



Efecto coadyuvante de la protoxina Cry1Ac en la inmunidad celular al administrarla con un buen agente patógeno de mucosas

Alain R. Rodríguez Orozco*

RESUMEN

Antecedentes: la mayor parte de los agentes patógenos usan las mucosas como puerta de entrada, la idea de inhibir su adhesión, invasión, replicación o colonización resulta atractiva no sólo para el diseño de vacunas, sino también para la formulación de inmunopreparados. La protoxina Cry1Ac de *Bacillus thuringiensis* es un potente coadyuvante de mucosas recientemente conocido.

Objetivo: determinar el efecto complementario de la protoxina Cry1Ac, de *Bacillus thuringiensis*, en la respuesta celular.

Material y métodos: se aislaron células mononucleares humanas de sangre periférica, en gradientes de Ficoll-Hypaque (d=1077), de allí se seleccionaron las células CD3-CD14+ con FACS Vantage y se estimularon con un lisado de *S. pyogenes*, y luego, con el mismo lisado, se coadministró Cry1Ac y se determinó inducir una proliferación de monocitos en experimentos de incorporación de timidina-³H.

Resultados: se obtuvo mayor respuesta de proliferación de monocitos cuando se administraron juntos la Cry1Ac y el lisado de *S. pyogenes* que cuando sólo se administró el lisado bacteriano. La mejor respuesta se obtuvo al estimular los monocitos con el lisado y 12.5 µg/mL de Cry1Ac (p<0.05).

Conclusiones: la Cry1Ac funciona como complemento de la respuesta celular. Este hallazgo resulta importante en el diseño de vacunas y el manejo de infecciones.

Palabras clave: monocitos, Cry1Ac, proliferación.

ABSTRACT

Background: The major part of pathogens use the mucosae to penetrate into the organisms, the idea to blockade the invasion, replication, colonization and multiplication of them results attractive not only to vaccines design, but immunopharmacs design, too. The protoxin Cry1Ac from *Bacillus thuringiensis* is a recent known mucosal adjuvant.

Objective: To determine the adjuvant effect of protoxin Cry1Ac from *Bacillus thuringiensis* on cellular response.

Material and methods: Mononuclear cells from human peripheral blood were isolated in Ficoll-Hypaque gradients (d=1077), those cells CD3-CD14+ were obtained with the help of FACS Vantage system, and then were stimulated with a lisate of *S. pyogenes* alone or combined with different concentrations of Cry1Ac. The proliferation of monocytes was determined in experiments of timidina-³H incorporation.

Results: The proliferative response of monocytes was major in those stimulated with *S. pyogenes* lisate and Cry1Ac than the observed when monocytes were stimulated with lisate alone. The major response was obtained with lisates of *S. pyogenes* plus 12.5 µg/mL of Cry1Ac (p<0.05).

Conclusion: Cry1Ac have an important adjuvant effect on the cellular immune response. These findings are important to treat infections and for vaccines design.

Key words: monocytes, proliferation, adjuvant, Cry1Ac.

* Inmunoalergólogo. Doctor en ciencias. Responsable del Laboratorio de Inmunología de la División de Posgrado. Facultad de Medicina Dr. Ignacio Chávez, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Michoacán, México.

Correspondencia: Dr. Alain R. Rodríguez Orozco. División de Posgrado. Facultad de Medicina Dr. Ignacio Chávez. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, CP 58000, PO Box 136, Morelia, Michoacán, México. Tel./fax: 52-443 3400513. E-mail: arorozco@hotmail.com

Recibido: febrero, 2006. Aceptado: abril, 2006.

La versión completa de este artículo también está disponible en internet: www.revistasmedicas.com.mx

Se conoce que la mayor parte de los agentes patógenos entran al organismo a través de la piel y las mucosas, ésta es una de las razones por las que resulta atractivo inhibir su adhesión, replicación y colonización desde los sitios en que penetran a nuestro organismo. Por lo tanto, la búsqueda de nuevos inmunopotenciadores de mucosa representa una alternativa para la obtención de complementos para vacunas y para la formulación de inmunopreparados.

***Bacillus thuringiensis* (Bt) Y SUS TOXINAS**

Es una especie bacteriana grampositiva, aerobia estricta, morfológicamente relacionada con *Bacillus cereus* y *Bacillus anthracis*. Estas especies de bacterias tienen, durante su ciclo de vida, dos fases bien identificadas: la de crecimiento vegetativo, en la que las bacterias se duplican por bipartición, dependiendo del medio de cultivo; y la de esporulación, en la cual se establece un programa de diferenciación a espora.^{1,2}

A *Bt* se la diferencia de *B. cereus* y *B. anthracis* por su capacidad para producir en el citoplasma, durante la esporulación, δ -endotoxinas en forma de cristales. Dicho cuerpo paraesporal es conocido por la presencia de las proteínas Cry y Cyt, que tienen propiedades insecticidas, usadas en la agricultura.^{3,4}

MECANISMO DE ACCIÓN INSECTICIDA DE LAS TOXINAS Cry DE *Bt*

Las toxinas Cry permanecen en cuerpos de inclusión en *Bt* como protoxinas inactivas y se solubilizan en el medio alcalino del tracto gastrointestinal del insecto y se activan mediante proteasas intestinales. Se ha postulado que la unión a los fosfolípidos de la membrana que contienen ácidos grasos insaturados es un prerrequisito para desempeñar su actividad citotóxica.⁵

El sitio primario de acción de las toxinas Cry lepidopteridas es el epitelio intestinal, pues la interacción de la toxina con el epitelio conduce a muerte celular por la pérdida de permeabilidad de la membrana a iones pequeños y gránulos y por la consiguiente pérdida de su función de barrera selectiva por trastornos en la integridad de la membrana e interrupción de la alimentación.^{6,7}

CAMBIOS MORFOFUNCIONALES RELACIONADOS CON LA ACTIVACIÓN DE LEUCOCITOS

Tras la llegada de los antígenos, los leucocitos experimentan una serie de transformaciones morfofuncionales que los capacitan para generar una

respuesta efectora, esta serie de acontecimientos constituye la activación celular.

CAMBIOS MORFOFUNCIONALES EN MONOCITOS ACTIVADOS

El primer tipo celular de la línea monocítica que entra a la sangre periférica proveniente de la médula ósea es el monocito, que no es una célula completamente diferenciada. Al llegar a otros tejidos y madurar morfofuncionalmente, los monocitos se transforman en macrófagos, que al estimularse algunos desarrollan un abundante citoplasma y se transforman en células epitelioides y otros se funden originando gigantes células multinucleadas, ambas implicadas en la reacción inflamatoria.

En los tejidos, los macrófagos pueden ser activados no sólo por antígenos particulados o solubles, sino también por productos de éstos y por citocinas secretadas al microentorno por diferentes células, entre ellas los linfocitos T y las células endoteliales. La multitud de interacciones con células, con proteínas de matriz extracelular y con efectores de la respuesta humoral, como anticuerpos y complemento, justifica en los macrófagos activados la enorme cantidad de receptores de superficie que poseen.

Finalmente, como producto de su activación se estimulan considerablemente sus funciones en la defensa natural y en la respuesta inmunitaria específica.⁸ Mediante varias técnicas, es posible medir en el laboratorio la fase de la proliferación en la que aumenta considerablemente el número de células; entre las más conocidas se encuentra la técnica de incorporación de timidina tritiada por células en cultivo, con un contador de radiaciones B es posible medir la cantidad de timidina marcada que incorporen las células en la síntesis de nuevo ADN. Los altos niveles de incorporación de este marcador se asocian con niveles elevados de proliferación celular.

MATERIAL Y MÉTODOS

Auxiliar: Se usó como auxiliar la protoxina recombinante Cry1Ac de *Bt*, obtenida en el laboratorio

del doctor Rubén López Revilla, CINVESTAV-IPN, México, DF.

Aislamiento de monocitos humanos

Se realizó por selección en un gradiente de densidad utilizando Ficoll-Hypaque con una densidad de 1.077. Las células totales en 6 mL de RPMI se depositaron cuidadosamente en un tubo de 15 mL con 3 mL de solución Ficoll-Hypaque. Luego se sometieron a centrifugación durante 25 minutos a 1,500 rpm en la centrífuga Sorvall, rotor SS-34.

Las células mononucleadas que quedaron en la interfase se extrajeron y se lavaron con solución buffer de fosfatos (PBS), mientras que las células CD3-CD14+ (anticuerpos monoclonales de Becton Dickinson, San José, California, Estados Unidos) se obtuvieron con la ayuda de un FACSVantage (Becton Dickinson, San José, California, Estados Unidos). La viabilidad celular se estimó por exclusión de azul de tripano.

Determinación de la viabilidad celular por exclusión de azul de tripano

Esta prueba de exclusión revela la integridad de la membrana plasmática, ya que el azul de tripano no pasa a través de la membrana íntegra de las células vivas.

Después de la incubación de las células mononucleadas con diferentes concentraciones de Cry1 Ac, se adicionaron a cada pozo 10 µL de azul de tripano al 4% para obtener una concentración final de 0.2% del colorante. Inmediatamente después se procedió a determinar la viabilidad en hemocitómetro, como el porcentaje de células teñidas de azul ("muertas") contra el porcentaje de células no teñidas ("vivas").

Efecto auxiliar de la protoxina Cry1Ac de *Bacillus thuringiensis* en la inmunidad celular, al administrarla con un buen patógeno de mucosas

Los monocitos humanos se sembraron en placas de 96 pocillos de fondo plano, en una concentración de 2×10^5 células/pozo en medio RPMI-1640 completo. Posteriormente se evaluó el efecto de un lisado bacteriano de *S. pyogenes* 1×10^4 células/mL en la

proliferación de estos monocitos y se seleccionó la dosis estimuladora máxima del lisado; luego se determinó qué efecto tenía sobre la proliferación de las células la estimulación con esta dosis del lisado bacteriano y diferentes concentraciones de Cry1Ac.

Las placas se incubaron durante 24 horas a 37 °C, en atmósfera húmeda con CO₂ al 5%. La viabilidad celular se determinó por medio de la exclusión de azul de tripano. El control negativo consistió en células no tratadas con Cry1Ac ni lisados, y el control positivo en células tratadas con fitohemaglutinina (5 µg /mL).

Seis horas antes del final de la incubación (72 horas) se añadieron 0.5 µCi/pozo de timidina-³H. Las células se cosecharon sobre filtros de fibra de vidrio con un cosechador automático (*Combi cell harvester*). El filtro de cada muestra se colocó en un vial con líquido de centelleo y 12 horas después se determinó la incorporación de timidina-³H en un contador de centelleo beta (Beckman, LS 6500).

La proliferación celular se estimó en cuentas por millón, y como índice de estimulación según la siguiente fórmula:

$$IE = \frac{\text{cpm media muestras} - \text{cpm media controles negativos}}{\text{cpm media controles positivos} - \text{cpm media controles negativos}} \times 100\%$$

Análisis estadístico

Los experimentos se analizaron mediante la prueba de la t de Student y se aceptó una significación estadística de $p < 0.05$. Se usaron la media y la desviación estándar entre triplicados para señalar los resultados de las muestras y los controles.

RESULTADOS

Al tratar monocitos humanos con distintas concentraciones de Cry1Ac y un lisado de *S. pyogenes* a la concentración de 1×10^4 células, se obtuvo mayor respuesta estimulante de proliferación con respecto a la encontrada con la mejor respuesta obtenida cuando se administraba el lisado bacteriano en forma independiente, de manera que Cry1Ac amplifica la proliferación celular inducida por *S. pyogenes*, que tuvo un índice de estimulación del 43% con respecto

a la que se encontró en las células no tratadas. La mayor respuesta de proliferación de monocitos se observó cuando éstos fueron tratados con lisados de *S. pyogenes* y 12.5 µg /mL de Cry1Ac ($p < 0.05$) (cuadro 1).

Cuadro 1. Efecto auxiliar de la Cry1Ac en la inmunidad celular cuando se administra al mismo tiempo que un buen inmunógeno de mucosas

Cry1Ac (mcg/mL)	Lisado de <i>S. pyogenes</i>	CryAc mcg/mL + lisado de <i>S. pyogenes</i>
0.39	1 x 10 ⁴ células 43 (a)	75 (b)
1.56		216 (c)
6.25		160 (d)
12.5		231 (e)
50		67 (f)

a vs b ($p < 0.05$); a vs c ($p < 0.05$); a vs d ($p < 0.05$); a vs e ($p < 0.05$); a vs f ($p < 0.05$).

DISCUSIÓN

La Cry1Ac potenció la respuesta de proliferación inducida por un agente patógeno de mucosas tan importante como *S. pyogenes*. Su auxilio se había demostrado en estudios anteriores en la respuesta humoral, en los que se encontró que la Cry1Ac potenciaba la respuesta de anticuerpos a ovalbúmina y el antígeno de superficie de hepatitis B cuando se administraba mezclada con éstos a animales de experimentación.⁹

Al igual que lo sucedido con la administración de subunidad B de toxina de cólera con proteínas de superficie de *Streptococcus*,¹⁰ la Cry1Ac tiene un efecto complementario cuando se administra junto con derivados de este patógeno; aunque el trabajo antes mencionado hace alusión a su colaboración en la respuesta de anticuerpos, se debe destacar que también refiere el efecto auxiliador de las endotoxinas provenientes del *Bacillus thuringiensis* sobre la respuesta celular. Así mismo, se sabe de su capacidad para potenciar la inmunidad antitumoral, al incrementar la respuesta citotóxica contra bleomicina y otros citostáticos.¹¹

Este efecto estimulante parece tener como célula diana importante al monocito en el que previamente demostramos que como resultado de la

estimulación con la protoxina Cry1Ac aumentaba considerablemente la explosión oxidante.¹² El estallido respiratorio es parte importante de la respuesta fagocítica, por lo que resulta atractivo que la Cry1Ac potencie pasos críticos de la fagocitosis por la repercusión que acarrea en la inhibición de la colonización de las mucosas por patógenos. Éste es un criterio que fundamenta también el efecto potente que tiene la Cry1Ac en la activación de monocitos.

Como sabemos, existen pocos complementos que estimulan las respuestas humorales y celulares, disponemos entonces de un candidato muy atractivo como acarreador de epítopes vacunales. Por existir clonada, es susceptible a la manipulación genética y cuenta con la aparente inocuidad para humanos;¹³ es estable al pH alcalino y resistente a la proteólisis,¹⁴ lo que hace más factible su manejo como inmunopotenciador, aunque resulta conveniente, antes de su uso como inmunoestimulante en humanos, evaluar en una forma más detallada su toxicidad.

Aun cuando la búsqueda y caracterización de nuevos coadyuvantes de mucosa continúa siendo un reto importante, la CryAc cumple un buen número de las condiciones que se le exigen a un auxiliar ideal, y sus efectos, tanto sistémicos como en la mucosa, son comparables con los obtenidos con la toxina del cólera, que es el auxiliar de mucosas mejor conocido.¹⁵

CONCLUSIONES

La protoxina Cry1Ac tiene efecto auxiliar en la respuesta celular cuando es administrada junto con un patógeno de mucosas, ya que estimula la proliferación de células inmunocompetentes de una manera más poderosa que cuando únicamente se administra el patógeno.

Este hallazgo resulta importante en el diseño de vacunas contra infecciones en mucosas y para regular la respuesta inmunitaria contra los patógenos que las usan como puerta de entrada al organismo. Se recomienda continuar con la caracterización de los efectos complementarios de esta protoxina bacteriana para explotar sus posibles usos clínicos.

REFERENCIAS

1. Brosseau R, et al. *Bacillus thuringiensis* insecticidal cristal toxins: Genes estructura and mode of action. *Biotechnol Adv* 1988;6:697-724
2. Soberón M y col. *Bacillus thuringiensis* y sus toxinas insecticidas. {Consultado el 13 de junio del 2005} <http://biomedweb.dgsca.unam.mx/libros/Cap12/videos/cl12an1.html>.
3. Cowles EA et al. Comparison of toxin overlay and solid-phase binding assays to identify diverse Cry1Ac toxin-binding proteins in *Heliothis virescens* midgut. *California* 1995;2738-44.
4. Custodio M. *Bacillus thuringiensis*. {Consultado el 13 de junio del 2005} http://bioinformática.uab.es/biocomputacio/treballs00-1/custodio/Bt_pag_ppal.htm.
5. Drobniewski FA and Ellar DJ. Investigation of the membrane lesion induced *in vitro* by two mosquitocidal delta-endotoxins of *Bacillus thuringiensis*. *Curr Microbiol* 1988;16:195-9.
6. Ebersold HR, Luthy P, Geiser P, Ettlinger L. The action of the delta-endotoxin of *Bacillus thuringiensis*: an electron microscopy study. *Experientia* 1978 34:1672.
7. Heimpel AM, Angus TA. Bacterial insecticides. *Bacteriol Rev* 1960;24:266-88.
8. Abbas AK, Litchman AH, Pober JS. Cells and tissues of the immune system. In: *Cellular and molecular immunology*. WP Saunders Company, 1994a;pp:14-31.
9. Vázquez RI, Moreno-Fierros L, Nery-Bazán L, de la Riva GA, et al. *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac protoxin is a potent systemic and mucosal adjuvant. *Scand J Immunol* 1999;49:578-84.
10. Wu HY, Russell MW. Induction of mucosal immunity by intranasal application of a streptococcal surface protein antigen with the cholera toxin B subunit. *Infect Immun* 1993;61:314-22.
11. Yokoyama Y, Kohda K. Enhanced cytotoxicity caused by increased DNA strand breakage resulting from synergistic potentiation of bleomycin with *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* d-endotoxin. *Anticancer Res* 1994;14:838-40.
12. Rodríguez-Orozco AR, Rico-Rosillo G, López R. The effect of Cry1Ac on human monocytes and neutrophil activation. *Allergy Clin Immunol* 2005;17:64-65.
13. McClintock JT, Schaffer CR, Sjoblad RD. A comparative review of the mammalian toxicity of *Bacillus thuringiensis*-based pesticides. *Pestic Sci* 1995;45:95-105.
14. Hofte H, Whiteley H. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol Rev* 1989;53:242-5.
15. Rodríguez-Orozco AR. The difficulty of obtaining immunologic response at mucosae. Use of coadjuvants. *Rev Alerg Mex* 2003-2005;50:161-5.