mice to unrelated protein antigens. *Vaccine* 6 (1988): 229.
9. Cox, J.C. and Coulter, A.R. Adjuvants- a classification and review of their modes of action. *Vaccine* 15 (1997): 248-256.
10. Dean, J., Derbyshire, Ellar and Jade Lia. Crystallization of the *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac and its complex with the receptor ligand N-acetyl-D-galactosamine *Acta Cryst.* 57 (2001): 1938-1944.
11. Dickinson, B.L. Dissociation of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin adjuvant activity from ADP-Ribosyltransferase activity. *Infect. Immun.* 63 (1995): 1617.
12. Eldridge, J.H., Staas, J.K., Meulbroek, J.A., McGhee, J.R., Tice, T.R. Biodegradable microspheres as vaccine delivery system. *Mol. Immunol.* 28 (1991): 287-294.

13. Elson, C. O., and Ealding, W. Generalized systemic and mucosal immunity in mice after mucosal immunization stimulation with cholera toxin. *J. Immunol.* 132 (1984): 2736-2741.
14. Eriksson K., Holmgren J. Recent advances in mucosal vaccines and adjuvants. *Curr. Opin. Immunol.* 14 (2002): 666-672.
15. Esquivel R and **Moreno-Fierros, L.** The Mucosal and systemic adjuvant effects of cholera toxin and Cry1Ac protoxin, on the specific antibody response to HIV-1 C4/V3 peptides, are different and depend on the antigen coadministered. *Viral Immunol* 18 (2005): 695-708.
16. Fernández, L. E. Gómez, I. Pacheco, S. Arenas, I. Gilla, S. S. Bravo, A. Soberón, M. Employing phage display to study the mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry toxins. *Peptides* 29 (2008): 324-329.
17. Galitsky, N., Cody, A.V., Wojtczak, D., Ghosh, J.R., Panghorn, W.L., English, L. Structure of the insecticidal bacterial delta endotoxin Cry3Bb1 of *Bacillus thuringiensis*. *Biol. Crystallogr.* 57 (2001): 1101–1109.
18. Grochulski, P., Masson, L., Borisova, S., Pusztai-Carey, M., Schwartz, J.L., Brousseau, R., Cygler, M. *Bacillus thuringiensis* Cry1A (a) insecticidal toxin: crystal structure and channel formation. *J. Mol. Biol.* 254 (1995): 447–464.
19. Guerrero-Manríquez G.G., Dean, H., **Moreno-Fierros L.** Structural Implication of the induced immune response by *Bacillus thuringiensis* Cry proteins. *Molecular Immunology.* 41 (2004): 1177-1183.
20. Guerrero, G.G., Russell, W.M., and **Moreno-Fierros, L.** Analysis of the cellular immune response induced by *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxins in mice: Effect of the hydrophobic motif from diphtheria toxin. *Mol Immunol.* 44 (2007): 1209-17.
21. Höfte, H., H. Whiteley. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol. Rev.* 53 (1989): 242- 255.
22. Holmgren J., Czerkinsky C., Eriksson K., Mharandi A. Mucosal immunization and adjuvants: a brief overview of recent advances and challenges. *Vaccine.* 21 (2003): 89-95.
23. Holmgren J, Czerkinsky C. 2005. Mucosal immunity and vaccines. *Nat Med.* 11:45-53.
24. Hooper, C. The new age of vaccines adjuvants. 3 (1991): 21-23.
25. Janeway C., Travers P., Walport Mark., Capra J. 2000, *Inmunobiología.* Elsevier Science, Barcelona (España).

26. Jarillo-Luna A., **Moreno-Fierros L.**, Campos-Rodríguez R., Rodríguez-Monroy M.A., Lara-Padilla, Rojas-Hernández S. Intranasal immunization with *Naegleria fowleri* lysates and Cry1Ac induces metaplasia in the olfactory epithelium and increases IgA secretion. *Parasite Immunol.* 30 (2008): 31-8.
27. Jurat-Fuentes, J.L., Adang, M.J. Characterization of a Cry1Ac-receptor alkaline phosphatase in susceptible and resistant *Heliothis virescens* larvae. *Biochem.* 271 (2004): 3127–3135.
28. Jurat-Fuentes, J.L., Adang, M.J. Cry toxin mode of action in susceptible and resistant *Heliothis virescens* larvae. *Invertebr Pathol.* 92 (2006): 166–171.
29. Kang, S.M., Compans, R.W. Enhancement of mucosal immunization with virus-like particles of simian immunodeficiency virus. *J Virol.* 77 (2003): 3615-3623.
30. Knight, P., Crickmore, N., and Ellar, D. J. The receptor for *Bacillus thuringiensis* Cry1A (c) delta-endotoxin in the brush border membrane of the lepidoptero *Manduca sexta* is aminopeptidase N, *Mol. Microbiol.* 11 (1994): 429-436.
31. Knowles, B. H. & Ellar, D. J. Characterization and partial purification of a plasma membrane receptor for *Bacillus thuringiensis*. Kurstaki lepidopteran-specific delta-endotoxin. *J. Cell Sci.* 83 (1986): 89-101.
32. Lavelle, E.C. Generation of improved mucosal vaccines by induction of innate immunity. *Cell Mol Life Sci.* 62 (2005): 2750-70.
33. Lavelle, E.C., Jarnicki, A., McNeela, E., Armstrong, M.E., Higgins, S.C., Leavy, O., Mills, K.H.G. Effects of cholera toxin on innate and adaptive immunity and its application as an immunomodulatory agent. *J. Leuc. Biol.* 75 (2004): 756–763.
34. Legorreta-Herrera, M., Oviedo, M., **Moreno-Fierros.** Pre-treatment with Cry1Ac protoxin modulates the immune response and increases the survival of *Plasmodium*-infected CBA/Ca mice. *J Biomed Biotechnol.* (2010): 198921.
35. Li, J., Carroll, J. & Ellar, D. J. 1991. Crystal structure of insecticidal delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5 Å resolution. *Nature*, 353: 815-821.
36. Lis, H., Sharon, N. Lectins: carbohydrate-specific proteins that mediate cellular recognition. *Chem. Rev.* 98 (1998): 637–674.
37. Lycke, N., & J. Holmgren. Strong adjuvant properties of cholera toxin on gut mucosal immune responses to orally presented antigens. *Immunology* 59 (1986): 301-308.

38. Lyke, N., Karlsson, A. Sjölander, and Magnusson. The adjuvant action of cholera toxin is associated with an increased intestinal permeability for luminal antigens. *Scand. J. Immunol.* 33 (1991): 691.
39. McClintock, J.T., Schaffer, C.R. A comparative reviews of the mammalian toxicity of *Bacillus thuringiensis*-based pesticides. *Pestic. Sci.* 45 (1995): 95-105.
40. McNall, R, J. Adang, M. J. Identification of novel *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac binding proteins in *Manduca sexta* midgut through proteomic analysis. Elsevier. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 33 (2003): 999–1010
41. Medina, J. A. 2011. Identificación de receptores para la toxina Cry1Ac en células linfoides y mieloides. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de estudios superiores Iztacala. Tesis de licenciatura.
42. Michalek, S.M., Eldridge, J.H., Curtiss III, R. Antigen delivery systems: new approaches to mucosal immunization. In *Handbook of Mucosal Immunology*. 1994: 373-390.
43. **Moreno-Fierros**, L., García, N., Gutiérrez, R., López-Revilla, R., Vázquez-padrón R. 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 (2000): 885-890.
44. **Moreno-Fierros** L, Pérez, O., Palomar, M. Slight influence of the estrous cycle stage on the Mucosal and systemic specific antibody response induced after vaginal and intraperitoneal immunization with protoxin Cry1Ac from *Bacillus thuringiensis* in mice. *Life Sci* 2002: 2667-80.
45. **Moreno-Fierros**, L., Ruiz-Medina, J., Esquivel, R., López-Revilla, R. and Piña-Cruz Saúl. Cry1Ac protoxin as carrier and adjuvant for the induction of mucosal and systemic antibody immune responses to polysaccharides of *S. pneumoniae* by intranasal immunization in mice. *Scand. J. Immunol.* 2003: 57-45.
46. Morris, Quevedo H, Martínez-Manrique C, Abdala-Díaz R, Campos-Orama D. Adyuvantes inmunológicos, 18(1999):130-7
47. Neutra M.R., Kozlowski P.A. Mucosal vaccines: the promise and the challenge. *Nat Rev Immunol.*, 2006: 148-58. Review.
48. O'Hagan D., MacKichan M., Singh M. Recent developments in adjuvants for vaccines against infectious diseases. *Biomolecular Engineering*, 18 (2001): 69-85.

49. Pardo-López L, Gómez I, Rausell C, Sanchez J, Soberón M, Bravo A. Structural changes of the Cry1Ac oligomeric pre-pore from bacillus thuringiensis induced by N-acetylgalactosamine facilitates toxin membrane insertion. *Biochemistry*. 45(2006):10329-36.
50. Prasad, S. S. S. V., and Shethna, Y. I. *J. Exp. Biol.* 14 (1976): 285–290.
51. Rodríguez-Orozco A. The difficulty of obtaining immunologic response at mucosae. Use of adjuvants. *Rev Alerg.* 50 (2003): 161-5.
52. Rodríguez, O. A. 2004. Efecto de la protoxina Cry1Ac de *Bacillus thuringiensis* sobre células inmunocompetentes y su aplicación en mecanismos de inmunogenicidad y adyuvancia. Instituto Politécnico Nacional. Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía. Tesis doctoral.
53. Rojas-Hernández S, Jarillo-Luna A, Rodríguez-Monroy M, **Moreno-Fierros L**, Campos-Rodríguez R. Immunohistochemical characterization of the initial stages of *Naegleria fowleri* meningoencephalitis in mice. *Parasitol Res.* 94(2004): 31-6.
54. Rojas-Hernández S, Rodríguez Monroy, M., **Moreno-Fierros, L.**, Jarillo-Luna, A., Carrasco-Yepe, M., Miliar-García, Campos-Rodríguez. Nitric oxide production and nitric oxide synthases immunoreactivity in *Naegleria fowleri*. *Parasitol Res.* 101(2007): 269-74.
55. Ryan E.J., Daly L.M., Mills K.H.G. Immunomodulators and delivery systems for vaccination by mucosal routes. *Trends Biotech*, 19(2001): 293-304.
56. Sankaranarayanan, R., Sekar, K., Banerjee, R., Sharma, V., Surolia, A., Vijayan, M. A novel mode of carbohydrate recognition in jacalin, a Moraceae plant lectin. *Nat. Struct. Biol.* 3 (1996): 596–603.
57. Shimizu, T., Morikawa, K. The prism: a new folding motif. *Trend Biochem. Sci.* 21, 3–6. Spangler BD. Structure and function of cholera toxin and related *Escherichia coli* heat labile enterotoxin. *Microbiol*; 46 (1996): 622–47.
58. Schnepf E, Crickmore N, Van Rie J, Lereclus D, Baum JR, Feitelson J. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol Mol Biol Rev.* 62 (1998): 705–806.
59. Soberón, M. & Bravo, A. Las toxinas Cry de *Bacillus thuringiensis*: modo de acción y consecuencias de su aplicación. *Biotecnología.* 4 (2007).
60. Vadlamudi, R.K., Weber, E., Ji, I., Ji, T.H., Bulla, L.A. Cloning and expression of a receptor for an insecticidal toxin of *Bacillus thuringiensis*. *J. Biol. Chem.* 270 (1995): 5490–5494.

61. Van Ginkel FW, Jackson RJ, Yuki Y, McGhee JR. Cutting edge: the mucosal adjuvant cholera toxin redirects vaccine proteins into olfactory tissues. *J Immunol* 165 (2001): 4778-4782.
62. Vázquez-Padrón, R.I., **Moreno-Fierros**, L., Neri-Bazán, L., De la Riva, G.A., López-Revilla R. *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac protoxin is a potent systemic and mucosal adjuvant. *Scand. J. Immunol.* 46 (1999a): 578-584.
63. Vázquez-Padrón, R.I., **Moreno-Fierros**, L., Neri-Bazán, L., De la Riva, G.A., López-Revilla, R. Intragastric and intraperitoneal administration of Cry1Ac protoxin from *Bacillus thuringiensis* induces systemic and mucosal antibody response in mice. *Life Sciences* 64 (1999b): 1897-1912.
64. Vázquez-Padrón, R.I., González-Cabrera, J., García Tovar, C., Neri-Bazán, L., Hernández, M., **Moreno-Fierros**, L., López-Revilla, R., de la Riva, G.A. Cry1Ac protoxin from *Bacillus thuringiensis* sp. *Kurstaki* HD 73 binds to surface proteins in the mouse small intestine. *Biochem. Biophys.* 271 (2000): 54–58.
65. Villadangos, J.A. Presentation of antigens by MHC class II molecules: getting the most out of them. *Mol. Immunol.* 38 (2001): 329–346.
66. Wang, J., Wanatabe, T. Antigen presentation to lymphocytes. *Life sciences.* 29 (2001): 482-488.
67. Williams N.A., Hirst T.R., Nashar T.O., Immune modulation by the cholera-like enterotoxins: from adjuvant to therapeutic. *Immunol. Today* 20 (1999): 95-101.