BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

LICENCIATURA EN BIOTECNOLIOGÍA

Aislamiento e identificación de una proteína Cry de *Bacillus thuringiensis*: posible utilidad como inmunopotenciador

Tesis que para obtener el título de

LICENCIADA EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:
C. RUTH ABRIL VELA SANCHEZ

DIRECTORA: Dra. MARIA CRISTINA GONZÁLEZ VÁZQUEZ

CO DIRECTOR: Dr. ALEJANDRO CARABARÍN LIMA

Agradecimientos

Agradezco a Dios por la oportunidad de vida; por la familia que tengo, por los amigos que hice y las personas tan extraordinarias que conocí.

Gracias a mis padres, Donato Vela Martínez y Ruth Sánchez Ramírez. Gracias por todo el amor y apoyo en cada paso que doy; también por formar en mi lo que soy ahora. Juntos llegamos lejos. Esto es de ustedes también. Gracias a mi hermano Misael Jonathan, porque siempre me animabas, porque siempre me has protegido.

Agradezco a la Dra. María Cristina González Vázquez y al Dr. Alejandro Carabarín Lima por darme la oportunidad de realizar este proyecto. Gracias por brindarme su confianza, su paciencia, su entusiasmo y sus conocimientos. Gracias por los detalles que tuvieron con mis compañeros y conmigo y gracias por que disfrute muchísimo mi estancia con ustedes.

Agradezco al comité conformado por la Dra. Norma Elena Rojas Ruiz por su orientación y ayuda en este proyecto y por recibirme en su laboratorio haciéndome parte de su equipo de trabajo. Así mismo a la Dra. Etelvina Gándara por brindarme apoyo, orientación y una sonrisa. Gracias a ambas por los momentos llenos de risas, reflexiones y su apoyo para este momento.

Agradezco también amigo y compañero David Israel Ríos Vázquez por estos años. Gracias por dejarme ser parte de tu vida; por estar a mi lado en las buenas y las malas y por las aventuras que tuvimos. Gracias por todo tu apoyo. Agradezco a mis amigos: A Yaremy Arroyo por tenerme tanta paciencia, por escucharme en mis malos momentos y siempre ser amable conmigo. A Irving Merino, gracias por siempre hacerme reír, aguantar mi carácter y escucharme en mis malos ratos. Gracias por que fuiste mi primer amigo en esta aventura. A Alejandro Sierra, por ser sincero en todo el tiempo; por abrirme las puertas de tu casa. A Linnet López, por los abrazos y la amabilidad que tienes. A Fabritzio Tapia, por las aventuras, las salidas y el entusiasmo ante la vida que siempre me contagiabas.

A todos, gracias a todos por hacer de esta aventura una de las mejores etapas de mi vida. Gracias porque siempre me apoyaron de manera incondicional y por todas las tareas, exámenes y trabajos que superamos juntos. Los quiero.

A mi amiga de toda la vida, Karina Hernández por estar en las buenas y en las malas; por apoyarme, por ser un ejemplo de superación y estar tantos años conmigo y por ser mi otra mitad. Vamos por más.

Agradezco a mis compañeros de trabajo de laboratorio Alejandro, Alexis, Cesar. Fabritzio, Monserrat, Pilar y Yessenia por darme su apoyo, su entusiasmo y porque juntos logramos que hubiera un ambiente de armonía y felicidad, juntos aprendimos.

Gracias a la familia Castillo Luna, por abrirme las puertas de su casa y tratarme como a una de su familia. Gracias por ser parte de mi familia y por cada consejo que me brindaron.

Tabla de contenido

Índice de tablas 6
Índice de gráficas 6
Índice de figuras 7
Abreviaturas 9
Resumen 11
Capítulo 1. Introducción 12
1. Familia *Bacillacea* 12
1.1 Género *Bacillus* 12
1.2 *Bacillus thuringiensis* (Bt) 13
1.3 Formación de la espora 14
1.4 Proteínas Cry 18
1.5 Mecanismo de acción de la proteína Cry como bioinsecticida 20
2. Adyuvantes o inmunopotenciadores 22
2.1 Definición adyuvante 22
2.2 Breve historia de los adyuvantes 22
2.3 Adyuvantes: clasificación 23
2.4 Adyuvantes inmunoestimuladores más comunes 25
2.5 Adyuvantes inmunopotenciadores naturales 28
3. Antecedentes Directos 31
3.1 Proteínas Cry como inmunopotenciadores naturales 31
4.Objetivos 34
4.1 Objetivo general: 34
4.2 Objetivos específicos: 34
5. Hipótesis 34
6. Justificación 34
Capítulo 2. Materiales y métodos 35
2.1 Esquema general de trabajo 35
2.2 Crecimiento bacteriano 36
2.3 Tinción Gram 36
2.4 Tinción con verde de malaquita 36
2.4 Obtención de esporas de Bt 37
2.5 Obtención de ADN por el método de Fenol-Cloroformo para *Bacillus* sp. 37

2.6 Amplificación del gen que codifica para el ARNr 16s 38
2.7 Electroforesis de los productos de PCR en gel de agarosa..... 39
2.8 Rompimiento de la espora y obtención de la proteína Cry 39
2.9 SDS PAGE y MALDI TOF 40
2.10 Inmunización en modelo murino hembra por vía intraperitoneal..... 40
2.11 Determinación de las isoclases de Inmunoglobulinas..... 41
2.12 Electrotransferencia y western blot 41
2.13 Análisis *in silico* y bioinformático 42
2.14 Análisis estadístico ANOVA 43
Capítulo 3. Resultados 44
3.1 Crecimiento bacteriano y obtención de la proteína Cry..... 44
3.2 Amplificación del gen que codifica para el ARNr 16s 47
3.3 Tratamiento para romper esporas 49
3.4 Efectividad del tratamiento e identificación de la Proteína Cry 50
3.5 Identificación de la proteína Cry por MALDI TOF 51
3.6 Análisis in silico y bioinformático. 52
3.7 Protocolo e inmunización en modelo murino hembra por vía intraperitoneal..... 56
3.7 Determinación de las isoclases de inmunoglobulinas 57
3.8 Titulación de anticuerpos por Western Blot 59
3.9 Mecanismo inmunológico de las proteínas Cry..... 60
Capítulo 4. Discusión 62
Capítulo 5. Conclusiones..... 66
Perspectivas 69
Bibliografía 70

Índice de tablas

Tabla	Título	Página
1	Clasificación actual de los adyuvantes basado en su composición	24
2	Clasificación de los adyuvantes naturales	30
3	Trabajos descritos con Cry1Aa, Cry1B, Cry1C	33
4	Cantidades, concentraciones y combinaciones de los solventes y detergentes utilizados para romper la membrana de las esporas	39
5	Posibles epítopos para linfocitos B. resultado del programa BepiPred-2.0: Sequential B-cellEpitope	52
6	Tabla de predicción posibles epítopos para linfocitos T	53
7	Valores de las distintas isoclases	57
8	Ventajas y desventajas de Cry2Aa como inmunoestimulador frente a otros adyuvantes inmunoestimuladores	67

Índice de gráficas

Gráfica	Título	Página
1	Evaluación de las distintas isoclases, mediante un ELISA indirecto	58

Índice de figuras

Figura	Título	Página
1	Esquema de la estructura de la endospora.	15
2	Diagrama esquemático ilustrativo de la esporulación en Bt.	17
3	Esquema del mecanismo de acción de las proteínas Cry en lepidópteros.	21
4	Cepa de Bt sembrada en medio LB.	4
5	Cepa de Bt sembrada en medio TrisG.	44
6	Células de Bt vistas a microscopio óptico a 100X.	45
7	Células vegetativas de Bt con tinción Gram vistas a microscopio de epifluorescencia a 100X.	46
8	Células de Bt teñidas con verde de malaquita al microscopio óptico al 100X.	47
9	Gel de agarosa que muestra los productos amplificados del gen ARNr 16S. Carril 1 MPM, carril2 amplificación el gen ribosomal 16S.	48
10a-10d	Tinción de las células de Bt con verde de malaquita posterior al tratamiento.	49
11	Gel “SDS-PAGE” de la proteína Cry obtenida.	50
12	Secuencia de la proteína analizada por MALDI TOF, mediante el espectrómetro de masas LTQ XL ETD.	51

13	Diagrama de listón para linfocitos T.	54
14	Diagrama de listón que indica la presencia de epítopos para linfocitos B.	55
15	Sangrado del modelo	56
16	Administración vía intraperitoneal en modelos murinos hembra BALB/c.	56
17	Isotipificación por ELISA	57
18	Western Blot con extracto de la proteína Cry2Aa como antígeno.	59
19	Mecanismo inmunológico de las proteínas Cry de *Bacillus thuringiensis*.	61

Abreviaturas

Abreviatura	Significado
ºC	Grados Celsius
µg	Microgramos
ADN	Ácido desoxirribonucleico
Bt	*Bacillus thuringiensis*
CE	Ectodominio
MPED	Dominio de la membrana extracelular proximal
TM	Dominio transmembranal
M	Mesosoma
CW	Pared celular
AF	Filamento axial
E	Exospora
S	Endospora
CYTO	Dominio citoplasmático
APC	Célula presentadora de antígeno
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad
Th	*T helper*
INF	Interferón
IL	Interleucina
LPS	Lipopolisacárido
CTL	Linfocitos T citotóxicos
Da	Daltons
DO	Densidad óptica
mL	Mililitro
Gr	Gramos
NaCl	Cloruro de Sodio
SDS	Dodecilsulfato de Sodio
1M	1 Molar
ACF	Adyuvante completo de Freund
TMB	3,3´, 5,5´-tetrametilbencidina
IgG	Inmunoglobulina G
kDa	KiloDalton
LB	Luria Bertani
Mg	Miligramos
mM	Milimolar
PBS	Buffer Salino de Fosfatos
PBS-T	Buffer Salino de Fosfatos-tween 20
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pH	Potencial de hidrógeno
rpm	Revoluciones por minuto

pb	Pares de bases
SDS PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
V	Volts
µL	Microlitro

Resumen

Bacillus thuringiensis es una bacteria Gram positiva productora de endosporas en la cual se expresan las proteínas Cry. Estas proteínas son tóxicas para las larvas de lepidópteros, coleópteros y dípteros. Sin embargo, no representan una amenaza contra humanos o mamíferos. Estas características les han permitido ser usadas en el campo de la biotecnología en plantas modificándolas con ingeniería genética, produciendo así los conocidos cultivos transgénicos. Sin embargo, se ha demostrado su capacidad de inducir una respuesta inmune en el hospedero cuando es utilizado como adyuvante.

Existen varios tipos de proteínas Cry, entre ellos Cry1Aa, qué cuando es utilizada como adyuvante, junto con otros antígenos para inmunizar modelos animales experimentales, ha sido capaz de generar una respuesta inmune adecuada capaz de proteger a estos. Por tal motivo, las proteínas Cry surgen como potenciales adyuvantes naturales para el desarrollo de vacunas.

En este trabajo se purificaron proteínas Cry obtenidas a partir de esporas *de Bacillus thuringiensis* del biopesticida comercial DIPEL DUST, mediante procedimientos químicos. Posteriormente, se realizaron corrimientos electroforéticos de proteínas en geles de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico(“SDS-PAGE”), en los cuales se pudo identificar una posible proteína Cry, para confirmar lo anterior se purificó y secuenció la proteína mediante la técnica de MALDI-TOF, y se identificó como Cry2Aa.

Una vez confirmada identidad de la proteína obtenida, se realizó la inmunización en el modelo murino hembra en tres ocasiones. Acabado el esquema de inmunización se cuantificó la producción de anticuerpos policlonales anti-Cry2Aa. Asimismo se realizaron ensayos bioinformáticos con la secuencia de la proteína para predecir la presencia de epítopos para linfocitos B y T, los cuales están involucrados en la respuesta humoral y celular, respectivamente y así confirmar la posible utilidad como adyuvante de esta proteína.

Capítulo 1. Introducción

1. Familia *Bacillacea*

1.1 Género *Bacillus*

Las bacterias del género *Bacillus* pertenecen a la familia *Bacillaceae*, una de las familias bacterianas con mayor actividad bioquímica. Son bacterias Gram positivas, aeróbicas o aeróbicas facultativas, catalasa positiva y, en cuanto a su morfología, poseen forma de bastón alargado. Se encuentran en prácticamente todos los ambientes, desde agua, suelo, aire, plantas y animales. Poseen flagelos laterales que les permiten movilidad. Su pH óptimo de crecimiento varía entre 5.5-8.5 (Layton, 2001). Su característica particular es la formación de endosporas de forma ovalada y/o cilíndrica.

El género *Bacillus* fue nombrado en 1835 por Christian Gottfried Ehrenberg al observar unas bacterias en forma de bastón. Posteriormente en 1872, Ferdinand Cohn describe el ciclo de vida del género al observar la formación y liberación de las esporas cuando trabajaba con *B. subtilis* y *B. anthracis.*

En la década de 1940, Nathan R. Smith, Francis E. Clark y Ruth E. Gordon redefinieron al *Bacillus* como bacterias formadoras de endosporas en condición aeróbica y que son más resistentes que las células vegetativas. En 1940, Ruth Gordon dividió, por primera vez, el género *Bacillus* en cuatro grupos basados en el fenotipo de esporas (hinchado o no hinchado), la maduración de la espora (esférica, cilíndrica o elipsoidal), pruebas bioquímicas (catalasa, hidrólisis) y sus condiciones de crecimiento (pH, temperatura) (Zeigler *et al*., 2008).

Taxonómicamente, y de acuerdo con la segunda edición del Manual de Bergey (1982), el género *Bacillus* pertenece a la familia *Bacilliaceae*, Orden *Bacillales* de Clase tres *Bacilli*, PhylumBXIII y se reafirma en el Dominio de las bacterias. La diferenciación entre las especies de *Bacillus* se centra en la fermentación de lactosa, sorbitol, manitol, hidrólisis de urea y descarboxilación de lisina. El tamaño de las células de las diferentes especies de *Bacillus* tienen un rango de longitud de 0.2 mm x 1.2 mm (Zeigler *et al.,* 2008).

En 1991, Ash y colaboradores, utilizaron la tecnología de secuenciación molecular del ARNr 16S para examinar todas las especies de *Bacillus* conocidas hasta entonces, y concluyeron que hay cinco grupos distintos con una similitud de secuencia en el ARNr 16S.Reconstruyeron un árbol filogenético en el cual concluyeron que el género *Bacillus* agrupa una gran cantidad de taxones, principalmente en 16S y 23S (Ash *et al*, 1991). El género *Bacillus* tiene una gran diversidad de ribosomas 16S, por tal motivo Xu y Cote (2003), dividieron el género en 5 grupos, de acuerdo con su patogeneidad y hábitat: patógeno, benéfico, de suelo, acuático y halófilo. Actualmente, se conocen 266 especies de *Bacillus* de gran variedad de ambientes (Zeigler*et al*.,2008).

1.2 *Bacillus thuringiensis* (Bt)

Es una bacteria cuya longitud varía entre 3.0-5.0 µm y 1.0-1.2 µm de ancho; es aerobia estricta y se encuentra generalmente en suelo, es catalasa positiva, oxidasa negativa. Sin embargo, se han reportado casos de su existencia en agua, algunos granos y el ambiente en general. Bt tiene dos ciclos de vida: el crecimiento vegetativo y la fase de esporulación. Mediante serología del antígeno flagelar (H),Bt se clasifica en 84 serovares (Polanczyk, 2017; Moohamed, *et al*, 2010).

1.2.1 Breve historia del descubrimiento de Bacillus thuringiensis (Bt)

Bt fue aislado por primera vez en 1902, por el científico japonés Ishiwata, cuando estudió la causa de muertes en larvas de gusanos de seda. Ishiwata inicialmente nombró a esta bacteria como *Bacillus sotto*, por lo que esta enfermedad también se conoció como enfermedad de Soto (Polanczyk, 2017). Unos años más tarde, en 1911, el científico alemán, Ernst Berliner, aisló una cepa bacteriana en las larvas de la polilla muerta en la harina mediterránea, ubicada en un molino harinero en el estado alemán de Turingia. Por esta razón, Ernst nombró apropiadamente a este *Bacillus* como *B. thuringiensis* (Bt) (Zeigler *et al*.,2008).

1.2.2 Uso de *Bacillus thuringiensis* (Bt) en la agricultura

Las endosporas de Bt producen proteínas insecticidas llamadas Cry, que son específicas con espectro único de actividad. La actividad y la especificidad de las proteínas es determinada por la interacción entre la sección amino terminal y los receptores existentes en el lumen intestinal de los insectos (Morris and Bryce, 2000). Estas son tóxicas para diferentes ordenes de insectos, como: Coleoptera, Hymenoptera, Homoptera, Lepidoptera, y Orthoptera (Polanczyk, 2017).

El primer producto basado en toxinas Bt se comercializó en Francia en 1938, para el control biológico de las polillas. Más tarde, en 1958, los productos Bt estaban disponibles comercialmente en Estados Unidos y las primeras formulaciones de esporas eran producidas en masa. El uso de toxinas Bt es para el control de plagas agrícolas que se lleva a cabo por plantas modificadas genéticamente (Mohamed, et al.,2010).

1.3 Formación de la espora

Las endosporas son estructuras bacterianas producidas únicamente por los géneros *Bacillus, Clostridium* y *Sporosarcina.* Tienen la peculiaridad de ser extraordinariamente resistentes al estrés medioambiental. Estas mismas son las que confieren la patogenicidad a dichos géneros bacterianos y esto gracias a la complejidad de su estructura, que consta de varias capas (figura 1).

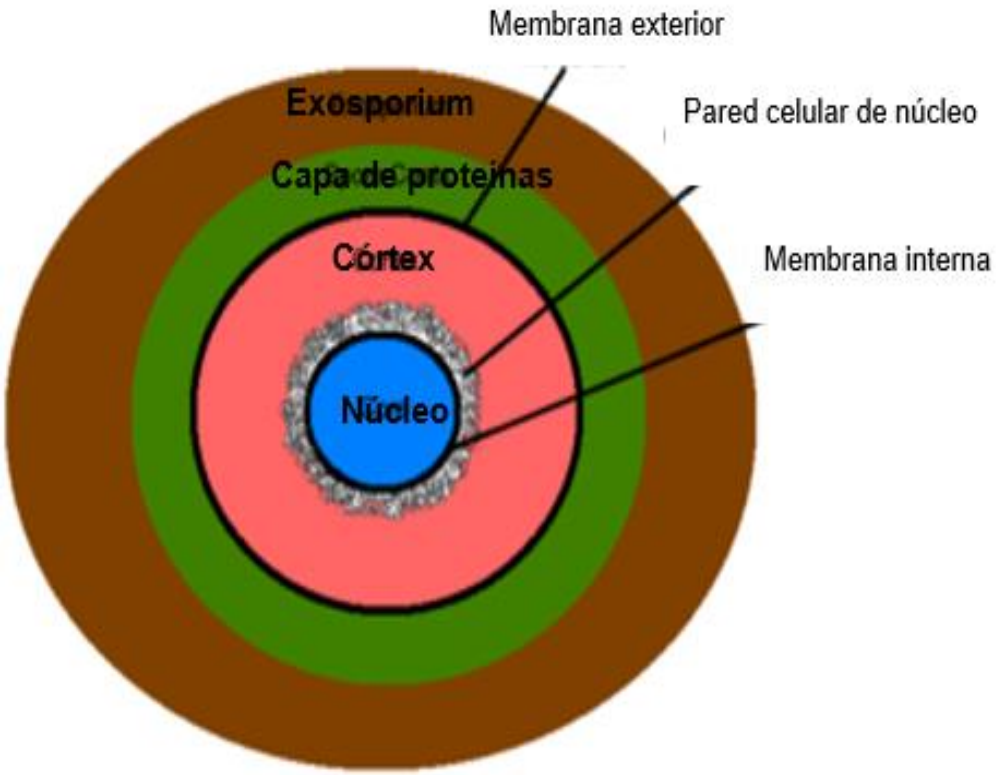


Figura1. Esquema de la estructura de la endospora (Tomado de Setlow,2014).

El núcleo de la endospora está rodeado por una membrana interna cubierta a su vez por una pared nuclear. La siguiente capa, es el córtex y es el que ocupa el mayor volumen en la endospora. El córtex, está conformado de peptidoglicano y está rodeado de una bicapa de fosfolípidos llamada membrana externa. El córtex está rodeado por una capa compuesta por más de 50 proteínas diferentes. Por último, la espora está recubierta por una capa delgada de proteínas denominada *exosporium* (Sansinenea,2012).

Durante la fase de esporulación, Bt tiene la capacidad de formar cristales de proteína de endotoxina. El desarrollo de esporas y cristales comprende siete etapas distintas: (a) fase I: formación de filamentos axiales; (b) fase II - tabique de la formación de la preforma; (c) fase III: cristales parapóricos y formación de esporas previas; (d) fases IV a VI: formación de exoesporas, pared celular primordial y transformación de los nucleósidos de esporas; y (e) fase VII - maduración de esporas y lisis celular. Esto se detalla en la figura 2 (Bulla *et al.,*1980, Ibrahim *et al*.,2010). Los cristales se sintetizan después de la etapa II de la esporulación y los acumulados en la célula pueden representar hasta el 25% del peso seco de las células esporuladas (Ibrahim *et al*., 2010).

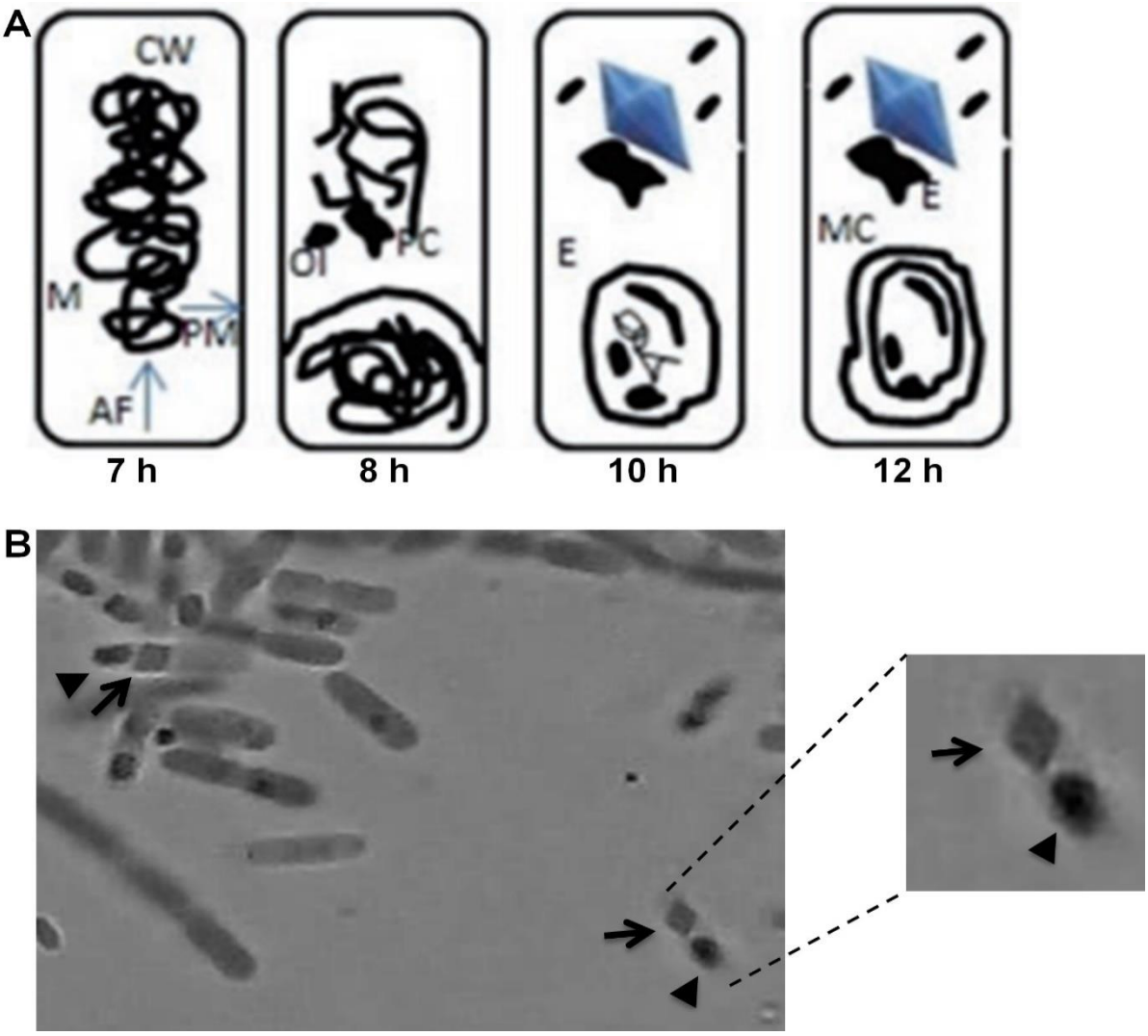


Figura 2. A) Diagrama Esquemático ilustrativo de la esporulación en Bt: (M) mesosoma, pared celular (CW), membrana plasmática (PM), filamento axial (AF), cristal parapente bipiramidal (PC), exospora (E), espora (S). B) Microscopía de Bt a 100X, los cristales están marcados con flechas negras y señalan la morfología del cristal proteínico, las esporas son señaladas con triángulos (Modificado de Bulla *et al.,* 1980*)*.

1.4 Proteínas Cry

La definición de proteínas Cry, agrupa a cualquier proteína paraesporal de Bt que muestre un efecto tóxico hacia algún organismo, verificable por medio de bioensayos; o bien, cualquier proteína que muestre similitud con las proteínas Cry. El cristal proteínico está constituido por proteínas Cry, las cuales son activadas por acción proteolítica y se denominan δ-endotoxina. Estos cristales pueden presentar distintas morfologías y pueden clasificarse en bipiramidales, cúbicos, cuadrados aplanados, esféricos y otras formas atípicas menos frecuentes (Khetan,2001). Los genes Cry poseenuna secuencia codificante de entre 1900 pb y unos 3600 pb. Existen 376 genes Cry distintos que se clasificaron en base a la similitud de secuencias en 54 grupos divididos en diferentes clases y subclases (Khetan,2001).

Las proteínas que codifican presentan una identidad aminoacídica que puede variar desde más de un 90% hasta menos de un 20%, y el intervalo de masas moleculares oscila entre 50 y 140 kDa. Estas proteínas se clasifican en 50 grupos y varios subgrupos, dependiendo de la estructura, la forma y la especificidad del huésped (Ibrahim *et al*., 2010).

Los genes Cry codifican proteínas de aproximadamente130 kDa que se agrupan durante la esporulación en inclusiones cristalinas bipiramidales. Estas se solubilizan en las condiciones alcalinas del intestino medio del insecto y se activan por proteólisis mediante proteasas asociadas al cristal o al intestino medio de la larva (Sauka & Benintende, 2008).

La gran mayoría de los genes Cry que se conocen pertenecen al grupo cry1, y son los más estudiados hasta ahora (Mario *et al.,* 2007). En 1998, se publicó una nueva nomenclatura, la cual clasificaba a las toxinas únicamente por su secuencia de aminoácidos. Por tal motivo, la gran mayoría de las proteínas estaban relacionadas y contenían hasta cinco dominios conservados. Se utilizó un sistema de nombres ligeramente modificado en el que cada toxina recibió un nombre que

incorpora cuatro niveles: El primer lugar, y en general, las toxinas que compartían al menos el 45% de identidad en su secuencia recibieron el mismo número. El segundo rango (“A”) se usó para distinguir secuencias que comparten entre 45% y 78% de identidad. Las que compartían entre 78% y 95% de identidad se distinguieron en el nivel terciario (“a”). El rango final, cuaternario, se usó para distinguir diferencias (Polanczyk, 2017). Posteriormente, en el 2003 y mediante un enfoque filogenético, se logró la clasificación de las proteínas Cry en tres grupos.

El grupo mayoritario de toxinas Cry se les conoce como la familia de tres-dominios, ya que están constituidas por tres dominios estructurales. Hasta la fecha, las estructuras terciarias de seis proteínas Cry de tres dominios diferentes, Cry1Aa, Cry2Aa, Cry3Aa, Cry3Bb, Cry4Aa y Cry4Ba se han determinado por cristalografía (Maagd, 2001).

La estructura terciaria del dominio N-terminal denominado dominio I es un conjunto de siete hélices α en las que la hélice-α5 central es hidrófoba y está rodeada por otras seis hélices anfipáticas; este dominio helicoidal es responsable de la inserción de la membrana y la formación de poros. El dominio II consiste en tres láminas beta antiparalelas con regiones de asa expuestas, y el dominio III es una lámina beta. Las regiones más expuestas en la estructura terciaria de la proteína son los dominios II y III, los cuales están implicadas en la unión al receptor (Palma *et al*.,2014).

Aunque la mayoría de las toxinas Cry del tipo de tres dominios se originan en *Bacillus thuringiensis*, se han encontrado homólogos en otras especies de bacterias con el advenimiento de la secuenciación de próxima generación, la posibilidad de encontrar genes de toxina Cry en otras bacterias aumentó. Por ejemplo, muchos genes Cry de tres dominios han sido anotados en GenBank de NCBI como originados de cepas de *Bacillus cereus.*

1.5 Mecanismo de acción de la proteína Cry como bioinsecticida

Los genes que codifican para las proteínas Cry, se han utilizado ampliamente en cultivos modificados genéticamente, estos cultivos transgénicos pueden producir cristales de Bt que se vuelven resistentes a los insectos. Las proteínas Cry no representan ningún riesgo toxicológico potencial para los humanos cuando se consumen a los cultivos transgénicos. Las moléculas receptoras que sirven como dianas para las proteínas Cry son las Cadherinas que se encuentran en el intestino medio de los insectos y en las células humanas como cadherinas-E. Estas caderinas son glicoproteínas transmembranales dependientes de calcio. La relevancia funcional de las caderinas, específicas del intestino medio en larvas de insectos, se manifiesta en su participación en el control del crecimiento, la división y la muerte celular a través de varias vías de señalización (Bravo, 2007).

Las caderinas que se unen a toxinas Cry de diferentes órdenes de insectos comparten una estructura compuesta de cuatro dominios: ectodominio (CE), un dominio de la membrana extracelular proximal (MPED), dominio transmembranal (TM) y un dominio citoplásmico (CYTO).

Hay varios modelos propuestos para explicar el modo de acción de las proteínas Cry. Uno de ellos explica que debe ser un proceso de varios pasos en el que debe haber un proceso de solubilización del cristal, procesamiento de las protoxinas, una unión al receptor, inserción en la membrana, agregación, formación de poros y, por último, citólisis. La figura 3 representa el mecanismo de acción. Otro modelo sugiere que el monómero de toxina podría unirse a un receptor de caderina y activar la transducción de señales dependiente de Mg^{2+}, una vía que conduce a la muerte celular (Bravo, 2007).

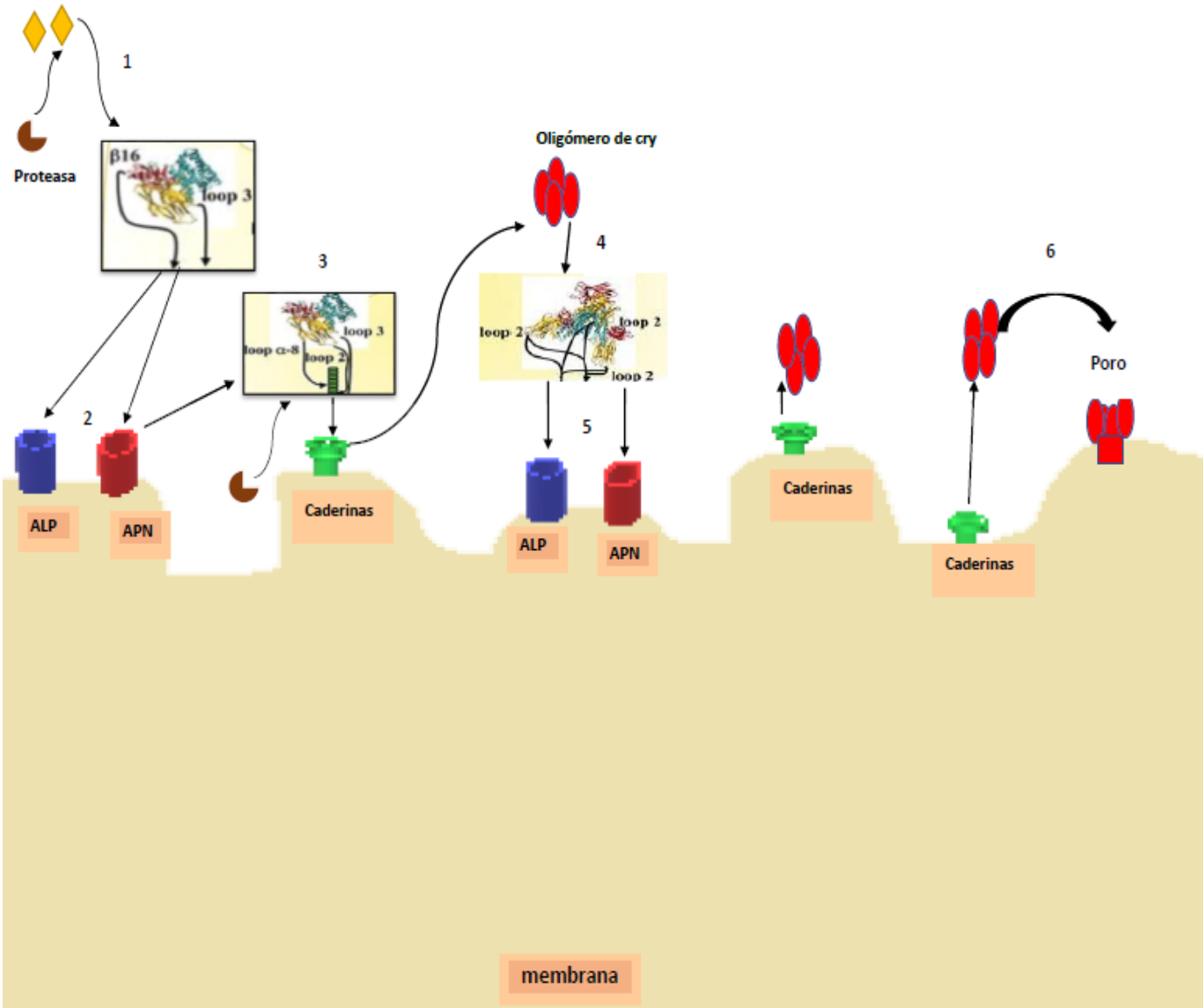


Figura 3. Esquema del mecanismo de acción de las proteínas Cry en lepidópteros. 1) la larva ingiere la proteína, es solubilizada en el lumen del intestino medio gracias al pH ácido y a condiciones de reducción y se activa por proteasas intestinales, generando el monómero de la toxina. 2) el monómero se une a los receptores ALP y APN con baja afinidad. 3) la toxina se une al receptor CAD y se induce le escisión proteolítica del extremo N- terminal. 4) la toxina es capaz de oligomerizarse en un oligómero de pre-poro de toxina. 5) la estructura oligomérica se une a los receptores ALP y APN con alta afinidad. 6) el pre-poro se inserta en la membrana causando la formación de poros.

2. Adyuvantes o inmunopotenciadores

2.1 Definición adyuvante

Las vacunas tradicionales derivadas de toxinas u organismos vivos atenuados o inactivados fueron eficaces para inducir predominantemente inmunidad basada en anticuerpos. Los adyuvantes (tomados del latín, "*Adjuvare*", que significa "ayudar") (Edelman *et al*., 1980), están diseñados para potenciar la respuesta inmunológica generada por la vacuna. Los adyuvantes fueron descritos originalmente como “sustancias usadas en combinación con un antígeno específico que producen una respuesta inmune más eficaz que el antígeno solo”, abarcando así una amplia gama de sustancias que pudieran servir y tener una función de adyuvante (Jennings, 1998).

2.2 Breve historia de los adyuvantes

Gastón Ramon, un veterinario francés, observó en el año 1923 que el rendimiento de los antisueros contra el tétanos y la difteria en los caballos fue mayor en los animales que desarrollaron un absceso en el sitio de inyección. Al inyectar almidón, pan rallado o tapioca, indujo la esterilidad de abscesos en el sitio de la inyección, y por lo tanto fue capaz de aumentar la producción de los antisueros. Posteriormente, en 1932, el aluminio fue utilizado en vacunas (British Society for Immunology,2011). La inmunización directa de la mayoría de los antígenos conduciría a una respuesta inmune pobre y a una eliminación rápida del antígeno del cuerpo. Para evitar esto, el antígeno primero se combina con un adyuvante. Al formar una emulsión estable entre el antígeno y el adyuvante, se permite una presentación sostenida del antígeno al sistema inmune y se retrasa la eliminación del antígeno del cuerpo.

Estos agentes pueden acelerar el desarrollo de la respuesta inmune contra el antígeno y, en última instancia, conducir a una respuesta adaptativa más fuerte de lo que de otro modo sería imposible. El adyuvante también debe proporcionar el beneficio adicional de permitir el uso de cantidades más pequeñas del antígeno (Di Pasquale,2015).

2.3 Adyuvantes: clasificación

Se han considerado muchas moléculas para su uso como adyuvantes. Los adyuvantes se han clasificado en dos grupos: 1) los que dirigen al antígeno a las células presentadoras de antígenos (APC) y 2) los tipos inmunoestimuladores que activan directamente dichas células a través de receptores específicos que producen respuestas inflamatorias amplificando la respuesta inmune innata (British Society for Immunology,2011). El objetivo final es activar el sistema inmune innato para responder más rápidamente a la infección y para que la respuesta inmune adaptativa sea más específica (Cárdenas-Vargas *et al.,* 2016). La tabla 1 muestra la clasificación de los adyuvantes más comunes usados en la medicina humana en base a su composición, basada en su composición de acuerdo con Coffman, Robert L. et al., 2010.

Tabla 1.

Clasificación actual de los adyuvantes basada en su composición de acuerdo con Coffman, Robert L. et al., 2010

Adyuvante	Composición
Basados en sales minerales 1.Aluminio 2.Fosfato de calcio	1.-Hidróxido de aluminio 1.-Fosfato de aluminio 2.-CaHPO4
Derivados de bacterias 1.CpG 2.Oligodesoxinucleótidos 3.(ODNs) 4.Monofosforíl lípido A (MPLA) 5.AS04	1.-ODNGs sintetizados que contienen motivos de CpG 3.-Derivados de LPS 4.- TLR4-agonista MPL, con sales de aluminio
Emulsiones 1.MF59 2.AS03 3.De Freud 4.Montanide 5.Adyuvante 65	1.- Emulsión aceite-agua (o/w) 2.-alfa-tocoferol y escualeno en emulsión aceite-agua (o/w) 3.-Emulsión agua-aceite (w/o) 4.-Emulsión agua-aceite (w/o) 5.- Emulsión agua-aceite (w/o)
Portadores 1.Liposomas 2.ISCOMS	1.-esferas lipídicas que contienen dentro suyo al antígeno 2.-partículas víricas de 30-40 nm y dodecaédricas compuestas de Quil A. lípidos y colesterol
Citocinas 1.GM-CSF, IL-2, IL-12, interferón tipo 1, IFN-γ	1.- Potenciales para inducir una respuesta inmune humoral
Adyuvantes de carbohidratos 1.QS21 2.Advax™ adjuvant	1.- Saponinas derivadas de una mezcla de glucósidos de triterpeno 2.- Un polisacárido cristalizado de una planta

2.4 Adyuvantes inmunoestimuladores más comunes

- Emulsiones: Los primeros diseños de emulsiones aplicables a vacunas fueron emulsiones de agua en aceite a base de un aceite mineral llamado adyuvante de Freund. La emulsión agua-aceite (w/o) viene en dos presentaciones: 1) el adyuvante completo de Freund (ACF) que contiene aceite mineral, emulsionante y 2) *Micobacterium tuberculosis* muertas porque suministra muramil-dipéptidos de la pared celular de las micobacterias, lo que permite una buena activación de macrófagos, que liberan la citoquina IL-1, que a su vez activa a los linfocitos TH. Además, el completo induce igualmente mejor los granulomas., y el adyuvante incompleto de Freund (IFA) que tiene la misma composición que CFA, pero sin bacterias (Salk *et al*.,1951). Se sabe que el aceite mineral utilizado en los adyuvantes de Freund tiene los siguientes tres mecanismos de acción específicos: (1) establecer un depósito de antígenos con liberación lenta de antígenos, (2) proporcionar un vehículo para el transporte de antígenos a través del sistema linfático a las células efectoras inmunes, y (3) interactuar con células presentadoras de antígenos, incluidos fagocitos, macrófagos y células dendríticas (Harold *et al*.,2005). En este último se descubrió que la inclusión de células micobacterianas aumentaba la respuesta humoral y era esencial para las reacciones de hipersensibilidad de tipo retardado. Con el descubrimiento de los receptores tipo Toll (TLR), el mecanismo del reconocimiento de las células micobacterianas y la respuesta inmune se comprende mejor. Tanto el TLR-2 como el TLR-4 son esenciales para el reconocimiento y respuesta inmune a las infecciones micobacterianas por macrófagos y células dendríticas. La activación de diferentes TLR conduce a diferentes respuestas celulares y de citoquinas, que alteran tanto la respuesta inmune humoral como celular. Los componentes micobacterianos en FCA tienden a producir una hipersensibilidad de tipo retardado más fuerte y sesgar la respuesta hacia un perfil Th1 (Harold *et al*., 2005). Los problemas de toxicidad que se han llegado a reportar han sido causados

por el aceite no biodegradable, los altos niveles de aceite en la emulsión (agua en aceite y mala calidad del aceite y / o emulsionante (Patel, 2015).

- AS03, una adyuvante propiedad de GlaxoSmithKline, ha sido muy utilizado para vacunas contra la influenza. Este se compone de escualeno, alfa tocoferol (vitamina E) y tween 80 en un buffer de fosfatos. El alfa tocoferol ha demostrado tener propiedades inmunoestimuladores cuyo mecanismo de acción se caracteriza por el reclutamiento de monocitos y granulocitos. En ensayos clínicos en los que el virus de la influenza H5N1 inactivado se usó como antígeno, la vacuna adyuvantada con AS03 indujo respuestas de anticuerpos altamente funcionales, células B de memoria y respuestas de células T $CD4^+$ e inmunidad de reacción cruzada a la combinación que presenta AS03, induce la activación de células del sistema inmune innato; los macrófagos son los probables iniciadores de la respuesta de citocinas como IL-6 y quimiocinas, potenciando el reclutamiento de CDs e incrementando la captación de antígenos (Fox *et al*.,2008).

- Sales de aluminio, también conocidas como sales de alumbre son de hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, y el sulfato fosfato de aluminio, estos componentes se han mezclado con una variedad de antígenos (Garçon *et al*.,2018). A pesar de usarse en una gran diversidad de vacunas, el mecanismo de acción de las sales minerales no está descrito de una manera exacta. Al inicio se creía que la formación de un absceso en el sitio de inmunización podría atraer una gran cantidad de células presentadoras de antígenos e incrementar la proliferación de linfocitos CD4 y mantener la isoclase de anticuerpos. Sin embargo, a la fecha se propuso otro mecanismo en el cual hay una activación del complejo Nalp3/NLRP3 y por consecuencia hay un incremento considerable de IL-1β, IL-8 (Serre *et al*.,2008). E inclusive se propone un incremento de las quimiocinas CCL2, CCL3, y CCL4 las cuales activan a los macrófagos (Jordan *et al.,*2004).

- MF59 está compuesto de escualeno, Span 85 y Tween 80 (ambos ofrecen mayor estabilidad a largo plazo) en tampón de citrato de sodio 10 mM a pH 6.5. y es capaz de generar anticuerpos muy específicos para un antígeno. Además, conduce a un aumento en la captación del antígeno, especialmente por los neutrófilos y los monocitos, y la translocación a los ganglios linfáticos drenantes (Atmar *et al*., 2006). En este mismo estudio, se realizó el análisis de los niveles y producción de IL-2,4y 6 la cual resultó positiva y en altos niveles (Ott *et al.,* 1995).

  En vía intramuscular se encontró que MF59 activa a los macrófagos residentes y las células musculares, creando un entorno de citoquinas y quimiocinas que se cree, promueve el reclutamiento de granulocitos y la diferenciación de los monocitos en DC.

- LPS (Lipopolisacarido es un compuesto derivado de la pared celular de las bacterias Gram negativas. Está formada por dos N acetil glucosamina fosforilada unida a seis o siete cadenas de ácido graso saturadas, en la cual se encuentra el núcleo y el antígeno O). El LPS interacciona directamente sobre el receptor TLR4, el cual activa la vía MyD88 e induce la secreción de citocinas TNF-α, IL-1β, IL-6, IL-10, e IL-15, así como quimiocinas (Kirschining CJ *et al.,*1998, Van Maele *et al*.,2010). Las vacunas donde se ha empleado el LPS como adyuvante han sido para virus del papiloma y de la hepatitis B (Casella *et al*., 2008).

- MPL es un derivado del lípido A del compuesto LPS. El mecanismo exacto de esta adyuvante aún no se describe; sin embargo, se sabe que podría estar activando el TLR4 de las células presentadoras de antígeno y activar una cascada de señalización mediada por TRIF, la cual activará al factor transcripcional NFκB, por lo cual hay la expresión de citocinas TNFα, IL-12, IL-6, IL-1β, INFγ, y GMCSF (Mata Haro *et al*.,2007). A nivel humoral hay una inducción de una isoclase IgG1 e IgG4 (Sasaki *et al*., 1997).

- AS04 es la combinación de dos adyuvantes el MPL y sales de aluminio (Lawson *et al*., 2011). Al inmunizar una vacuna con el adyuvante AS04 el antígeno va a ser estabilizado y protegido por las sales de aluminio, además de permitir una activación de una respuesta inmune humoral de largo plazo debido a la presencia de MPL. Las vacunas contra el virus de la hepatitis B y VPH usan el adyuvante ASO4 (De Carvalo *et al*., 2010).
- Virosomas son pequeñas partículas que contiene proteínas virales incrustadas acompañadas de fosfolipidos. Las proteínas de membrana del virosoma son reconocidos por los macrófagos los cuales internalizan y endocitan a las proteínas para presentarlos en el complejo MHCII y activar linfocitos CD4. Sin embargo, el antígeno interno de origen bacteriano, viral o plasmídico, este es procesado y presentado en el complejo MHCI en el cual activa a linfocitos CD8 (Cárdenas *et al*., 2017). Se ha aprobado el uso de este adyuvante en las vacunas contra la hepatitis A e influenza HINI (Herzog *et al*.,2009).

2.5 Adyuvantes inmunopotenciadores naturales

Se ha prestado especial atención a los adyuvantes capaces de promover un tipo de respuesta inmune Th1, que se considera la mejor respuesta inmune protectora contra infecciones. Sin embargo, los adyuvantes más potentes de promoción de Th1 exhiben cierta toxicidad, lo que limita su uso clínico. Desde hace 30 años, se ha optado por el uso de adyuvantes naturales obtenidos de microorganismos (hongos, bacterias o parásitos), plantas y animales.

La clasificación de los adyuvantes naturales se basa en el origen, es decir, de dónde se extrajeron dichos compuestos. Por lo cual, encontramos que se clasifican en adyuvantes derivados de plantas, de hongos; organismos marinos e insectos. En la actualidad existen una gran variedad de compuestos usados como adyuvantes. Se han estudiado adyuvantes derivados de plantas como la saponina

o QS-21, los cuales inducen una respuesta Th1-Th2 y por tal motivo se han usado en contra del cáncer, sin embargo, estos productos producen granulomas en el huésped por lo cual no han sido aprobados.

Las citocinas involucradas en la activación de la respuesta inmune Th1 o Th2, han sido usadas como adyuvantes, para estimular la activación de la respuesta correcta y potenciarla con el antígeno que la acompaña. Algunas de las citocinas empleadas es el INF-α, el cual activa una respuesta inmune mediada por linfocitos CD8, además de incrementar la secreción de anticuerpos de largo plazo (Proietti *et al*.,2002). Sin embargo, algunas de ellas como la citocina IL-2, la cual regula la respuesta inmune tipo Th1, puede provocar efectos adversos como la hipotensión, e inclusive puede exacerbar la enfermedad por el incremento de la respuesta inmune (Medermoff *et al*.,2002). En la tabla 2 se resume la clasificación de los adyuvantes más utilizados.

Tabla 2.

Clasificación de los adyuvantes naturales

Tipo	***Descripción***
Derivados de plantas • Saponinas • Tomatinas • polisacáridos	Saponinas: glucósidos anfipáticos capaz de generar una respuesta Th1 frente a antígenos exógenos, así como una respuesta inflamatoria. Tomatinas: glicoalcaloide derivado del tomate. Induce el reclutamiento de células mononucleares. Polisacáridos: Inulina
Derivados de Hongos • *Cordycessinensis* • *Ganodermalucidum* • *Lentinusedodes*	Incremento en interleucinas 5, 4, 7, 12. Estimulan TNFa e INF gamma y potencializan la producción de citocinas. Activación de células B murinas.
Organismos Marinos • Esponja marina a-GalCer • Crustáceo quitosano	Esponja marina: compuesta por azúcares alfa y glicolípidos capaces de potenciar a las citocinas e INF gamma e IL4 Crustáceo quitosano: compuesto por glucosamina y N-acetil-D-glucosamina
Derivados de insectos • Artenpilina C • Ácido cafeíco • Ácido cinámico • Ácido felúrico • Flavonoides • triterpenos	En su mayoría logran generar una respuesta proinflamatoria y algunas IL.

3. Antecedentes Directos

3.1 Proteínas Cry como inmunopotenciadores naturales

Una estrategia utilizada en el diseño de vacunas para mejorar su inmunogenicidad incluye la administración conjunta de adyuvantes que estimulan y mejoran la inmunidad. Las proteínas Cry, se han descrito como posibles adyuvantes por su resistencia y estabilidad en ambientes altamente alcalinos. Por esta razón, varios grupos de investigación han estudiado el uso de proteínas Cry como adyuvantes potenciales (Moreno *et al*.,2018). El papel de las proteínas Cry como adyuvantes de vacunas se observó inicialmente con los trabajadores que manejaban bioinsecticidas, el estudio demostró que las proteínas Cry de Bt, aumentaron significativamente la cantidad de inmunoglobulinas IgG e IgE. A partir de esta observación, se comenzaron a estudiar las propiedades inmunogénicas de estas proteínas. Estos estudios comenzaron con la proteína Cry1Ac, la cual fue inmunizada por diferentes vías como la intragástrica, la intraperitoneal y la intranasal (Gutiérrez *et al*.,2000). Las dos últimas son las más eficientes debido a su capacidad para inducir un isotipo de anticuerpos IgA e IgG en un modelo murino, estos anticuerpos demostraron protección en modelos animales, cuando se infectaron con la bacteria *Brucella abortus* o con parásitos como *Naegleria floweri (*Rojas *et al*.,2004); *Plasmodium chadaubi, Plasmodium bergheiy Taenia crassiceps* (Gutierrez *et al*., 2000; Ibarra *et al*.,2014).

Cuando la proteína Cry1Ac se inmunizó junto con los extractos totales de la ameba *Naegleria floweri* de vida libre, se observó una protección del 100% en los animales contra el desarrollo de meningoencefalitis, sin embargo, cuando los animales se inmunizaron solamente con la proteína Cry1Ac, el 60% de los ratones infectados sobrevivieron (Rojas *et al*.,2004). En el caso de ratones inmunizados con Cry1Ac e infectados con *P. berghe*i, tenía la capacidad de inducir un aumento significativo en el isotipo de los anticuerpos IgG e IgM, así como a favorecer la expresión de las citocinas TGF-β e INF-γ. La respuesta inmune es capaz de disminuir la carga parasitaria en el modelo murino (Ibarra *et al*.,2014). Lo contrario,

ocurrió cuando los ratones se inmunizaron con la proteína Cry1Ac y los lisados totales de *T. crassiceps*, en los que solo se observó una protección del 40% en el modelo animal infectado experimentalmente y los ratones inmunizados solo con Cry1Ac no sobrevivieron (Rojas *et al*.,2004). Estos resultados demuestran que Cry1Ac sola no puede generar una respuesta inmune específica; sin embargo, cuando se usa en compañía de un antígeno en particular, potencia la respuesta inmune y puede funcionar como chaperona o adyuvante. Hasta ahora, el posible mecanismo inmunológico desarrollado por la proteína Cry1Ac no se conoce completamente, pero esta proteína es capaz de estimular en macrófagos la sobreexpresión de CD80 y CD86 de la glicoproteína de superficie, lo que estimula la secreción de TNF-α y las citocinas IL-6 para activar una respuesta inmune que permita la sobrevivencia de modelos animales contra algunas infecciones experimentales (Vázquez *et al*.,2000). La tabla 3 muestra un resumen de algunos trabajos realizados utilizando proteínas Cry como posible adyuvante y estudiando su capacidad inmunitaria.

Tabla 3.
Trabajos descritos con proteínas Cry1 A a,b y c

Proteína	Vía de administración	Resultado
Cry1Ac recombinante de Bt HD73	• Intraperitoneal • Intragástrica e intraperitoneal • Intranasal • Intranasal e intraperitoneal • Ensayos en línea celular RAW 264.7	❖ Propiedades inmunogénicas y adyuvantes. Potenciar la respuesta inmune contra antígenos coadministrados (toxina de cólera BSA) (Vázquez-Padrón,1999). ❖ Propiedades inmunogénicas y adyuvantes al potenciar la respuesta inmune contra antígenos coadministrados de la hepatitis B (HBsAg) y BSA (Vázquez *et al*.,1999). ❖ Induce anticuerpos IgM, IgG e IgA en suero, fluidos del intestino grueso e intestino delgado y aumentó el título de anticuerpos frente a polisacáridos neumocócicos (Moreno-Fierros *et al*., 2003, Moreno Fierros *et al*., 2000) ❖ Como adyuvante induce protección contra *Brucella abortus (G*González-González *et al*., 2015). ❖ Induce respuestas de células de anticuerpos significativas. Aumentó la activación de las células T y la producción de citocinas en el tejido linfoide asociado a nariz y los linfocitos de los conductos nasales (Rodríguez *et al*., 2010) ❖ Como adyuvante induce protección contra *Naegleria fowleri* (Rojas *et al*., 2004, Lavelle,2005). ❖ Se une a proteínas HSPs, vimentina, α-enolasa y actina. HSP 70 participa en la activación de macrófagos (Rubio *et a*l.,2017).
Cry1A, Cry1 Ab, Cry1Aa	Intranasal e intraperitoneal	Induce anticuerpos IgG e IgA en diferentes compartimentos mucosa les y en sangre (Guerrero *et al*., 2004).
tCry1Ab	Intraperitoneal	Es inmunogénica y puede inducir una respuesta inmune Th1 / Th2 mixta, con intensa producción de anticuerpos anti Cry1Ab IgG1 e IgG2a (Adel *et al*., 2011).

4.Objetivos

4.1 Objetivo general:

- Identificar el potencial inmunológico de la proteína Cry de *Bacillus thuringuiensis ser. Kurstaky* como posible adyuvante o inmunoestimulador.

4.2 Objetivos específicos:

- Obtener y purificar una proteína Cry nativa de *Bacillus thuringuiensis ser. Kurstaky.*
- Analizar *in silico* las características inmunológicas de la proteína Cry obtenida.
- Inmunizar un modelo murino para inducir una respuesta inmune.
- Identificar la respuesta inmune humoral generada por la inmunización.

5. Hipótesis

La proteína Cry obtenida tendrá el potencial de inducir una respuesta inmune humoral al inmunizarse de manera sola.

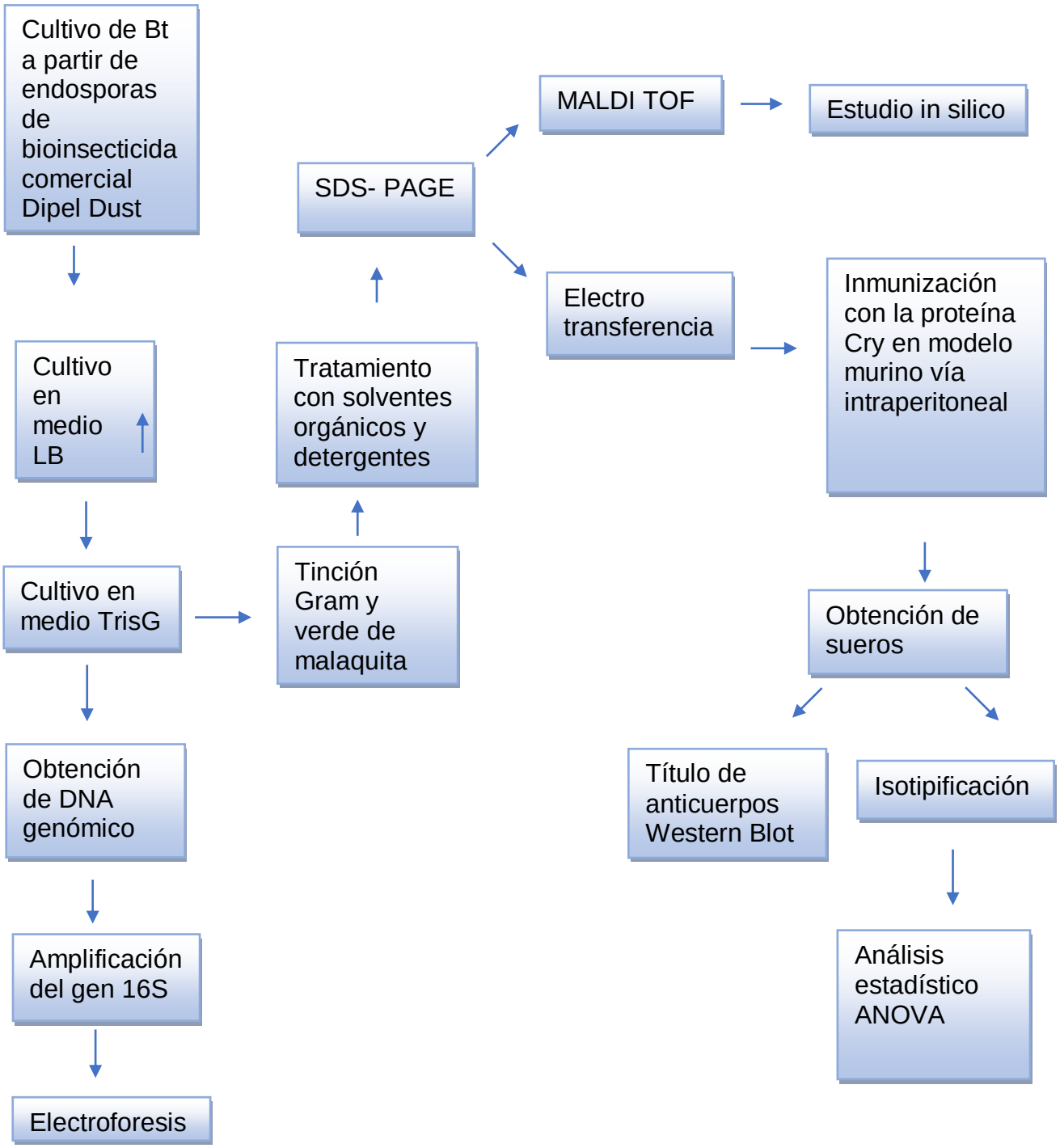
6. Justificación

El uso de adyuvantes vacunales permite que los antígenos vacunales sean exitosos al generar una respuesta inmune efectiva. Sin embargo, muchos de estos adyuvantes clásicos utilizados no solo generan una respuesta humoral y celular en el huésped si no que es conocido que muchos de estos pueden generan efectos colaterales. Desde hace una década se ha trabajado en la obtención de adyuvantes o inmunoestimuladores de nueva generación basados en macromoléculas como proteínas, lípidos o microorganismos. La desventaja de estos es que siguen en estudio y son costosos en su producción (Vázquez-Padrón *et al.,2000)*.

El uso de proteínas como inmunoestimuladores se ha propuesto como una alternativa nueva de uso en vacunas. Es por esto por lo que surge la necesidad de probar si la familia de proteínas Cry puede usarse como inmunoestimulador.

Capítulo 2. Materiales y métodos

2.1 Esquema general de trabajo



2.2 Crecimiento bacteriano

Se compró el bio insecticida comercial Dipel DUST, el cual contiene esporas y cristales tóxicos de *Bacillus thuringiensis serovar Kurstaky*. Se pesó 2.0 gr. del bio insecticida, y se inoculó un matraz que contenía 15 mL de caldo Luria Bertani con glucosa para estimular el crecimiento de bacterias. El matraz se mantuvo en agitación constante a 28 ºC y se monitoreó durante 48 horas, hasta que presentó la mayor turbidez posible. Posteriormente, se realizó la tinción de Gram de *B. thuringiensis* para corroborar el morfotipo de la cepa.

2.3 Tinción Gram

Se colocaron 20 µL de agua tridestilada estéril (PISA) en un portaobjetos limpio, para tomar una asada de la placa con medio LB de bacterias de Bt y homogenizar la muestra con agua para, realizar un frotis. Las bacterias fueron fijadas por calor y se adicionó cristal violeta por un minuto, se lavaron las bacterias con agua a flujo constante y se eliminó el exceso de colorante con papel absorbente. A la tinción se le adiciono una gota de Lugol por 30 segundos, se lavó y se adicionó una gota de alcohol-cetona por 15 segundos, y nuevamente se lavó. Por último, se adicionó safranina y se dejó por un minuto, se lavó con agua corriente; para observar la preparación en el microscopio óptico (MOTIC mod.BA210) y en contraste de fases (VELAB VE-370) con objetivo de 100X.

2.4 Tinción con verde de malaquita

La tinción con verde de malaquita es una coloración diferencial que permite observar esporas, células vegetativas y cristales al teñir las células que aún se encuentran en fase vegetativa. Para ello, se adicionó 20 µL de agua tridestilada estéril (PISA) en el centro de un portaobjetos, se tomó una asada de un cultivo bacteriano en medio Tris G y se realizó un frotis horizontal. Posteriormente, se adicionaron dos gotas de colorante verde de malaquita y se pasó por el fuego hasta observar emisión de vapores, para fijar. Se retiró el exceso de colorante con agua destilada. Se adicionaron dos gotas de Safranina. Se dejó reposar un

minuto, se enjuagó y se dejó secar. Finalmente, se observó la muestra en el microscopio (VELAB VE-370) a 100X.

2.4 Obtención de esporas de Bt

Una vez corroborada el morfotipo bacteriana, la cepa de *Bacillus thuringiensis* fue resembrada en una placa con medio Tris G (Rojas *et al.,* 2010) y caldo TrisG en un matraz de 50 mL. Este medio permite la estimulación del proceso de esporulación debido a las altas concentraciones de sales y una cantidad limitada de nutrientes [1ml $CaCl_2$, 1 mL $(NH_4)_2SO_4$, 1 mL de Glucosa al 20%, 5 ml Tris 1M pH 7.5, 0.15 g de extracto de levadura, 1 ml K_2HPO_4 al 5% y 1 mL Sales Tris G ($CaCl_2$, $FeSO_4$, $CuSO_4$, ZnSO, $MnSO_4$, $MgSO_4$)].

2.5 Obtención de ADN por el método de Fenol-Cloroformo para *Bacillus* sp.

Para la extracción del ADN se siguió la metodología de extracción de DNA por el método de fenol-cloroformo. Se tomó una asada de la placa con TrisG y se inoculó un tubo cónico de propileno con 5 mL de caldo LB. Se incubó a 28 ºC por 12 hrs. Se empastillaron las bacterias mediante centrifugación a 8000 rpm por 5 min. A la pastilla bacteriana se le adicionaron 200 µL de buffer de lisis (50 mM de Tris HCl, 50 mM EDTA pH 8, 1 % de SDS y 50 mM de NaCl) se agitó en vórtex hasta que la pastilla se disgregará. Se adicionó lisozima con ayuda de un palillo estéril, se incubó a 37ºC por 10 minutos. Posteriormente se agregaron 2 µL de sarcosil al 20% y se homogeneizó por inversión suave. Se centrifugó a 1100 rpm por 10 minutos. Se obtuvo la fase acuosa a la cual se le adicionó 1 volumen de fenol-cloroformo isoamlílico, se mezcló por inversión suave hasta homogeneizar; se centrifugó a 1100 rpm por 10 minutos.

Se tomó la fase acuosa y se adicionó un volumen de cloroformo. Se realizó agitación fuerte con ayuda del vórtex y se centrifugó a 1100 rpm por 10 minutos. Este paso se repitió dos veces más. Se adicionó un volumen de etanol absoluto frio y un volumen de acetato de sodio 3M pH 7 y se homogenizó por inversión suave. Se precipitó a -20 ºC por 12 hrs. Pasado el tiempo, se centrifugó a 1100

rpm por 10 minutos y se decantó el sobrenadante. Se adicionaron 200 µL de etanol al 70%, se mezclaron por inversión suave. Se centrifugó a 1100 rpm por 10 minutos y se decantó el sobrenadante. Una vez eliminados los residuos de etanol, se resuspendió el ADN purificado en 50 µL de agua tridestilada estéril.

Para corroborar la obtención y calidad del ADN, la muestra se cargó en un gel de agarosa al 1% y se corrió mediante electroforesis con TBE al 0.5X.

2.6 Amplificación del gen que codifica para el ARNr 16s

Se realizó la amplificación del gen 16s utilizando los primers

TXBA1	5´AGAGTTTGATCATGGCTCA 3´	100nm	STD
TXBA101	5´AGGAGGTGATCCAACCGCA 3´	100nm	STD

Las condiciones de amplificación son las siguientes:

1.- Preparación del Mix para un volumen final de 25µL:

- 2µg de ADN genómico
- 0.1 µg de primer TXBA 101
- 0.1 µg de primer reverse TXBA 1
- 2.5 µL del buffer TAQ
- 2.5 µL de TAQ polimerasa
- 15.75 µL de agua destilada

Los primers utilizados fueron de acuerdo con lo reportado por Márquez, M. *et al*,2014.

Las condiciones de PCR para 30 ciclos:

- 95 ºC para 1.30 minutos
- 94 ºC para 30 segundos
- 54 ºC para 45 segundos
- 55 ºC para 2 minutos
- 72 ºC para 1 minuto

2.7 Electroforesis de los productos de PCR en gel de agarosa

Para corroborar la amplificación de los productos de PCR, las muestras se cargaron en un gel de agarosa al 1% y se corrieron mediante electroforesis con TBE al 0.5X a 90 V por 30 minutos.

2.8 Rompimiento de la espora y obtención de la proteína Cry

Para la obtención de la proteína Cry, se rompieron las esporas, siguiendo los métodos y técnicas de Rahbani y colaboradores (Jihane *et al*., 2014), con algunas modificaciones. A partir de un cultivo de 20 días en medio TrisG se empastillaron 5 mL en cuatro tubos eppendorf de 1.5 mL. Cada tubo se lavó dos veces con 500 µl de NaCl 1M. Se agita y se centrifuga a 1200 rpm por 5 minutos. Cada tubo se lavó con un detergente o una combinación diferente de detergentes para determinar cuál era el mejor tratamiento. En la tabla 4 se muestran las cantidades, concentraciones y combinaciones de los solventes y detergentes utilizados para romper la membrana de las esporas.

Tabla 4. Cantidades, concentraciones y combinaciones de los solventes y detergentes utilizados para romper la membrana de las esporas

No. De Tubo	Solvente	Detergente (s)
1	900 µL NaCl 1M	100 µL Tween 20%
2	900 µL NaCl 1M	100 µL SDS
3	800 µL NaCl 1M	100 µL Tween 20% + 100 µLSDS
4	800 µL NaCl 1M	200 µL Tween 20%

Una vez agregado el o los detergentes, se agitó ligeramente en vórtex y se precipitó mediante un spin a 13,000 rpm. Por último, se desechó el sobrenadante y se quedó con la pastilla de ADN. Este procedimiento se realizó dos veces. Se resuspendió la pastilla en 1 mL de PBS para quitar el exceso de detergente. Se agitó en un vórtex y se centrifugó.

Se agregaron 900 µL de PBS más 100 µL de Éter etílico. Se agitó en un vórtex y se dejó en hielo durante 10 minutos. Pasado este tiempo, se centrifugó por 2 minutos a 11000 rpm. Este procedimiento se realizó tres veces.

Se centrifugó a 6000 rpm durante 5 minutos. Al final se lavó la pastilla con 50 µL de agua destilada fría. Como paso final, se tiñó con verde de malaquita para determinar el grado de rompimiento de la espora.

2.9 SDS PAGE y MALDI TOF

Se realizó una electroforesis de proteínas SDS PAGE al 12%, se tiñó con azul de Comasie y se cortó la tercera banda con un peso aproximado de 60 a 75 kDa. El corrimiento, así como la extracción de la banda de la proteína se realizó en condiciones de estricta esterilidad. Una vez obtenida la banda se mandó al centro de proteómica del instituto de Biotecnología de la UNAM para una identificación de proteínas por el método MALDI TOF.

2.10 Inmunización en modelo murino hembra por vía intraperitoneal

Con el fin de evaluar la respuesta inmune se utilizaron ocho ratones BALB/c hembras, obtenidos de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, de dos meses de edad. Se inmunizaron por vía intraperitoneal, previamente se obtuvieron sueros pre inmunes de cada uno de los ratones.

Se dividieron en tres grupos. El primer grupo fueron dos controles positivos, uno inmunizado con 10 µL de PBS y el otro con 10 µL de ACF. El segundo grupo de tres ratones se inmunizaron con 10 µg de del macerado del gel SDS PAGE que contenía la proteína Cry. El tercer grupo inmunizado con el macerado del SDS PAGE más ACF en proporción 1:1.000.

2.11 Determinación de las isoclases de Inmunoglobulinas

Las isoclases de IgG (IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3) producidos se evaluaron por duplicado mediante el método de ELISA, utilizando el Kit: ISO2, de SIGMA®. Las placas se recubrieron con extracto total de las proteínas Cry (10 µg por pozo) en 20 µL de PBS (pH 7.5) dejándose a incubación a 4 ºC por 12 hrs. Posteriormente las placas se lavaron 3 veces con PBS-T al 0.05% y se adicionaron a cada pozo: 50 µL de un mix de los sueros obtenidos de los ratones en una dilución 1:1.000 y se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente (exceptuando los pozos blancos). Se decantó y se realizaron 3 lavados nuevamente. Se adicionaron 50 µL de PBS a los pozos blanco y 50 µL por pozo, de la dilución 1:1.000 en PBS, de las subclases de Igs. Se incubo durante 30 minutos a temperatura ambiente, se decanta y se dan 4 lavados. Se adicionaron 50 µL del anticuerpo IgG anti-mouse acoplado a peroxidasa de rábano (HRP), en dilución 1:5,000 con PBS, se incubó de 15 a 30 minutos a temperatura ambiente. Se decanta y dan 4 lavados. Por último, se adicionó 50 µL de 3,3 ', 5,5'-tetrametilbencidina (TMB) como sustrato, se incubó por 15 minutos a temperatura ambiente. La reacción se detiene con 50 µL de 0.05M H_2SO_4 (resultando en un color amarillo), la reacción se determinó a 450 nm en un lector de microplacas ELISA (lector BioTek ELx800™, BioTek Instruments, EE. UU.).

2.12 Electrotransferencia y western blot

Se realizó un SDS page del extracto total de proteína Cry. Una vez terminado, las proteínas del gel restante se electro transfirieron, a una membrana de nitrocelulosa a 80 V durante 1 hora manteniendo una temperatura de 4°C en el buffer de transferencia (Glicina 2.9 g, Tris base 5.8g, SDS .37g, 200mL de metanol pH 8.3). Al terminar se tiño la membrana con rojo de Ponceau y se lavó con agua tridestilada estéril hasta remover el colorante. Posteriormente la membrana se bloqueó con 50 mL de leche sin grasa al 4% (p/v) en PBS estéril, pH 7.5 durante 12 hrs a 4 ºC. Una vez esto, se realizaron 3 lavados con PBS-T 20 al 0.05% de 10 minutos cada uno y se cortó con un bisturí estéril en un total de 13 tiras.

Se realizó el western blot incubando las tiras durante 2 horas a 37°C con el anticuerpo policlonal anti-Cry en unadilución1:1000 en PBS. Luego se retiró el anticuerpo y se realizaron otros 3 lavados con PBS-T, pH 7.5, las membranas se incubaron con un anticuerpo secundario IgG anti-ratón acoplado a fosfatasa alcalina a una dilución 1:1000 durante 1 hora a 37ºC en PBS. Pasado el tiempo se retiró el segundo anticuerpo y se realizaron 3 lavados con PBS-T para remover el exceso del segundo anticuerpo. Se reveló con el sustrato NBT/BCIP durante 10 minutos.

2.13 Análisis *in silico* y bioinformático

Con el fin de localizar en la estructura de la proteína Cry2Aa las posibles regiones más inmunogénicas, se realizaron estudios bioinformáticos para detectar los epítopos para linfocitos B y para linfocitos T.

El programa BepiPred-2.0) Sequential B-cellEpitope Predictor (http://www.cbs.dtu.dk/services/BepiPred/), nos permitió conocer las secuencias más inmunogénicas para linfocitos B. El enlace a la página se muestra a continuación: http://www.cbs.dtu.dk/services/BepiPred/

Los programas NetCTL 1.2 (http://www.cbs.dtu.dk/services/NetCTL/) y NetMHCPan 4.0 server, (http://www.cbs.dtu.dk/services/NetMHCpan/) permitieron la predicción de epítopos para linfocitos T.

2.14 Análisis estadístico ANOVA

Las diferencias entre los grupos se determinaron mediante un análisis de varianza ANOVA. Así mismo se utilizó el método de Tukey en ANOVA para crear intervalos de confianza para todas las diferencias entre las medias de los niveles de los factores mientras controla la tasa de error por grupo en un nivel especificado. Se consideraron diferencias estadísticamente significativas cuando el valor de *P fue <0.05.

Capítulo 3. Resultados

3.1 Crecimiento bacteriano y obtención de la proteína Cry

La morfología colonial típica de Bt se muestra en las figuras 4 y 5. Las placas muestran la apariencia de vidrio esmerilado y bordes regulares.

Figura 4. Cepa de Bt sembrada en medio LB.

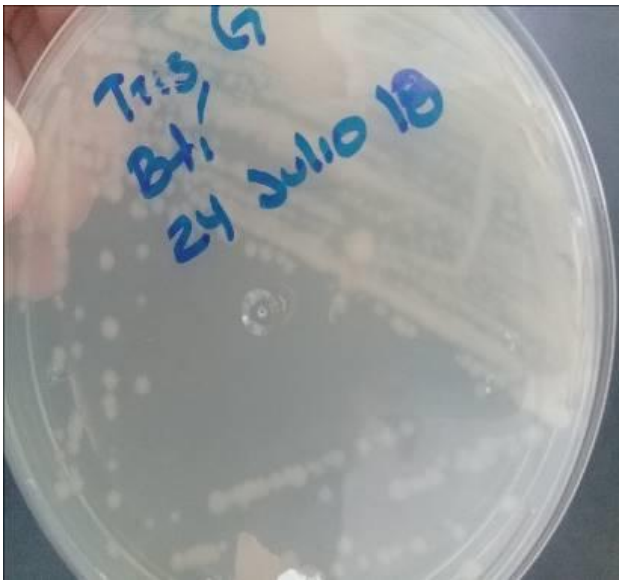


Figura 5. Cepa de Bt sembrada en medio trisG.

Las células vegetativas de *Bacillus thuringiensis* cultivadas en el medio LB fueron utilizadas para hacer tinción de Gram, con la finalidad de corroborar el morfotipo característico de la bacteria *B. thuringiensis* en forma de bastón (figura 6). La muestra se observó a microscopio óptico y de epiflurosencia 20 días después del sembrado (figura 7).

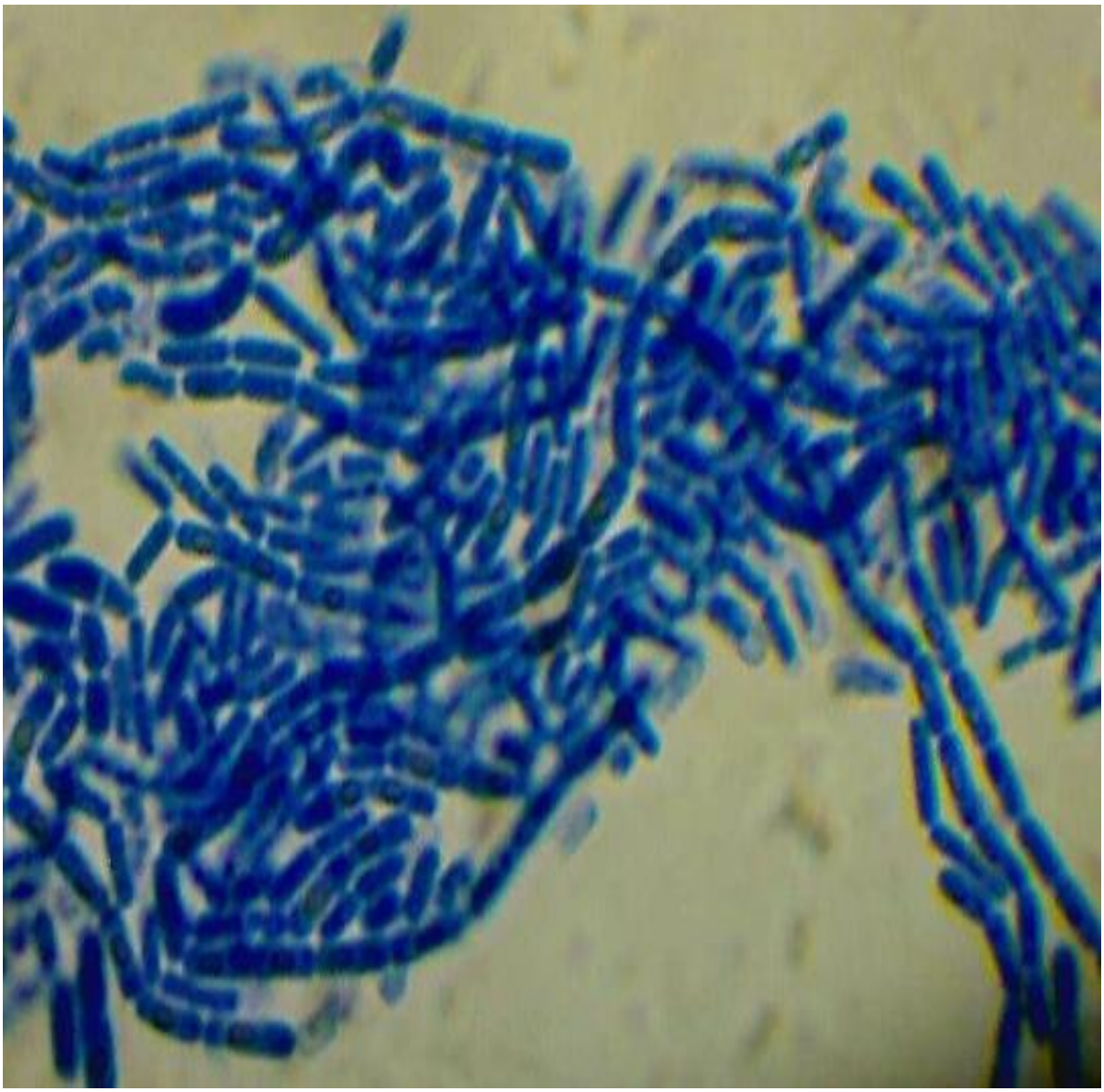


Figura 6. Células de Bt vistas a microscopio óptico a 100X.

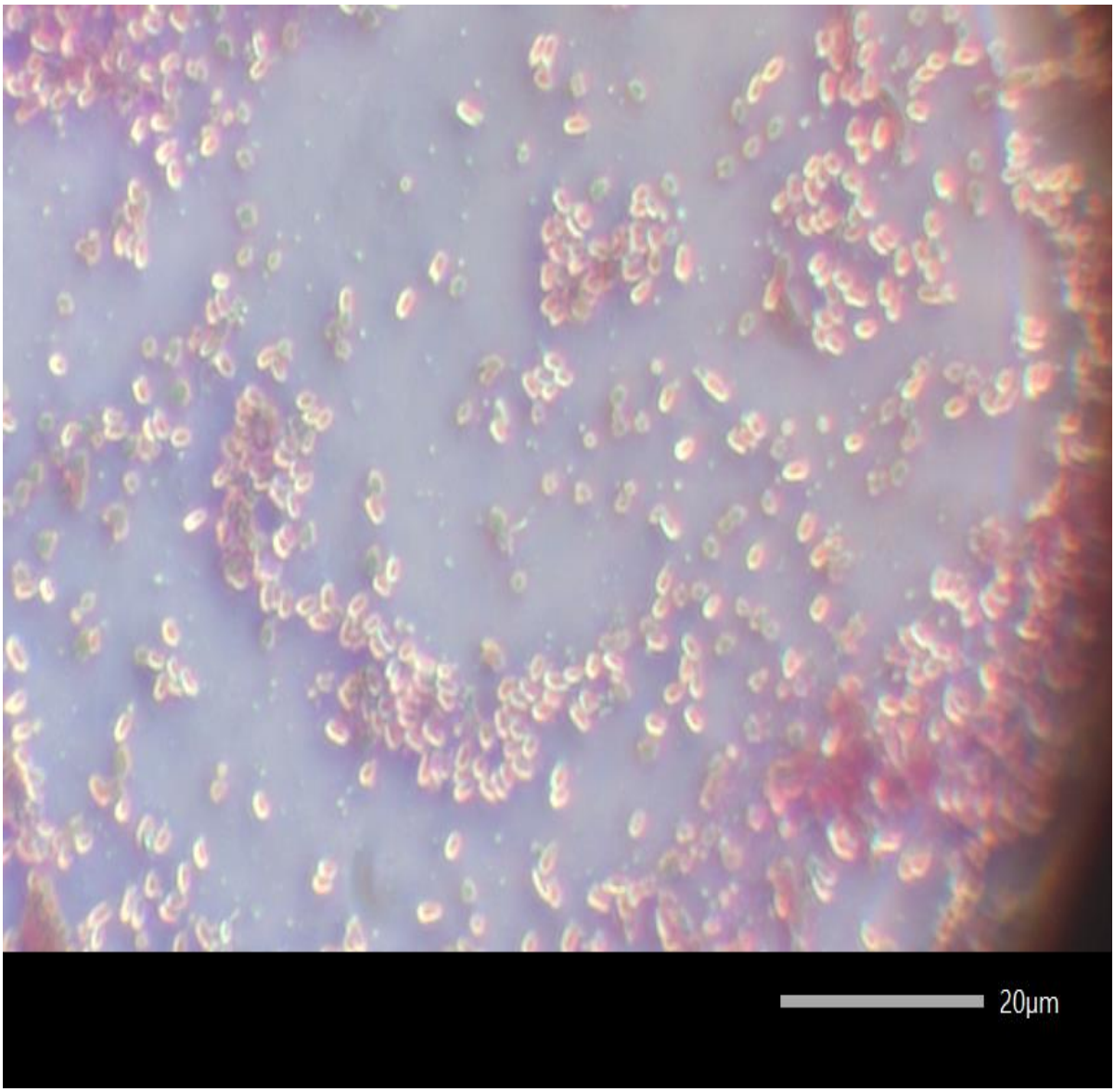


Figura 7. Células vegetativas de Bt con tinción Gram vistas a microscopio de epifluorescencia a 100X.

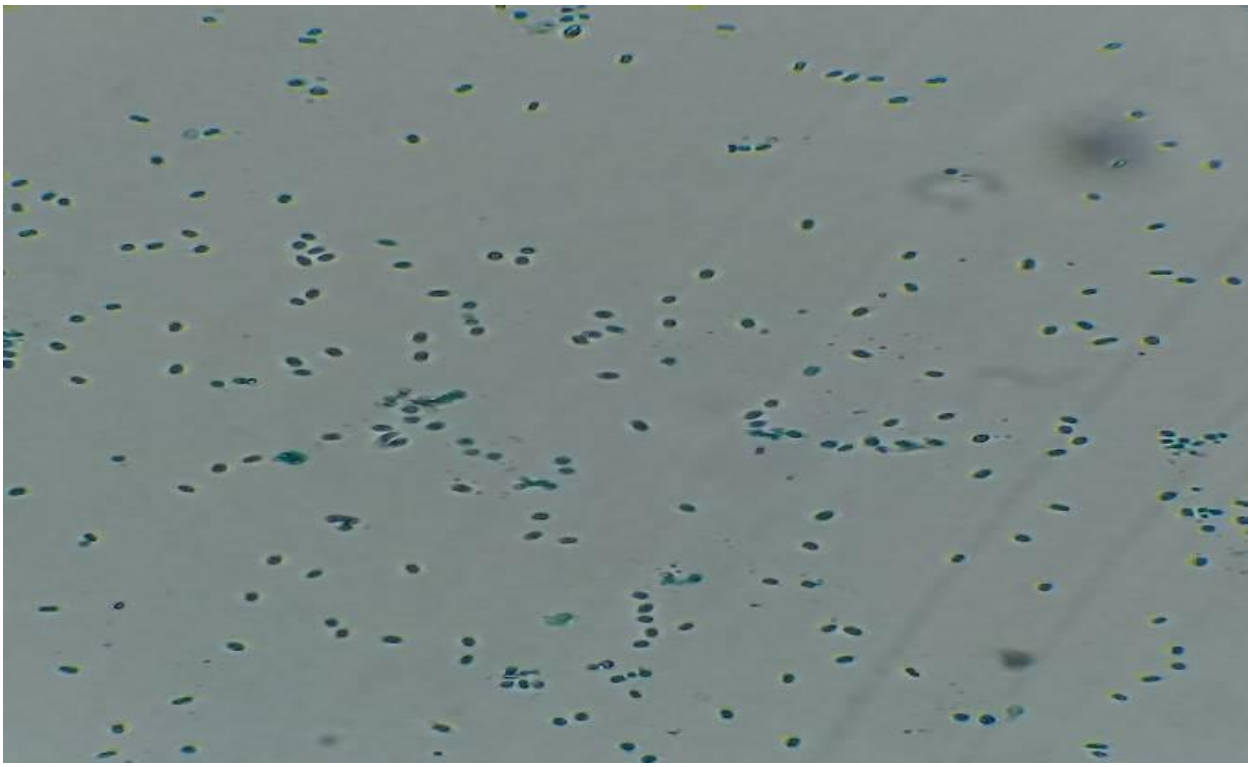


Figura 8. Células de Bt teñidas con verde de malaquita al microscopio óptico al 100X.

Las esporas de *Bacillus thuringiensis* fueron teñidas con verde de malaquita. Las esporas se tiñeron de verde, las células vegetativas rojas y los cristales son de color oscuro (figura 7 y 8).

3.2 Amplificación del gen que codifica para el ARNr 16s

Para confirmar la correcta amplificación se realizó una electroforesis en gel de agarosa. Los productos de PCR fueron migrados en un gel de agarosa al 1% esperando ver una banda de alrededor de 1000pb (figura 9).

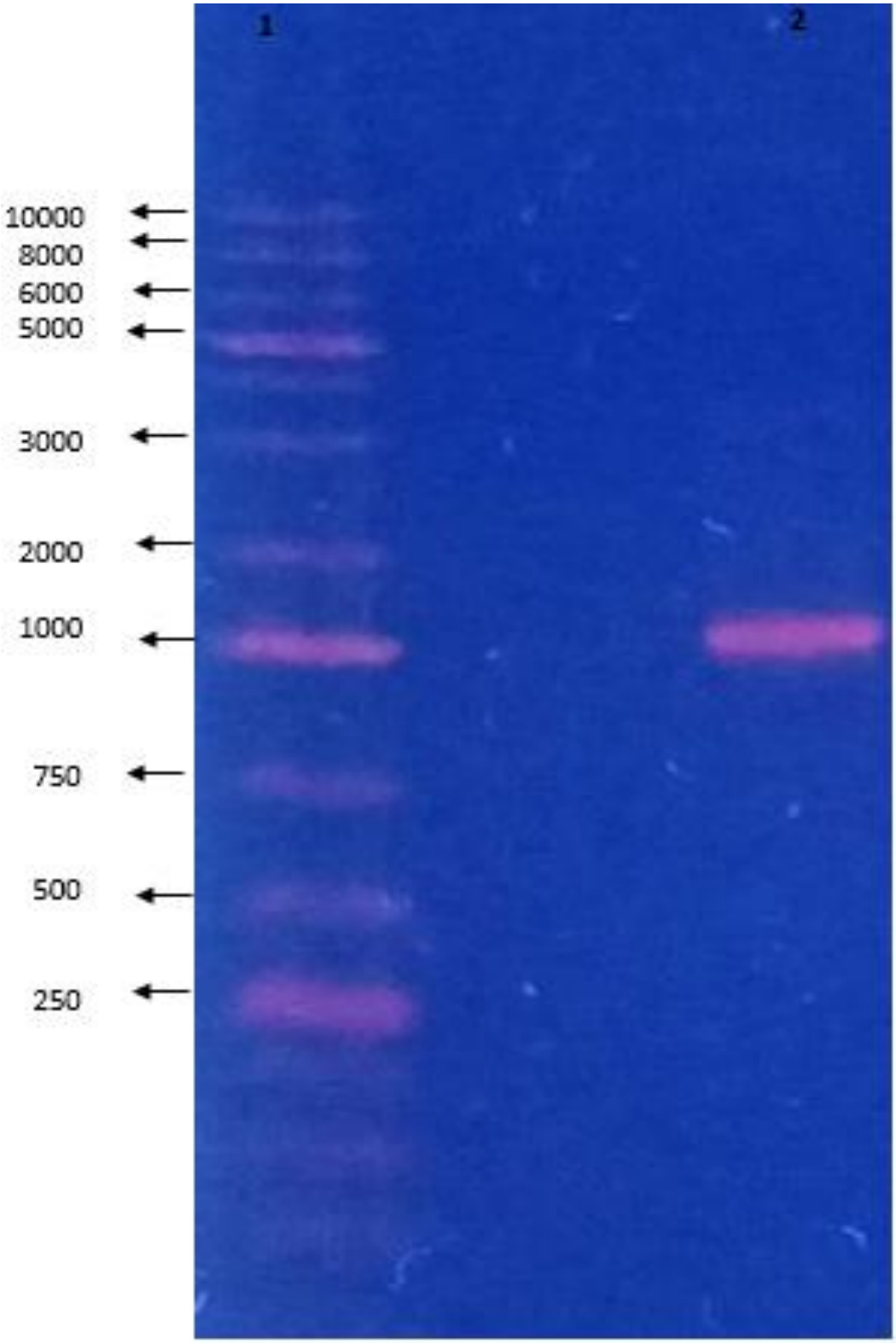


Figura 9. Gel de agarosa que muestra los productos amplificados del gen ARNr 16S. Carril 1 MPM, carril2 amplificación el gen ribosomal 16S.

3.3 Tratamiento para romper esporas

Se usó el protocolo descrito por Rahbani y colaboradores con algunas modificaciones para aumentar la eficiencia de extracción de las proteínas. La figura 10 muestra cuál de los detergentes resulta mejor. El uso de SDS al 1% fue el más efectivo, seguido del Tween-SDS y por último Tween 20% esto en base a que con el uso de SDS 1% tanto el carril del SDS PAGE muestra una banda nítida y en la tinción se logró apreciar mejor los cristales liberados.

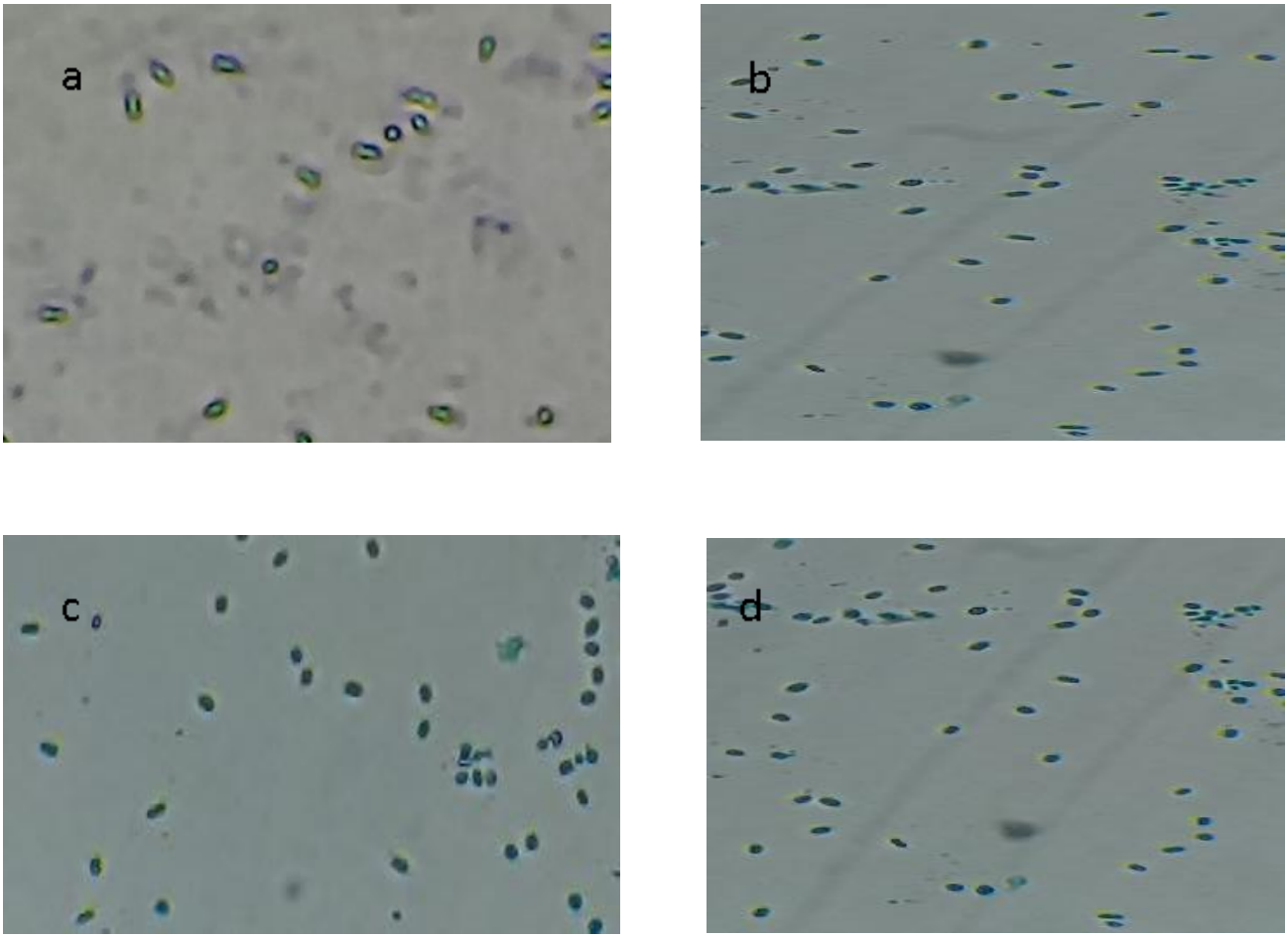


Figura 10: Tinción de las células de Bt con verde de malaquita posterior al tratamiento. a) Tween 20, b) SDS 1%, c) Tween-SDS, d) SDS 1%.

3.4 Efectividad del tratamiento e identificación de la Proteína Cry

El SDS PAGE nos mostró bandas de aproximadamente 66KDa que corresponde a las proteínas Cry de Bt (figura 11). Esto ayudó, además, a corroborar que el uso del SDS 1% resulta efectivo por la nitidez las bandas que correspondían al carril del tubo 1.

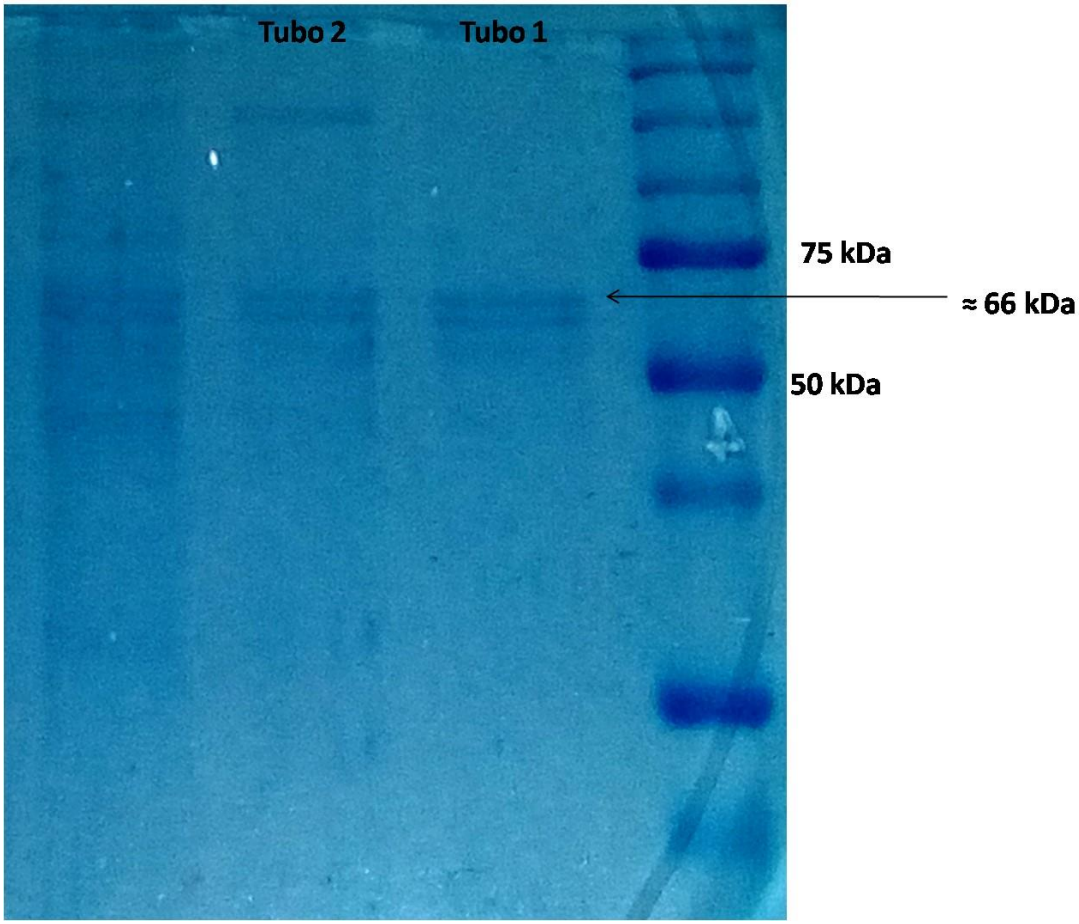


Figura 11. Gel “SDS-PAGE” de la proteína Cry obtenida.

3.5 Identificación de la proteína Cry por MALDI TOF

El resultado arrojado por la secuenciación MALDI TOF indicó que la proteína tenía un peso de 70 kDa y corresponde a una proteína Cry2 familia A subclase a.

CR2AA_BACTK (100%), 70,854.5 Da

Pesticidal crystal protein Cry2Aa OS=Bacillus thuringiensis subsp. kurstaki GN=cry2Aa PE=1 SV=1

2 exclusive unique peptides, 2 exclusive unique spectra, 8 total spectra, 25/633 amino acids (4% coverage)

```
MNNVLNSGRT TICDAYNVVA HDPFSFEHKS LDTIQKEWME WKRTDHSLYV APVVGTVSSF LLKKVGSLIG KRILSELWGI
IFPSGSTNLM QDILRETEQF LNQRLNTDTL ARVNAELIGL QANIREFNQQ VDNFLNPTQN PVPLSITSSV NTMQQLFLNR
LPQFQIQGYQ LLLLPLFAQA ANMHLSFIRD VILNADEWGI SAATLRTYRD YLRNYTRDYS NYCINTYQTA FRGLNTRLHD
MLEFRTYMFL NVFEYVSIWS LFKYQSLMVS SGANLYASGS GPQQTQSFTA QNWPFLYSLF QVNSNYILSG ISGTRLSITF
PNIGGLPGST TTHSLNSARV NYSGGVSSGL IGATNLNHNF NCSTVLPPLS TPFVRSWLDS GTDREGVATS TNWQTESFQT
TLSLRCGAFS ARGNSNYFPD YFIRNISGVP LVIRNEDLTR PLHYNQIRNI ESPSGTPGGA RAYLVSVHNR KNNIYAANEN
GTMIHLAPED YTGFTISPIH ATQVNNQTRT FISEKFGNQG DSLRFEQSNT TARYTLRGNG NSYNLYLRVS SIGNSTIRVT
INGRVYTVSN VNTTTNNDGV NDNGARFSDI NIGNIVASDN TNVTLDINVT LNSGTPFDLM NIMFVPTNLP PLY
```

Figura 12. Secuencia de la proteína analizada por MALDI TOF, mediante el espectrómetro de masas LTQ XL ETD.

3.6 Análisis in silico y bioinformático.

El programa BepiPred-2.0: Sequential B-cellEpitope Predictor nos permite la visualización de secuencias donde se encuentran epítopos de reconocimiento. El objetivo de compararlo con lo reportado para las proteínas Cry 1A es visualizar la similitud entre epítopos para predecir una respuesta celular. La presencia de epítopos para posibles linfocitos B y T podrían facilitar el realizar o no una inmunización. Los resultados indicaron que era posible, por lo cual se procedió a realizar la inmunización. La tabla 5 muestra dichas secuencias que se encuentran en la misma posición que la familia de cry1A para linfocitos B.

Tabla 5

Posibles epitopos para linfocitos B. resultado del programa BepiPred-2.0: Sequential B-cellEpitope

Secuencias	Posición
DAYNVVAHDPFSFEHKSLDT	13 al 33
KKVGSLIGKRI	63 al 73
YASGSGPQQTQSFTAQ	276 a 271
AQNWPFLY	290 a 297
FQTTLSLRCGAFSARGNSNYFPDYF	398 a 422
TRPLHYNQ	439 a 446
VYTVSNVNTT	565 a 574

Los programas NetCTL 1.2 y NetMHCPan 4.0 server muestran secuencias de la proteína Cry2Aa y los supertipos de linfocitos T y se eligieron aquellos cuya secuencia se repitiera de forma significativa en la secuencia. Estas secuencias se muestran en la tabla 6.

Tabla 6. Tabla de predicción posibles epítopos para linfocitos T

Epitopo	**SUPERTIPO**
FLLKKVGSL	A2, A3, B27, B8
LLLPLFFAQA	A2, B27, A24, B39, B44, B58
EWKRTDHSL	A24, B8, B27
FTAQNWPFL	A26, A1, B1, B39, A24, A58
APVVGTVSS	B7, B62, A3
YNVVAHDPF	B62, A24, B58
SQRLNTDTL	B62, B44, A3, A2, B39
FQIRGYQLL	B62, B8, B39, B44, B27, A24, A2
YSNYCINTY	B62, A26, A24, B58
RTYMFLNVF	B62, A26, A1, A3. B44, B39, B58
SLFQVNSNY	B62, A26, A1, A3, B39, A24, B44

Los sitios donde hay linfocitos tanto B como T como se muestran en las figuras 13 y 14 de acuerdo con lo arrojado por los programas NetCTL 1.2 y NetMHCPan 4.0 server.

Figura 13. Diagrama de listón para linfocitos T. En color azul se muestra la zona de acoplamiento para linfocitos T.

Figura 14. Diagrama de listón que indica la presencia de epítopos para linfocitos B. En rojo se indica la región de acoplamiento de linfocitos B.

3.7 Protocolo e inmunización en modelo murino hembra por vía intraperitoneal

En cuanto a los sangrados realizados, tres por cada cola (figura 15). En el primer periodo de sangrado se obtuvieron un aproximado de 300 µL de sangre y un promedio de 50 µL de suero pre inmune. Posteriormente en los últimos 3 sangrados se obtuvieron un promedio de 250µL de sangre y 40 µL de suero.

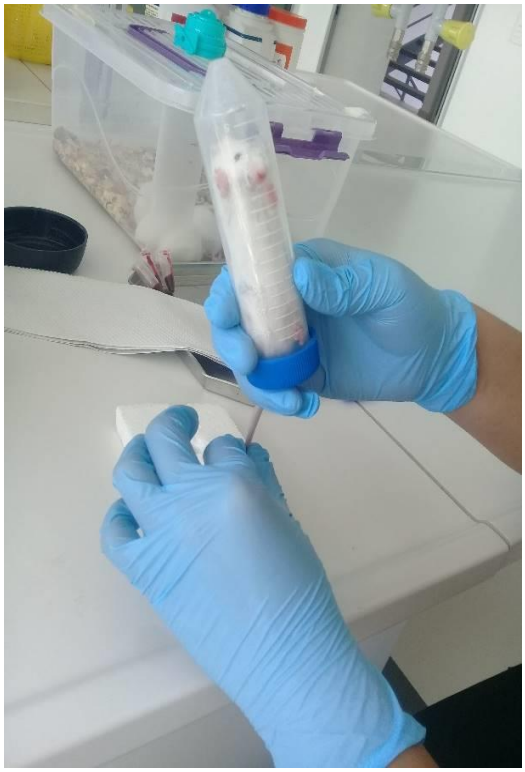


Figura 15. Sangrado del modelo.

Figura 16. Administración vía intraperitoneal en modelos murinos hembra BALB/c.

3.7 Determinación de las isoclases de inmunoglobulinas

Con el ensayo de ELISA (figura 17) se logró graficar los valores la DO de las distintas isoclases (grafica 1). En la tabla 7 se muestra el perfil de isoclases obtenidas de anticuerpos de mayor a menor concentración: **IgG2b>IgG2a>IgG3>IgG1**.

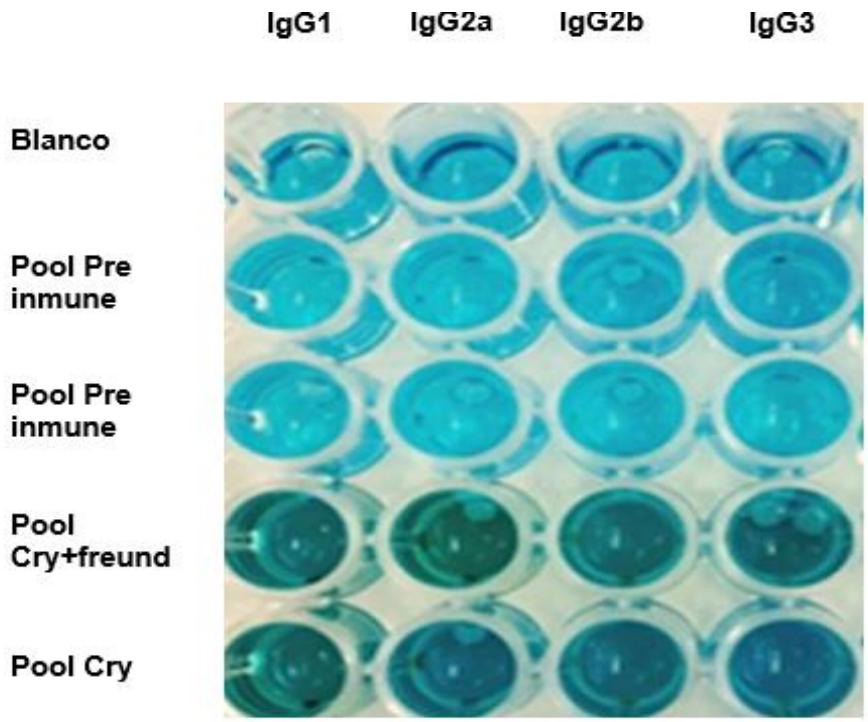
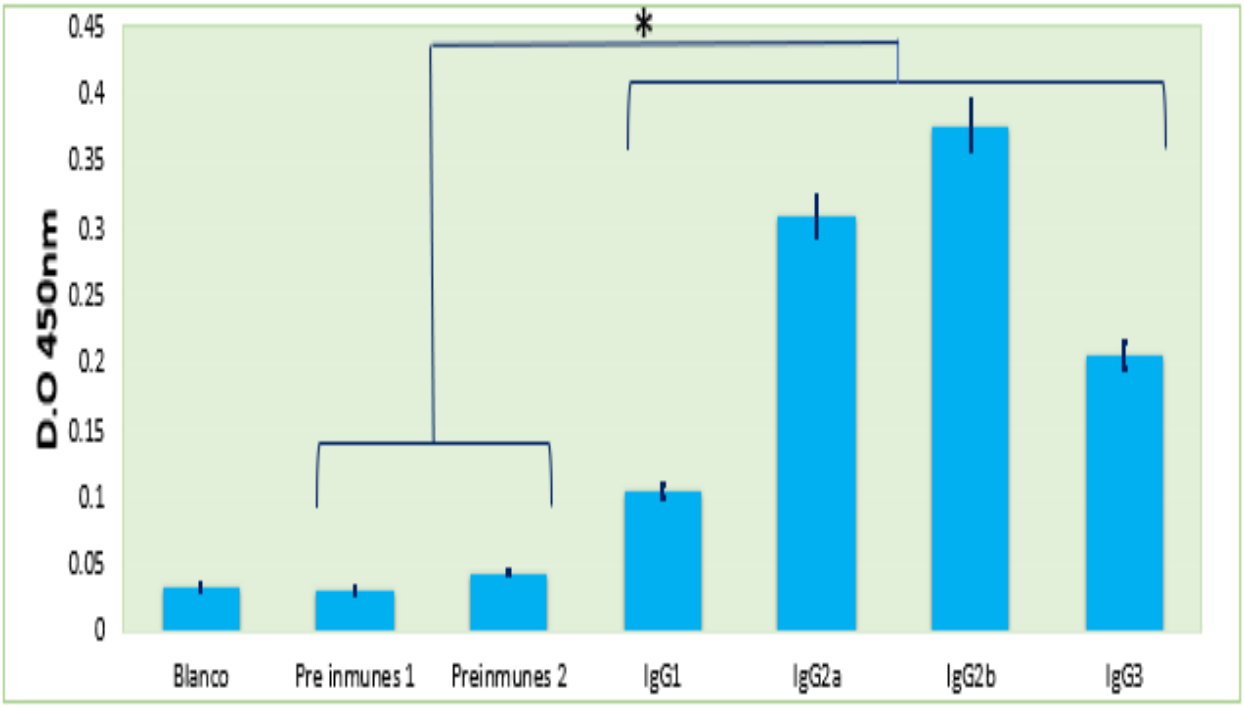


Figura 17. Isotipificación por ELISA.

Tabla 7. Valores de distintas isoclases

Blanco	Preinmunes Cry 2Aa	Pre inmunes Cry2Aa + ACF	IgG1	IgG2a	IgG2b	IgG3
0.033	0.031	0.044	0.105	0.309	0.376	0.298



Grafica 1. Evaluación de las distintas isoclases de anticuerpos mediante ELISA indirecto. La grafica presenta el promedio de tres experimentos independientes (n=12). Se encuentran diferencias estadísticamente significativas (*p<0.05) entre los sueros preinmunes y los sueros hiperinmunes (IgG´s).

3.8 Titulación de anticuerpos por Western Blot

Los sueros de los ratones inmunizados con la proteína Cry 2Aa macerada, así como los ratones inmunizados con la proteína Cry 2Aa más ACF, utilizados a una dilución de 1:5,000 en PBS, reconocieron a las proteínas Cry2aA de aproximadamente 70 kDa, no así los sueros preinmunes en cuya reacción no hubo un reconocimiento de ninguna proteína de extracto total (figura 18).

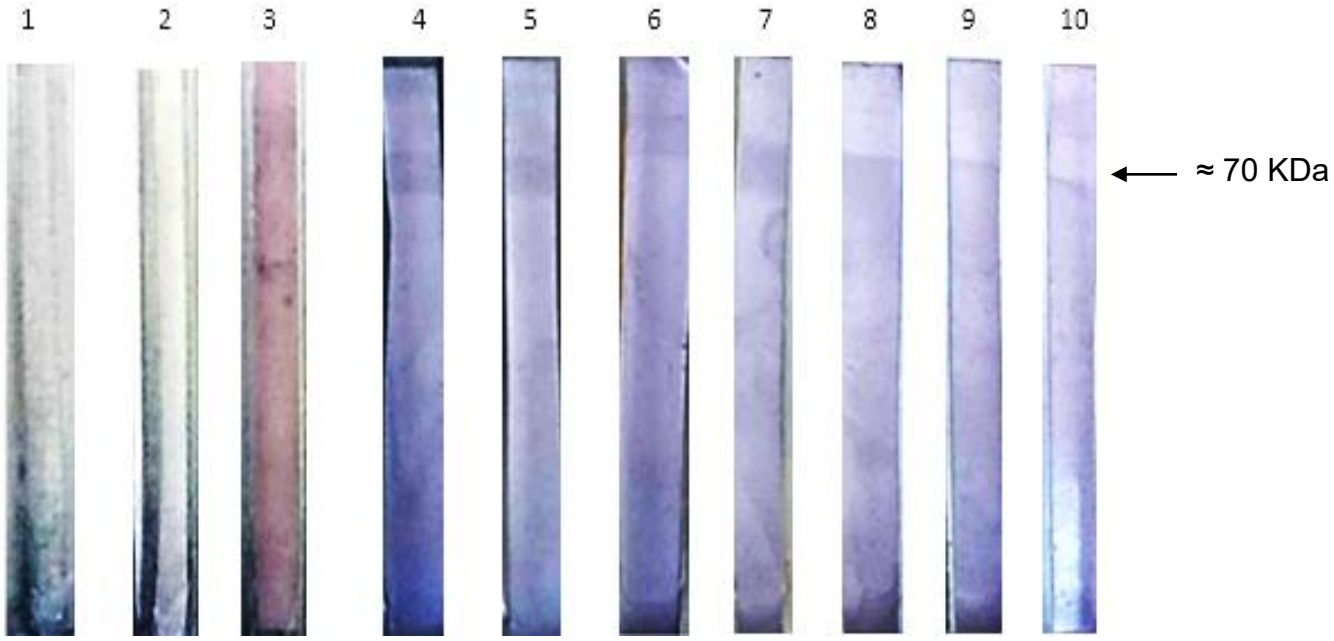


Figura 18. Western Blot con extracto de la proteína Cry2Aa como antígeno:
1) Pre inmune con Cry2Aa sin ACF, 2) Pre inmune con Cry2Aa con ACF, 3) PBS, 4-6) Extracto de proteína Cry2Aa, 7) ACF, 8-10) Extracto de proteína Cry2Aa más ACF.

3.9 Mecanismo inmunológico de las proteínas Cry

En este trabajo se propone un posible mecanismo de acción inmunológico para las proteínas Cry (figura 19). Las proteínas Cry al ser administrada vía intraperitoneal puede ser reconocida por los receptores TLR 4 de las células presentadoras de antígeno (APC), lo cual genera la expresión y secreción de la citocina IL 12, la cual ha sido clasificada como una citocina pro inflamatoria. Pequeños epítopos de la proteína Cry son expuestos en los complejos MHC II y MHC I de las APC, una vez presentadas en la membrana plasmática interactúan con los linfocitos T colaboradores (TCD4+) y los linfocitos T citotóxicos (TCD8+) respectivamente.

Esta interacción permite la activación de los linfocitos B y a su vez la secreción de IL 2 e IFN-γ mediada por la acción de los linfocitos T CD4 + lo que promueve la aparición de Los linfocitos CD4. La producción de IFN-γ induce la producción y secreción de IgG2, en las células plasmáticas.

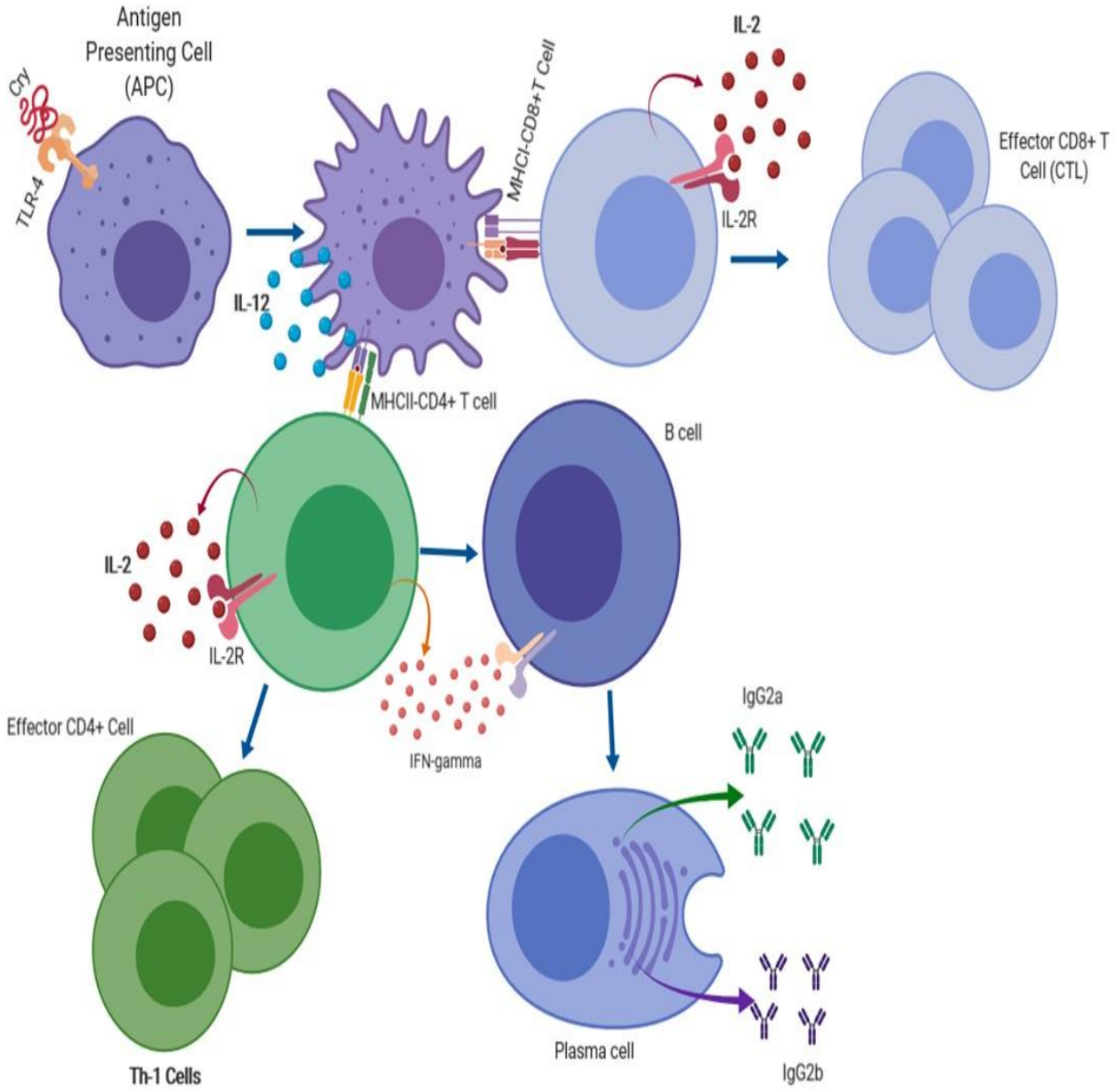


Figura 19. Mecanismo inmunológico de las proteínas Cry de *Bacillus thuringiensis*.

Capítulo 4. Discusión

Desde la década de los 80's se han reportado diversas metodologías para la obtención de la proteína Cry, en su mayoría basadas en gradientes de densidad o centrifugación con algún buffer alcalino, sin embargo, no son tan efectivas ya que las metodologías descritas en años recientes se basan en gradientes de azúcares como sacarosas y el más reciente en cromatografía en columna de carboximetil celulosa (Ito *et al.,* 2004; Rolle, 2013). Estas son parcialmente exitosas, sin embargo, pueden resultar complicadas y caras. Rahbani y colaboradores utilizan el medio Anderson, que consiste en el uso de dos fuentes de carbono, extracto de levadura y caldo nutritivo (Anderson,1999). Este medio es ideal para mantener a Bt por periodos largos de crecimiento y para volúmenes grandes que van desde los 5 a 7 litros. Debido al análisis de los diferentes medios de cultivo, se decidió utilizar Tris G, ya que el proceso de esporulación es más rápido y no se requerían grandes cantidades de proteína. Además, se utilizó PBS para aumentar las interacciones hidrofóbicas (Ito *et al*., 2004; Rolle, 2013).

Desde la década de los 90´s se ha trabajado en el estudio de la familia Cry a nivel inmunológico (Estibaliz, 2012). Debido a la falta de adyuvantes naturales de uso vacunal, ha surgido el interés en su uso como inmunógeno y/o adyuvante. Ya se han realizado algunos trabajos con la familia 1A; sin embargo, las rutas y el mecanismo de acción por el que es capaz de generar una respuesta inmune humoral y celular aún está en vías de ser estudiada.

A partir de un bioinsecticida comercial (Dipel Dust) se pudieron aislar células vegetativas, el bioinsecticida contiene esporas y cristales. Para confirmar dicho aislamiento fue necesario crecer a Bt en sólido y caldo LB, el cual no es un medio selectivo, pero si enriquecido y gracias a su fuente de carbono y de aminoácidos es que Bt tiene la capacidad de crecer. En contraste al medio TrisG el cual contiene una alta cantidad de sales por lo que Bt es sometida a estrés y por tal motivo induce la esporulación (Rojas *et al*, 2010). La esporulación es un mecanismo de supervivencia y de protección de los microorganismos cuando están sometidos a estrés ambiental o inducido, por lo que este medio favorece el proceso de esporulación (Ricca *et al*., 2004). Y por último para confirmar que el

aislado corresponde a una bacteria, se realizó la amplificación del gen que codifica para el ARNr 16S.

Los detergentes como SDS permiten la degradación de las glicopoteínas y /o proteínas (Gloxhuber *et al*.,1992) que rodean el núcleo y por ende el cristal proteínico. Una concentración de SDS al 1% es suficiente para degradar esas proteínas, pero no las Cry, ya que el uso de un solvente orgánico como el éter etílico minimiza el riesgo de degradación de los cristales por sus cualidades bioquímicas. Con los resultados obtenidos se comprobó la efectividad del tratamiento; sin embargo, tomando en cuenta las microscopias y las bandas del SDS PAGE el resultado es mejor con SDS al 1%.

Con la metodología antes descrita se obtuvo una concentración de proteínas suficiente para realizar un corrimiento electroforético, el cual permitió identificar una proteína de 70 kDa, la cual por peso podría ser una proteína Cry (Polanczyk, 2017). Para corroborar esto, se realizó una secuenciación de proteínas MALDI-TOF. El resultado demostró que era una proteína Cry 2Aa con un peso aproximado de 70 KDa.

La proteína Cry 2Aa comparte una homología del 17 al 20% con respecto a Cry1A, además, su segundo dominio (residuo 273-473) es una lámina beta de unión a receptor, por lo que podemos estipular que ese dominio es el encargado de unirse a los receptores de linfocitos T y B.

Una vez purificada e identificada la proteína, se realizó la inmunización con la proteína Cry2Aa macerada de SDS-PAGE y se administró a un modelo murino, el cual resulta ser una especie económica y de fácil manipulación, se le administró Cry2Aa por vía intraperitoneal. Esta vía de inmunización resulta muy conveniente puesto que genera una buena respuesta inmune, tanto humoral como celular, solo después inmunización vía intravenosa.

La proteína Cry2Aa al inmunizarse sola resulto ser un buen inmunógeno, esto debido a que la inmunogenicidad depende, en parte de cuatro propiedades del inmunógeno: alteridad (la capacidad de ser reconocida como ajena a el organismo hospedero), tamaño molecular (los inmunógenos más activos tienden a presentar masa molecular de 50000 a 100000 Da o más. Por lo regular, las sustancias con

masa molecular menor de 5000 a10000 Da, son antígenos deficientes inmunológicamente), composición y complejidad químicas, es decir la capacidad de ser procesado y presentado en el contexto del MHC en la superficie de una célula presentadora de antígeno. Las macromoléculas como proteínas, glicoproteínas, polisacáridos y otras, tienden a ser inmunogénicas *per se* (Kindt, Goldsby *et al*.,2007). La proteína Cry2Aa tiene un peso de 71KDa comparado con la familia 1A cuyo peso es de 120 KDa por lo que su rango de peso es el adecuado para generar una respuesta inmune; además de que es capaz de reconocida como ajena por la producción de anticuerpos y por la presencia de linfocitos T y B podemos afirmar que su complejidad y composición química es la adecuada.

Los trabajos reportados con la familia 1Aa, 1b y 1c demuestran que son capaces de generar anticuerpos del tipo IgM, IgA, activar macrófagos, inducir la secreción de algunas citocinas y activar una respuesta Th1 y Th2 (respuesta inmune humoral y celular) (Vázquez *et al.*,1999; Moreno-Fierros *et al*.,2003, Moreno-Fierros *et al*.,2000).

Ahora bien, de acuerdo con el isotipo generado por la proteína Cry2Aa IgG2b>IgG2a>IgG3>IgG1la familia de IgGs es la que se encuentra en mayor proporción en suero sanguíneo, por lo que es crítica al momento de generar una respuesta inmune. Es esta misma la que genera la activación de sistema de complemento. Las IgGs se producen por la acción de los Linfocitos B. Por lo regular, los epítopos para célula B se componen de aminoácidos hidrófilos en la superficie de la proteína que son accesibles. Las secuencias de aminoácidos, ocultas en el interior de una proteína, a menudo consisten en aminoácidos de predominio hidrófobo y no pueden funcionar como epítopos de célula B, a menos que se desnaturalice la proteína (Kindt, Goldsby *et al.,* 2007). La tercera secuencia muestra una zona rica en STNQ que son aminoácidos con esta característica y esta pertenece a la región del dominio II que es reportado como el dominio que se une a los receptores.

La expresión de estas isoclases (IgG2b>IgG2a>IgG3>IgG1) sugiere una respuesta mixta Th1/Th2, lo que indica una respuesta inmune humoral y celular,

este resultado es similar a los trabajos descritos con Cry1Ab detallan una respuesta tipoTh1/Th2 y alta producción de IgG2a (Adel *et al*.,2011).

Para complementar se realizó un estudio de posibles epítopos para linfocitos T citotóxicos o cooperadores. En la literatura los trabajos descritos para la proteína Cry1Aa muestran la presencia de $CD4^+$, sin embargo, el estudio en $CD8^+$ aún no se reporta. Al momento de realizar la inmunización los macrófagos presentan al antígeno a las células T a través de MHC II. Este complejo es reconocido por un TCR y este mismo reconoce una secuencia peptídica que, al poder inferir, sería el monómero de la Cry2Aa (Kindt, Goldsby *et al*.,2007).

Ahora bien, los Linfocitos T cooperadores ($CD4^+$) se encargan de iniciar la cascada de la respuesta inmune mediante la interacción con un complejo péptido-MHC-II. Cuando se activan, los linfocitos $CD4^+$ se diferencian, pudiendo secretar diferentes citocinas. Estas subpoblaciones celulares de citocinas son las Th1 y Th2. Th1 es capaz de inducir la producción de IL8, IL6 e IL12 activando la intervención de macrófagos. Por su parte Th2 segrega IL4 e IL5 e induce la activación de linfocitos B. (Kindt, Goldsby *et al*.,2007). Los resultados de este trabajo muestran estos posibles sitios donde se encuentran la interacción con Linfocitos T.

Se puede inferir que Cry2Aa genera una respuesta inmune eficiente y suficientemente atractiva como inmunoestimulador. Recordando que un buen inmunoestimulador o adyuvante debe cumplir con ciertas características para considerarse bueno como tal; alguna de ellas y que cumple esta proteína es la baja dosis en la que puede ser administrada y que sea rentable, alta producción de anticuerpos específicos genera una respuesta humoral y generar memoria inmunológica. Sin embargo, existen una gran cantidad de adyuvantes que se usan a nivel comercial o a nivel de investigación, incluso salen nuevos donde se propone un uso potencial, pero presentando algunas desventajas como el adyuvante completo de Freund el cual puede generar toxicidad en el hospedero.

Capítulo 5. Conclusiones

- La proteína Cry2Aa aislada de *Bacillus thuringiensis* serovar *Kurstaky* es un buen candidato para utilizarse como inmunoestimulador para vacunas.

- La isoclase generada en ratones inmunizados con el macerado de la proteína Cry 2Aa genera y estimula una respuesta inmunológica notable.

- El análisis *in silico* indica que Cry2Aa tendría epítopos predichos capaces de activar a linfocitos B y linfocitos T citotóxicos.

- Los epítopos para linfocitos B y T de la proteína Cry 2Aa son similares a los de las proteínas Cry 1Aa, b y c.

- Bt podría ser empleado como inmunoestimulador ya que muestra ciertas ventajas con respecto a otros adyuvantes. En la tabla 8 se comparan algunas de las ventajas y desventajas de la proteína frente a otros adyuvantes utilizados en la investigación y medicina.

Tabla 8. Ventajas y desventajas de Cry2Aa como inmunoestimulador frente a otros adyuvantes inmunoestimuladores

Adyuvante	Ventajas	Desventajas
ACF	Transporta los antígenos a través del sistema linfático a las células efectoras inmunes. Interactúa con células presentadoras de antígenos Liberación lenta de antígenos	producir una hipersensibilidad de tipo retardado Problemas de Toxicidad Altos niveles de aceite y de mala calidad
Sales de aluminio	Incremento considerable de IL-1β, IL-8 Activación de Células Th2 y Linfocitos B Estimula la respuesta NLRP3	El mecanismo de acción de las sales minerales no está descrito de una manera exacta. Suele generar granulomas cuando se administra vía subcutánea e intradérmica Ligeramente tóxico
MF59	Respuesta Th1 y Th2 Uso en dosis pequeñas Reclutamiento de Células dendríticas y macrófagos De fácil degradación	Obtención costosa
AS03	induce la llegada de macrófagos, lo cuales secretan citocinas e IL Dosis menores	Reacciones inflamatorias sostenidas Formación de granulomas y úlceras en el sitio de inyección
LPS	Estimula la producción de citocinas y quimocinas Células NK	Ligeramente Tóxico Se han reportado casos de choques sépticos en pacientes
Virosomas	Eficacia en personas inmucomprometidas	Costo elevado de producción

	Respuestas tipo Th1 y Th2 Estimula la presentación cruzada de antígenos Producción de Linfocitos B	
ISCOMS	Estimula a células TCD4+ T CD8+ Producción de IL e INF	Baja toxicidad Reacciones alergénicas
Cry2Aa	Podría inducir una respuesta celular tipo Th1 y Th2 Respuesta humoral: activación de macrófagos. Generación de IgG2b y 2a Posible estimulación de Citocinas como IL 8 y 6 Estimula la memoria inmunológica	Mecanismo de acción no estudiado Posible reacción alergénica La cantidad de administración puede variar dependiendo de la vía de administración En este trabajo, la proteína no es recombinante por lo que pudiera haber interferencias por parte de la acrilamida denle el SDS PAGE.

Perspectivas

- Obtener la proteína recombinante rCry 2Aa.
- Inmunizar la proteína rCry 2Aa a un modelo murino sin adyuvante de Freud por diferentes vías de inmunización.
- Caracterizar los anticuerpos y determinar las isoclase en el modelo inmunizado con la proteína rCry 2Aa sin adyuvante.
- Analizar el tipo de citocinas generadas al inmunizar con la proteína Cry2Aa sin adyuvante.
- Fusionar antígenos específicos con la proteína rCry 2Aa y evaluarla como inmunopotenciador.

Bibliografía

1. Adel-Patient, K., Guimaraes, V., Paris, A., Drumare, M., Ah-Leung, S., Lamourette, P., Nevers, M., Canlet, C., Molina, J., Bernard, H., Créminon, C., Jean-Michel Wal.(2011).Immunological and Metabolomic Impacts of Administration of Cry1Ab Protein and MON 810 Maize in Mouse. PLoS ONE 6(1) https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016346
2. Anderson, T. (2003). Effects of Carbon: Nitrogen Ratio and Oxygen on the Growth Kinetics of *Bacillus thuringiensis* and Yield of Bioinsecticidal Crystal Protein. The University of Western Ontario. Vol 17(3) 225-231.
3. Ash, C., Farrow, J., Wallbanks, S and M.D. Collins, M. (2008). Phylogenetic heterogeneity of the genus *Bacillus* revealed by comparative analysis of small-subunit-ribosomal RNA sequences. Letters in Applied Microbiology. Vol 13(4), 202–206.
4. Atmar, R., Keitel, W., Patel, M., Katz, J., She, D., Sahly, H., Pompey, J., Cate, T and Couch, R. (2006). Safety and Immunogenicity of Nonadjuvanted and MF59-Adjuvanted Influenza A/H9N2 Vaccine Preparations, Clinical Infectious Diseases, Vol 43 (9), 1135–1142.
5. Bravo, A. (2007). Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. Toxicon :Official Journal of the International *Society on Toxinology*, Vol 49(4), 423–435.
6. Bulla, Jr. D. B. Bechtel, K. J. Kramer, Y. I. Shethna, A. I. Aronson & P. C. Fitz-James (1980) Ultrastructure, Physiology, and Biochemistry of Bacillus Thuringiensis, CRC Critical Reviews in Microbiology. Vol 8(2), 147-204.
7. Cárdenas-Vargas, A., Pedroza, C. & Elizondo-Quiroga, D. (2016). Adyuvantes para vacunas: tipos, aplicaciones y modos de acción. Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas. Vol 47 (3), 29-47.
8. Casella, C. Mitchell, T. (2008). Putting endotox into work forus: monophosphoryllipid A as a safe and effective vaccine adjuvant. Cellular and Molecular Life Science https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00018-008-8228-6

9. Coffman R., Sher, A., Seder, A. (2010). Vaccine adjuvants: putting innate immunity to work. Cell Press. Immunity. Vol 33, 92– 503.
10. Crickmore, N., Zeigler, D., Feitelson, J., Schnepf, E., Van Rie, J., Lereclus, D. (1998). Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. Microbiology Molecular Biology. Vol 62 (3), 807-13.
11. Di Pasquale, Alberta., Scott, Preiss., Tavares, F., Da Silva & Garçon, N. (2015). Vaccine Adjuvants: from 1920 to 2015 and Beyond. Vaccines. Vol *3*(2), 320–343.
12. Edelman, R., Hardegree, M. & Chedid, L. (1980). Summary of an international symposium on potentiation of the immune response to vaccines. *The Journal of Infectious Diseases. Vol 141(*1), 103–112.
13. Fox, C., Anderson, C. & Dutill, T. (2008). Monitoring the effects of component structure and source on formulation stability and adjuvant activity of oil-in-water emulsions. Colloids Surf B Biointerfaces. Vol 65(1) 98-105.
14. González-González E., García, A., Flores, R., López, R. & Moreno, L., (2015) The protoxin Cry1Ac of *Bacillus thuringiens* is improves the protection conferred by intranasal immunization with *Brucella abortus*RB51 in a mouse model. Veterinary Microbiology. Vol 175, 382–8.
15. González J, Dulmage H, Carlton B. Correlation between specific plasmids and delta-endotoxin production in *Bacillus thuringiensis*. Plasmid 1981; 5: 352-65
16. Gloxhuber, C., & Kunster, K. (1992). Anionic Surfactants: Biochemistry, toxicology, dermatology (2nd ed.). New York
17. Guerrero GG, Dean DH, Moreno-Fierros L (2004) Structural implication of the induced immune response by Bacillus thuringiensis Cry proteins: role of the N-terminal region. Mol Immunol 41:1177–83
18. Helson, R. (2011). Adjuvants: Introduction. British Society for Immunology dehttps://www.immunology.org/public-information/bitesized-immunology/vacunas-y-tratamientos-terapéuticos/adjuvants-introduction

19. Harold, Stils. (2005). Adjuvants and Antibody Production: Dispelling the Myths Associated with Freund's Complete and Other Adjuvants. ILAR Journal. Vol 46(3), 280–293 de la base de datos NCBI PUDMED.
20. Herzog, C., Hartmann, K., Künzi, V., Kürsteiner, O., Mischler, R., Lazar, H. & Glück, R. (2009). Eleven years of InflexalV-a virosomal adjuvanted influenza vaccine. Vaccine. Vol 27(438) 1–7.
21. Ibarra, S., García, L., Moreno, L. (2014) Coadministration of protoxin Cry1Ac from *Bacillus thuringiensis* with metacestode extract confers protective immunity to murine cysticercosis. Parasite Immunology 36. 10.1111/pim.12103.
22. Ibrahim MA, Griko N, Junker M, Bulla LA (2010) *Bacillus thuringiensis.* A genomics and proteomics perspective. Bioengineered Bugs 1(1):31–50
23. Ito, A., Yasuyuki, S., Sakae, k., Yoshitomo, K., Kyoko, k., Kenjiro, M., Eiichi, M., Tetsuyuki, A. & Michio, O. (2004). A *Bacillus thuringiensis* crystal protein with selective cytocidal action to human cells. The Journal of Biological Chemestry. Recuperado el 14 de Mayo de 2004, de http://www.jbc.org/content/279/20/21282.long
24. Jennings, R., Simms, J. & Heath, A. Adjuvants and delivery systems for viral vaccines—mechanisms and potential. (1998). *In*: Brown F, Haaheim LR, editors. Modulation of the Immune Response to Vaccine Antigens, Dev Biol Stand 92. Basel: Karger,19–28.
25. Jihane, R., Dominique, S., Mireille, K., Laure, C. & Cédric, Brandam. (2014). A simple method for the separation of *Bacillus thuringiensis* spores and crystals. [versión electrónica]. Journal of Microbiological Methods 2014. Vol 107,147-149.
26. Jordan, M., Mills, D., Kappler, J., Marrack, P. & Cambier, J. (2004). Promotion of B cell immune responses via an alum-induced myeloid cell population. Science. Vol 304, 1808-1810.
27. Khetan, S.(2001). Bacterial Insecticide: *Bacillus thuringiensis*. En: Khetan editor. Microbial Pest Control, 2001, p. 14.

28. Kindt, T., Goldsby R., Osborne, B., & Kuby, J. (2007). Inmunología de Kuby. México, D. F.: McGRAW-HILL INTERAMERICANA EDITORES, S.A. de C.V
29. Kirschning, J., Wesche, H., Merrill Ayres, T., & Rothe, M. (1998). Human toll-like receptor 2 confers responsiveness to bacterial lipopolysaccharide. The Journal of experimental medicine. Vol *188*(11), 2091–2097.
30. Layton, C.(2001). *Bacillus* spp: perspectiva de su efecto biocontrolador mediante antibiosis en cultivos afectados por fitopatógenos. https://www.researchgate.net/publication/316651571_Bacillus_spp_perspectiva_de_su_efecto_biocontrolador_mediante_antibiosis_en_cultivos_afectados_por_fitopatogenos
31. Lavelle, E. (2005). Generation of improved mucosal vaccines by induction of innate immunity. Cellular Molecular Life Science. Vol 62,2750–2770.
32. Lawson, L., Norton, E. & Clements, J. (2011). Defending the mucosa: adjuvant and carrier formulations for mucosal immunity. Currient Opinion Immunology. Vol 23, 414–420.
33. Maagd, R.(2001). How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. *Trends in Genetics*. Vol 45,193 - 199.
34. Márquez, V., Ochoa, J., Cruz, C., Alonso, P., Olmedo-Alvarez, G., P, S., & Abascal, E. (2014). Isolation of Actinobacillus pleuropneumoniae from Layer Hens Showing Clinical Signs of Infectious Coryza. *Avian Diseases, 58*(4), 638-641. Retrieved from http://www.jstor.org/stable/26431761
35. Mata-Haro., Cekic, V., Caglar, M., Chilton, M., Casella, P., Mitchell, C. (2007). The Vaccine Adjuvant Monophosphoryl Lipid A as a TRIF-Biased Agonist of TLR4.Science, American Association for the Advancement of Science. American Association for the Advancement of Science.
36. Mohamed, A., Ibrahim, Natalya, G., Matthew, J., & Bulla, L. (2010). *Bacillus thuringiensis*., Errores de bioingeniería. Vol 1, 31-50,

37. Moreno-Fierros L., Ruiz-Medina, E., Esquivel, R., Lopez-Revilla R., Pina, S. (2003). Intranasal Cry1Ac protoxin is an effective mucosal and systemic carrier and adjuvant of *Streptococcus pneumoniae* polysaccharides in mice. Scandinavian Journal Immunology. Vol 57, 45–55.
38. Moreno-Fierros, L., García, N., Gutiérrez, R., López-Revilla, R., Vázquez-Padrón, R. & Garcia, N.(2000). Intranasal, rectal and intraperitoneal immunization with protoxin Cry1Ac from *Bacillus thuringiensis* induces compartmentalized serum, intestinal, vaginal and pulmonary immune responses in Balb/c mice. Microbes Infectology. Vol 2, 885–890.
39. Moreno, L., Gutiérrez, R., López, Rubén., Vázquez, R. 5 April 2000. Intranasal, rectal and intraperitoneal immunization with protoxin Cry1Ac from *Bacillus thuringiensis* induces compartmentalized serum, intestinal, vaginal and pulmonary immune responses in Balb/c mice. Scientifiques et Médicales. Elsevier SAS.
40. Moreno, L. & Torres, M.(2018). Efectos Inmunológicos y adyuvantes de la proteína Cry1Ac, Revista de Educación; Laboratorio de inmunología en mucosas. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. UNAM. Tlanepantla. Estado de México. México. Revista de Educación Bioquímica.
41. Garçon, N. & Martin, F. (2018). Evolution of Adjuvants Across the Centuries, Editor(s): Stanley A. Plotkin, Walter A. Orenstein, Paul A. Offit, Kathryn M. Edwards, Plotkin'sVaccines (SeventhEdition), Elsevier, 61-74.,
42. Ott, G., Barchfeld, G., Chernoff, D., Radhakrishnan, R., Van, P., Van Nest, G. (1995). MF59 Design and Evaluation of a Safe and Potent Adjuvant for Human Vaccines. Vaccine Designs Pharmaceutical Biotechnology. Vol 6. Springer
43. Palma, L., Muñoz, D., Berry, C., Murillo, J., & Caballero, P. (2014). Bacillus thuringiensis toxins: an overview of their biocidal activity. Toxins. Vol *6*(12), 3296–3325.
44. Patel, N. (2015). Cuba Has a Lung Cancer Vaccine—And America Wants It. Wired.

45. Polanczyk, L.(2017). Bacillus thuringiensis and *Lysinibacillus sphaericus*: Characterization and use in the field of biocontrol.Cham, Switzerland: Springer International Publishing.
46. Palma, L., Muñoz, D., Berry, C., Murillo, J., & Caballero, P. (2014). Bacillus thuringiensis toxins: an overview of their biocidal activity. Toxins. Vol *6*(12), 3296–3325.
47. Pusztai, M., Fast, P., Gringorten, L., Kaplan, H., Lessard, T. & Carey, P. (1991). The mechanism of sunlight-mediated inactivation of *Bacillus thuringiensis* crystals. Biochemestry. Vol 247, 43-77
48. Ricca Ezsio, Simon M Cutting. (2003). Emerging Applications of Bacterial Spores in Nanobiotechnology. Journal of Nanobiotechnology. https://jnanobiotechnology.biomedcentral.com/articles/10.1186/1477-3155-1-6
49. Rodríguez, M. & Moreno-Fierros, L. (2010). Striking activation of NALT and nasal passages lymphocytes induced by intranasal immunization with Cry1Ac protoxin. Scandinavian Journal Immunology. Vol 71 (3),159–168.
50. Rojas-Ruíz Norma E., Vázquez-Cruz Candelario, Sánchez-Alonso Patricia, Sansinenea-Royano Estíbaliz. (2010). Análisis poblacional de células vegetativas de *Bacillus thuringiensis* en interacción in vitro con bacterias del suelo. Agrociencia, 44, 13.
51. Rojas-Hernández S, Rodríguez-Monroy M a., López-Revilla R, Reséndiz-Albor A., MorenoFierros L (2004) Intranasal coadministration of the Cry1Ac protoxin with amoeba llysates increases protection against Naegleria fowleri meningoencephalitis. InfectImmun 72:4368– 75.
52. Rubio, N., Ilhuicatzi, D., Torres, M., Reyes, J., Nava, R., González-González, E. y Moreno-Fierros, L. (2018). La activación de macrófagos inducida por la protoxina Cry1Ac de *Bacillus thuringiensis* implica las vías ERK1 / 2 y p38 y la interacción con la célula-superficie - HSP70. Journal Cellular Biochemestry. Vol 119, 580-598.
53. Salk, J., Laurent, A. & Bailey, M. (1951). Direction of research on vaccination against influenza: new studies with immunological adjuvants. Public Health Nations Health. Vol 41, 669-677.

54. Sansinenea Royano Estíbaliz (2012). *Bacillus thuringiensis* Biotechnology. NewYork: Springer, Dordrecht. https://www.springer.com/gp/book/9789400730205

55. Sauka, D. & Benintende, G. (2008). *Bacillus thuringiensis:* generalidades. Un acercamiento a su empleo en el biocontrol de insectos lepidópteros que son plagas agrícolas. Revista Argentina de Microbiología. Vol 40 (2), 124-140.

56. Serre, K., Mohr, E., Toellner, K., Cunningham, A., Granjeaud, S., Bird, R., MacLennan, I. (2008). Molecular differences between the divergent responses of ovalbumin-specific CD4 T cells to alum-precipitated ovalbumin compared to ovalbumin expressed by Salmonella. [version electronica]. Molecular Immunology. Vol 45(6),3558-3566.

57. Setlow, P. (2014). Spore Resistance Properties. Microbiology spectrum. 2. 10.1128/microbiolspec.TBS-0003-2012.

58. Soberón, M. & Bravo, A. Las toxinas Cry de *Bacillus thuringiensis*: modo de acción y consecuencias de su aplicación, Biotecnologia. Vol 14.

59. Van, M., Laurye, C., Christophe, C., Delphine, S., Pascal, D., Laure, F., Janot, I., Erard, L., Bertout, F., Leger, J., Sebbane, H., Benecke, F., Renauld, A., Jean-Christophe.(2010). TLR5 Signaling Stimulates the Innate Production of IL-17 and IL-22 by $CD3^{neg}CD127^{+}$ Immune Cells in Spleen and Mucosal. The Journal of Immunology. Vol 185 (2), 1177-1185.

60. Vázquez RI, Moreno-Fierros L, Neri-Bazán L, De La Riva G a., López-Revilla R, (1999). *Bacillus* thuringiensis Cry1Ac protoxinis a potent systemic and mucosal adjuvant. [version electronica]. Scandinavian Journal Immunology. Vol 49(6) 578–584

61. Vázquez-Padrón, R., González-Cabrera, J., García, C., Neri, L., Lopéz, R. & Hernández, M.(2000). Cry1Ac protoxin from *Bacillus thuringiensis* sp. Kurstaki HD73 binds to surface proteins in the mouse small intestine. Biochemestry Biophysical Research Communication. Vol 271(1), 54–58.

62. Vazquez-Padrón, R., Moreno-Fierros, L., Neri, L., De la Riva, G., López, R. (1999). Intragastric and intraperitoneal administration of Cry1Ac

protoxin from Bacillus thuringiensis induces systemic and mucosal antibody responses in mice. LifeScience. Vol 64, 189–912.

63. Zeigler, D., & Perkins, John. (2008). The Genus Bacillus. Practical of Handbook of Microbiology. https://www.researchgate.net/publication/279869790_The_Genus_Bacillus