

# EFFECTOS INMUNOLÓGICOS Y ADYUVANTES DE LAS PROTEÍNAS CRY1A\*

**Marilu Torres Martínez y Leticia Moreno Fierros**

Laboratorio de inmunología en mucosas. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. UNAM. Tlanepantla. Estado de México. México. Correo E: lemofi@unam.mx

## RESUMEN

Las proteínas Cry1A de *Bacillus thuringiensis*, pudieran ser utilizadas como una estrategia para incrementar la eficacia de las vacunas debido a que; son inmunogénicas y son adyuvantes efectivos capaces de incrementar protección a nivel sistémico y de mucosas, no son tóxicas en vertebrados y presentan bajos costos de producción. Esta revisión resume los estudios reportados hasta el momento sobre las propiedades inmunogénicas de las proteínas Cry1A..

## PALABRAS

### CLAVE:

Proteína Cry, *Bacillus thuringiensis*, adyuvantes, inmunógenos.

## ABSTRACT

*Bacillus thuringiensis* Cry1A proteins could be used as a strategy to increase the efficacy of vaccines as they are; immunogenic and effective adjuvants able to increase protection at the systemic and mucosal levels, they are non-toxic in vertebrates and have low production costs. This review summarizes the studies reported so far on the immunogenic properties of Cry1A proteins.

## KEY WORDS:

Cry protein, adjuvants, immunogens.

## INTRODUCCIÓN

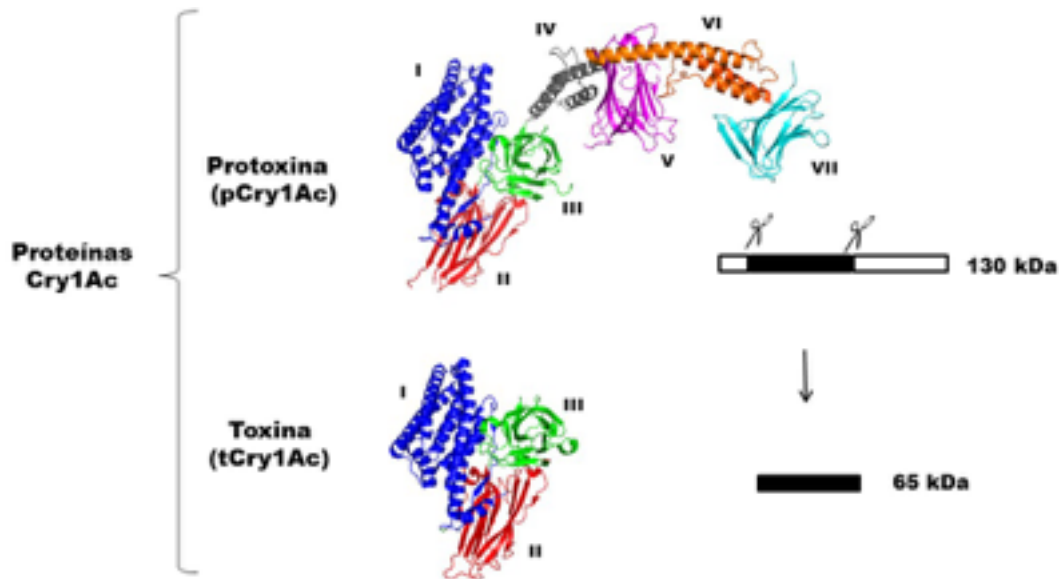
Las proteínas Cry son producidas por la bacteria Gram positiva *Bacillus thuringiensis* (Bt) en cristales paraesporales; una característica importante de estas proteínas es que presentan algún efecto tóxico específico hacia algún organismo, habitualmente insectos; mientras que no son tóxicas para vertebrados ni para otros insectos no blanco. Estas proteínas son producidas por Bt como protoxinas cristalinas, que, al ser ingeridas por larvas de insectos susceptibles, son solubilizadas y procesadas proteolíticamente por proteasas presentes en el intestino medio, generándose las toxinas Cry (tCry). Se han identificado algunas proteínas Cry que son selectivamente tóxicas para diferentes órdenes de insectos tales como Lepidóptera, Coleóptera, Himenóptera, Homóptera, Ortóptera y Mallophaga, así como nemátodos (1), por lo que han sido ampliamente utilizadas comercialmente como insecticidas, para el control de insectos plaga que atacan a los cultivos; y también para el control de insectos vectores causantes de enfermedades como la malaria y el dengue (2). El mecanismo por el cual las proteínas Cry ejercen su acción bioin-

secticida ha sido ampliamente estudiado (3-7); ya que muchos de los estudios reportados han sido encaminados a evaluar su toxicidad en insectos. Sin embargo, los estudios dirigidos a determinar sus efectos en mamíferos son limitados y la mayoría consisten de estudios clínicos orientados a determinar los efectos tóxicos potenciales (8), que en general indican que no son tóxicas en mamíferos.

Se ha reportado que varias proteínas Cry, particularmente las proteínas Cry1Ab, Cry1Aa y Cry1Ac, son inmunogénicas, ya que son capaces de inducir anticuerpos específicos hacia la proteína al ser administradas por diferentes vías. Nuestro grupo de trabajo se ha enfocado particularmente en estudiar las propiedades inmunológicas de las proteínas Cry1Ac y ha demostrado que la protoxina Cry1Ac (pCry1Ac) de Bt es inmunogénica tanto a nivel sistémico como de mucosas (9-11) y actúa como adyuvante en mucosa, ya que al coadministrarla con antígenos de diferentes naturaleza, proteica (12, 13) y polisacárida (14), es capaz de potenciar o modular la respuesta inmune hacia el antígeno con el cual se coadministra. Se ha reportado que en modelos murinos puede incrementar la protección en varios modelos de infecciones parasitarias y

**Tabla 1**  
 Propiedades inmunopotenciadoras de las proteínas Cry1A

Proteína /especie	Vía de administración	Efectos	Referencias
Bt como insecticida	Trabajadores expuestos	Presentaron anticuerpos IgE e IgG específicos contra células vegetativas.	23, 24, 25
pCry1Ac recombinante de Bt HD73 (forma soluble y cristalina)	Intragástrica e intraperitoneal	pCry1Ac tiene propiedades inmunogénicas y adyuvantes al potenciar la respuesta inmune contra antígenos coadministrados (toxina de cólera y la albúmina de suero bovino (BSA).	11
pCry1Ac recombinante de Bt HD73	Intragástrica e intraperitoneal	pCry1Ac tiene propiedades inmunogénicas y adyuvantes al potenciar la respuesta inmune contra antígenos coadministrados (antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg) y la albúmina de suero bovino (BSA).	13
pCry1Ac recombinante de Bt HD73	Intranasal	pCry1Ac induce anticuerpos IgM, IgG e IgA en suero y lavados vaginales y traqueobronquiales, en los fluidos del intestino grueso e intestino delgado y aumentó el título de anticuerpos frente a polisacáridos neumocócicos.	14, 28
pCry1Ac, pCry1 Ab, pCry1Aa	Intranasal e intraperitoneal	Induce anticuerpos IgM, IgG e IgA en diferentes compartimentos mucosales y en sangre	46
pCry1Ac recombinante de Bt HD73	Intranasal	Adyuvante. Induce protección contra <i>Brucellas abortus</i>	15
pCry1Ac recombinante de Bt HD73	Intranasal e intraperitoneal	Adyuvante. Induce protección contra <i>Naegleria fowleri</i>	32, 35, 36
pCry1Ac recombinante de Bt HD73	Intraperitoneal	Adyuvante. Induce protección contra modelo de <i>Taenia crassiceps</i>	34
pCry1Ac recombinante de Bt HD73	Intraperitoneal	Adyuvante. Induce protección contra modelo de <i>Plasmodium chabaudi</i> y <i>Plasmodium berghet</i> ANKA As	33
pCry1Ac recombinante de Bt HD73	Intranasal	pCry1Ac induce respuestas de células de anticuerpos significativas, y 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	37
pCry1Ac recombinante de Bt HD73	Ensayos <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	pCry1A activa induce la activación de macrófagos murino obtenidos de diferentes sitios mucosales.	40
pCry1Ac recombinante de Bt HD73	Ensayos en línea celular RAW 264.7	pCry1Ac se endocita vía clatrina, colocaliza con RAb5 y RAb7 y se une a proteínas HSPs, vimentina, $\alpha$ -enolasa y actina. HSP 70 participa en la activación de macrófagos .inducida por pCry1Ac	45
tCry1Ac,tCry1 Ab, tCry1Aa	Intranasal e intraperitoneal	Induce anticuerpos IgG e IgA en diferentes compartimentos mucosales y en sangre	46
tCry1Aa recombinante y una mutante Cry1Aa8	Intranasal	Ambas toxinas generaron respuestas inmunes celulares en ratones y promovieron la producción de IFN- $\gamma$	31
tCry1Ab	Intraperitoneal	Es inmunogénica y puede inducir una respuesta inmune Th1 / Th2 mixta, con intensa producción de anticuerpos anti Cry1Ab IgG1 e IgG2a	48
tCry1Ab	Intranasal	Aumento título de anticuerpo	49
tCry1Ac	Ensayos <i>in vitro</i> y línea celular RAW 264.7	tCry1Ac activa macrófagos de bazo y de la línea celular RAW 264.7. Activa MAPKs y el factor de transcripción NF- $\kappa$ B	50



**Figura 1.** Estructura obtenida por difracción de rayos x de la protoxina (pCry1Ac) y toxina Cry1Ac (tCry1Ac) donde se muestran en números romanos los VII y III dominios que componen la protoxina y toxina respectivamente. La estructura tridimensional de la tCry1Ac está compuesta por tres dominios (I, II y III). El dominio I: haz de siete  $\alpha$ -hélices, seis de las cuales rodean a la hélice 5. Dominio II: Prisma beta de tres hojas  $\beta$  antiparalelas alrededor de un núcleo hidrofóbico con algunas regiones de asas expuestas y el dominio III, es un sándwich  $\beta$ , compuesto por dos hojas  $\beta$  antiparalelas (51). La pCry1Ac muestra que en su región N-terminal una estructura similar a los dominios I, II y III que presenta la tCry1Ac, y en la región carboxilo terminal, muestra 4 dominios. Los dominios IV y VI son alfa-hélices y los dominios V y VII tienen una conformación de barril beta tipo rollo (52). La figura fue realizada con las coordenadas depositadas en el PDB para protoxina, con código 4W8J y para toxina, con código 4ARX, utilizando el programa PyMOL. La tCry1Ac (con peso aproximado de 65 kDa) se genera luego que la protoxina (peso de 130 kDa) es procesada proteolíticamente.

bacterianas (15) por lo que se propone como una herramienta valiosa para incrementar la eficacia de vacunas induciendo inmunoprotección en mucosas, si se emplea ya sea como adyuvante, o como inmunomodulador. El objetivo de la presente revisión es hacer una recopilación breve de los estudios reportados hasta el momento de las propiedades inmunogénicas de las proteínas Cry1A. En la tabla 1 se muestra un resumen de los reportes sobre los efectos inmunopotenciadores de las proteínas Cry1A.

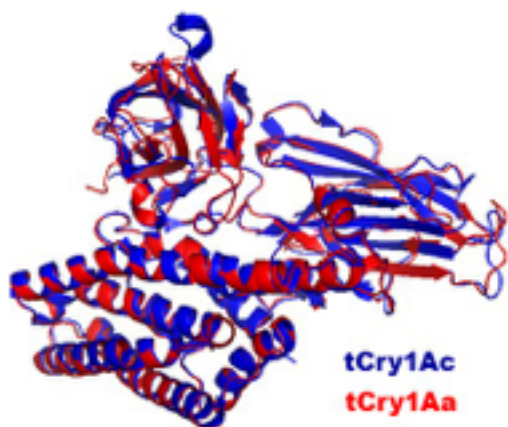
### LAS PROTEÍNAS Cry

Las proteínas Cry son delta endotoxinas producidas por la bacteria del suelo Bt en la etapa de crecimiento durante su fase de esporulación (16) y se han usado comercialmente como bioinsecticidas. Las formulaciones agrícolas que contienen Bt usadas contra insectos se han aplicado en forma de pulverización y generalmente están compuestas por una mezcla de esporas secas y las proteínas cristalinas que se aplican en áreas como las hojas y las raíces, donde se alimentan los insectos y sus larvas (17). También se han utilizado en forma

de polvos humectables, líquidos concentrados, cebos, polvos, y anillos de liberación prolongada. Pero el modo de aplicación transgénico de Bt, en el cual se expresan la forma de toxina Cry activa, ha demostrado ser más eficaz que la forma de pulverización (17-20).

pCry es proteína de un peso de 130 kDa que después de ser procesada proteolíticamente pierde aproximadamente 600 residuos de su extremo carboxilo terminal y entre unos 20 y 50 residuos de su extremo amino terminal generando la toxina activa de 60 kDa (21) (Fig. 1).

Las proteínas Cry se clasifican en base a la homología de su secuencia de aminoácidos. Las toxinas que pertenecen a cada grupo comparten entre un 40-45% de identidad en su secuencia de aminoácidos y se representan con un número arábigo (Cry1, Cry2...Cry70). En cada grupo las toxinas que comparten un 70% de identidad se agrupan asignándole una segunda letra en mayúscula (Cry1A, Cry1B, etc), y una letra minúscula aquellas que presentan entre un 70% a 95% de identidad en su secuencia de aminoácidos (Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, etc) (22) (Fig. 2).



**A**

Toxinas Cry	% de identidad entre la secuencias de aminoácidos
tCry1Ac - tCry1Ab	91.66
tCry1Ac - tCry1Aa	84.79
tCry1Ab - tCry1Aa	89.29

**B**

**Figura 2. A.** Superposición de la estructura cristalográfica de la toxina Cry1Ac (tCry1Ac)-azul y la toxina Cry1Ab (tCry1Ab)-rojo, donde se muestra la similitud estructural entre ambas proteínas. Las estructuras fueron visualizadas a través del programa PyMOL con las coordenadas depositadas en "Protein Data Bank" para tCry1Ac con código 4ARX y para la tCry1Aa con código 1CIY. Hasta la fecha no se ha logrado difractar la estructura de Cry1Ab. **B.** Porcentaje de identidad entre las secuencias de proteínas de Cry1Ac, Cry1Ab y Cry1Aa. El alineamiento de la secuencia se realizó a través de CLUSTALW.

### PROPIEDADES INMUNOGÉNICAS Y ADYUVANTES DE LAS PROTEÍNAS Cry

Los primeros reportes acerca a los efectos inmunológicos inducidos por las proteínas Cry fueron determinados por la presencia de anticuerpos en el suero de trabajadores que se encontraban expuestos a productos comerciales de Bt, la bacteria que produce Cry. Se ha reportado que poblaciones y trabajadores que fueron expuestos a la pulverización de Bt, presentaron niveles de anticuerpos elevados (23–25). Del mismo modo, Bernstein y cols. encontraron anticuerpos IgG e IgE específicos contra células vegetativas de Bt en trabajadores que estaban altamente expuesto a insecticidas que contenían Bt (25).

Asimismo, se ha reportado que las proteínas Cry aisladas de cristales de Bt parecían tener actividad anti-tumoral contra las células del sarcoma ascites de Yoshida, posiblemente relacionados con su capacidad para mejorar la inmunidad general (26). Los mismos autores mostraron que los cristales de insecticidas de esporas Bt mejoran la respuesta inmune a los ovinos de glóbulos rojos (27).

Nuestro grupo ha demostrado que la pCry1Ac recombinante es altamente inmunogénica y posee efectos adyuvantes tan potentes como los de la toxina del cólera tanto a nivel mucoso como sistémico (11, 13, 28, 29). En un inicio se evaluó, el efecto inmunogénico tanto de la pCry en forma cristalina como soluble, y se observó que ambas formas de pCry1Ac (Bt var kurstaki HD73) eran inmunogénicas, ya que eran capaces de inducir una

respuesta inmune a nivel sistémico al ser administradas por vía intraperitoneal o intragástrica. Sin embargo, la forma soluble fue más eficiente que la forma cristalina en la inducción de una respuesta mucosal por vía intragástrica. Aunque por vía intraperitoneal ambas formas (soluble y cristalina) inducen respuestas de anticuerpos IgG e IgM en suero de magnitudes similares (11). En este mismo estudio se evaluaron los títulos de anticuerpos en heces y suero después que ambas formas fueran administradas solas y coadministradas con la toxina de cólera, un potente adyuvante mucoso ampliamente estudiado, sin embargo, tóxico. Al coadministrar la pCry1Ac con la toxina de cólera por vía intraperitoneal, se observó un aumento de las respuestas antitoxina de cólera, en anticuerpo de heces, lo que sugirió que las proteínas Cry pueden tener un efecto adyuvante cuando se administraba con otros antígenos.

Adicionalmente a la administración intragástrica e intraperitoneal, la inmunogenicidad de pCry1Ac soluble se ha evaluado aplicando a la proteína por otras rutas de inmunización: intranasal rectal, y vaginal, determinando su capacidad para inducir respuestas de anticuerpos específicos significativas en suero y en secreciones de mucosas recuperadas de lavado intestinal, broncoalveolar y vaginal de ratones BALB/c (11, 28, 30). Se ha observado también que la respuesta de anticuerpos inducida en suero, vagina e intestino grueso por la aplicación de intraperitoneal y vaginal de Cry1Ac en diestro y estro, no se modifica debido al estadio del ciclo estral (30).

## EFFECTOS ADYUVANTES DE LA PROTOXINA Cry1Ac

Los efectos adyuvantes de pCry1Ac se han evaluado con respecto a las respuestas de anticuerpos específicos alcanzadas tanto a nivel sistémico y mucosas hacia antígenos coadministrados de diferente naturaleza, tales como el antígeno de superficie de hepatitis B (13), péptidos de HIV (29) y polisacáridos neumocócicos (14). Se observó que el efecto adyuvante en mucosas inducido por pCry1Ac depende de la vía de administración y del antígeno utilizado e incluso puede ser tan potente como el provocado por la toxina del cólera.

pCry1Ac tiene efectos adyuvantes mucosos y sistémicos al inducir la respuesta de anticuerpos intestinales y sistémicos cuando se coadministra con proteínas como la albumina de suero bovino (BSA) y un antígeno de superficie de hepatitis B (HbsAg) en ratones Balb/c por las vías oral e intraperitoneal (13).

La capacidad de Cry1Ac de inducir respuestas sistémicas y en distintos sitios mucosos, incluyendo la mucosa vaginal que es un sitio en el que es difícil inducir respuestas inmunes significativas por la aplicación de proteínas solubles, sugería que podría utilizarse como acarreador de antígenos, de esta manera se evaluó y demostró el potencial de esta proteína como acarreador vacunal de un polisacárido capsular 6B (14) y de un epítipo de la toxina diftérica (31).

pCry1Ac es adyuvante y puede funcionar como un acarreador de vacuna, ya que la inmunización intranasal de polisacáridos de pneumococos coadministrados o conjugados con la proteína Cry1Ac indujo respuestas de anticuerpos séricos y en lavados traqueopulmonares significativamente mayores a las obtenidas por la administración de polisacáridos solos (14).

Se evaluó el potencial de pCry1Ac como adyuvante y vector vacunal de péptidos vacunales de HIV. La capacidad de Cry1Ac para incrementar la respuesta inmune humoral y celular en mucosas y sistémicas hacia péptidos fue modesta, sin embargo se aportó evidencia de que el efecto adyuvante de Cry1Ac y de toxina de cólera en la respuesta inmune local y sistémica depende del péptido coadministrado (29).

## EFFECTO PROTECTOR DE LA pCry1Ac

Se había demostrado que la Cry1Ac era inmunogénica y que tenía efectos adyuvantes en la respuesta inmune de anticuerpos (a nivel de mucosas y a nivel sistémico) cuando se coadministraba con antígenos de distinta naturaleza (proteínas y po-

lisacáridos), así que posteriormente se evaluó si como adyuvante incrementaban la protección en modelos de infecciones en mucosas y sistémicas, lo que mostraría su utilidad potencial como un coadyuvante protector prometedor capaz de mejorar la eficacia de las vacunas.

Se observó que la pCry1Ac soluble ya sea sola o coadministrada como coadyuvante, confiere protección en varios modelos de infecciones parasitarias en ratón, como los causados por *Naegleria fowleri*, *Taenia crassiceps*, *Plasmodium chabaudi* y *Plasmodium berghei* ANKA AS (32-34), y que además, aumentaba la inmunoprotección conferida por la vacuna RB51 en ratones desafiados con la cepa virulenta *Brucella abortus* 2308 (15).

La inoculación intranasal de *Naegleria fowleri* en ratones, provoca la meningoencefalitis amibiana primaria de una forma muy similar a la que se presenta en el humano (32). La infección es rápida y fatal, mata al 100% de los ratones infectados en 7 días. Interesantemente la pCry1Ac tiene un efecto adyuvante protector en el modelo de meningoencefalitis amibiana primaria en ratón; ya que al coadministrar la pCry1Ac con antígenos de *Naegleria fowleri* por vía intranasal incrementó a un 100% la protección ante la infección con esta amiba. Se indujeron respuestas significativas de anticuerpos IgG e IgA en suero y lavados traqueopulmonares por la inmunización intranasal e intraperitoneal, sin embargo, los títulos de anticuerpos en suero no parecen correlacionarse con el grado de protección, ya que el máximo grado de protección se logró por la vía intranasal mientras que los máximos títulos de anticuerpos se indujeron por la ruta intraperitoneal. Mientras que los títulos de anticuerpos IgG e IgA inducidos en lavados nasales y traqueopulmonares si se correlacionan con el grado de protección (32). Asimismo, la aplicación intranasal sola de pCry1Ac confiere a los ratones un alto nivel de protección contra la infección por *Naegleria fowleri* (60%), comparable al que se obtiene mediante la inmunización intranasal con extracto de proteínas totales de trofozoítos de *Naegleria fowleri* (32, 35, 36).

Estos resultados sugerían que tanto las respuestas de anticuerpos como los mecanismos inmunes innatos podían estar participando en los efectos protectores observados. Posteriormente, utilizando ratones deficientes en STAT-6 se encontró que la respuesta Th2 es indispensable en la protección conferida por la inmunización Cry1Ac coadministrada con extractos, ya que los ratones deficientes en STAT-6 no sobrevivieron a la infección a pesar de presentar respuestas Th1 más altas que las presentadas por los ratones silvestres que presentan preferentemente respuestas Th2 (36)

Por estos hallazgos y ante la necesidad del desarrollo de adyuvantes necesarios para mejorar la eficiencia de protección de las vacunas existentes se consideró importante evaluar el efecto adyuvante protector de la pCry1Ac en otros modelos de infección de patógenos que representaran un problema importante de salud para la población a nivel nacional y mundial.

Se evaluó el efecto inmunoprotector de Cry1Ac en un modelo de malaria murino, determinando si la pCry1Ac era capaz de inducir la respuesta inmune innata para inducir la protección contra *Plasmodium chabaudi* (no letal) y *Plasmodium berghei* ANKA AS (letal). Encontrándose que el pretratamiento con pCry1Ac induce protección contra ambas especies de Plasmodium ya que reduce la parasitemia, incrementa el tiempo de sobrevivencia, modula la expresión de mRNA de citocinas proinflamatorias como IFN- $\gamma$  y TGF- $\beta$  e incrementa los niveles de anticuerpo específicos IgG e IgM en ambas especies de Plasmodium en ratones (33).

De forma similar se determinó si la pCryAc como adyuvante inducía protección en un modelo murino experimental de cisticercosis por *Taenia crassiceps*. Al evaluar el efecto de la administración intraperitoneal de lisados solos, pCry1Ac sola, o pCry1Ac coadministrada con lisados de metacéstodos, se encontró que la pCry1Ac coadministrada con el extracto metacéstodos confirió protección por encima del 47%, sin embargo la pCry1Ac sola no provee protección (34), a diferencia del efecto protector inducido por pCry1Ac sola en los dos modelos de infección anteriormente descritos de *Naegleria fowleri* (32) y *Plasmodium* (33).

De forma importante también se observó que la proteína Cry1Ac usada como un adyuvante mucosal administrada por vía intranasal puede ser una alternativa prometedora para mejorar la vacuna RB51 contra la brucelosis, ya que al coadministrar pCry1Ac con la cepa vacunal RB51 de *Brucella abortus* y después de un desafío intranasal con la cepa virulenta *B. abortus* 2308 en ratones BALB / c aumentó la inmunoprotección conferida por la vacuna. Pues se observó una disminución de la carga bacteriana esplénica cuando se desafía intranasalmente con la cepa virulenta *B. abortus* 2308; se generó *in vivo* una mayor actividad citotóxica en respuesta a la transferencia de células previamente infectadas, se indujo proliferación de células TCD8 + citotóxicas en respuesta a la estimulación con bacterias inactivadas por calor; aumentó la producción de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ ; y se indujo una respuesta significativa de IgG2a (15).

## MECANISMO INMUNOMODULADOR DE pCry1Ac

El encontrar que la administración de la proteína Cry1Ac sola confería protección en algunos modelos de infección sugería que esta proteína tiene la capacidad de activar la respuesta inmune innata. De la misma manera se consideró que las propiedades inmunopotenciadoras de la pCry1Ac podrían estar relacionadas con su capacidad para activar linfocitos y células presentadoras de antígeno.

Al evaluar los efectos de la pCry1Ac en la producción de citocinas en linfocitos obtenidos de diferentes compartimientos mucosales intestinales y nasales; y en la expresión de marcadores de activación, proliferación, moléculas de adhesión en linfocitos. Se encontró que esta proteína tiene la capacidad de inducir preferentemente la activación de linfocitos B y TCD4<sup>+</sup>, así como de inducir la producción de citocinas o de modificar el patrón existente de citocinas producidas constitutivamente en linfocitos de los distintos compartimientos mucosales. Se encontró que la aplicación intranasal de pCry1Ac favorece la inducción de respuestas de citocinas tipo Th2 en linfocitos nasales obtenidos del tejido linfoide asociado nariz (NALT) y pasajes nasales (37).

Para continuar la caracterización del efecto inmunostimulador de la pCry1Ac y en virtud de que varios adyuvantes de origen microbiano ejercen parte de su actividad a través de inducir la expresión de moléculas coestimuladoras y la producción de citocinas por parte de células presentadoras de antígeno (38, 39), se evaluó si la pCry1Ac era capaz de activar a los macrófagos e inducir estos efectos. Se demostró que pCry1Ac es capaz de activar macrófagos murinos de cultivos primarios y de la línea celular celular RAW 264.7 en ensayos *in vivo* e *in vitro*, induciendo la expresión de moléculas coestimuladoras como CD80 y CD86 y la sobreproducción de citocinas proinflamatorias IL-6, TNF- $\alpha$  y la quimiocina MCP-1. Se observó que al administrar pCry1Ac por vía intranasal e intraperitoneal en ratones BALB/c, se induce una respuesta de activación en macrófagos de diferentes sitios sistémicos y mucosos como peritoneo, bazo, nódulos linfáticos mesentéricos, o en pulmón y lavados traqueoalveolares. Asimismo, los ensayos *in vitro* realizados con células adherentes obtenidas de diferentes mucosas, mostraron que esta proteína era capaz de inducir la expresión de moléculas coestimuladoras CD80 y CD86 e inducir la producción de citocinas proinflamatorias TNF- $\alpha$ , IL-6 y MCP-1, obteniendo en varios casos efectos comparables a los obtenidos con el lipopolisacárido

(LPS). Mediante el uso de inhibidores de MAPKs se sugirió la participación de las vías de las MAPKs ERK1/2 y p38 en la sobreexpresión de las moléculas coestimuladoras y la producción de citocinas inducidas por pCry1Ac (40), posteriormente se confirmó la capacidad de pCry1Ac de inducir la activación de las MAPKs ERK1/2, JNK y p38 en macrófagos (44).

Las toxinas del grupo Cry1A se unen a los receptores encontrados en la membrana de las células epiteliales del intestino medio de insectos (41) tales como la aminopeptidasa N de 120 kDa (APN) (42) y una glicoproteína de tipo cadherina de 210 kDa (43) y recientemente se ha publicado que la pCry1Ac tiene también sitios de unión en el intestino medio del insecto, proponiéndose un nuevo modelo dual de acción de las proteínas Cry (6). Sin embargo, no se sabe si estas glicoproteínas funcionan como receptores de toxinas Cry1A en vertebrados. Se ha informado de que la pCry1Ac se une a los enterocitos de ratón *in vitro* (44), pero la unión no fue inhibida por la GalNAc, la manosa o la biotina, lo que sugiere que otro tipo de moléculas están interactuando con las proteínas Cry (31).

Hasta recientemente no se había mostrado evidencia que sugiriera la existencia de posibles receptores para las proteínas Cry1Ac en mamíferos. Sin embargo, dado los hallazgos que demostraban la capacidad de pCry1Ac de activar macrófagos y que las MAPKs median algunos de los efectos inducidos por pCry1Ac; y conociendo que las vías de las MAPKs se activan principalmente a través de las interacciones ligando-receptor, nos dimos a la tarea de identificar proteínas de unión a pCry1Ac que pudieran ser potenciales receptores. Primero se demostró que la pCry1Ac muestra una unión saturable específica a la superficie de los macrófagos lo que evidencia la presencia de posibles receptores en este tipo celular. Encontramos también que la internalización de pCry1Ac es mediada por endocitosis mediada por clatrina ya que es inhibida por monodansilcadaverina y pCry1Ac colocaliza con las proteínas de endosomas tempranos y tardíos Rab5 y Rab7 respectivamente. A través de ensayos de inmunoprecipitación y posterior identificación por MALDI-TOF-TOF se encontraron varias proteínas de unión a pCry1Ac, tales como proteínas de choque térmico (HSPs), vimentina,  $\alpha$ -enolasa y actina. Se confirmó la interacción de HSPs70 con pCry1Ac y su colocalización en la superficie celular de los macrófagos. Además, se encontró que la activación de macrófagos inducida por Cry1Ac es parcialmente mediada por HSP70 de superficie ya que el pretratamiento con anticuerpos anti HSP70 inhibe la fosforilación de ERK1 y la producción de MCP1 inducida por Cry1Ac en macrófagos. Además,

la participación *in vivo* de HSP70 de superficie en los efectos de Cry1Ac en macrófagos se evaluó en ratones tratados con feniletilsulfonamida, un inhibidor funcional de HSP70, los resultados apoyan la función de HSP70 ya que el inhibidor disminuyó la migración de macrófagos inflamatorios inducida por Cry1Ac en la cavidad peritoneal. Sin embargo es necesario determinar la participación funcional de otras proteínas de unión a pCry1Ac en macrófagos como posibles receptores (45).

## PROPIEDADES INMUNOLÓGICAS DE LA tCry1Ac

La mayoría de los estudios basados en las propiedades inmunológicas de las proteínas Cry, se han centrado en la pCry1Ac (9, 14, 44). Sin embargo, se ha demostrado que parte de la inmunogenicidad (evaluada por la respuesta inmune humoral) de estas toxinas reside en la región del extremo N-terminal (46). Guerrero (31), evaluaron qué implicaciones tenía la región del extremo N-terminal de la pCry1Ac (que corresponde a la estructura y secuencia de la tCry1Ac) en las propiedades inmunológicas de las varias pCry. Al comparar la inmunogenicidad de las diferentes familias de protoxinas y toxinas Cry: Cry1 (Aa, Ab y 1Ac) y la proteína Cry3A se encontró que las toxinas Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Ac eran capaces de inducir respuestas específicas de anticuerpos IgG e IgA en el suero y varios sitios de mucosas (intestino delgado, el intestino grueso y en los lavados traqueo-pulmonales) después de administrarse vía intraperitoneal o vía intranasal, lo que demostraba que las tCry1A también son inmunogénicas tanto a nivel sistémico como mucosal, como la protoxina. Al realizar ensayos de inhibición de la reactividad de anticuerpos anti protoxina por competencia con toxina Cry, se encontró que gran parte de los anticuerpos que se generaban hacia la protoxina iban dirigidos a la región de la toxina. Lo que sugería que la región que corresponde a las toxina Cry en la protoxina, es importante en los efectos inmunológicos inducidos por la protoxina (46).

Asimismo, se ha demostrado el potencial de las toxinas Cry1A de funcionar como vector vacunal, ya que en un estudio se mostró, que la inmunización con unas proteínas mutantes de la toxina Cry1Aa como la denominada Cry1Aa8, en la que un motivo hidrofóbico de ocho aminoácidos en la  $\alpha$ -hélice 7 del dominio I de la toxina Cry1A silvestre, se intercambió por un epítipo de toxina diftérica, indujo respuestas de anticuerpos que reconocieron a la toxina diftérica. Además se observó tanto la toxina Cry1Aa silvestre, como la mutante Cry1Aa8, fueron capaces de generar respuestas inmunitarias

celulares y aumentar la producción de citocinas, principalmente IFN- $\gamma$  e IL-12 después de una estimulación intranasal (47).

Posteriormente, se confirmó la inmunogenicidad de la toxina Cry1Ab, en un modelo de ratón BALB/c, al mostrar que esta proteína genera respuestas específicas de anticuerpos tanto IgG1 e IgG2a, indicando que induce una respuesta inmune mezclada Th1/Th2 cuando se administra intraperitonealmente (48). De la misma manera, Andreassen y cols., confirmaron la inmunogenicidad de Cry1Ab por la vía intranasal, previamente reportada por Guerrero (31, 49).

Asimismo, recientemente se demostró que la tCry1Ac es capaz de activar los macrófagos de bazo y de la línea celular RAW264.7, induciendo la expresión de las moléculas coestimuladoras CD80 y CD86 e ICOS-L y la producción de las citocinas proinflamatorias IL-6, TNF- $\alpha$  y la quimiocina MCP-1. Además se demostró la capacidad de tCry1Ac de inducir la activación de las MAPKs ERK1/2, p38 y JNK y la translocación al núcleo del factor de transcripción NF- $\kappa$ B; así como la participación de las MAPKs en algunos de los efectos de activación inducidos por tCry1Ac, a través del uso de inhibidores específicos de esta vía (50).

## CONCLUSIONES

Dentro de las estrategias actuales para desarrollar vacunas mucosales efectivas y/o inmunoterapias se encuentra la búsqueda de formas más eficientes de administración de antígenos al sistema inmune de mucosas y el descubrimiento de adyuvantes de mucosas y sistémicos seguros y provean inmunidad. Considerando antecedentes ya reportados sobre la pCry1Ac se pudiera proponer como una

herramienta valiosa para incrementar la eficacia de vacunas induciendo inmunoprotección en mucosas, si se emplea ya sea como adyuvante, o como inmunomodulador, así como para caracterizar la compartimentalización del sistema inmunitario de las mucosas.

La mayoría de los estudios de las propiedades inmunológicas se han realizado en las proteínas del grupo Cry1Ac, sin embargo, se ha observado que la protoxina y toxina del grupo Cry1Aa y Cry1Ab, también son inmunogénicas induciendo respuesta a nivel de mucosas y sistémico, considerando el alto porcentaje de identidad entre estas proteínas como se aprecia en la (Fig. 2) en la que se muestra la superposición de la estructura cristalográfica de la toxina Cry1Ac y de la toxina Cry1Ab. Además, podría profundizarse en el estudio de las propiedades adyuvantes de las protoxinas CryAb y Cry1Aa, así como de las toxinas de los tres grupos. Asimismo, creemos necesario evaluar la respuesta de tipo celular que puede generar estas proteínas, ya que existen pocos estudios al respecto. También es importante identificar si existen otros receptores en mamíferos para los cuales las proteínas Cry podrían ser ligandos; así como caracterizar las vías de señalización que pueden estar activando como parte de la caracterización del mecanismo inmunomodulador de las proteínas Cry.

## AGRADECIMIENTOS

Al financiamiento otorgado por los siguientes proyectos: SEP, proyecto CB177612, UNAM PAPIIT, proyecto IN219416, Proyecto PAPCA 2016-No.28, al posgrado en "Ciencias Bioquímica" de la UNAM. MTM recibió una beca de CONACYT con número 209662.





## REFERENCIAS

1. De Bortoli S A, Vacari A M, Polanczyk RA, Carolina A, Veiga P, Goulart R M (2017) "Bacillus thuringiensis and Lysinibacillus sphaericus" pp. 67–77.
2. Bravo A, Likitvivatanavong S, Gill SS, Soberón M (2011) Bacillus thuringiensis: A story of a successful bioinsecticide. *Insect Biochem Mol Biol* 41:423–31.
3. Pardo-López L, Soberón M, Bravo A (2013) Bacillus thuringiensis insecticidal three-domain Cry toxins: mode of action, insect resistance and consequences for crop protection. *FEMS Microbiol Rev* 37:3–22.
4. Gill SS, Cowles EA, Pietrantonio PV (1992) The Mode of Action of Bacillus thuringiensis Endotoxins. *Ann Rev Entomol* 37:615–34.
5. Adang MJ, Crickmore N, Jurat-Fuentes JL (2014) Diversity of Bacillus thuringiensis Crystal Toxins and Mechanism of Action. *Adv Insect Physiol* 39-87 p.
6. Tabashnik BE, Zhang M, Fabrick J a., Wu Y, Gao M, Huang F (2015) Dual mode of action of Bt proteins: protoxin efficacy against resistant insects. *Scientific Reports*. Nature Publishing Group 5:15107.
7. Zhang X, Candas M, Griko NB, Taussig R, Bulla LA (2006) A mechanism of cell death involving an adenylyl cyclase/PKA signaling pathway is induced by the Cry1Ab toxin of Bacillus thuringiensis. *Proc Natl Acad Sci* 103:9897–902.
8. Rubio-Infante N, Moreno-Fierros L (2016) An overview of the safety and biological effects of Bacillus thuringiensis Cry toxins in mammals. *J Appl Toxicol* 36:630–48.
9. Moreno-Fierros L, Garcia N, Gutierrez R, Lopez-Revilla R, Vazquez-Padron RI (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 Infect* 2:885–90.
10. Moreno-Fierros L, Pérez-Ordóñez I, Palomar-Morales M (2002) Slight influence of the estrous cycle stage on the mucosal and systemic specific antibody response induced after vaginal and intraperitoneal immunization with protoxin Cry1Ac from Bacillus thuringiensis in mice. *Life Sci* 71:2667–80.
11. Vazquez-Padron RI, Moreno-Fierros L, Neri-Bazan L, de la Riva GA, Lopez-Revilla R (1999) Intragastric and intraperitoneal administration of Cry1Ac protoxin from Bacillus thuringiensis induces systemic and mucosal antibody responses in mice. *Life Sci* 64:1897–912.
12. Esquivel-Perez R, Moreno-Fierros L (2005) Mucosal and systemic adjuvant effects of cholera toxin and Cry1Ac protoxin on the specific antibody response to HIV-1 C4/V3 peptides are different and depend on the antigen co-administered. *Viral Immunol* 18:695–708.
13. Vázquez RI, Moreno-Fierros L, Neri-Bazán L, De La Riva G a., López-Revilla R, (1999) Bacillus thuringiensis Cry1Ac protoxin is a potent systemic and mucosal adjuvant. *Scand J Immunol* 49:578–84.
14. Moreno-Fierros L, Ruiz-Medina EJ, Esquivel R, Lopez-Revilla R, Pina-Cruz S (2003) Intranasal Cry1Ac protoxin is an effective mucosal and systemic carrier and adjuvant of Streptococcus pneumoniae polysaccharides in mice. *Scand J Immunol* 57:45–55.
15. Gonzalez-Gonzalez E, Garcia-Hernandez AL, Flores-Mejia R, Lopez-Santiago R, Moreno-Fierros L (2015) The protoxin Cry1Ac of Bacillus thuringiensis improves the protection conferred by intranasal immunization with Brucella abortus RB51 in a mouse model. *Vet Microbiol* 175:382–8.
16. Feitelson JS, Payne J, Kim L (1992) Bacillus thuringiensis: Insects and Beyond. *Nat Biotech Nature Pub Co* 10:271–5.
17. Chattopadhyay A, Bhatnagar NB, Bhatnagar R (2004) Bacterial Insecticidal Toxins. *Crit Rev Microbiol* 30:33–54.
18. Chattopadhyay A, Bhatnagar NB, Bhatnagar R (2016) Critical Reviews in Microbiology Bacterial Insecticidal Toxins Bacterial Insecticidal Toxins. *Crit Rev Microbiol* 7828:33–5433.
19. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops (2016).
20. Sanahuja G, Banakar R, Twyman RM, Capell T, Christou P (2011) Bacillus thuringiensis: a century of research, development and commercial applications. *Plant Biotechnol J* 9: 283–300.
21. De Maagd R a., Bravo A, Crickmore N (2001) How Bacillus thuringiensis has evolved specific toxins to colonize the insect world. *Trends Genet* 17:193–9.

22. Crickmore N, Zeigler DR, Feitelson J, Schnepf E, Van Rie J, Lereclus D (1998) Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiol Mol Biol Rev* 62:807-13.
23. Samples JR, Buettner H (1983) Ocular infection caused by a biological insecticide. *J. Infect. Dis.* 148:614.
24. Green M, Heumann M, Sokolow R, Foster LR, Bryant R, Skeels M (1990) Public health implications of the microbial pesticide *Bacillus thuringiensis*: An epidemiology study, Oregon, 1985-86. *Am J Public Health* 80:848-52.
25. Bernstein IL, Bernstein JA, Miller M, Tierzieva S, Bernstein DI, Lummus Z (1999) Immune responses in farm workers after exposure to *Bacillus thuringiensis* pesticides. *Environ. Health Perspect* 107:575-82.
26. Prasad SSS V., Shethna YI (1976) Mode of Action of a Purified Antitumor Protein from the Proteinaceous Crystal of *Bacillus thuringiensis* subsp. *thuringiensis* on Yoshida Ascites Sarcoma Cells. *Antimicrob Agents Chemother* 10:293-8.
27. Prasad SS, Shethna YI (1975) Enhancement of immune response by the proteinaceous crystal of *Bacillus thuringiensis* var *thuringiensis*. *Biochem Biophys Res Commun* 62:517-23.
28. Moreno-Fierros L, García N, Gutiérrez R, López-Revilla R, Vázquez-Padrón RI, 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 Infect* 2:885-90.
29. Esquivel-Perez R, Moreno-Fierros L, Esquivel-Pérez R, Moreno-Fierros L (2005) Mucosal and systemic adjuvant effects of cholera toxin and Cry1Ac protoxin on the specific antibody response to HIV-1 C4/V3 peptides are different and depend on the antigen co-administered. *Viral Immunol* 18:695-708.
30. Moreno-Fierros L, Pérez-Ordóñez I, Palomar-Morales MM, Perez-Ordóñez I, Palomar-Morales MM (2002) Slight influence of the estrous cycle stage on the mucosal and systemic specific antibody response induced after vaginal and intraperitoneal immunization with protoxin Cry1Ac from *Bacillus thuringiensis* in mice. *Life Sci* 18:2667-80.
31. Guerrero GG, Russell WM, Moreno-Fierros L (2007) Analysis of the cellular immune response induced by *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxins in mice: Effect of the hydrophobic motif from diphtheria toxin. *Mol Immunol* 44:1209-17.
32. Rojas-Hernández S, Rodríguez-Monroy M a., López-Revilla R, Reséndiz-Albor A ., Moreno-Fierros L (2004) Intranasal coadministration of the Cry1Ac protoxin with amoebal lysates increases protection against *Naegleria fowleri* meningoencephalitis. *Infect Immun* 72:4368-75.
33. Legorreta-Herrera M, Meza RO, Moreno-Fierros L (2010) Pretreatment with Cry1Ac protoxin modulates the immune response, and increases the survival of Plasmodium-infected CBA/Ca mice. *J Biomed Biotechnol* 2010:198921.
34. Ibarra-Moreno S, García-Hernández A. L, Moreno-Fierros L (2014) Coadministration of protoxin Cry1Ac from *Bacillus thuringiensis* with metacestode extract confers protective immunity to murine cysticercosis. *Parasite Immunol* 36:266-70.
35. Jarillo-Luna A., Moreno-Fierros L, Campos-Rodríguez R, Rodríguez-Monroy MA, Lara-Padilla E, Rojas-Hernandez S (2008). Intranasal immunization with *Naegleria fowleri* lysates and Cry1Ac induces metaplasia in the olfactory epithelium and increases IgA secretion. *Parasite Immunol* 30:31-8.
36. Carrasco-Yepez M, Rojas-Hernandez S, Rodríguez-Monroy MA, Terrazas LI, Moreno-Fierros L (2010) Protection against *Naegleria fowleri* infection in mice immunized with Cry1Ac plus amoebic lysates is dependent on the STAT6 Th2 response. *Parasite Immunol* 32:664-70.
37. Rodríguez-Monroy M a., Moreno-Fierros L (2010) Striking activation of NALT and nasal passages lymphocytes induced by intranasal immunization with Cry1Ac protoxin. *Scand J Immunol* 71:159-68.
38. Lavelle EC (2005) Generation of improved mucosal vaccines by induction of innate immunity. *Cell Mol Life Sci* 62:2750-70.
39. Williams NA, Hirst TR, Nashar TO (1999) Immune modulation by the cholera-like enterotoxins: from adjuvant to therapeutic. *Immunol Today* 20:95-101.
40. Moreno-Fierros L, García-Hernández ALAL, Ilhuicatzí-Alvarado D, Rivera-Santiago L, Torres-Martínez M, Rubio-Infante NN (2013) Cry1Ac protoxin from *Bacillus thuringiensis* promotes macrophage activation by upregulating CD80 and CD86 and by inducing IL-6, MCP-1 and TNF- $\alpha$  cytokines. *Int Immunopharmacol* 17:1051-66.

41. Vadlamudi RK, Weber E, Ji I, Ji TH, Bulla LA (1995) Cloning and expression of a receptor for an insecticidal toxin of *Bacillus thuringiensis*. *J Biol Chem* 270:5490–4.
42. Knight PJ, Crickmore N, Ellar DJ (1994) The receptor for *Bacillus thuringiensis* CryIA(c) delta-endotoxin in the brush border membrane of the lepidopteran *Manduca sexta* is aminopeptidase N. *Mol Microbiol* 11:429–36.
43. Nagamatsu Y, Koike T, Sasaki K, Yoshimoto A, Furukawa Y (1999) The cadherin-like protein is essential to specificity determination and cytotoxic action of the *Bacillus thuringiensis* insecticidal CryIAa toxin. *FEBS Lett* 460:385–90.
44. Vázquez-Padrón RI, Gonzáles-Cabrera J, García-Tovar C, Neri-Bazan L, Lopéz-Revilla R, Hernández M (2000) Cry1Ac protoxin from *Bacillus thuringiensis* sp. kurstaki HD73 binds to surface proteins in the mouse small intestine. *Biochem Biophys Res Commun* 271:54–8.
45. Rubio-Infante N, Ilhuicatzí-Alvarado D, Torres-Martínez M, Reyes-Grajeda JP, Nava-Acosta R, González-González E (2017) The Macrophage Activation Induced by *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac Protoxin Involves ERK1/2 and p38 Pathways and the Interaction with Cell-Surface-HSP70. *J Cell Biochem Jun* 13.
46. 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.
47. Guerrero GG, Moreno-Fierros L (2007) Carrier potential properties of *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxins for a diphtheria toxin epitope. *Scand J Immunol* 66:610–8.
48. Adel-Patient K, Guimaraes VD, Paris A, Drumare MF, Ah-Leung S, Lamourette P, Nevers MC, Canlet C, Molina J, Bernard H, Créminon C, Wal JM (2011) Immunological and metabolomic impacts of administration of Cry1Ab protein and MON 810 maize in mouse. *PLoS One* 27:e16346.
49. Andreassen M, Rocca E, Bøhn T, Wikmark O-G, van den Berg J, Løvik M (2015) Humoral and cellular immune responses in mice after airway administration of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab and MON810 Cry1Ab -transgenic maize. *Food Agric Immunol* 26:521–37.
50. Torres-Martínez M, Rubio-Infante N, García-Hernández AL, Nava-Acosta R, Ilhuicatzí-Alvarado D, Moreno-Fierros L (2016) Cry1Ac toxin induces macrophage activation via ERK1/2, JNK and p38 mitogen-activated protein kinases. *Int J Biochem Cell Biol* 78:106-115.
51. Derbyshire DJ, Ellar DJ, Li J (2001) Crystallization of the *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac and its complex with the receptor ligand N-acetyl-D-galactosamine. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 57:1938-44.
52. Evdokimov AG, Moshiri F, Sturman EJ, Rydel TJ, Zheng M, Seale JW, Franklin S (2014) Structure of the full-length insecticidal protein Cry1Ac reveals intriguing details of toxin packaging into in vivo formed crystals. *Protein Sci* 23:1491-7.