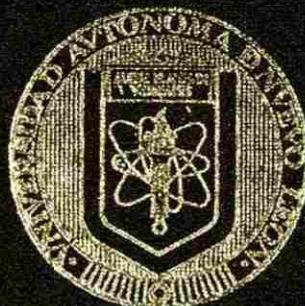


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



ACTIVIDAD ADYUVANTE DE LOS CRISTALES Y LAS
PROTEINAS DE *BACILLUS THURINGIENSIS* GM-1
VAR. AIZAWAL EFECTO SOBRE LA RESPUESTA
INMUNE HUMORAL Y CELULAR

TESIS QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS
CON ESPECIALIDAD EN INMUNOBIOLOGIA

PRESENTA:

Q.B.P. MAXIMO EUGENIO ROMAN CALDERON

MONTERREY, N. L.

JULIO DE 1997

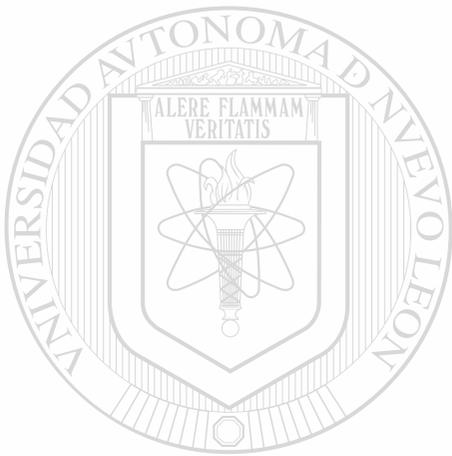
TM

Z5320

FCB

1997

R6



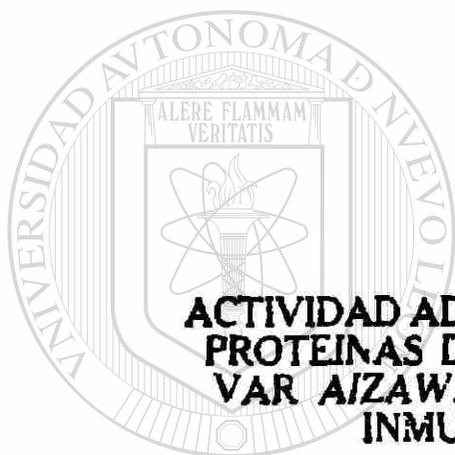
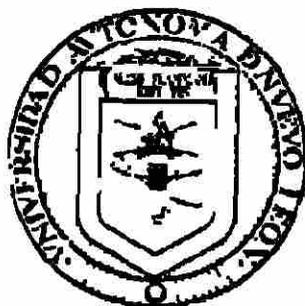
UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO**



**ACTIVIDAD ADYUVANTE DE LOS CRISTALES Y LAS
PROTEÍNAS DE *BACILLUS THURINGIENSIS* GM-1
VAR AIZAWAI EFECTO SOBRE LA RESPUESTA
INMUNE HUMORAL Y CELULAR**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



**DIR TESIS QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS
CON ESPECIALIDAD EN INMUNOBIOLOGÍA**

PRESENTA:

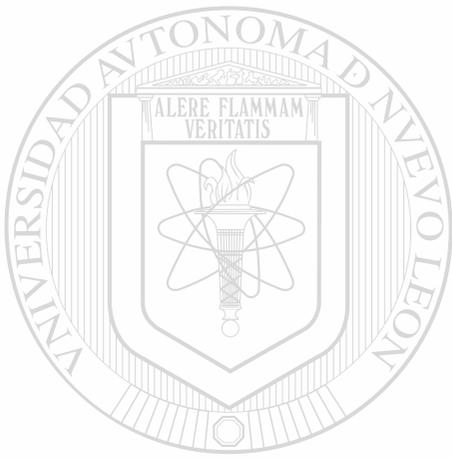
Q.B.P. MAXIMO EUGENIO ROMAN CALDERON

MONTERREY, N. L.

JULIO DE 1997

TM
Z5320
FCB
1997
R6

0116-30760

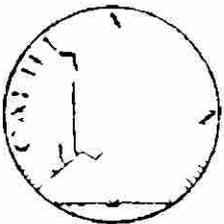


UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

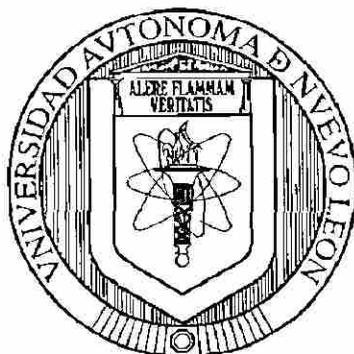


DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



FONDO TESIS

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO



ACTIVIDAD ADYUVANTE DE LOS CRISTALES Y LAS PROTEÍNAS DE *BACILLUS THURINGIENSIS* GM-1 VAR. AIZAWAI. EFECTO SOBRE LA RESPUESTA INMUNE HUMORAL Y CELULAR

U A N L

— TESIS QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN INMUNOBIOLOGÍA —

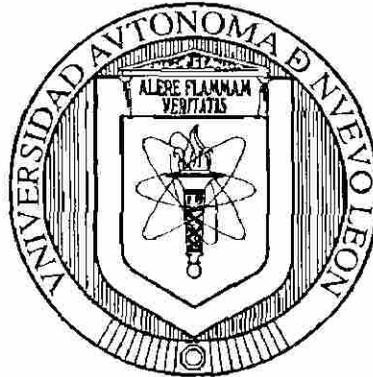
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS
PRESENTA

Q.B.P. MAXIMO EUGENIO ROMÁN CALDERÓN

MONTERREY, N. L.

JULIO DE 1997

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO



ACTIVIDAD ADYUVANTE DE LOS CRISTALES Y LAS PROTEÍNAS DE BACILLUS THURINGIENSIS GM-1 VAR. AIZAWAI. EFECTO SOBRE LA RESPUESTA INMUNE HUMORAL Y CELULAR

COMISION DE APROBACION DE TESIS

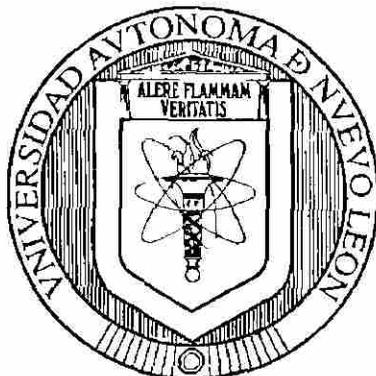
Dra. Cristina Rodríguez Padilla
Director

Dr. Reyes S. Tamez Guerra
Co-Director

Dr. Luis J. Galán Wong
Co-Director

Dra. Julia Verde Star
Subdirectora de Postgrado

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO



ACTIVIDAD ADYUVANTE DE LOS CRISTALES Y LAS PROTEÍNAS DE BACILLUS THURINGIENSIS GM-1 VAR. AIZAWAI. EFECTO SOBRE LA RESPUESTA INMUNE HUMORAL Y CELULAR

COMISION DE EXAMEN

Dra. Cristina Rodríguez Padilla
Presidente

Dr. Reyes S. Tamez Guerra
Secretario

Dr. Luis J. Galán Wong
Vocal

MONTERREY, N.L.

JULIO DE 1997



YO HE OFENDIDO A DIOS Y AL HOMBRE
PORQUE MI TRABAJO NO ALCANZÓ LA CALIDAD
QUE DEBIÓ

Leonardo da Vinci

UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

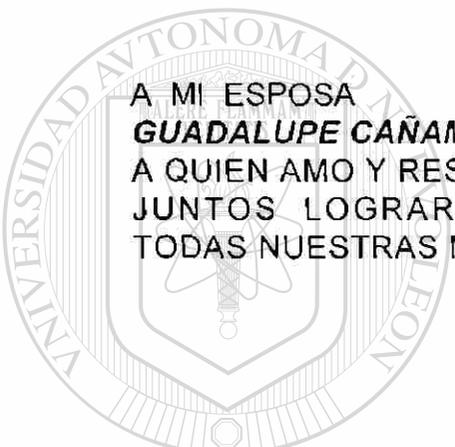


DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

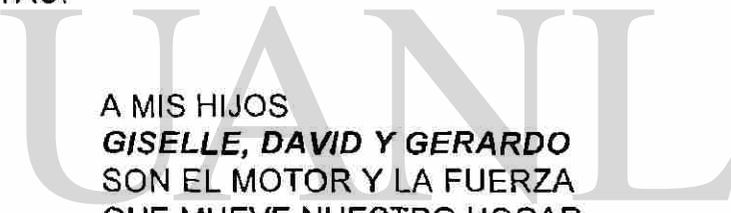
DEDICATORIA

**A DIOS, SIEMPRE PRESENTE
QUIEN ME HA PERMITIDO
SER LO QUE SOY Y ESTAR
DONDE ESTOY.**

**A LA MEMORIA DE MI MADRE
ANTONIA CALDERÓN ACUÑA
TE AMARE SIEMPRE.**



**A MI ESPOSA
GUADALUPE CAÑAMAR R.
A QUIEN AMO Y RESPETO,
JUNTOS LOGRAREMOS
TODAS NUESTRAS METAS.**



**A MIS HIJOS
GISELLE, DAVID Y GERARDO
SON EL MOTOR Y LA FUERZA
QUE MUEVE NUESTRO HOGAR,
LOS AMO.**

**A MI PADRE
MÁXIMO ROMÁN M.
SIEMPRE AUSENTE,
TAMBIÉN TE AMO.**

**A MIS HERMANOS
LEONEL Y CRISTINA
ESPERO QUE LA HERIDA
DE LA DISTANCIA
ALGUN DIA CICATRICE.
POR EL AMOR CON EL
CUAL CRECIMOS.**

AGRADECIMIENTOS

A la *Dra. Cristina Rodríguez*, sus ideas y consejos siempre oportunos, en el desarrollo del presente trabajo. Maestra siempre agradecido por permitirme compartir el éxito y momentos difíciles en el laboratorio.

Al *Dr. Reyes S. Tamez Guerra*, maestro brillante, ejemplo a seguir, gracias por permitirme ser parte del laboratorio.

Al *Dr. Luis Galán Wong*, maestro de gran corazón, gracias por las oportunidades que siempre me ha brindado.

A la *Dra. Julia Verde Star*, por el apoyo que recibí en la realización de mis estudios y de la presente investigación

Al *Dr. Mario Rocha*, por su amistad siempre sincera.

Al *Ing. Orel Darío García*, realmente la oportunidad que me brindo me permitió continuar con mis estudios, muchas gracias.

Al *Dr. Juan M. Alcocer González*, por sus ideas chispeantes y su amistad.

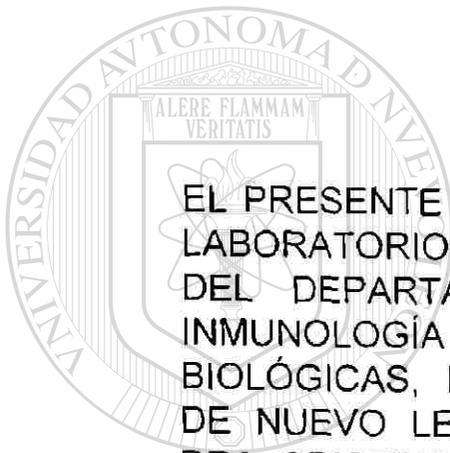
Al CONACYT, por la beca que me otorgaron para la realización de la maestría y culminación del presente trabajo.

Al *M.C. Enrique Ramírez Bon*, por su ayuda en la preparación del material histológico.

A mis amigos del laboratorio de Biología molecular, *Dr. Benito Pereyra* y *MC. Magda Iracheta*, por su amistad, consejos, experiencia y material compartido en el presente trabajo.

A mis compañeros y amigos del laboratorio de Inmunología, *Leonardo, Pepe, Laurita, Juanny, Arturo*. La maestra *Yola, Belmontes, Esther, Perita*, La comadre *Bertha* y *Betty Reyna* por su amistad siempre sincera.

A mis compañeros y amigos del laboratorio de Virología, *M.C. Pablo Zapata*, y *Q.B.P. Ma. Antonieta Lara*, por su amistad y material que siempre hemos compartimos.



EL PRESENTE TRABAJO SE DESARROLLO EN EL LABORATORIO DE INMUNOLOGÍA Y VIROLOGÍA DEL DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA E INMUNOLOGÍA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS, DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN, BAJO LA DIRECCIÓN DE LA DRA. **CRISTINA RODRÍGUEZ PADILLA.**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

ÍNDICE DEL CONTENIDO

	pag.
☞ Ubicación	i
☞ Índice de figuras y gráficas	v
☞ Índice de tablas	vi
☞ Abreviaturas	vii
☞ Resumen.	viii
☞ Summary	x
☞ Introducción.	1
☞ Antecedentes.	
♦ Aduvantes No Bacterianos.	3
➤ Compuestos de Aluminio.	3
➤ El Aduvante Incompleto de Freund.	3
➤ Los Liposomas.	4
➤ Complejos Inmunoestimulantes (ISCOM).	4
➤ Aduvantes Sintéticos.	5
♦ Aduvantes Mediadores del Hospedero.	5
♦ Aduvantes Bacterianos.	5
➤ El Aduvante Completo de Freund.	6
➤ El Lipopolisacárido o Endotoxina Bacteriana.	6
<hr/>	
♦ <i>Bacillus thuringiensis</i> .	
➤ La Clasificación de <i>B.t.</i>	7
➤ La Purificación de los Cristales (δ -endotoxina) de <i>B.t.</i>	8
➤ Las Proteínas del Cristal de <i>B.t.</i>	12
➤ La Estructura de las Proteínas del Cristal de <i>B.t.</i>	13
➤ Actividades Tóxicas y el Modo de Acción de las δ -Endotoxinas de <i>B.t.</i>	16
➤ El Receptor en la Membrana Epitelial y el Modo de Acción de la Toxina.	17
➤ Otras Actividades Biológicas de <i>B.t.</i>	22
☞ Hipótesis.	25
☞ Objetivos.	26
☞ Importancia.	27
☞ Materiales y Métodos.	
1. Obtención de la Cepa.	28

2. Antígenos.	28
3. Anticuerpos.	28
4. Producción de los Cristales.	29
5. Obtención de los Cristales.	29
6. Purificación de los Cristales.	29
6.1 Procesamiento de la Muestra de Cristales para Microscopía Electrónica de Barrido.	30
7. Solubilización de los Cristales.	
➤ Método I.	30
➤ Método II.	30
➤ Método III.	30
8. Digestión Enzimática de la Proteína Solubilizada.	
A. Digestión con Tripsina.	31
B. Digestión con Papaina.	31
9. Determinación de la Concentración de Proteína.	31
10. Determinación del Peso Molecular SDS-PAGE.	32
11. Western Blot (Inmunoelctrotransferencia).	32
12. Determinación del Efecto de los Cristales y las Proteínas en la Inmunidad Humoral.	33
12.1 Método de Cunningham y Szenberg de 1968.	34
12.2 Ajuste de las Células Formadoras de Placa a un Millón de Células de Bazo.	34
12.3 Tinción de los Núcleos con cristal Violeta y Enumeración en la Cámara de Neubauer.	35
12.4 Determinación de la Viabilidad Celular por el Método de Azul Tripán.	35
13. Cultivo de las Células de Bazo para la Obtención y Caracterización de los Anticuerpos Producidos por las Cé- lulas Plasmáticas.	36
13.1 Elisa Indirecto Dependiente de Antígeno para la Captura de Clase	36
14. Estimulación de la Inmunidad Celular con las Proteínas de GM-1. Prueba de Hipersensibilidad en Ratones Balb/c.	37
14.1 Caracterización Morfológica de las Poblaciones Celulares Infiltrantes en la Inflamación.	38
☛ Resultados	
I. Purificación de los Cristales	39
II. Obtención y Caracterización de las Proteínas del Cristal	40

III. Efecto de los Cristales y las Proteínas del Cristal de <i>B.t.</i> GM-1 sobre la Respuesta Humoral de Anticuerpos.	44
IV. Actividad de las Proteínas del Cristal de <i>B.t.</i> GM-1 Sobre la Respuesta Inmune Celular.	50
☞ Discusiones.	55
☞ Conclusiones.	58
☞ Perspectivas	59
☞ Literatura Consultada.	60
☞ Apéndice de Soluciones y Reactivos.	74



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

INDICE DE FIGURAS Y GRAFICAS

	fig.	graf.	pag.
♦ Estructura Atómica de la Toxina de <i>B.t.</i> CryIII A.	1		15
♦ Las Esporas y los Cristales de GM-1.	2		39
♦ Los Cristales de GM-1 al Microscopio Electrónico de Barrido.	3		39
♦ Electroforesis de las proteínas del cristal de GM-1.	4		41
♦ Inmuno-electrotransferencia de las proteínas de GM-1 con anti-CryIA(b).	5		41
♦ Inmuno-electrotransferencia de las proteínas de GM-1 con anti-CryIA(c).	6		42
♦ Inmuno-electrotransferencia de las proteínas de GM-1 con anti-CryIII A.	7		42
♦ Inmuno-electrotransferencia de las proteínas de GM-1 con anti-CryIII C.	8		43
♦ Inmuno-electrotransferencia de las proteínas de GM-1 con α -Otp.	9		43
♦ Célula formadora de placa lítica anti E.C.	10		44
♦ Intoxicación de los ratones Balb/c con L.P.S	11		47
♦ Reacción de inflamación en un ratón Balb/c.	12		51
♦ Corte histológico del coginete plantar de un ratón Balb/c 3 h. después del reto antigénico con GM-1.	13		52
♦ Corte histológico del coginete plantar de un ratón Balb/c 3 h. después del reto con solución salina.	14		52
♦ Corte histológico del coginete plantar de un ratón Balb/c 24 h. después del reto antigénico con GM-1	15		53
♦ Corte histológico del coginete plantar de un ratón Balb/c 48 h. después del reto antigénico con GM-1	16		53
♦ Corte histológico del coginete plantar de un ratón Balb/c 3 h. después del reto antigénico, mostrando el infiltrado de leucocitos polimorfonucleares	17		54
♦ Efecto en el # de C.F.P. anti-E.C. de GM-1, L.P.S. y A.S.B.		1	46
♦ Actividad de los cristales y las proteínas de GM-1 sobre el # de C.F.P. anti-E.C.		2	47
♦ Anticuerpos secretados por las células de bazo.		3	49
♦ Respuesta inflamatoria a la proteína de GM-1 de los ratones Balb/c.		4	50
♦ Respuesta inflamatoria específica a la proteína de GM-1 en ratones Balb/c.		5	51

INDICE DE TABLAS

	# de Tabla	pag.
◆ Clasificación de las Cepas de <i>B.t.</i>	1	11
◆ Genes y Proteínas del Cristal Insecticida de <i>B.t.</i>	2	20
◆ Nomenclatura Actual de las Proteínas del Cristal de <i>B.t.</i>	3	21
◆ Protocolo para el Método de Lowry.	4	31
◆ Esquema de Inmunización de Ratones Balb/c con los Cristales y las Proteínas de GM-1.	5	33
◆ Protocolo de Sensibilización de Ratones Balb/c con las Proteínas de GM-1 para la Inducción de una Reacción de Inflamación.	6	38
◆ Rendimiento Proteico de los Cristales de GM-1 Purificados en el Sistema Fosfato-Polietilenglicol.	7	40
◆ Viabilidad de las Células de Bazo de Ratón Balb/c	8	45
◆ Efecto de los Cristales de GM-1 Sobre el # de C.F.P. anti-E.C.	9	45
◆ Efecto de las Proteínas de GM-1 Sobre el # de C.F.P. anti-E.C. Dosis de 0.1 mg/kg.	10	48
◆ Efecto de las Proteínas de GM-1 Sobre el # de C.F.P. anti-E.C. Dosis de 1.0 mg/kg.	11	48
◆ Efecto de las Proteínas de GM-1 Sobre el # de C.F.P. anti-E.C. Dosis de 2.5 mg/kg.	12	49
◆ Soluciones para la Preparación de Geles SDS-PAGE.	13	78
◆ Poder de Resolución de la Poliacrilamida en SDS-PAGE.	14	79

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

ABREVIATURAS

Ab.	anticuerpos.
BSA	albúmina sérica bovina.
α Otp	anticuerpos anti-polipéptido sintético de la proteína de <i>B.t. var. thuringiensis</i>
A.C.F.	Adyuvante completo de Freund
A.I.F.	Adyuvante incompleto de Freund
<i>B.t.</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>
<i>Bti.</i>	<i>Bacillus thuringiensis var. israelensis</i>
cel/ml	células/mililitro.
C.F.P.	células formadoras de placa.
cm.	centímetro (s).
CO ₂	dióxido de carbono.
Cry	proteínas de cristal
cry	genes del cristal
col.	colaboradores
CsCl	cloruro de cesio
E.C.	eritrocitos de carnero
EDTA	ácido etilen-diamino-tetracético sal de sodio
ed.	editores
Fig.	figura.
° C	grado (s) Centígrados
GM-1/t	proteína de GM-1 digerida con tripsina
GM-CSF	factor estimulante de la colonia de granulocitos y macrófagos
graf.	gráfica
H	antígeno flagelar
h.	hora (s)
HCl	ácido clorhídrico
HD-	Howard Dulmage-
HIV	virus de la inmunodeficiencia humana
hps	proteínas de choque térmico
Ig. (A, M, G)	inmunoglobulina (A, M, G,).
IL- (1,2)	Interleucina (uno, dos)
INF- (γ , β)	Interferón- gama, beta
IP	intraperitoneal
ISCOM	Complejo inmunoestimulante
kDa	kilodaltones
LPS	lipopolisacarido
L-121	polímero plurónico L-121
mA.	miliamperes
mg/ml	miligramos por mililitro

mg/kg

min.

MDP

ml.

M.

MNC

Mr.

mM

NaBr

NaOH

NaCl

NBT

ng.

Nm.

N.Y.

#

O

pH

PBS

PG

pp.

(+)

%

µg.

µl.

α

β

γ

δ

PAGE

PBS

PCI (s)

PIPLC

r.p.m.

SAF-1

seg.

ser.

SDS

TGF-β

TPCK

U/ml

var.

volts.

miligramo por kilogramo

minutos

muramildipéptido

mililitro (s)

molar

membrana de nitrocelulosa

peso molecular relativo

milimolar

bromuro de sodio

hidróxido de sodio

cloruro de sodio

nitroazul de tetrazolium

nanogramo

nanómetro

New York

número

antígeno somático

logaritmo negativo de la concentración de

iones de Hidrógeno

solución salina fosfato

polietilén glicol

páginas

positivo

por ciento

microgramos

microlitros

alfa

beta

gamma

delta

electroforesis en gel de poliacrilamida

solución salina fosfato

proteínas del cristal insecticida

fosfolipasa C especifica de

fosfatidilinositolfosfato

revoluciones por minuto

formulación adyuvante sintética-1

segundos

serotipo

lauril sulfato sal de sodio

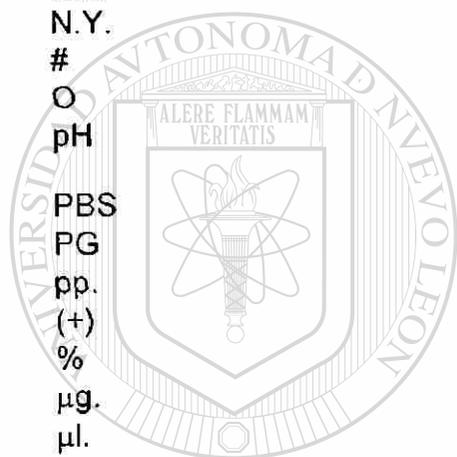
factor de crecimiento transformante beta

tosilfenilalanilclorometano

unidades por mililitro

variedad

voltios



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

®

RESUMEN

Es de suma importancia la búsqueda de proteínas con capacidad adyuvante que estimulen selectivamente la respuesta inmune mejorando la inmunogenicidad de ciertos antígenos. En el presente trabajo, se describe una nueva actividad biológica de *Bacillus thuringiensis*, la actividad adyuvante de las proteínas del cristal de *B.t.* GM-1 var. aizawai. Se determinaron y caracterizaron las proteínas del cristal, que incrementan selectivamente el número de células formadoras de placa (C.F.P.) líticas contra eritrocitos de carnero (E.C.) en ratones Balb/c. Los cristales, se purificaron en un sistema acuoso bifásico, formado de polietilenglicol-fosfato, con un rendimiento de hasta un 35% de proteína. Se encontró, que los cristales están formados por una proteína (protoxina) con un peso molecular relativo (Mr) de 130 kDa. La solubilización de los cristales en NaOH-Glicina a pH10, produjo una proteína con un Mr de 98 kDa y la digestión enzimática con tripsina, una proteína principal con un Mr de 62 kDa daltones. Estas proteínas fueron reconocidas por los anticuerpos anti-CryIA(b) y anti-CryIA(c), y de ninguna manera por los anticuerpos anti-CryIIIA, anti-CryIIIC y anti- α -Otp. Se determinó el efecto adyuvante para las tres proteínas, encontrando incrementos máximos en el número de C.F.P. de 62% con 0.1 mg/kg de cristales completos aplicados 24 h. después que el antígeno : 104% con 2.5 mg/kg de la proteína solubilizada a pH 10, aplicada 24 h. después que el antígeno y la máxima respuesta que se obtuvo fue de 143% cuando se administró 2.5 mg/kg de la proteína digerida con tripsina al mismo tiempo que el antígeno. Así mismo se encontró, que con este último tratamiento se incrementó notablemente la producción de anticuerpos de las subclases IgG1, IgG2a, IgG3, en menor proporción los de IgG2b e IgA y de ninguna manera los de IgM. Por otro lado, se encontró que la proteína de 62 kd. induce una reacción de inflamación aguda que tiene su máxima respuesta a las 3 h., después de haber recibido el reto antigénico, con una abundante infiltración de células polimorfonucleares en el sitio donde se depositó el antígeno. Se observó que esta respuesta fue específica de la proteína del cristal y no persistió a las 24 y 48 h, lo que indica que no se trata aparentemente de una reacción de hipersensibilidad retardada.

SUMMARY

It is of sum importance the search of proteins with adjuvant capacity that stimulate selectively the immune response to improve the immunogenicity of certain antigens. In the present work, a new biological activity of *Bacillus thuringiensis*, the adjuvant activity of the proteins of the crystals of *B.t.* GM-1 var. aizawai were determined and characterized, that selectively increase the number of plaque former cells (C.F.P.) against sheep eritrocites (E.C.) in Balb/c mice. The crystals, were purified in a biphasic water system, formed of polietilenglycol-phosphate, with a 35% of efficient proteic. It was found by polyacrylamide electrophoresis under reducing conditions, that the crystals are formed by a protein (protoxin) with a molecular relative weight (Mr) of 130 kDa. The solubilization of the crystals in NaOH-Glycin at pH10, produced a protein with a Mr de 98 kDa and the enzymatic digestion with tripsin, a principal protein with a Mr of 62 kDa. Those proteins were recognized by the antibodies of the proteins from the crystals, anti-CryIA(a) and anti-CryIA(c), but not the antibodies anti-CryIIIA, anti-CryIIIC and anti- α -Otp. The adjuvant effect was determined for the three protein treatments of GM-1, finding the maximum increasement in the number of C.F.P. of 62% with 0.1 mg/kg of complete crystals applied 24 h. after the antigen; 104% with 2.5 mg/kg of the solubilized protein at pH10, added 24 h. after the antigen and the maximum response that was obtained was of 143 % when managing 2.5 mg/kg of the protein tripsin digested at the same time that the antigen. Of equal manner, it was found, that with the last treatment the antibodies production of the subclasses IgG1, IgG2a, IgG3 were intensively increased and minor proportion IgG2b and IgA, but in no way the IgM antibodies. On the other hand, It was also found that the protein of 62 kDa induces a reaction of harsh inflammation that has their maxim response at the 3 h., after receiving the antigenic challenge, with abundant polymorfonuclears infiltration cells in the site where the antigen was deposited, it was observed that this response was specific of the crystal protein and did not persist at the 24 and 48 h, which indicates that aparently it is not a delayed hipersensibility reaction.

INTRODUCCIÓN

Una de las estrategias que se siguen para el desarrollo de vacunas en humanos y animales es el uso de sustancias adyuvantes para mejorar la respuesta inmune a antígenos no inmunogénicos.

Los adyuvantes de vacunas se pueden definir como compuestos que actúan inespecíficamente al aumentar la respuesta específica de un antígeno de poca o ninguna inmunogenicidad. El modo de acción sobre las células del sistema inmunológico *varía entre las diferentes sustancias y para otras es todavía un misterio* (Warren y Chedid, 1988). Se han encontrado diferentes tipos de productos de diversos orígenes, que tienen actividad inmunomoduladora, algunos son de origen mineral como los compuestos de aluminio, estimuladores de la respuesta humoral y ampliamente usados en vacunas en humanos pero no siempre eficaces (Danveport y col., 1968). Otros adyuvantes son mediadores endógenos del hospedero, como interleucina-1 (IL-1) e interleucina-2 (IL-2) (Nunberg y col. 1989, Staruch y Wood, 1983). También se han utilizado moléculas que actúan como acarreadores de el antígeno, tales como los liposomas, los cuales son vesículas compuestas de fosfolípidos y colesterol y tienden a activar la respuesta inmune celular hacia un antígeno (Allison y Gregoriadis, 1974).

Los adyuvantes deben de presentar las siguientes características para el antígeno: estimular la producción de anticuerpos isoprotectivos del tipo IgG2a en el ratón e IgG1 en primates, los del tipo IgE deben de ser evitados, aunque pueden contribuir a la protección contra algunos parásitos, deben de estimular la inmunidad mediada por células, como: activación de linfocitos T cooperadores, linfocitos T citotóxicos y macrófagos y estimular la producción de citoquinas tales como Interferon- γ , Interleucina 1 y 2 y factor estimulante de la colonia de granulocitos y macrófagos (GM-CSF). Dentro de los efectos indeseables para un adyuvante, encontramos que no deben de producir reacción en el sitio de la inyección, ser pirogénicos, o inducir artritis (Allison y Byars, 1991).

Se ha reportado que algunos microorganismos, particularmente bacterias y/o moléculas derivadas, son potentes estimuladoras de la inmunidad humoral y celular. El Lipopolisacárido (LPS), derivado de la pared celular de bacterias gram negativas; muramilo dipéptido (MDP) y dimicolato de threolosa (TDM) procedentes de la pared celular de micobacterias son tres excelentes ejemplos de sustancias adyuvantes, los que tienen la desventaja de ser altamente tóxicos en sus formas crudas para ser usados en humanos (Warren y Chedid, 1988).

Bacillus thuringiensis, es un bacilo, esporulado, que produce diversos tipos de toxinas y enzimas (referido por Lambert y Peferoen, 1992), la bacteria se caracteriza primeramente por producir un cristal parasporal o δ -endotoxina de naturaleza proteica, cuya principal actividad biológica es la toxicidad hacia diferentes ordenes de insectos

susceptibles, plagas agrícolas y vectores de enfermedades en el humano (Höfle y Whiteley, 1989).

Los cristales proteicos, pueden estar formados de una o varias proteínas cristal insecticidas (PCI), cuya característica principal en el control biológico es que son selectivas, atóxicas para mamíferos, lo que los hace seguros y generalmente no ocasionan resistencia (Aronson y col., 1986).

En base a la comparación de las secuencias de aminoácidos de las diferentes proteínas del cristal y al espectro de actividad, fueron inicialmente establecidos seis grupos tóxicos en relación con sus insectos blancos (Höfle y Whiteley, 1989; Feitelson y col. 1992), sin embargo, recientemente Lorence y Quintero, hicieron una revisión de las proteínas Cry y Cyt producidas por *B.t.* (Lorence-Quiñones y Quintero-Ramírez., 1966), en donde se reconocen 15 grupos y un número indeterminado de proteínas no clasificadas además de las proteínas Cyt, de igual manera, la lista de estas toxinas es también reportada en internet (Crickmore, 1966) la cual se basa exclusivamente en la similitud de la secuencia de los aminoácidos y no en el aspecto tóxico (tabla #3). Una de las características de estas toxinas, es la especificidad que presentan, dependiente de la presencia de receptores específicos (Vadlamudi y col., 1993) en la membrana del intestino medio del insecto susceptible y cuya afinidad de unión está correlacionada con la toxicidad (Van Rie y col., 1990).

Otras actividades biológicas han sido encontradas para estas toxinas, como son: incremento en la respuesta inmune humoral (Prasad y Shetna, 1975); actividad antitumoral (Prasad y Shetna, 1976; Rodríguez-Padilla, 1996) sinergismo, al incrementar la actividad de drogas antitumorales (Yokoyama y col., 1991) y la activación de macrófagos peritoneales murino, con la producción de Oxido Nítrico y TNF- α (Gómez-Flores y col., 1997).

Dentro de las exoenzimas y exotoxinas producidas por la bacteria, encontramos una fosfolipasa C, exoenzima, la cual estimula linfocitos T (Taguchi y col., 1980). La β -exotoxina, también conocida como factor mosca o thuringiesina, es un nucleótido tóxico producido por algunos aislados, que interfiere con la síntesis de DNA de vertebrados e invertebrados, es de efectos teratogénicos, y su ausencia en cualquier formulación con la δ -endotoxina es un requisito. Recientemente, fue reportado un método sencillo para su detección (Arevalo y Galán-Wong, 1994).

El propósito del presente trabajo fue evaluar el posible efecto adyuvante de los cristales y las proteínas (protoxina y toxina) de *B.t.* GM-1 sobre la respuesta inmune humoral esto es, incremento en los niveles de anticuerpos hacia un antígeno (incremento en el número de C.F.P. anti-E.C.) y sobre la respuesta inmune celular, esto es, producción de una reacción de hipersensibilidad retardada en ratones Balb/c, ya que actualmente no se cuenta con una sustancia que resulte sin efectos tóxicos o adversos en humanos, que estimule la respuesta específica a antígenos no inmunogénicos, o que active cualquier mecanismo citotóxicos específicos de antígenos tumorales o parásitos intracelulares.

ANTECEDENTES

Debido a que las actuales estrategias de vacunación obtienen por tecnología de ingeniería genética, antígenos recombinantes (*Amon y Horwitz, 1992*) que resultan ser de poca inmunogenicidad, el uso de adyuvantes es una alternativa para producir una respuesta abundante y protectora. Para algunos patógenos, la inmunidad mediada por células resultaría mejor que una inmunidad humoral, para otros, una protección local a nivel de mucosa puede ser mejor que una inmunidad sistémica (*Lise y Audibert, 1989*), por lo que es importante lograr el tipo de respuesta adecuada para cada microorganismo.

Existen una amplia variedad de sustancias, de diversos orígenes, que tienen la propiedad de estimular el sistema inmune, las que han podido agruparse de acuerdo a su origen en no bacterianos, mediadores del hospedero y bacterianos y (*Warren y Chedid, 1988*).

ADYUVANTES NO BACTERIANOS

Algunos compuestos de aluminio, el adyuvante incompleto de Freund y los liposomas son algunos tipos de adyuvantes importantes de este grupo.

LOS COMPUESTOS DE ALUMINIO.

Las sales de aluminio (Sulfato de Aluminio, Hidróxido de Aluminio y Fosfato de Aluminio) son utilizadas para precipitar o absorber antígenos y partículas virales, lo que forma una vacuna (*Edelman, 1980*). Los adyuvantes de aluminio incrementan los anticuerpos al antígeno, pero, la inmunidad celular es poca o deficiente, esto hace que la potencia de la vacuna dependa de la capacidad inmunogénica del antígeno (*Bomford, 1984*). Un ejemplo donde un adyuvante de aluminio funciona como incrementador de la respuesta de anticuerpos, es con la toxina diftérica (*Glenny y col., 1926*), sin embargo, en 1968, *Davenport y col.*, encontraron que antígenos purificados del virus de la influenza absorbidos con fosfato de aluminio fue incapaz de funcionar como una vacuna en humanos. Otra desventaja de los compuestos de aluminio, es la inestabilidad de las fórmulas vacunales al ser liofilizadas, necesitando refrigeración para su transporte (*Warren y Chedid, 1988*).

EL ADYUVANTE INCOMPLETO DE FREUND (AIF)

El AIF, consiste de una emulsión de agua y aceite mineral más el antígeno. El agente emulsionante puede ser Lanolina o Arlacel A y a diferencia del adyuvante completo de Freund, carece de micobacterias (*Bach, 1984*). La emulsión afecta la manera en que el antígeno es presentado a las células del sistema inmune, ya que forma un depósito en el sitio de la inyección, lo que trae

una lenta y continua liberación del antígeno (Hebert, 1968). El AIF, ha sido exitosamente usado en veterinaria con antígenos virales (Edelman, 1980); no obstante, su uso en humanos no está autorizado, ya que se ha encontrado que las emulsiones de aceite producen granulomas locales (Ogunuki y col., 1966), además, de que se ha observado que pueden favorecer el desarrollo de tumores en ratones (Murray y col., 1972).

LOS LIPOSOMAS

Son vesículas artificiales compuestas de bicapas de fosfolípidos y colesterol, las que pueden ser unilamelares, multilamelares y de diferentes tamaños. Cuando las vesículas se forman, cualquier soluto soluble en agua quedará atrapado en el espacio acuoso interliposomal, compuestos liposolubles van a ser incorporados en la membrana lipídica. Cualesquier sustancia con determinada solubilidad, carga eléctrica, tamaño u otras características estructurales, puede ser incorporada en los liposomas sin afectar su formación (Gregoriadis, 1985; 1990). Debido a su naturaleza hidrofóbica son buenos candidatos como adyuvantes (Warren y Chedid, 1988), dependiendo ésta, del número de capas, carga, composición, método de preparación así como la ruta de inoculación (Allison y Gregoriadis, 1974; Gregoriadis, 1976; Heath y col., 1976; Tyrrell y col., 1976; Kramp y col., 1982; Shek y col., 1983; Van Rooijen y col., 1983).

Un antígeno que es atrapado en un liposoma estimula la inmunidad humoral, debido en gran parte que el sistema funciona como un depósito (al igual que los compuestos de aluminio y las emulsiones de aceite) que está supliendo constantemente al macrófago de antígeno libre o atrapado (Gregoriadis, 1990). La inmunogenicidad de un antígeno libre o atrapado puede ser drásticamente mejorada en algunos casos a través de la administración de liposomas junto con otros adyuvantes (Manabe y col., 1989). Así, una formulación vacunal para mejorar la respuesta a un antígeno recombinante (R32 tet32) del esporozoito de *Plasmodium falciparum* fue desarrollada, encontrando que la mejor respuesta se obtuvo con el antígeno atrapado en liposomas conteniendo lípido A y absorbido a aluminio (Richards y col., 1988).

Una gran cantidad de antígenos de diversos orígenes han sido atrapados en los liposomas con el objeto de mejorar su inmunogenicidad (Gregoriadis, 1990).

COMPLEJOS INMUNOESTIMULANTES (ISCOM)

Morein, y col. en 1984, describieron un complejo inmunoestimulante llamado "ISCOM" en el cual proteínas de la membrana viral son presentadas en una forma multimérica a las células inmunocompetentes. La matriz del iscom es el glicósido Quil A, extraído de la corteza de del árbol de Molina, *Quillaja*

saponaria. Las saponinas forman micelas a una concentración crítica de 0.03%, teniendo una región hidrofóbica accesible que interactúa con las proteínas de membrana (Morein y col., 1987). Las proteínas de membrana de algún tipo de virus envuelto incorporadas en iscom, resultan altamente inmunogénicas e inducen una respuesta de anticuerpos aún a proteínas consideradas pobres inmunogénicamente (Osterhaus y col., 1985; Lovgren y Morein, 1991).

ADYUVANTES SINTETICOS

Una formulación adyuvante sintética (SAF-1) fue desarrollada por Allison y Byars en 1986, la cual consiste de un análogo sintético atóxico del muramildipéptido en una emulsión de escualeno-polímero plurónico L-121. La función del análogo del muramildipéptido es inducir la expresión de genes del complejo de histocompatibilidad; las microesferas de escualeno, sirven para concentrar el antígeno en la superficie y el polímero L-121, el cual presenta una región hidrofóbica, que interactúa con el escualeno y dos regiones hidrofílicas que sirven para estabilizar la proteína antigénica (Allison y Byars, 1990, 1991).

SAF-1 ha sido utilizado exitosamente con diferentes tipos de antígenos virales y de tumor en animales experimentales y sus propiedades han sido comparadas con otros tipos de adyuvantes (Kenney y col., 1989; Allison y Byars, 1990) resultando una sustancia sintética prometedora en el desarrollo de vacunas.

ADYUVANTES MEDIADORES DEL HOSPEDERO

Se han descrito dos moléculas endógenas que presentan actividad adyuvante cuando se administran con el antígeno. Estas son la Interleucina-1 (IL-1) y la Interleucina-2 (IL-2). Se pueden producir grandes cantidades de estas dos moléculas, ya que la clonación de sus genes (Lomedico, y col., 1984, Taniguchi y col., 1984) lo permite. En 1983, Staruch y Wood demostraron que la IL-1 incrementó "in vivo" la respuesta secundaria de anticuerpos en ratones a un antígeno proteico. Por otro lado, en 1989, Nunberg y col. encontraron que la administración sistémica diaria de IL-2 junto con virus inactivados de la rabia puede incrementar la potencia de la vacuna en ratones singénicos al menos 25 veces, sugiriendo que la IL-2 actúa incrementando la respuesta inmune celular a la vacuna. A pesar de estas propiedades adyuvantes reportadas para la IL-1 y la IL-2, en 1988, Warren y Chedid citaron que la IL1 purificada recombinante induce fiebre y mediadores de la inflamación, lo que hace a la molécula tóxica para ser usada como adyuvante en humanos.

ADYUVANTES BACTERIANOS

Exotoxinas, endotoxinas, así como moléculas estructurales de la pared celular de diferentes especies de bacterias, son potentes sustancias que activan

la respuesta inmune celular, además de incrementar los niveles de anticuerpos específicos del antígeno.

EL ADYUVANTE COMPLETO DE FREUND

El adyuvante completo de Freund (ACF), fue desarrollado en 1937. Es el adyuvante más potente conocido, está formulado igual que el A.I.F., pero además contiene micobacterias muertas suspendidas en la emulsión. Este adyuvante es excelente para estimular la respuesta celular (*Warren y Chedid, 1988*) y al igual que el AIF, es muy tóxico para su uso en humanos, debido a que los componentes micobacteriales inducen reacciones de hipersensibilidad retardada o granulomas (*Male y col., 1987*), sin olvidar los posibles efectos no deseados de los aceites (*Allison y Byars, 1990*).

Dos moléculas de la pared celular de micobacterias son las responsables de modular la respuesta inmune. Una de ellas es el derivado de peptidoglicano conocido como " factor cuerda " o dimicolato de threalosa, aislado por Ellouz y col., en 1974. En 1977, Saito y col., demostraron que el factor cuerda incrementa la función fagocítica de las células del sistema reticuloendotelial en ratones. La otra molécula es el muramildipeptido (MDP) o N-acetilmuramil - L - alanil - D - isoglutamina. Cuando los MDP's son administrados con un antígeno purificado de un agente infeccioso, aumentan la respuesta de anticuerpos al antígeno, así como a una amplia variedad de péptidos sintéticos (*McLaughlin y col., 1980*).

EL LIPOPOLISACARIDO O ENDOTOXINA BACTERIANA

Los lipopolisacáridos (LPS), de bacterias gram negativas, son moléculas anfipáticas polianiónicas, con actividad adyuvante para la inmunidad humoral y celular (*Johnson y col., 1956, Ohta y col., 1982*). Si se administran con el antígeno producen una respuesta específica, si son administrados solos producen una respuesta policlonal (*Seppala y Makela, 1984*). El principal problema de usar LPS como adyuvante en vacunas humanas, es su toxicidad, aún en pequeñas cantidades. La remoción química de un grupo fosfato de la porción lipídica, resulta en una molécula de monosfosforil lípido A, la cual retiene la actividad adyuvante pero es menos tóxica, como se observó en embriones de pollo (*Ribi y col., 1984*). Chiller y col. en 1973, habían sugerido que el lípido A es la molécula responsable de la actividad adyuvante del LPS.

Diversos mecanismos de acción contribuyen probablemente a la actividad del LPS, ya sea que actúe como mitógeno policlonal de linfocitos B independientemente de la actividad de células T (*Gery y col., 1972*), a nivel de macrófagos favoreciendo la presentación del antígeno (*Ziegler, y col., 1984*) o

en otras células, donde promueve la secreción de Interleucina 1 (Staruch y Wood, 1983).

Bacillus thuringiensis (B.t.) es una bacteria con actividad bioinsecticida en una proteína cristalina que produce durante su ciclo de vida. Este cristal intracelular varía en forma, bipiramidal, (Nagamatsu y col., 1984); triangular, (Rodríguez-Padilla y Col 1990); rectangular, (Galán-Wong y col. 1990); irregular, (Ohba y Aizawa, 1989); redondos, (Orduz, y col., 1992), factor que no influye en su espectro tóxico (Lilley y col., Haider y Mahmood, 1990); rango de hospedero (Hofte y col. 1988); y especificidad hacia las diferentes especies de insectos blancos (Juquet y col., 1987).

Los genes de las toxinas del cristal parasporal son codificados en grandes megaplásmidos (Lereclus y col., 1982) y una misma cepa puede tener mas de una toxina en su cristal, con un rango de hospedero para mas de un orden de insecto (Yamamoto y McLaughlin 1988; Cheun y Hammock 1985).

LA CLASIFICACION DE *B.t.*

En 1962, de Barjac y Bonefoi establecieron un sistema de clasificación para diferentes especies de bacilos entomopatógenos productores de cristal en base a la reacción de los antígenos flagelares ("H"), describiendo 6 grupos serológicos pertenecientes a la especie de *B.t.* Actualmente, éste es el sistema oficial de clasificación manejado por el Instituto Pasteur de Paris, Francia (Lecadet, 1994), que agrupa a 50 grupos serológicos con 63 serovariedades diferentes (Thiery y Frachon, 1996) (tabla #1).

Otros sistemas de clasificación han sido propuestos de igual manera que el de Barjac y Bonnefoi. En 1965, Norris y Burges proponen que la comparación entre las características bioquímicas, el patrón electroforético de esterases así como el estudio serológico de los antígenos "H" pudieran llevar a un mejor conocimiento, distribución y epidemiología (epizotias) de la bacteria, sin embargo, los autores no pudieron diferenciar los grupos serológicos galleria y aizawai en base al patrón de esterasa. De igual manera, en 1990, de Barjac y Frachon demuestran que no existe correlación entre los grupos serológicos y las características bioquímicas, por lo que muchas serovariedades no pueden ser distinguidas en base a este carácter. En 1982 Sekijima y Ono, proponen que los antígenos somáticos termoestables ("O") pudieran ser usados como parámetros para agrupar las especies de *B.t.* Usando la técnica de aglutinación en tubo de células vegetativas, agruparon 12 grupos serológicos "H" en 13 grupos serológico "O", no pudiendo establecer diferencia entre las variedades *kurstaki*, *galleriae* y *aizawai*, así como *alesti* y *darmstadiensis* que pertenecen a diferentes serotipos "H". En 1984, de Lucca describe un método para agrupar 28 serovariedades de *B.t.* en base a la reactividad con 12 diferentes lectinas de origen vegetal y animal.

El estudio demuestra que 10 de las 28 serovariedades fueron individualizadas por su habilidad para aglutinar con las diferentes lectinas, lo indica una limitante del método en establecer un sistema claro en la clasificación de la bacteria.

Publicaciones recientes sobre la identificación y clasificación de *B.t.* en base a los antígenos flagelares "H" han sido reportadas. En 1989, Ohba y Aizawa reportaron 2 nuevas serovariedades pertenecientes al grupo serológico 3, por lo que los subfactores antigénicos para *alesti* y *kurstaki* (de Barjac y Frachon 1990) cambiaron, las dos nuevas serovariedades son tóxicas para tres especies de lepidópteros y no para mosquitos y mosca doméstica y fueron identificadas por sus antígenos "H" como 3a:3d sub-especie *sumiyoshiensis* y 3a:3d:3e sub-especie *fukuokaensis*. En 1990, Rodríguez-Padilla y col. describieron la variedad *neoleonensis* como el serotipo H-24, la primera cepa internacional reportada en México la cual se caracteriza por presentar un cristal inusual de forma triangular y que actualmente está clasificada como H24a:24b (Lecadet, 1994). En 1992, Orduz y col. reportan un nuevo serotipo de *B.t.* aislado en Colombia correspondiente al antígeno H-30 y nombrado como la variedad *medellin*. En 1994, Juárez-Perez y col. reportaron el serotipo H-32 aislado de muestras de suelo de Cameroon. Ultimamente, en 1994, Lee y col. describieron las variedades *coranensis* (H-25); *leesis* (H-33), y *konkukian* (H-34) todas en base a sus antígenos flagelares. El método utilizado en la identificación y clasificación en base a estos antígenos "H" fue recientemente publicado (Rodríguez-Padilla y col., 1996), como un método sencillo, sensible, barato y reproducible en la clasificación de la bacteria.

LA PURIFICACIÓN DE LOS CRISTALES (&ENDOTOXINA) DE *B.t.*

B.t. es un bacilo, gram (+), esporulado, flagelado, descrito por Berliner en 1911. La bacteria de distribución mundial, es un habitante natural del suelo y de ambientes relacionado con insectarios (Dulmage y Aizawa, 1982), donde la bacteria persiste a las condiciones adversas del medio ambiente por largos periodos de tiempo en forma de espora. Cuando las esporas germinan se produce células vegetativas que por división celular se multiplican, restaurando su ciclo de vida y si las condiciones del microambiente le son desfavorables se sintetiza nuevamente la espora dentro de un saco o esporangio. La bacteria se separó del género *Bacillus cereus*, porque al mismo tiempo que se produce la espora, un número limitado de proteínas que se cristalizan en posición *parasporal* aparecen, las que se liberan al medio ambiente junto con la espora cuando la pared celular se degrada. Si estos cristales tóxicos son ingeridos por las larvas de un insecto susceptible, le producen la muerte.

El disponer de preparaciones de cristales libres de espora ha favorecido el conocimiento de las unidades de proteínas que los componen, la secuenciación de aminoácidos, así como la clonación y manipulación de genes para la producción de proteínas quimeras y plantas transgénicas más resistentes a las plagas, cuya producción en el campo está siendo llevada a cabo en países industrializados (Fox, 1995).

Han sido reportados diversos métodos de purificación de cristales, todos ellos encaminados primeramente en conocer las diferentes PCI que los forman. Un método sencillo, rápido, de bajo costo, que permite la purificación de grandes volúmenes de cristales, es el formado por un sistema acuoso bifásico a base de polietilenglicol-fosfatos, método que tiene su origen en el trabajo de Sacks y Alderton de 1961, el que fue utilizado para separar las esporas de diversas especies de bacilos de las células vegetativas y restos celulares. El sistema utiliza polietilenglicol 4000 en una solución compuesta de dos sales de fosfato de potasio. La fase superior es de polietilenglicol, el cual concentra las esporas y la fase inferior es de fosfatos, el que concentra en la interfase las células vegetativas y restos celulares.

En 1966, Pendleton y Morrison, describieron un sistema acuoso de dos fases con tetracloruro de carbono como la fase orgánica, para separar los cristales de las esporas de *B.t.* El método tiene el inconveniente de que se debe reducir la carga de esporas presente en el complejo por flotación, antes de la separación en el sistema orgánico. Un año después, en 1967, Goodman y col. describieron un sistema acuoso bifásico polímero-polímero a base de polietilenglicol 6000 y Dextran sulfato de sodio 500, este sistema rinde hasta 250 mg de cristales con una pureza del 99.94% a partir de una pasta húmeda de 10 g del complejo, con un rendimiento del 2.5 %.

Recientemente, en 1994, Guereca y col. describieron las características de un sistema acuoso bifásico sal-polímero a base de polietilenglicol y sales de fosfato de potasio dibásica y monobásica en relación 3:1, que permiten la separación de esporas y cristales de *B.t.* HD-1 y otras 9 cepas, reportando un rendimiento del 42% de cristales puros, en donde las condiciones de centrifugación son críticas en la partición. La pureza de los cristales obtenida es de casi un 100%, la cual se juzgó además, por el patrón electroforético de las proteínas del cristal de las diferentes cepas utilizadas en el estudio.

Otros métodos de purificación, en base a la formación de gradientes de centrifugación han sido descritos. En 1972, Fast reporta un procedimiento en base a la formación de gradientes de centrifugación con cloruro de cesio (CsCl). En 1975, Sharpe y col., describen otro método de centrifugación el cual utiliza gradientes lineales de 1.0 a 1.4 g/cm³ de renografin-agua. Sin embargo, en ambas técnicas el rendimiento que se obtiene de cristales puros

es bajo y el volumen de muestra que se procesa es mínimo, además la agregación de esporas y cristales es un problema que siempre se presentó en ambos métodos.

En 1978, Ang y Nickerson, describieron un método de centrifugación para la purificación de los cristales de *B.t. var. thuringiensis* y *kurstaki* HD-1 por gradientes zonales de Bromuro de sodio (NaBr). Este método permite la purificación de grandes volúmenes de muestra, con un rendimiento de entre un 15% a un 20% de cristales puros.

En 1989, Zhu y col., utilizaron gradientes Ludox de centrifugación para la purificación de los cristales de 4 cepas de *B.t.*. Los gradientes se forman con dos concentraciones diferentes de sílica gel y de 2 a 5 ml de extracto crudo de esporas y cristales. Las muestra son agitadas vigorosamente varias veces para producir espuma y permitir la eliminación de un exceso de spora por flotación. El método permitió la separación de los cristales conteniendo menos del 1% de esporas y de entre 5 a 10 mg de cristales puros se obtuvieron a partir de 100 ml de cultivo. La pureza se demostró también, por electroforesis en geles de poliacrilamida.

En 1980, Rao y Shethna describieron un método de alto rendimiento que permite la purificación de los cristales por sedimentación, con una pureza de un 83% a un 99% y entre un 5% a un 60 % de rendimiento en la recuperación, dependiendo de la variedad de *B.t.* en el proceso. El método se fundamenta en la propiedad que tienen los cristales de agregarse en solución acuosa bajo condiciones controladas de salinidad.

Una técnica que utiliza cromatografía en columna ha sido utilizada en la purificación a pesar de la naturaleza cristalina de la δ -endotoxina. En 1994, Murty y col. describieron una técnica rápida y sencilla para separar los cristales de las esporas y restos celulares de *B.t. var. kurstaki* y *yunnanensis*. El método utilizó una columna con una matriz de intercambio iónico de Carboxi Metil-Celulosa la cual retiene los cristales. El método permite obtener cristales con una pureza superior al 98% , la cual se juzgó por microscopía y electroforesis en geles de poliacrilamida. El rendimiento en la recuperación de los cristales varió entre un 14% a un 25% para cada una de las cepas respectivamente.

De todas las técnicas descritas anteriormente, la que resulte mejor va a ser la que mejor se adapte a las condiciones y necesidades del laboratorio así como de la pureza y cantidad de cristales requeridos para la investigación que se este desarrollando

Tabla # 1
 CLASIFICACIÓN DE CEPAS DE *Bacillus thuringiensis* DE ACUERDO
 AL SEROTIPO FLAGELAR "H"
 (I. Thiery y E. Frachon, 1996)

ANTÍGENO FLAGELAR	SEROVARIEDAD	CODIGO	PRIMERA MENCION Y/O PRIMERA DESCRIPCION VÁLIDA
1	<i>thuringiensis</i>	THU	Berliner, 1915 , Heimpel & Angus, 1958
2	<i>finitimus</i>	FIN	Heimpel & Angus, 1958
3a,3c	<i>alesti</i>	ALE	Toumanoff & Vago, 1951 , Heimpel & Angus, 1958
3a,3b, 3c	<i>kurstaki</i>	KI R	de Barjac & Lemille 1970
3a,3d	<i>sumiyoshiensis</i>	SUM	Ohba & Aizawa, 1989
3a,3d, 3e	<i>fukuoensis</i>	FUK	Ohba & Aizawa, 1989
4a,4b	<i>sona</i>	SOT	Ishiwata, 1905 , Heimpel & Angus, 1958
4a,4c	<i>kumae</i>	KEN	Bonnefoi & de Barjac, 1963
5a,5b	<i>galleriae</i>	GAL	Shvetsova, 1959 , de Barjac & Bonnefoi, 1962
5a,5c	<i>canadensis</i>	CAN	de Barjac & Bonnefoi, 1972
6	<i>entomocidus</i>	ENT	Heimpel & Angus, 1958
7	<i>acawai</i>	AIZ	Bonnefoi & de Barjac, 1963
8a,8b	<i>morrisoni</i>	MOR	Bonnefoi & de Barjac, 1963
8a,8c	<i>ostrinae</i>	OST	Gaixin Ketian, Minghua & Xingmin, 1975
8b,8d	<i>nigeriensis</i>	NIG	Weiser and Prasertphon, 1984
9	<i>tolworthi</i>	TOL	Norris, 1964 , de Barjac & Bonnefoi, 1968
10a,10b	<i>darustadiensis</i>	DAR	Krieg, de Barjac & Bonnefoi, 1968
10a,10c	<i>londrina</i>	LON	Arantes y col (no publicado)
11a, 11b	<i>toumanoffi</i>	TOU	Krieg 1969
11a, 11c	<i>kyushuensis</i>	KYU	Ohba and Aizawa, 1979
12	<i>thompsoni</i>	THO	de Barjac & Thompson, 1970
13	<i>pakistani</i>	PAK	de Barjac, Cosmao Dumanoir, Shaik & Viviani, 1977
14	<i>israeliensis</i>	ISR	de Barjac, 1978
15	<i>dakota</i>	DAK	De Lucca, Simonson & Larson, 1979
16	<i>indiana</i>	IND	De Lucca, Simonson & Larson, 1979
17	<i>tohokuensis</i>	TOH	Ohba, Aizawa & Shimizu, 1981
18a, 18b	<i>kumamotoensis</i>	KUM	Ohba, Ono, Aizawa & Iwanami, 1981
18a, 18c	<i>yosoo</i>	YOS	Lee H H (no publicado)
19	<i>tochiensis</i>	TOC	Ohba, Ono, Aizawa & Iwanami, 1981
20a, 20b	<i>yunnanensis</i>	YUN	Wan-Yu, Qi-Fang, Xue-Ping & You-Wei, 1979
20a, 20c	<i>pundicheriensis</i>	PON	Rajagopalan et al (no publicado)
21	<i>colmeri</i>	COL	De Lucca, Palmgren & de Barjac, 1984
22	<i>shandongensis</i>	SHA	Ying, Jie & Xichang, 1986
23	<i>japonensis</i>	JAP	Ohba & Aizawa, 1986
24a, 24b	<i>neoleonensis</i>	NEO	Rodriguez-Padilla y col , 1988
24a, 24c	<i>novosibirsk</i>	NOV	Burtseva, Kalmikova y col., (no publicado)
25	<i>coreanensis</i>	COR	Lee H H et al. , 1994
26	<i>silu</i>	SIL	de Barjac & Lecadet (no publicado)
27	<i>mexicanensis</i>	MEX	Rodriguez-Padilla & Galan-Wong, 1988 (no publicado)
28a, 28b	<i>monterrey</i>	MON	Rodriguez-Padilla & Galan-Wong, 1988 (no publicado)
28a, 28c	<i>jegathesan</i>	JEG	Lee L H (no publicado)
29	<i>amagiensis</i>	AMA	Ohba (no publicado)
30	<i>medellin</i>	MED	Orduz, Rojas, Correa, Montoya y de Barjac, 1992
31	<i>toguchim</i>	TOG	Hodirev (no publicado)
32	<i>cameroun</i>	CAM	Jacquemard, 1990, Juarez-Perez et al.,(no publicado)
33	<i>leesti</i>	LEE	Lee H H et al., 1994
34	<i>konkukan</i>	KON	Lee H H et al , 1994
35	<i>seoullensis</i>	SEO	Shim (no publicado)
36	<i>malaysiensis</i>	MAL	Ho (no publicado)
37	<i>andatusensis</i>	AND	Santiago-Alvarez y col. (no publicado)
38	<i>oswaldocruzi</i>	OSW	Rabinovitch y col (no publicado)
39	<i>brasiliensis</i>	BRA	Rabinovitch y col (no publicado)
40	<i>huachongensis</i>	HUA	Yu Ziniu (no publicado)
41	<i>sooncheon</i>	SOO	Lee H H (no publicado)
4.2	<i>jinghongensis</i>	JIN	Rong Sen Li (no publicado)
4.3	<i>guiyangensis</i>	GUI	Rong Sen Li (no publicado)
4.4	<i>higo</i>	HIG	Ohba (no publicado)
4.5	<i>roskildensis</i>	ROS	Hinnrschen & Hansen (no publicado)
46	<i>champsais</i>	CHA	Champsaisang, 1994
47	<i>wratislaviensis</i>	WRA	Lonc, 1995
48	<i>balearica</i>	BAL	Iriarte Garcia, 1995
49	<i>muju</i>	MUJ	Park, 1995
50	<i>navarrensis</i>	NAV	Iriarte Garcia, 1995

LAS PROTEÍNAS DEL CRISTAL DE *B.t.*.

Diversas soluciones para la solubilización de los cristales han sido descritas, todas ellas con el mismo principio, que simula a las condiciones de pH alcalino que ocurren en el intestino medio de las larvas de insecto.

Debido al gran número de aislados descritos (tabla #1) y al hecho de que todos ellos son cristalíferos, diferentes variantes en las soluciones de solubilización se han reportado, ya que un método puede ser efectivo para los cristales de una cepa pero inefectivo con los de otra (Aronson, 1995).

La solubilización de los cristales liberan una protoxina, esta es una proteína que varía de tamaño dependiendo de la especie de *B.t.* de que se trate (tabla #2). La inmediata digestión de la protoxina por una enzima (simulando las condiciones del intestino del insecto) genera una o más proteínas de un peso molecular menor. La enzima más utilizada *in vitro* en la transformación de la protoxina a toxina es la Tripsina, recientemente, una molécula con una gran similitud con esta ha sido aislada del intestino medio de larvas de insecto (Milne y Kaplan, 1993), las proteasas de los jugos intestinales de larvas de insectos son también utilizadas en la solubilización y digestión (Tojo y Aizawa, 1983).

En 1979, Bulla y col. utilizaron una solución alcalina de NaOH 1N, pH 12, por 5 horas, para la solubilización de los cristales de *B.t.* var. *kurstaki* (cepa aislada de Dipel), determinaron el peso molecular por cromatografía de filtración con Sephadex G-100 y SDS-PAGE y concluyeron que los cristales están compuestos por una toxina de 68 kDa daltones, con actividad para *M.sexta*. Sin embargo, en 1981, Yamamoto y McLaughlin, aislaron por cromatografía en columna con Sephacryl S-300 dos proteínas (toxinas) de *B.t. kurstaki* HD-1. Los cristales fueron solubilizados con una solución de NaOH pH10 y β -mercaptoetanol al 2% como agente reductor, estimaron por SDS-PAGE el peso molecular de las dos proteínas P₁ y P₂ como de 135 kDa y 65 kDa respectivamente. P₁ retuvo la toxicidad hacia larvas *T. ni* y P₂ fue tóxica además para larvas del segundo instar de *Aedes taeniorhynchus*.

En 1983, Tojo y Aizawa, utilizaron un sistema doble alcalino, para la solubilización de los cristales de HD-1 var. *kurstaki*. El sistema consistió primeramente de una solución de Glicina-NaOH 0.1 M pH10.2, 10 mM de ditioneitol; las proteínas solubles fueron precipitadas con ácido acético 2 M. a un pH 4.5. La resolubilización del precipitado fue llevado a cabo en una solución de Carbonato-NaOH 0.1 M., pH10.2, con proteasas del intestino de *B. mori*. Este sistema generó una proteína tóxica de 59 kDa y otra proteína de menor peso sin efecto sobre *B.mori*, encontraron también una proteína de 120 kDa antes de el tratamiento enzimático que retiene su toxicidad para las larvas del gusano de seda.

Nagamatsu y col., en 1984, obtuvieron una solubilización completa de los cristales de *B.t.* var. *dendrolimus* cuando estos fueron calentados a ebullición por 2 minutos en una solución 64 mM. de Tris-HCl pH 6.7, 1% SDS, 0.5% de ditiotritol. El sistema generó una protoxina con un Mr. de 145 kDa con toxicidad para *B. mori*.

Debido a que no todos los cristales son totalmente solubilizados bajo los protocolos antes mencionados, quizás porque algún factor intrínseco a la misma naturaleza de las proteínas cristalinas pudiera estar involucrado en la solubilidad. A este respecto, en 1995, Aronson encontró suficiente evidencia que le sugirió que en la composición de las proteínas del cristal de *B.t.* *aizawai* HD133, hay un factor que afecta la solubilidad y toxicidad, HD-133 produce inclusiones cristalinas que contienen tres diferentes protoxinas, CryIA(b), CryIC y CryID. Con experimentos de transformación con los genes que codifican para estas proteínas, demostró que la presencia del gen cryIA(b) como parte de el grupo de proteínas que componen HD-133, favorece la solubilidad y toxicidad y su ausencia favorece la resistencia a la solubilización.

LA ESTRUCTURA DE LAS PROTEINAS CRISTAL DE *B.t.*

En 1989, Bietlot y col. describieron un protocolo, con el cual obtuvieron el fragmento tóxico (toxina) directamente de los cristales purificados de *B.t.* var. *kurstaki* HD-73. Encontraron en geles de poliacrilamida una sola proteína (banda) de 66 kDa bajo condiciones reductoras y no reductoras, después de que los cristales fueron tratados en una solución de Caps 0.1M pH 10.5, con 1mg/ml de Tripsina Pancreática Bovina tratada con TPCK (tosilfenilalanilclorometano). La proteína solubilizada fue dializada utilizando un poro de exclusión de 50 kDa, para eliminar las proteínas de menor tamaño. Determinaron la estructura secundaria de la toxina de 66 kDa por Espectroscopía de Ramán, encontrando que esta formada por un 20% de proteínas α -helices, un 35% de proteínas β -plegadas y un 45 % de proteínas desordenadas.

Choma T.C. y col. en 1990, Utilizaron el mismo sistema de solubilización y digestión con Tripsina que Bietlot y col. para determinar la estructura de la protoxina y toxina de *B.t.* var. *kurstaki* HD-73. Mediante condiciones reductoras con β -mercaptoetanol. encontraron que cuando la protoxina de 130 kDa es digerida con Tripsina se degrada la región carboxilo terminal, generándose 7 cortes que producen pequeños péptidos de 10 kDa, y finalmente se obtiene una toxina de 67 kDa que corresponde a la región amino terminal de la protoxina y es resistente a proteólisis adicional con Tripsina. Esta toxina fue cortada con papaína en dos fragmentos, uno de de 34.5 kDa aminoterminal que corresponde a la región conservada de la

molécula y otro de 32.3 kDa carboxilo terminal que corresponde a la región hipervariable.

En 1991, Convents y col. determinaron que el fragmento tóxico de la toxina CryIC esta compuesto por dos dominios estructurales que corresponden a la fracción aminoterminal de la proteína

Recientemente, en 1995, Grochulski y col. reportaron la estructura tridimensional de la proteína de 65 kDa. CryIA(a) de *B.t. kurstaki* HD-1. La proteína globular esta formada de 3 dominios. El dominio I, comprende los residuos de aa. 33 al 253 y está formado por 8 α -hélices; el dominio II, comprende los residuos de aa. 265 al 461 y esta formado de 3 láminas β -plegadas antiparalelas y 2 α -hélices cortas, los residuos 365 al 371 de este dominio forman un "anillo" el cual es altamente flexible y pudiera ser el responsable de la unión al receptor ; el dominio III, comprende los residuos de aa. 463 hasta el 609 y está formado por 2 láminas antiparalelas β -sandwich altamente retorcidas con una lámina adicional β -plegada externa formada por los residuos de aa. 254 a el 264. La proteína contiene 16 puentes de sal entre aa. cuya función probablemente sea la de proteger la toxina durante la solubilización y activación en el intestino de el insecto. A pH alcalino, los residuos de aspartato y glutamato, se cargan negativamente; los de arginina y lisina, positivamente y los de histidina, se mantienen sin carga; esto trae como consecuencia que la mayor parte de la proteína tiene una carga positiva, aunque parte del dominio I es parcialmente negativo. Esta carga eléctrica básica de la toxina juega un papel importante en la unión con el receptor. Los autores también reportaron que en sistemas artificiales de membrana, la toxina es capaz de formar poros o canales catiónicos selectivos, pero de una manera diferente a como lo hace Cry IIIA.

En 1986, Herrnstadt y col., de Mycogen Co. de San Diego California, E.U.A. aislaron una cepa de *B.t.* tóxica para larvas del escarabajo colorado de la papa y otras especies de Coleópteros. Los cristales de forma rectangular, producen una toxina de 64,000 daltones cuando son tratados directamente en condiciones alcalinas con SDS y no se genera ningún fragmento tóxico de menor peso molecular cuando esta proteína solubilizada es tratada con diferentes enzimas. Por otro lado, no se encontró ninguna relación antigénica se encontró entre esta proteína y las de HD-1 y HD-73 las cuales son tóxicas para Lepidópteros.

Han sido reportado otros aislados tóxicos para Coleópteros además de la variedad *san diego*, los cuales producen una δ -endotoxina con peso molecular similar (tabla # 2) . En 1991, Li y col. determinaron la estructura atómica de la toxina CryIII A de *B.t.* var. *tenebrionis* específica para Coleópteros (fig. # 1). Encontraron que la toxina está formada de tres dominios que son determinantes en la actividad biológica de la molécula y

constituyen parte de la base de su función insecticida. Cuatro puentes de sal entre cada uno de los tres dominios están involucrados en la solubilidad de los cristales a pH alcalino. La activación proteolítica de la protoxina por las proteasas intestinales de las larvas del insecto remueven 50 aa. de la porción amino terminal, permitiendo una región conservada carboxilo terminal. El dominio II está compuesto por las láminas β -plegadas 1, 2 y 3, las que pudieran estar involucrados en la unión de la toxina al receptor. Al dominio III se le ha relacionado en la estabilidad estructural y la integridad de la toxina. En el dominio I, las α -hélices del son las responsables de la formación de poros en la superficie de la membrana, esto último es confirmado por Gazit y Shai, en 1993 y 1995, quienes encontraron que la región α -5 del bloque I corresponde a una región conservada de 23 aa. Además sugieren, que α -5 tiene una localización transmembranal por lo que es la responsable de formar el poro en la membrana del epitelio del insecto y el segmento α -7 es un segmento que inicia la unión del dominio I en la membrana.

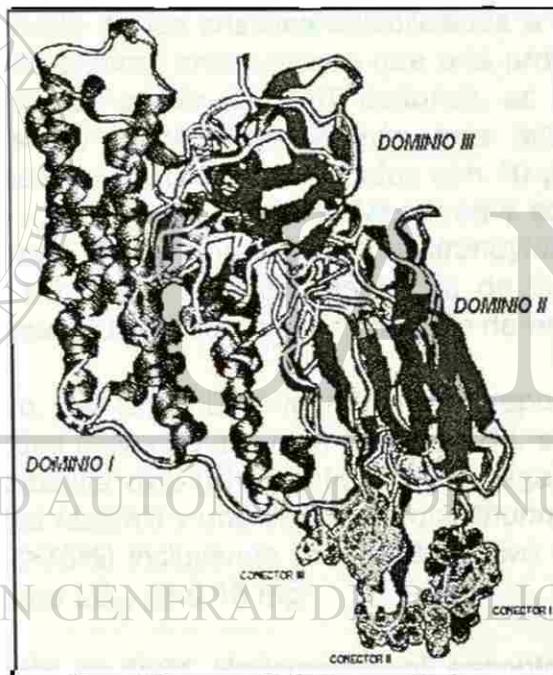


Fig # 1. Estructura atómica de la toxina de *B.t. var. tenebrionis*, CryIIIA.

Dominio I. amino terminal, de 290 aa. compuesto de 7 α -hélices

Dominio II. del 291 al 500 aa. compuesto de 3 β -plegadas antiparalelas. Conectores I, II y III

Dominio III. carboxilo terminal, del 501 al 644 aa. es un "sandwich" de 2 β -plegadas antiparalelas

Recientemente, en 1996, Wu y Dean encontraron que tres conectores o plegamiento (I, II, III) en el dominio II son las estructuras involucradas en la unión de la toxina al receptor, además el tercer conector pudiera estar involucrado en la inserción de las proteínas de la toxina en la bicapa lipídica de la membrana, en el epitelio del intestino del insecto.

ACTIVIDADES TÓXICAS Y EL MODO DE ACCIÓN DE LAS δ -ENDOTOXINAS DE *B.t.*

Las toxinas que producen las diversas variedades de *B.t.* varían en tamaño (27-140 kDa), afinidad y especificidad. Seis grupos tóxicos fueron establecidos en base a los genes que producen las toxinas, con relación a su insecto blanco para los tres ordenes de insectos susceptibles: lepidópteros, dípteros y coleópteros, además de huevecillos de nemátodos (tabla # 2). Sin embargo, otras actividades tóxicas para invertebrados has sido reportadas además de las consideradas anteriormente (Lorence y Quintero, 1996). A este respecto, en 1985, el trabajo de Bottjer y col. confirmó que los cristales de *B.t.* var. *israeliensis* (*Bti*) y *kurstaki* afectó la viabilidad de los huevecillos del nemátodo *Trichostrongylus colubriformis* y no observaron efecto tóxico en larvas del 3er. instar y adultos. Este mismo año, Bone y col. encontraron que la actividad tóxica de *Bti* sobre los huevos de *T.colubriformis* se encuentra en un precipitado insoluble de los cristales solubilizados a pH de 10.5. Un año después, los mismos autores encontraron que una proteína de los cristales solubilizados de *Bti* con un Mr. de 1510 daltones, es la responsable de la actividad ovicida sobre nemátodos, además esta actividad tóxica se ve incrementada cuando los cristales son tratados con 10 μ g de Tripsina por 72 horas a 37°C (Bone y Bottjer, 1988). En 1989, Meadows y col. reportaron que los huevecillos y larvas del nemátodo *Trichostrongylus colubriformis* son susceptibles a un LD₅₀ de 0.21 μ g/ml de toxina de *B.t.* var. *morrisoni*, no determinando el tamaño de la proteína responsable de esta toxicidad.

Por otro lado, en 1992, Drummond y col. reportaron en un ensayo preliminar la actividad tóxica de diversas cepas de *B.t.* sobre adultos del piojo de las ovejas *Damalinia ovis* (Phthiraptera:Mallophaga). Encontraron que 8 cepas de la variedad *kurstaki* y una de la variedad *thuringiensis* resultaron ser altamente tóxicas (>75%) incluyendo un aislado nativo el cual causo 97 \pm 3% de mortalidad con una LC₅₀ de 0.13 mg.

Recientemente, en 1994, Hodgman y col. encontraron que los cristales purificados de *B.t.* libres de β -exotoxina fueron tóxicos a una concentración de 10 μ g/ml, para larvas de *Musca domestica*, siendo el primer reporte de la actividad tóxica de la δ -endotoxina hacia mosca domestica.

Estos reportes incrementan el potencial biotecnológico y desarrollo de *B.t.* el cual pudiera estar encaminado a la búsqueda de nuevos aislados con nuevos espectros de toxicidad o actividad biológica o bien el mejoramiento por ingeniería genética de las toxinas ya existentes que pudieran ampliar el rango de insectos susceptibles.

El conocimiento de la estructura molecular de las toxinas y sus receptores en la célula epitelial del intestino del insecto ayudará a entender porque hay proteínas atóxicas (Ohba y Aizawa 1985,1988; Rodríguez-Padilla y col., 1990; Galán-Wong y col., 1990) contra algunas de las especies de insectos que ya han sido reportadas como blanco; también en el mejoramiento de la toxicidad y espectro tóxico de las toxinas ya existentes, además, ayudará posiblemente a entender los mecanismos de susceptibilidad y resistencia que desarrollen algunos insectos contra las diferentes toxinas reportadas.

EL RECEPTOR EN LA MEMBRANA EPITELIAL Y EL MODO DE ACCIÓN DE LA TOXINA.

Cuando una larva de insecto susceptible ingiere los cristales Lepidoptero-específico CryIA, estos se solubilizan en el pH alcalino del intestino. Esto trae como consecuencia la liberación de una protoxina, la cual es inmediatamente activada por proteasas intestinales en una toxina, que se va a unir sobre un receptor específico en la superficie de las células epiteliales del intestino medio (Van Rie 1990), los síntomas de intoxicación son observados aproximadamente a los 30 minutos después de la ingestión, estos incluyen: un cese en la alimentación, parálisis del intestino, vómito, diarreas, falta de movimiento y finalmente la muerte de la larva (Himeno, 1987). La interacción toxina-receptor produce la formación de poros en la membrana celular mediante la inserción de parte de la toxina en la bicapa lipídica (Prince, 1990). Este poro puede ser selectivo para aniones y cationes (Himeno, 1987; Knowles y col., 1989), lo que trae como consecuencia desestabilización del balance osmótico y la lisis celular (Mathavan y col., 1989). Los cambios ultraestructurales que ocurren durante la intoxicación incluyen: hinchamiento de células columnares, desintegración de microvellosidades apicales, deformación del plegamiento basal y finalmente, las células globo inducen alargamiento de la cavidad global y del interespacio del plegamiento basal. (Himeno 1987).

Diversos estudios de la interacción de la δ -endotoxina con las células del intestino de diferentes especies de larvas de insectos, de importancia agrícola se han realizado, entre los que encontramos el realizado en 1987, por Jaquet y col. quienes reportaron que *Heliothis virescens* fué mas susceptible a los cristales purificados de *B.t. kenyae* y *B.t. kurstaki* que a los cristales de *B.t. morrisoni*, *darmstadiensis* e *israeliensis*. Posteriormente en 1988, Hofmann y col. reportaron que la interacción de la δ -endotoxina recombinante y nativa de diferentes especies de *B.t.* con la membrana del intestino de *P. brassicae* y *M. sexta* requiere de la presencia de sitios de unión de alta afinidad y que esta interacción pudiera estar involucrada en la toxicidad de *B.t.* con sus insectos blancos. En 1989, Van Rie y Col. reportaron que las toxinas recombinantes de tres variedades de *B.t.*, fueron altamente tóxicas para *M. sexta* y no para *H. virescens*, encontrando evidencia suficiente de que la toxicidad en el insecto susceptible es determinada por sitios de unión

de alta afinidad en la membrana de las células epiteliales del intestino y que la diferencia en el espectro insecticida con respecto a *H. virescens* es también determinada por la afinidad de unión de la toxina con los sitios en la membrana celular.

En 1990, Wolfersberger reportó la presencia de sitios de unión de alta afinidad en vesículas de membrana del intestino de *Lymantria dispar* con las toxinas de *B.t.* HD-73, cry IA(c) y HD-19, cryIA(b). en donde HD-19 fue 400 veces más tóxica que HD-73. Por estudios de competencia entre ambas toxinas se demostró que HD-73 fue 10 veces más afín en la unión a las vesículas, no existiendo una correlación entre la afinidad de unión y la toxicidad. En cambio, Van Rie y col., en 1990, reportaron por experimentos de unión a membrana y toxicidad, que tres diferentes PCI's lepidóptero-específicas, Cry IA(a), CryIC y CryIE presentaron diferentes patrones de toxicidad contra *M.sexata*, *S. littoralis* y *H.virescens*, existiendo una correlación entre la toxicidad y la unión de los PCI's a sitios de alta afinidad en las vesículas de membrana de cada especie. Los autores sugieren, que la presencia de diferentes receptores en la membrana epitelial de las diferentes especies de insectos, determinan la especificidad de los PCI's. Esta idea fue apoyada por Oddou, y col., en 1991, quienes aislaron, identificaron y caracterizaron parcialmente tres proteínas receptoras (glicoproteínas) de el intestino de *H.virescens* que específicamente se unen a tres diferentes PCI's de *B.t.* Las toxinas CryIA(a) y CryIA(b) de *Bt. kurstaki* HD-1 se unen a una misma proteína de 170 kDa. La toxina CryIA(c) de *B.t.* HD-73 se une a dos proteínas receptor, una de 120 kDa y otra de 140 kDa.

En 1995, Cowles y col. demostraron por experimentos en monocapa ("overlay") que proteínas de 170, 140, 120, 90, 75, 60 y 50 kDa. del intestino de *H.virescens* se unen a la toxina de CryIA(c) y por unión a fase sólida, demostraron, que un grupo de estas proteínas contiene proteínas de unión de alta afinidad con la toxina. El receptor de 120 kDa. de *H. virescens*, fue recientemente clonado. Este receptor es altamente específico para la toxina CryIA(c) y presenta alta homología con los receptores aminopeptidasa N de procariotes y eucariotes (Gill y col., 1995). En 1993, Denolof y col. reportaron que existe una correlación entre la unión de los PCI's CryIA(b), CryIA(c), CryID, CryIE con su receptor y la toxicidad. Demostraron la presencia de dos diferentes receptores en el intestino medio del insecto *Ostrinia nubilalis*, y por estudios de competencia encontraron que hay diferencias en la afinidad de estas toxinas por los diferentes receptores y su toxicidad.

En 1991, Ge y col. reportaron que la especificidad de la δ -endotoxina puede ser determinada por factores extrínsecos, tales como, el pH del intestino de el insecto, proteasas, receptores y factores intrínsecos como, la estructura de la toxina, dominios funcionales, dominios de unión y dominios citolíticos dentro de la región tóxica de la proteína. Reportaron, la localización de los dominios que confieren la especificidad a la toxina de CryIA(c) para

H.virescens y *T.ni*, PCI que resulta ser 10 veces mas tóxica para estos insectos, que CryIA(b). Tres dominios están involucrados en la especificidad hacia *H. virescens*, uno comprende los residuos de aa 335-450, asociados con la actividad tóxica; otro comprende los residuos de aa. 335-615 los que son requeridos en la especificidad, y uno mas, que comprende los residuos 450-612, involucrados también en la especificidad.

En 1992, Lee y col. determinaron que la especificidad de la toxina CryIA(a) que se une a las vesículas de membrana, en el receptor de *B. mori*, esta determinada por un grupo de residuos de aa., del 332 al 450, que incluyen la porción aminoterminal de la región hipervariable de la proteína.

En 1994, Estrada y Ferre reportaron que las toxinas CryIA (a,b y c) fueron 10 veces mas tóxicas contra larvas neonatas de *Trichoplusia ni*, que las toxinas CryIB y CryID, las cuales mostraron baja susceptibilidad. Demostraron una correlación entre la toxicidad y la unión de los PCI's en el epitelio del intestino de l insecto, encontrando además, que CryIA(b) y CryIA(c) tienen alta afinidad por el mismo sitio de unión en las vesículas de membrana, mientras que CryIA(a), se une a un sitio diferente. Por otro lado, indujeron resistencia específica en larvas de *T.ni* a la toxina de CryIA(b).

Se ha encontrado evidencia suficiente de que el receptor que interacciona con la toxina en la superficie de la membrana del insecto tiene residuos de carbohidratos (Knowles y col. 1994). Recientemente, Knight y col. (1994,1995), reportaron y posteriormente clonaron la glicoproteína receptor para CryIA(c) en la membrana de *Manduca sexta*, como una metaloproteasa con actividad de aminopeptidasa N. Esta misma glicoproteína fue aislada e identificada en 1994, por Sangadala y col. de la membrana del intestino medio de *M. sexta*, como una proteína de 120 KDa. Esta proteína difiere en tamaño de una proteína de 210 KDa reportada en 1993, por Vadlamudi-R.K. y col. y en 1994, por Martínez-Ramírez y col. aislada de intestino medio de *M. sexta* la cual se une a la toxina CryIA. Estudios *in vitro* también han mostrado, que en el escarabajo *Tenibrio molitor*, la toxina del cristal de *B.t.* CryIIIA se une a una proteína receptora de 144 KDa (Belfiore, 1994).

Tabla #2
Genes y Proteínas del Cristal Insecticida de *Bacillus thuringiensis*
(Adaptado de Hofte y Whiteley 1989 y Feitelson y col., 1992)

Tipo de gene o Proteína	Sub-especie y/o cepa	Hospedero	Nº de aminoácidos en la proteína	Masa molecular de la proteína (Protóxina)
cryIA(a)	kurstaki HD-1 aizawai sotto	Lepidóptero	1,176	133.2
cryIA(b)	entomocidus berliner 1715 kurstaki HD-1 aizawai IPL-7 kurstaki NRD-12 aizawai IC-1	Lepidóptero	1,155	131.0
cryIA(c)	kurstaki HD-73	Lepidóptero	1,178	133.3
cryIB	thuringiensis HD-2 entomocidus HD-110	Lepidóptero	1,207	138.0
cryIC	entomocidus 601 aizawai HD-137 entomocidus HD-110	Lepidóptero	1,189	134.8
cryID	aizawai HD-68	Lepidóptero	1,165	132.5
CryIE		Lepidóptero		133.2
CryIF		Lepidóptero		133.6
CryIG		Lepidóptero		130.0
cryIIA	kurstaki HD-263	Lepidóptero/Díptero	633	70.9
cryIIB	kurstaki HD-1	Lepidóptero	633	70.8
cryIIIA	san diego tenebrionis EG2158	Coleóptero	644	73.1
CryIIIB		Coleóptero		74.3
CryIIIC		Coleóptero		129.4
CryIIID		Coleóptero		73.0
cryIVA	israeliensis	Díptero	1,180	134.4
cryIVB	israeliensis	Díptero	1,136	127.8
cryIVC	israeliensis	Díptero	675	77.8
cryIVD	israeliensis	Díptero	643	72.4
CryV		Lepidóptero/Coleóptero		81.2
CryVA(a)		Nemátodos		
CryVA(b)		Nemátodos		
CryVIA		Nemátodos		
CryVIB		Nemátodos		
cytA	israeliensis morrisoni PG-14	Díptero/Citotóxica	248	27.4

Tabla # 3

Nomenclatura Actual de las Proteínas del Cristal de *Bacillus thuringiensis*

Nomenclatura Actual	Nomenclatura anterior	Clave de acceso al Gen Bank	Nomenclatura Actual	Nomenclatura anterior	Clave de acceso al Gen Bank
Cry1Aa	CryIA(a)	M11250	Cry3C	CryIIID	X59797
Cry1Ab	CryIA(b)	M13898	Cry4A	CryIVA	Y00423
Cry1Ac	CryIA(c)	M11068	Cry4B	CryIVB	X07423
Cry1Ad	CryIA(d)	M73250	Cry5Aa	CryVA(a)	L07025
Cry1Ae	CryIA(e)	M65252	Cry5Ab	CryVA(b)	L07026
Cry1Ba	CryIB	X06711	Cry5B		U19725
Cry1Bb	ET5	L32020	Cry6A	CryVIA	L07022
Cry1Bc	CryIB(c)	Z46442	Cry6B	CryVIB	L07024
Cry1Ca	CryIC	X07518	Cry7Aa	CryIIIC	M64478
Cry1Cb	CryIC(b)	M97880	Cry7Ab	CryIIICb	U04367
Cry1Da	CryID	X54160	Cry8A	CryIIIE	U04364
Cry1Db	PrtB	Z22511	Cry8B	CryIIIG	U04365
Cry1Ea	CryIE	X53985	Cry8C	CryIIIF	U04366
Cry1Eb	CryIE(b)	M73253	Cry9A	CryIG	X58120
Cry1Fa	CryIF	M63897	Cry9B	CryIX	X75019
Cry1Fb	PRrD	Z22512	Cry9C	CryIH	Z37527
Cry1Ga	PrtA	Z22510	Cry9D	N141	D85580
Cry1Gb	CryH2		Cry10A	CryIVC	M12662
Cry1Ha	PrtC	Z22513	Cry11A	CryIVD	M31737
Cry1Hb		U35780	Cry11B	Jeg80	X86902
Cri1Ia	CryV	X62821	Cry12A	CryVB	L07027
Cry1Ib	CryV	U07642	Cry13A	CryVC	L07023
Cry1ja	ET4	L32019	Cry14A	CryVD	U13955
Cry1jb		U31527	Cry15A	34kDaa	M76442
Cry1K		U28801	Cry16A	cbn31	X94146
Cry1L	CryE2		Cry17A	cbn72	
Cry2Aa	CryIIA	M31783	Cry18A	CryBP1	X99049
Cry2Ab	CryIIB	M23724	Cyt1Aa	CytA	X03182
Cry2Ac	CryIIC	X57252	Cyt1Ab	CytM	X98793
Cry3A	CryIIIA	M22472	Cyt1B		U37196
Cry3Ba	CryIIIB	X17123	Cyt2A	CytB	Z14147
Cry3Bb	CryIIIB2	M89794			

Neil Crickmore. Septiembre de 1996

OTRAS ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DE *B.t.*

Además de las actividades tóxicas de las PCI'S para diferentes ordenes de insectos, se han reportado efectos sobre la respuesta inmune humoral, así como toxicidad sobre células tumorales.

En 1975, Prasad y Shethna reportaron que los cristales de *B.t.* var *thuringiensis*, incrementaron en ratas los niveles de anticuerpos en circulación contra eritrocitos de carnero (E.C.). Observaron que a una dosis de 2.5 mg/kg de cristales administrados 24 horas después que el antígeno, los títulos de anticuerpos hemaglutinantes y hemolíticos se incrementaron respectivamente, hasta 10,240 y 12,760 unidades/ml. contra 320 y 1553 unidades/ml. en las ratas controles no tratadas con los cristales. Los autores encontraron que el incremento en la producción de anticuerpos es de ambas clases de inmunoglobulinas, IgM e IgG y además observaron que los anticuerpos de la clase IgG tienen mayor capacidad hemolítica en las ratas tratadas con los cristales que en los controles.

En 1976, Prasad y Shethna, mencionan que dentro de otras actividades biológicas de *B.t.* se encuentra la actividad antitumor contra Sarcoma Ascítico de Yosida y Sarcoma de Yosida. Ellos encontraron que los cristales inhiben el crecimiento de tumores avanzados y que además, inducen protección en los animales tratados contra el nuevo reto de células tumorales, desarrollándose una memoria inmunológica. De igual manera, la inmunidad hacia el tumor pudo ser transferida adoptivamente en ratas singénicas normales a través de el suero y linfocitos de ratas libres de tumor tratadas con los cristales. En una previa publicación de estos mismos autores, en 1975., reportaron que la actividad antitumoral e insecticida de los cristales de *B.t.* var. *thuringiensis* esta en una proteína obtenida por digestión alcalina con NaOH 1M por 15 horas. La proteína fué purificada por cromatografía de DEAE-Celulosa y Shepadex G-200, determinándose un peso molecular de entre 13,000 y 13,300 daltones.

B.t. var. *israeliensis* (*Bti*), produce diversas toxinas en sus cristales, una de ellas, con un peso molecular de 25-27 kDa, mata mosquitos y moscas negras. En 1983, Thomas y Ellar reportaron que los cristales solubilizados de *Bti* a pH 10.5, generan una proteína de 28,000 daltones. El solubilizado tuvo efecto citolítico y citopático en diferentes líneas celulares de insectos dípteros y lepidópteros. Ellos también observaron, el efecto en fibroblastos de ratón, linfocitos primarios de cobayo y tres líneas celulares de carcinoma epiteal de ratón. Además el solubilizado en alcali causó la hemólisis de eritrocitos de diferentes especies incluyendo humanas. La muerte de ratones Balb/c fué inducida con la administración intravenosa de 15 a 30 µg de las proteínas solubilizadas y no oralmente.

En 1989, Knowles y col. determinaron que el efecto citolítico de la toxina de 27 kDa de *Bti* ocurre a través de la formación de canales en bicapas lipídicas artificiales selectivas para cationes K^+ y Na^+ , en un mecanismo de lisis osmótica. Este mismo año, Yokoyama y col. reportaron que la proteína de *Bti* de 25 kDa inhibió el crecimiento in-vitro de células de leucemia murina L1210 a una dosis de 0.9 $\mu\text{g/ml}$ y cuando combinaron la proteína, purificada por DEAE-celulosa, con bleomicina a una dosis no tóxica de 0.7 $\mu\text{g/ml}$, el efecto citotóxico de la bleomicina fue incrementado 6.4 veces, un efecto menor se observó con el extracto crudo de la proteína solubilizada. Posteriormente en 1991, encontraron que la proteína de 25 kDa de *Bti* actúa sinérgicamente potenciando el efecto tóxico de la bleomicina en tumores sólidos in vivo en ratones. De las diferentes drogas probadas en combinación con la toxina de *Bti*, contra diferentes línea tumorales, el efecto se observó en la regresión del Carcinoma de Ehrlich al combinar 2.0 mg/kg/día de bleomicina y 0.3 mg/kg/día de *Bti*. Un efecto similar se encontró al combinar las mismas dosis de bleomicina y *Bti* contra el tumor B16.

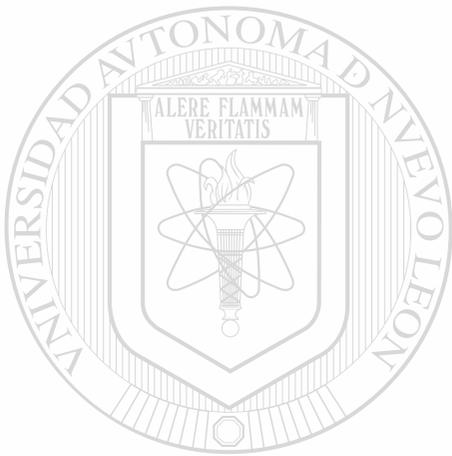
Recientemente, en 1996, Rodríguez-Padilla encontró que una proteína de 20 kDa. de los cristales de *B.t.* var. *thuringiensis*, tiene actividad citotóxica *in vitro* hacia 11 líneas de células tumorales humanas. Encontró que la línea mas sensible es un linfoma histiocítico U-937 (15 $\mu\text{g/ml}$), y la línea mas resistente es un glioblastoma de 400 $\mu\text{g/ml}$. El mecanismo citotóxico sobre las células tumorales no esta del todo claro, pero éste posiblemente ocurre por lisis celular o Apoptosis (Aggarwal y Rodríguez Padilla, 1996). Recientemente, se ha reportado que esta proteína es capaz de activar la producción de Interferón- γ y óxido nítrico en macrófagos peritoneales de ratas (Gomez-Flores y col., 1997).

Diversas cepas de *B.t.* producen una exoenzima durante la fase logarítmica de crecimiento con actividad sobre el fosfatidilinositol, fosfolípido de membrana que sirve como ancla de algunas proteínas de membrana. En 1980, Taguchi y col. aislaron y purificaron una fosfolipasa C de cultivos de *B.t.* con una actividad de 312 U/ml y con un peso molecular aproximado de 23,000 daltones. Esta enzima hidroliza específicamente fosfatidilinositol, produciendo mensajeros intracelulares que activan genes específicos.

En 1992, Sarafov y col. reportaron la fosfolipasa C de *B.t. kustaki* específica de fosfatidilinositol (PIPLC) tiene efecto en células de carcinoma espinocelular. Los autores encontraron hasta un 64% de inhibición *in vitro*, de el crecimiento de una línea celular de carcinoma Sofia IC, al cocultivar las células con 0.11 U/ml. de PIPLC. El efecto fué observado al tercer día de el cultivo. Los resultados encontrados in vivo, con hamster fueron también relevantes. Encontraron hasta un 29% de inhibición de el crecimiento de el tumor en animales que recibieron 4.9 U/PIPLC/kg., sin metástasis en hígado y bazo. Cabe destacar, que los autores observaron, que los animales que

recibieron PIPLC, el tumor presentaba degeneración vacuolar, regiones necróticas y abundante infiltrado de tejido linfoide, así como un incremento de las cuentas *linfocitarias de sangre periférica* de hasta un 78%.

Recientemente, Rahman y col. (1995), encontraron una nueva actividad inmunomoduladora en la PIPLC de *B.f.*, la cual promueve la generación de linfocitos T citotóxicos específicos de aloantígeno, en un cultivo mixto de linfocitos. El mecanismo por el cual el PIPLC genera los linfocitos citotóxicos posiblemente sea a través de la generación de un segundo mensajero intracelular del fosfatidilinositol que acelera el incremento del Ca^{2+} intracelular, o bien por la generación de una señal coestimuladora que coopera con una señal mediada por la IL-2.

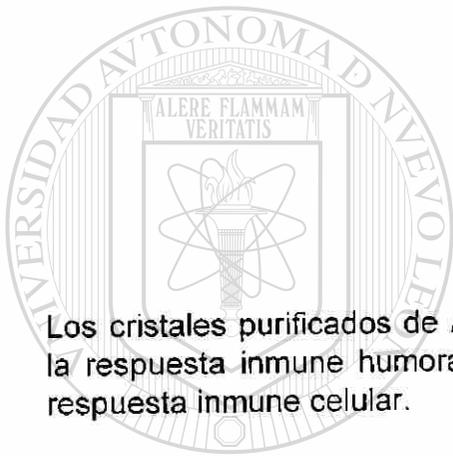


UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



HIPÓTESIS

Los cristales purificados de *Bacillus thuringiensis* GM-1 var. *aizawai* incrementan la respuesta inmune humoral contra eritrocitos de carnero (E.C.) y estimulan la respuesta inmune celular.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



OBJETIVOS

- 1) Obtención, purificación y caracterización de los cristales de *B.t.* GM-1, así como las proteínas que los componen.
- 2) Medir el efecto de los cristales y sus proteínas sobre la respuesta inmune humoral, enumerando células formadoras de placas hemolíticas contra eritrocitos de carnero (E.C.) en ratones Balb/c.
- 3) Determinar la clase y subclase de anticuerpos que se producen por la acción de las proteínas del cristal de GM-1.
- 4) Medir el efecto de los cristales de GM-1 sobre la respuesta inmune celular, induciendo una reacción de hipersensibilidad en cojinete plantar de ratones Balb/c.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

IMPORTANCIA

En nuestro país, existen importantes problemas a resolver en el área de salud. Enfermedades infecciosas en donde un agente etiológico esta involucrado, afectan principalmente la población socioeconómica media-baja y baja. De toda esta gama de enfermedades, la tuberculosis, enfermedades diarreicas agudas, fiebre de tifoidea, salmonelosis, shigelosis, paludismo, herpes, hepatitis A y hepatitis B, HIV, así como cáncer cérvico-uterino son algunos de los trastorno que afectan la población y que se caracterizan porque un microorganismo esta involucrado.

Para combatir esta problemática, los centros de salud utilizan diferentes alternativas, como son la utilización de fármacos y vacunas como un mecanismo de prevención, la que resulta la mejor opción, pero antes de que el individuo se infecte.

Para el desarrollo de una vacuna se necesita algunas veces contar con una sustancia adyuvante que estimule a el antígeno despertar la respuesta inmune especifica local o sistémica que permita eliminar al microbio agente causal de la enfermedad. Actualmente en el mundo no se cuenta con una sustancia adyuvante que estimule selectivamente la respuesta inmune celular y humoral y que además no sea tóxica en humanos al ser usada con la vacuna. Algunas toxinas bacterianas que tiene este efecto como el LPS, y el MDP resultan ser tóxicos y pirogénicos, efectos adversos que no permiten su uso en humanos. El conocimiento de la naturaleza atóxica de las proteínas (Cry) de los cristales de *Bacillus thuringiensis* para mamíferos y el hombre y la importancia de poder contar con un adyuvante que carezca de efectos tóxicos colaterales perjudiciales, hacen de la δ -endotoxina producida por esta bacteria un fuerte candidato, que pudiera resultar ser una sustancia útil en el desarrollo de vacunas para ser usada en humanos.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. OBTENCIÓN DE LA CEPA.

- La cepa de *Bacillus thuringiensis*. GM-1 identificada como var. *aizawai* serotipo H-7 (Lecadet, 1994) fue proporcionada de la colección del Laboratorio de Inmunología y Virología de la F.C.B., de la U.A.N.L..
- La cepa singénica de ratones Balb/c fue obtenida del bioterio del Laboratorio de Inmunología y Virología de la F.C.B., de la U.A.N.L..

2. ANTÍGENOS.

- Eritrocitos de carnero (SRBC) al 20 % en solución de Alsever's de 2 o mas semanas de edad.
- Cristales completos de GM-1. Diferentes concentraciones. (0.1 mg/kg, 1.0 mg/kg y 2.5 mg/kg).
- Proteína soluble de los cristales de GM-1. Diferentes concentraciones (0.1 mg/kg, 1.0 mg/kg y 2.5 mg/kg).
- Proteínas digeridas con Tripsina (Tripsinadas) de GM-1. Diferentes concentraciones (0.1 mg/kg, 1.0 mg/kg y 2.5 mg/kg).
- Albúmina sérica bovina (BSA).
- Lipopolisacárido de *Salmonella thyphimurium* (Sigma L7261)

3. ANTICUERPOS:

- Anticuerpo policlonal de conejo anti-Cry-IA(b) (obtenido a partir de la fracción tóxica recombinante de *B.t.* var *thuringiensis*).
- Anticuerpo policlonal de conejo anti-CryIA(c) y anti-CryIIIC obtenidos a partir de la purificación de las fracciones tóxicas en geles de poliacrilamida de las δ endotoxinas de HD-73 y GM-33 respectivamente.
- Anticuerpo policlonal de conejo anti-CryIIIA obtenido a partir de la purificación de la fracción tóxica en geles de poliacrilamida de la δ endotoxina de *B.t.* var. *tenebriones*.
- Todos los anti-Cry fueron gentilmente proporcionados por el laboratorio de Biología Molecular, F.C.B., U.A.N.L.
- El anticuerpo policlonal de conejo α -Opt fue obtenido a partir de un péptido sintético de la proteína de 20 Kd de *B.t.* var *thuringiensis* y proporcionado por el Dr. B: Aggarwal.

- Anticuerpos monoclonal de cabra anti-ratón: IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgA e IgM, (Sigma Chemical Co. Kit ISO2 # 073H-4810).
- Conjugado anti-IgG de conejo -Fosfatasa Alcalina, y anti-IgG de cabra-Fosfatasa Alcalina (Sigma Chemical Co. A8025 y A7650 respectivamente).

4. PRODUCCIÓN DE LOS CRISTALES.

Los cristales fueron producidos creciendo las bacterias en agar nutritivo en botellas, con una superficie de 22 por 23 cm. a pH 7 e incubadas por 72 h. a 96 h. a 30 °C. Se determinó la presencia de esporas y cristales y escasas células vegetativas, al teñir un frotis con cristal violeta (ver apéndice) y su posterior observación al microscopio óptico.

5. OBTENCIÓN DE LOS CRISTALES.

El complejo de esporas y cristales crecidos en el agar nutritivo, fue cosechado de acuerdo al método de Delafield y col., en 1968, de la siguiente manera:

El crecimiento de cada botella fue obtenido con 50 mls. de una solución de lavado 1 M (ver apéndice). Los cristales y esporas (la muestra), fueron lavados 2 veces con la misma solución, una vez con solución de lavado 0.1 M. y una vez con Tritón X-100, 0.01%. y finalmente una vez con agua destilada estéril pH 7.

La pasta cremosa de cristales y esporas se mantuvo en un volumen mínimo de agua destilada estéril pH 7 hasta su purificación. Esta muestra no se debe de congelar ya que esto dificulta la purificación, además, durante los lavados, se centrifugó cada vez a 10,000 rpm/10 min a 4°C.

6. PURIFICACIÓN DE LOS CRISTALES.

Los cristales fueron purificados en un sistema acuoso bifásico, en base a los trabajos de Sacks y Alderton en 1961; Goodman y col. en 1967 y de Guereca y col. en 1994 y adaptado en nuestro laboratorio de la siguiente manera:

11.18 gr. de polietilenglicol 3350 (PG) y 34.1 ml. de solución de fosfatos 1M (ver apéndice) se agregaron en un tubo de centrifuga de 50 mls., el que se agitó vigorosamente para solubilizar el PG.,. Después que se formaron 2 fases, se mezclaron 5 ml. de la muestra en el tubo y se centrifugó a 1000 rpm por 3 min. Los cristales libres de esporas fueron concentrados en la interfase del sistema y son cosechados cuidadosamente con una pipeta Pasteur. Se tiñeron con cristal violeta y se observó al microscopio óptico .Si persiste la presencia de espora, el

proceso se repite una vez mas o las que sean necesarios hasta no observar esporas contaminantes. Los cristales son lavados 2 veces con agua destilada pH 7 estéril, centrifugando a 10,000 rpm por 10 min. Opcionalmente se hizo una observación de los cristales al microscopio electrónico de barrido para confirmar su pureza. Finalmente los cristales fueron concentrados en un volumen mínimo de agua destilada estéril, liofilizados y congelados a - 20 °C hasta su uso.

6.1 PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA DE CRISTALES PARA MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO.

Brevemente: Se colocó en una base de aluminio o porta muestra, una gota de cristales purificados y una gota de fotoflo 200 Kodak como agente dispersante. Esta muestra se dejó secar a temperatura ambiente, y fue después recubierta con oro al 100% en un recubridor iónico Balzers SCD040. La muestra se observó en un microscopio electrónico de barrido Leica S440 a 10kv de energía.

7. SOLUBILIZACIÓN DE LOS CRISTALES.

La solubilización de los cristales se hizo de acuerdo a Prasad y Shetna 1974, con una modificación en los tiempos de hidrólisis y a Nagamatsu y col. 1984, de la siguiente manera:

↳ Método I. (Prasad y Shetna)

De 1 a 4 mg/ml. de cristales se disolvieron en 1 ml. de NaOH 0.01M.-Glicina 0.1M pH10. Estos se agitaron con una barra magnética por 3 h.,

↳ Método II. (Prasad y Shetna)

De 1 a 4 mg/ml. de cristales se disolvieron en 1 ml. de NaOH 0.1M.-Glicina 0.1M pH12. La suspensión se agitó con una barra magnética por 5 h.

↳ Método III (Nagamatsu y col.)

De 1 a 4 mg/ml. de cristales se disolvieron en 1 ml. de solución de solubilizado (N) (ver apéndice). Los cristales fueron mezclados en un agitador mecánico (S/P S8223-1) y después calentados en un baño de agua a ebullición por 3 min.

En los tres métodos, después de solubilizar, se eliminó el material no disuelto por centrifugación a 10,000 rpm por 20 min. Las proteínas en solución fueron dializadas contra 81 vol. de amortiguador de fosfatos 0.02 M, pH7.2, a 4°C. y después fueron colectadas en volúmenes de 1 ml., liofilizadas y congeladas a -70°C hasta su uso.

8. DIGESTION ENZIMATICA DE LA PROTEINA SOLUBILIZADA

A. La digestión se llevó a cabo con Tripsina de acuerdo a Jaquet y col., 1987, de la siguiente manera: 1 mg. de Tripsina (Sigma Chemical Co. # T0646) se disolvió en amortiguador PBS pH8.2. Enseguida, 1 mg de proteína solubilizada por el método I fue digerida con 500 µg de Tripsina por ½ h.. La proteína así digerida, fue liofilizada y congelada a -70°C. hasta su uso, la actividad de la Tripsina fue eliminada con PMSF a una concentración final de 1mM (ver apéndice).

B. La digestión enzimática con papaína se llevó a cabo de acuerdo a Choma y col., 1990, de la siguiente manera: 1 mg. de proteína solubilizada por el método III se digirió con 200 µg. de papaína (Sigma P-3125). La mezcla se incubó por 10 s. a temperatura ambiente e inmediatamente después la actividad enzimática se eliminó con 100mM de EDTA de concentración final. La proteína así digerida, fue liofilizada y congelada a -70°C. hasta su uso

9. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA.

Se realizó por el método de Lowry y col., 1951. Se preparó una línea de regresión utilizando un estándar de BSA de 0.5 mg/ml de concentración inicial. Al mismo tiempo que se prepararon los estándares, se prepararon las muestras problema, haciendo diluciones apropiadas de ambos, de tal manera que las lecturas de absorbancia de los problemas caigan dentro de las lecturas de los estándares y poder extrapolar en la línea de regresión, al momento de calcular la concentración de proteína desconocida para los problemas. El método se hizo con el siguiente protocolo:

Tabla #4
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Protocolo para la determinación cuantitativa de proteínas por el método de Lowry. Línea de regresión con un estandar de BSA de 0.5 mg/ml.

Tubo	ml. de Std.	ml. de H ₂ O	ml. de NaOH 1N.	Concentración en mg/ml.
1	-	0.5	0.5	-
2	0.1	0.4	0.5	0.05
3	0.2	0.3	0.5	0.1
4	0.3	0.2	0.5	0.15
5	0.4	0.1	0.5	0.2
6	0.5	-	0.5	2.5
Problema 0.5 ml. dilución apropiada				?

Se calentaron todos los tubos a ebullición por 5 minutos y se dejaron enfriar a temperatura ambiente. Después se le agregó a cada tubo 2.5 ml de reactivo C (ver apéndice), se agitó rápidamente, y se dejó reposar por 10 minutos, posteriormente a cada tubo se le adicionó 0.5 ml. del reactivo de Folin Ciocalteu 1N, agitándose rápidamente y se dejó reposar por ½ hora.

Todos los tubos se prepararon por duplicado, y se les determinó la absorbancia de luz visible a 750 nm. en un espectrofotómetro Beckman DU 650.

10. DETERMINACIÓN DEL PESO MOLECULAR. SDS-PAGE

La determinación del peso molecular de la(s) proteína (s) de los cristales, se hizo por corrimiento electroforético en geles de poliacrilamida con SDS, al comparar con estandares de peso molecular conocidos, de acuerdo a Laemmli de 1970.

El criterio de selección de la matriz de poliacrilamida (% del gel) y los volúmenes de reactivos utilizados en la preparación de los geles se hizo en base a las tablas # 13 y # 14 (ver apéndice).

Brevemente: se preparó un gel concentrador al 4-5% y un separador al 12% o al 15%. Se colocaron entre 1 a 5 µg de proteína (concentración final) en los carriles, para posteriormente aplicar 20 mA de corriente constante, durante 2 horas. La electroforesis se llevó a cabo en una cámara Novex X Cell II. Se utilizaron marcadores de peso molecular conocido en el gel como controles. Al final del corrimiento el gel se tiñó con azul comassie por 1 hora y se destiñó con solución para la decoloración de geles # I por una hora y con la solución # II, toda la noche (ver apéndice).

11. WESTERN BLOT (INMUNOELECTROTRANSFERENCIA)

Con el fin de caracterizar las proteínas del cristal de GM-1, se realizaron pruebas de western blot para conocer la similitud y diferencia con las proteínas de los cristales de otras variedades de *B.t.*. Para esto se utilizaron los anticuerpos anti-CryIA(b); anti-CryIA(c), anti-CryIIIA, anti-CryIIIC y anti- α -Otp, bajo el siguiente protocolo:

Se colocó el gel de poliacrilamida sobre una membrana de nitrocelulosa MNC (Bio-Rad), previamente lavada con solución de transferencia (ver apéndice). Ambos fueron protegidos por dos hojas de papel filtro de tamaño apropiado en forma de "sandwich" y colocados dentro del cartucho de transferencia.

El cartucho, se introdujo en la cámara de transferencia Novex X Cell II, la cual se rellenó con la solución de transferencia y se aplicaron 100 mA. de corriente constante toda la noche (14 horas). Se colocó la MNC en dirección hacia el

electrodo negativo (rojo), de no ser así, la transferencia no se lleva a cabo en dirección hacia la nitrocelulosa.

Después de finalizar la corrida, se obtuvo la MNC evitando tocarla con los dedos, y se tiñó con rojo Ponceau. Inmediatamente después, se lavó la membrana con agua destilada hasta eliminar todo el colorante, para proceder a la inmunodetección bajo el siguiente método:

Se lavó la membrana 2 veces con TBS-Tween20 0.05% (ver apéndice) por 10 min, posteriormente, se bloqueó la MNC 1 vez con TBS-Tween20 al 2% por 10 min. El primer anticuerpo que se agregó a la MNC (anti-CryIA(b); Cry-IA(c); CryIIIA, CryIIIC y α -Otp). se incubó por 1 h. a temperatura ambiente, el conjugado (anti-IgG de conejo-Fosfatasa Alcalina, diluido 1:10,000), se incubó por 1 hr., el substrato BCIP y NBT (Pierce Inmunopure 34071), se agregó e incubó aproximadamente de 5 a 10 minutos hasta que se desarrolló un color azul marrón. Finalmente la reacción enzima-substrato se detuvo con agua destilada.

12. DETERMINACIÓN DE EL EFECTO DE LOS CRISTALES Y LAS PROTEÍNAS EN LA INMUNIDAD HUMORAL.

10 Ratones Balb/c se inmunizaron con 0.2 ml. de E.C. al 20 %, por vía intraperitoneal (IP) al día cero, 7 de los 10 ratones fueron inmunizados con los cristales (los 3 restantes se usaron como control), lo mismo se hizo con la proteína solubilizada y las digeridas con tripsina a diferentes dosis y tiempos con respecto a la administración del antígeno, en base a la siguiente tabla:

Tabla #5

Esquema de inmunización de ratones Balb/c con los cristales y las proteínas de GM-1

*Tiempo Día	*DOSIS			*Via
	0.1 mg/kg	1.0 mg/kg	2.5 mg/kg	
-18	"	"	"	IP
-24	"	"	"	"
0	"	"	"	"
-24	"	"	"	"
-48	"	"	"	"
-72	"	"	"	"

* mg/kg de peso del ratón

* Tiempo de administración de los cristales con respecto al antígeno

* Via de inmunización intraperitoneal (I.P.)

Se obtuvieron las células de bazo al quinto día con respecto al antígeno, y se determinó el número de células formadoras de placas hemolíticas de acuerdo al método de Jerne y Nordin de 1963, modificado por Cunningham y Szenberg en 1968.

12.1 MÉTODO DE CUNNINGHAM Y SZENBERG DE 1968.

Los 10 ratones inmunizados (7 tratados y 3 controles) fueron sacrificados y los bazos de cada uno de ellos fueron obtenidos individual y asépticamente en solución de Hank's (ver apéndice). Las células de bazo fueron obtenidas al transfundir estos con 5 o 6 ml. de solución de Hank's utilizando aguja de 26 X ½", las cuales fueron mantenidas todo el tiempo en un baño de hielo, lavadas una vez con Hank's y concentradas al centrifugar suavemente a 1000 r.p.m. por 10 min. Después, las células fueron suspendidas en un volumen de 2 a 3 ml. (solución madre), contadas en un hemacitómetro, visualizando los núcleos al teñirlos con una solución de cristal violeta (ver apéndice). También se determinó la viabilidad celular por el método de Azul Tripán (Azul Tripán al 0.4% Sigma Chemical Co. T8154). Las células linfoides de cada bazo fueron ajustadas a una concentración de 2×10^5 en 300 μ l de solución de Hank's en un tubo de 13 x 50 estéril, se les adicionó 120 μ l de eritrocitos de carnero (antígeno) ajustados al 12-15% en Hank's. y 120 μ l de complemento de Cobayo absorbido con el antígeno, diluido 1:2. Inmediatamente después, las cámaras de Cunningham (3 por cada bazo/ratón) fueron llenadas con 110 μ l de la suspensión de células, antígeno y complemento y selladas con parafina. Todas las cámaras, se incuban a 37 °C/ 1 hora, para después enumerar visualmente las placas hemolíticas. Las placas dudosas, o con la presencia de artefactos, no se tomaron en cuenta.

12.2 AJUSTE DE LAS CÉLULAS FORMADORAS DE PLACA A UN MILLÓN DE CÉLULAS DE BAZO.

1. Primero se calcula el número de células en la cámara, de la siguiente manera :

$$Y = \left(\frac{A}{B} \right) C$$

- En donde:
- Y= # de células en la cámara
 - A= # de células que se utilizan en el experimento
 - B= Volumen de solución que contiene a las células de bazo, E.C. y complemento + el volumen de solución que se agregó con las células.
 - C= Volumen agregado a la cámara.

2. Después se ajusta el # de C.F.P. contadas en la cámara a un millón de células de bazo, con la siguiente fórmula :

$$C.F.P./10^6 \text{ Cel. Bazo} = \left(\frac{X}{Y}\right)Z$$

En donde : X= # C.F.P. contadas en la cámara
 Y= # de células en la cámara
 Z=10⁶ células de bazo

12.3 TINCIÓN DE LOS NÚCLEOS CON CRISTAL VIOLETA Y ENUMERACIÓN EN LA CÁMARA DE NEWBAUER.

Se hizo una dilución 1:20 de las células de bazo en un tubo de 13x50 mm, Para esto se agregaron 190 µl. de cristal violeta (ver apéndice) y 10 µl. de la suspensión madre de células de bazo. Esta suspensión se agitó suavemente y se dejó reposar por 3-5 min. Después se colocó una alícuota en la cámara de Newbauer y se contaron las células en los cuadros de las esquinas, utilizando el objetivo de 10X.

La cantidad total de células por ml. se determina en base a la siguiente formula:

$$\text{Células por ml.} = \# \text{ total de células} \times 4 \times \text{dilución} \times 10^4$$

12.4 DETERMINACIÓN DE LA VIABILIDAD CELULAR POR EL MÉTODO DE AZUL TRIPÁN.

Para llevar a cabo esta prueba, se colocaron en un tubo de 13 x 50, 50 µl de azul tripán (Sigma Chemical Co. T8154) y 50 µl de una dilución 1:10 de las células de bazo (dilución final de 1:20). Después de agitar suavemente la suspensión. Se colocó una alícuota en la cámara de Newbauer. Se contaron las células al microscopio utilizando el objetivo de 10X, presentes en los cuadros de las esquinas, cada uno contienen 16 cuadros que representan 0.1 mm³. Las células vivas excluyen (no se colorean) el colorante, las células muertas tiñen su núcleo de azul marrón. Se tuvo el cuidado de no dejar pasar mas de 10 min. en contar las células, ya que el azul tripán en este tiempo tiñe células vivas y muertas. Finalmente se determinó la viabilidad celular en base a la siguiente formula:

$$\% \text{ de Viabilidad} = \frac{\text{Total de células vivas} \times \text{ml}}{\text{Total de células vivas y muertas} \times \text{ml}}$$

13. CULTIVO DE LAS CÉLULAS DE BAZO PARA LA OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LOS ANTICUERPOS PRODUCIDOS POR LAS CÉLULAS PLASMÁTICAS.

Las células de los bazos no utilizadas para las pruebas de Cunninham fueron transferidas asépticamente a botellas individuales de cultivo de células con RPMI, adicionado con 8% de suero fetal bovino, a una densidad de 1×10^6 células x mls. Aquí fueron cultivadas por 48 horas en una incubadora (Lab Líne Imperial II) a 37 °C, con una atmósfera del 5% de CO₂ y 10 libras/min de aire. Después de la incubación los sobrenadantes fueron cosechados a 3000 rpm por 15 min a 4°C., los cuales fueron concentrados por deshidratación con azúcar de caña granulado a 4°C, hasta un volumen final aproximado de 3-5 ml. en una membrana de diálisis de poro apropiado. Los sobrenadantes de los cultivos concentrados, fueron después dializados contra 80 volúmenes de PBS pH 7.2. a 4°C., separados en volúmenes de 0.5 ml. y congelados a -70°C hasta su uso.

13.1 ELISA INDIRECTO DEPENDIENTE DE ANTÍGENO PARA LA CAPTURA DE CLASE.

Se cubrió una placa de 96 pozos (Costar, Vinilo 2596) con 100 µl. de una dilución 1:80 de E.C. al 1.0%, en las siguientes coordenadas:

1. Para el tratamiento I, las repeticiones en las columnas 1 a la 6, de las filas A a la C.
2. Para el tratamiento II, las repeticiones en las columnas 7 a la 12 y de las filas A a la C.
3. Para el tratamiento III, las repeticiones en las columnas 1 a la 6 y de las filas E a la G.
4. Las columnas 1 a la 12 de la fila D, se cubrieron con 100 µl. de gelatina (Sigma Chemical Co. G-7765) con una concentración de 0.1 mg/ml.

La placa, se incubó por 4 días a 4°C, este tiempo de incubación permitió una mejor adhesión de los E.C. a la fase sólida. Después, la placa se lavó 3 veces con 150µl. de solución de lavado (ver apéndice). Los sitios de adhesión no específicos fueron bloqueados con 100 µl. de BSA al 1.5%, incubando por 2 h. a temperatura ambiente, lavó 3 veces, se agregaron 100 µl. de los sobrenadantes del cultivo de las células del bazo (anticuerpo secretado), bajo el siguiente protocolo:

- Para el tratamiento I, el sobrenadante de las células estimuladas con las proteínas tripsinadas de GM-1.
- Para el tratamiento II, el sobrenadante de las células estimuladas solo con el antígeno (E.C.).

- Para el tratamiento III, el sobrenadante de las células de un ratón normal (no estimulado).

La placa se incubó a 4°C, toda la noche, se lavó 3 veces y se agregaron 100 µl. de los diferentes anticuerpos de cabra, anti-ratón, (Sigma Chemical Co. Kit ISO2, 073H-4810) diluidos 1:1000, bajo el siguiente protocolo:

- Las columnas 1 y 7, de las filas A a la G y A a la D, el anticuerpo **anti-IgG1**.
- las columnas 2 y 8, de las filas A a la G y A a la D, el anticuerpo **anti-IgG2a**.
- Las columnas 3 y 9, de las filas A a la G y A a la D, el anticuerpo **anti-IgG2b**.
- Las columnas 4 y 10, de las filas A a la G y A a la D, el anticuerpo **anti-IgG3**.
- Las columnas 5 y 11, de las filas A a la G y A a la D, el anticuerpo **anti-IgA**.
- Las columnas 6 y 12, de las filas A a la G y A a la D, el anticuerpo **anti-IgM**.

La placa se incubó por 1 h. a temperatura ambiente y se lavó 3 veces. Posteriormente se agregaron 100 µl. del conjugado anti-IgG de Cabra -Fosfatasa Alcalina (Sigma Chemical Co., A7650) diluido 1:30,000. La placa con el conjugado se incubó a temperatura ambiente por 1 h. se lavó 3 veces. Posteriormente se agregaron 100 µl. del sustrato (a una concentración de 2.0 mg/ml en solución de sustrato - ver apéndice -). Además, 100 µl. de sustrato en las coordenadas H 1-4 sirvieron como blanco para calibrar el espectrofotómetro. La placa se incubó a 30-37°C. por ½ hora en la oscuridad. Cuando se observó un color amarillo verdoso se agregaron 50 µl. de NaOH 3N. para detener la reacción enzimática. Finalmente se determinó la absorbancia a 405 nm en un microlector de Elisa, Biotek Instrument EL 311.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

14. ESTIMULACIÓN DE LA INMUNIDAD CELULAR CON LAS PROTEÍNAS DE GM-1. PRUEBA DE HIPERSENSIBILIDAD EN RATONES BALB/C.

Los ratones (por triplicado para cada dosis) fueron sensibilizados en la base de la cola utilizando diferentes dosis de las proteínas tripsinadas de GM-1 bajo el siguiente protocolo:

Tabla #6

Protocolo de sensibilización de ratones Balb/c con las proteínas tripsinadas de GM-1 para la inducción de una reacción de inflamación.

Dosis de Sensibilización	Nº de Inyecciones aplicadas	Intervalo de entre cada inyección (días)
cero	cero	cero
50 µg	1	cero
100 µg	2	7
150 µg	3	7
200 µg	2	7
300 µg	3	7
400 µg	4	7

Los ratones fueron retados al séptimo día después de la última dosis de sensibilización con 25 µg de proteína de GM-1 en 25 µl de solución salina, en el cojinete plantar de la pata derecha y solamente con solución salina (25 µl) en la pata izquierda (control negativo). Un grupo de 5 ratones fueron retados con 25 µg de BSA en 25 µl de solución salina en vez de las proteínas de GM-1. La reacción de inflamación fue medida con un Bernier a las 3, 24 y 48 horas después del reto.

14.1 CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE LA(S) POBLACIONE(S) CELULARE(S) INFILTRANTES EN LA INFLAMACIÓN.

Las Piezas de tejido (cojinete plantar) fueron fijadas en una solución de PBS-Formalina neutra al 10% por 6 a 12 horas. Las piezas se procesaron por histología (deshidratación en diferentes alcoholes) y finalmente se incrustaron en parafina. Posteriormente, se procesaron los cortes al microtomo, de 6 a 8 µm de grosor los que fueron montados en un portaobjeto desgrasado. Los cortes se tiñeron posteriormente con Hematoxilina y Eosina, para ser observados finalmente al microscopio óptico a baja y mediana resolución.

RESULTADOS

I. PURIFICACION DE LOS CRISTALES EN EL SISTEMA BIFÁSICO DE POLIETILENGLICOL - FOSFATOS 1M

Se produjeron los cristales de *B.t.* GM-1 en agar nutritivo y después que fueron purificados en el sistema bifásico fosfatos-P.G., se obtuvo un rendimiento proteico de un 20% a un 35% (tabla # 7) con respecto al complejo de esporas y cristales. La pureza de éstos se determinó por examen de las muestras al microscopio óptico (fig # 2), microscopio electrónico de barrido (fig. # 3) y por análisis electroforético en geles de poliacrilamida, encontrándose que los cristales producen aparentemente una sola proteína (una banda) al ser solubilizados (fig. # 4, carriles 2, 6 y 7) con un Mr de 130 kDaa.

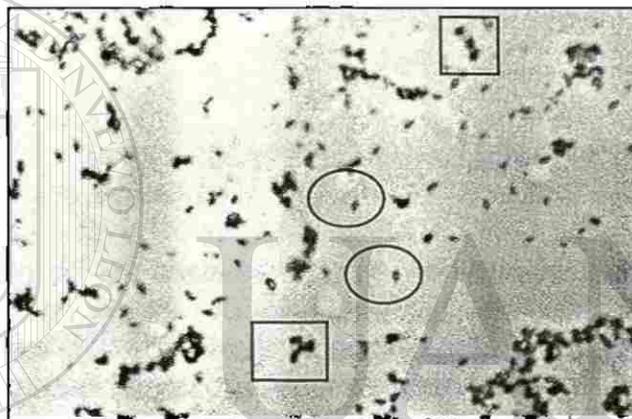


Fig. # 2. Fotomicrografía de microscopio óptico), tinción simple con cristal violeta de *B.t.* GM-1 mostrados esporas y cristales antes de su purificación en el sistema bifásico. Círculos=Cristales; Cuadros=Esporas. 1000X.

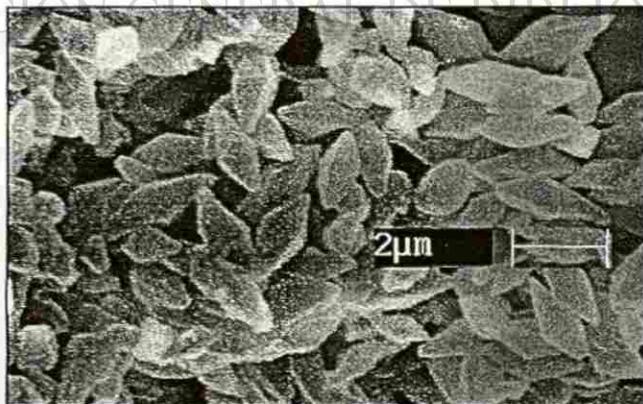


Fig. # 3 Fotomicrografía de microscopio electrónico de barrido de *B.t.* GM-1, mostrando los cristales purificados libres de espora después de pasar el complejo espora-cristal por el sistema bifásico. 7 000 X.

Tabla # 7

Rendimiento proteico obtenido de los cristales de GM-1 al ser purificados en el sistema acuoso bifásico de fosfatos-polietilenglicol.

	Concentración de Proteínas en mg/ml		
	Lote I	Lote II	Lote III
Complejo Espora Cristal	22.17	24.33	42.33
Cristales Puros	7.83	8.3	8.83
Rendimiento %	35.32	34.31	20.86

II. OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LAS PROTEÍNAS DEL CRISTAL DE *Bacillus thuringiensis* GM-1.

La solubilización de los cristales de GM-1 en NaOH-glicina a pH 10 por 3 h., generó una proteína con un Mr. de 98 kDa (Fig. # 4, carril # 3), en cambio, el tratamiento a pH 12 por 5 h, no produjo ninguna banda en el gel de poli-acrilamida (no mostrado) después de haber llevado a cabo la electroforesis. El tratamiento enzimático con tripsina aplicado a la proteína solubilizada produjo una proteína principal con un Mr de 62 kDa., y dos aparentes proteínas con un Mr de 64 y 59 kDa. (Fig. # 4, carril # 4).

Por otro lado, la solubilización de los cristales con 64 mM de Tris-base generó igualmente una proteína con un Mr. de 130 KDa. (Fig. # 4 carril # 6 y 7) y la digestión de esta proteína con papaina produjo una proteína con un Mr. de 62 kDa (Fig. # 4 carriles 9 y 10).

El análisis antigénico de las proteínas del cristal reveló por Western Blot reacción cruzada con los anticuerpos CryIA(b) y CryIA(c) (fig. 5 y 6), y ninguna reacción se obtuvo con los anticuerpos CryIIIA, CryIIIC y α Otp (fig. 7, 8 y 9).

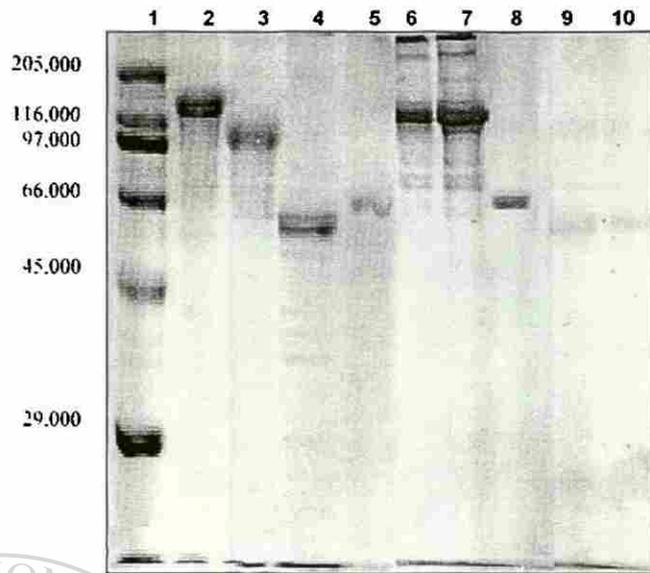


Fig. #4. Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS al 12% de las Proteínas del Cristal de GM-1 con diferentes tratamientos.

Carril 1: marcadores de peso molecular. Carril 2. protoxina de GM-1 solubilizada con buffer de muestra para electroforesis (ver apéndice). Carril 3: proteína del cristal solubilizada con NaOH 0.01M, pH10.2 Carril 4 Proteínas del Cristal solubilizadas con NaOH digeridas con 500 µg/mg de Tripsina (Sigma Chemical Co. T-0646; Tripsina 1340 Unidades/mg; Quimiotripsina 3.5 Unidades/mg) Carril:5 y 8 BSA. Carril:6 y 7 Solubilizado de GM-1 Tris 64 mM. Carril 9 y 10: Digestion de la proteína solubilizada con Tris 64 mM con Papaina (relacion 5:1).

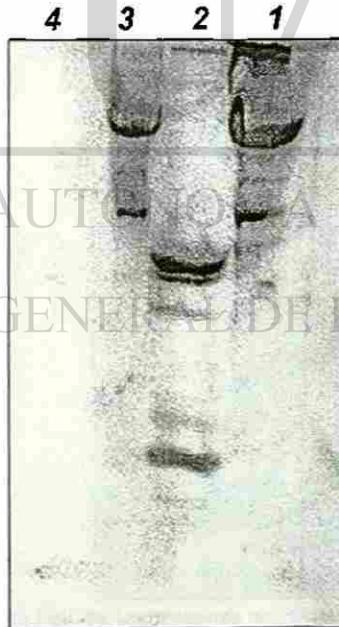


Fig. #5. Western Blot de las proteínas del cristal de GM-1 contra el anticuerpo anti-CryIA(b).

Carriles: 1:GM-1/Solubilizado con Trisma base 64 mM, 2: GM-1 solubilizado con NaOH y digerido con 500 µg, de tripsina, 3: Cristal de *B.t. var thurngiensis*, solubilizado en buffer de muestra para electroforesis (control (+)), 4 BSA (control (-)).



Fig. #6. Western Blot de las proteínas del cristal de GM-1 contra el anticuerpo anti-CryIA(c).

Carriles: 1.GM-1/Solubilizado con Trisma base 64 mM, 2: GM-1 solubilizado con NaOH y digiendo con 500 µg, de tripsina, 3: Cristal de *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis*, solubilizado en buffer de muestra para electroforesis (control (+)), 4.BSA (control (-)).

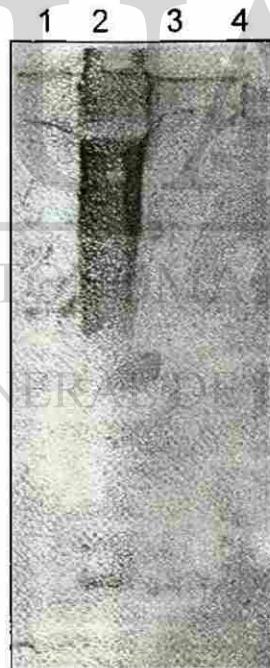


Fig. #7. Western Blot de las proteínas del cristal de GM-1 contra el anticuerpo anti-CryIIIA.

Carriles: 1: BSA (control (-)); 2:*B.t* var. *tenebrionis*; 3: GM-1/Solubilizado con Trisma base 64 mM; 4: GM-1 solubilizado con NaOH y digerido con 500 µg. de tripsina.



Fig. #8. Western Blot de las proteínas del cristal de GM-1 contra el anticuerpo anti-CryIIIC.

Carriles: 1: BSA (control (-)); 2: *B.t.* var *monterrey* GM-33; 3: GM-1/Solubilizado con Trisma base 64 mM; 4: GM-1 solubilizado con NaOH y digerido con 500 µg, de tripsina.



Fig. #9. Western Blot de las proteínas del cristal de GM-1 contra el anticuerpo α Otp.

Carriles: 1: BSA (control(-)); 2: Proteína del cristal de *B.t.* var. *thunngiensis* 3: GM-1 solubilizado con Trisma base 64 mM.; 4: GM-1 solubilizado con NaOH y digerido con 500 µg, de tripsina

III EFECTO DE LOS CRISTALES Y LAS PROTEINAS DEL CRISTAL DE *Bacillus thuringiensis* GM-1 SOBRE LA RESPUESTA HUMORAL DE ANTICUERPOS. EFECTO SOBRE EL NÚMERO DE CÉLULAS FORMADORAS DE PLACA EN RATONES BALB/c.

Se determinó la viabilidad de las células de bazo en los experimentos, registrándose un promedio de $87.6 \pm 5.1\%$ células viables por bazo, en 8 ratones evaluados (tabla #8).

Cuando los ratones fueron tratados a diferentes dosis y tiempos con los cristales completos, se encontró que a una dosis de 1.0 mg/kg, 48 horas antes del estímulo con el antígeno y con una dosis 0.1 mg/kg, 24 horas después que se aplicó el antígeno, se incrementaron el # de C.F.P. (Fig. #10) en un 48% y un 62 % respectivamente, con una significancia estadística del 0.05%. Por otro lado, no se observó ningún efecto cuando los ratones fueron tratados con 2.5 mg/kg (tabla #9).

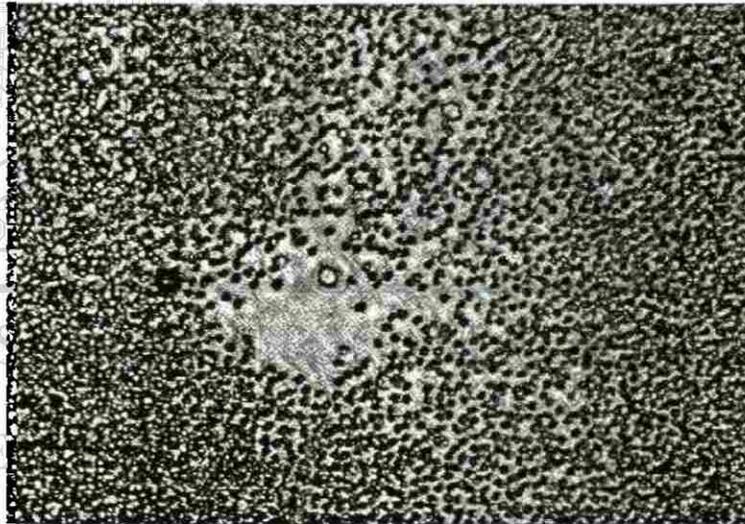


Figura #10. Fotomicrografía de una célula formadora de placa lítica de ratón Balb/c anti-E C . Al centro puede observarse una célula plasmática y la ausencia de eritrocitos a su alrededor como resultado de la lisis por acción del complemento (aumento 100X).

Tabla # 8

PORCIENTO DE VIABILIDAD PROMEDIO OBTENIDO CON LAS CÉLULAS DE BAZO DE RATONES BALB/C

Ratón #	Total de Células/ml.	% de Viabilidad
1	43.2	83.7
2	9.4	93.6
3	16.2	88.8
4	19.8	86.8
5	13.8	81.1
6	21.8	93.5
7	17.4	81.6
8	21.8	91.7
Total		*87.6± 6.1

*Media±Desv. Estd

Tabla # 9

EFEECTO DE LOS CRISTALES COMPLETOS DE GM-1 SOBRE EL NUMERO DE CÉLULAS FORMADORAS DE PLACAS DE RATONES BALB/c ANTI-E.C.

Tratamiento	CÉLULAS FORMADORAS DE PLACA/10 ⁶ CÉLULAS DE BAZO						
	Tiempo de Administración de los Cristales						
	-48 Horas	-24 Horas	0 Horas	+24 Horas	+48 Horas	+72 Horas	Control
0.1mg/kg	1533±113	888-355	1255±536	*1677±908	1488±484	1085±395	1038±675
Incremento en %	48	-14	18	62	43	5	0
1.0 mg/kg	*2386±690	2199-101	1919±108	1871±479	1626±647	1602±651	1608±651
Incremento en %	48	37	19	16	1	0	0
2.5 mg/kg	ND	1182-417	1116±278	1153451	ND	ND	991±326
Incremento en %		19	13				0

Media±Desviación Estandar

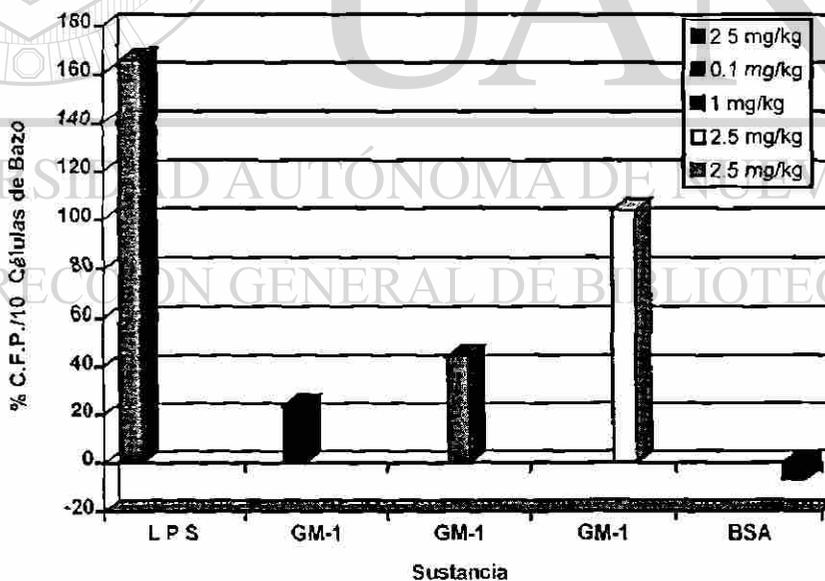
*p≥0.05 Distribución "U" Mann Whitney

Al comparar el efecto que tienen tres diferentes dosis (0.1, 1.0 y 2.5 mg/kg) de la proteína de GM-1 solubilizada a pH 10 (GM-1/s), con respecto a L.P.S. y BSA, 24 horas después del estímulo con el antígeno, se encontró que L.P.S incrementó la respuesta de células formadoras de placa líticas en un 62% mas que GM-1/s (gráfica #1, barra roja), no obstante, el incremento en la respuesta con GM-1/s fue de un 104%(gráfica #1, barra amarilla) en cambio, BSA no presento ningún efecto en la respuesta (gráfica #1, barra negra) todo esto a una dosis de 2.5 mg/kg para las tres sustancias comparadas.

Posteriormente, cuando se determinó el efecto que tienen las proteínas solubilizadas y digeridas con tripsina (GM-1/s-t) se encontró:

1. Que el tratamiento de 0.1 mg/kg 48 horas antes y 24 horas después, incrementó en un 61 % y 124 % la respuesta con respecto al control, con una significancia estadística del 0.05% (tabla #10).
2. Con el tratamiento de 1.0 mg/kg, 48 horas antes de el estímulo con el antígeno, se obtuvo un incremento en la respuesta de un 135%, la cual es mas significativa que con 0.1 mg/kg. No obstante, en los demás tiempos, la respuesta no tuvo diferencia significativa con respecto al control (tabla #11).
3. El tratamiento con 2.5 mg/kg, permitió un incremento de un 86% en la respuesta 48 horas antes, el cual es significativo con respecto al control. La mayor respuesta con esta dosis se logro obtener cuando las proteínas se inocularon al mismo tiempo que el antígeno, los E.C., con un 143% de incremento en la respuesta (tabla #12).

Los resultados obtenidos, nos indican que el mejor efecto se logró con la proteína solubilizada y digerida con tripsina, esto es, el efecto de los cristales y/o las proteínas incrementaron notablemente el # de de placas líticas a medida que la proteína del cristal en los tratamientos era la de menor peso molecular (gráfica #2, -Digerido-).



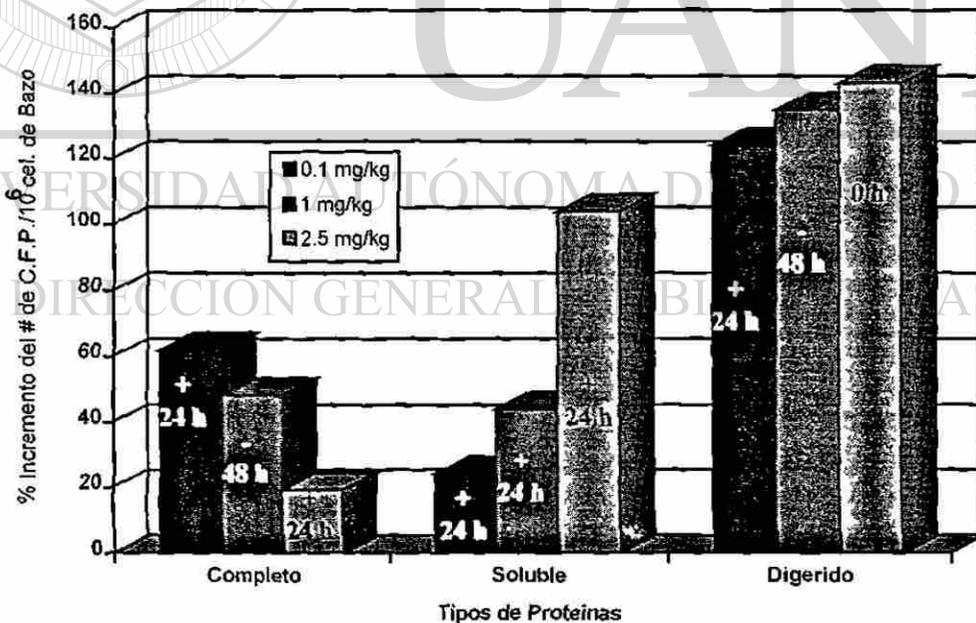
Gráfica #1. Efecto en el # de células formadoras de placa anti-E.C. de ratones Balb/c al aplicar 24 horas después que el antígeno tres dosis diferentes de la proteína del cristal solubilizada en NaOH-Glicina pH10 de GM-1, lipopolisacárido (LPS) y albumina sérica bovina (BSA).



Figura #11. Fotografía que muestra el estado de intoxicación de los ratones Balb/c al ser tratados con LPS y ninguna intoxicación aparente al ser tratados con la proteína de GM-1.

Los ratones a y b, fueron tratados con 2.5 mg/kg de LPS por vía intraperitoneal. Obsérvese los síntomas de diarrea, piloerección y fotofobia. Uno de los ratones en el experimento murió a las 48 horas después de recibir el tratamiento.

El ratón c, fue tratado con 2.5 mg/kg de proteína de GM-1 por la misma vía.



Gráfica # 2. Actividad de los Cristales y las Proteínas de *Bacillus thuringiensis* GM-1 Administradas a Diferentes Tiempos. Efecto Sobre el # Celulas Formadoras de Placa en Ratones Balb/c.

Tabla # 10

Efecto de las proteínas del cristal de *Bacillus thuringiensis* GM-1/s digeridas con Tripsina sobre la respuesta inmune humoral de ratones Balb/c

Proteínas de GM-1/s 0.1 mg/kg	*Células Formadoras de Placa/10 ⁶ Células de Bazo		
	Tratados	No Tratados	Diferencia en %
Tiempo de aplicación respecto al antígeno			
48 horas antes	* 2527±655	1573±677	61
24 horas antes	1504±940	1573±677	-4
Al mismo tiempo	2348±1220	1573±677	49
24 horas después	* 3527±1598	1573±677	124

La proteína GM-1/s fue digerida con 500 µg/mg de Tripsina (Sigma T0646) por ½ hora a temperatura ambiente

*Media ± desviación estandar

*p≥0.05 Distribución "U" Mann Whitney

Tabla # 11

Efecto de las proteínas del cristal de *Bacillus thuringiensis* GM-1/s digeridas con Tripsina sobre la respuesta inmune humoral de ratones Balb/c

Proteínas de GM-1/s 1.0 mg/kg	*Células Formadoras de Placa/10 ⁶ Células de Bazo		
	Tratados	No Tratados	Diferencia en %
Tiempo de aplicación respecto al antígeno			
48 horas antes	* 3064±1373	1302±282	135
24 horas antes	1576±642	1302±282	21
Al mismo tiempo	1589±710	1302±282	22
24 horas después	1622±257	1302±282	25

La proteína GM-1/s fue digerida con 500 µg/mg de Tripsina por ½ h a temperatura ambiente

*Media ± desviación estandar

*p≥0.05 Distribución "U" Mann Whitney

Tabla # 12

Efecto de las proteínas del cristal de *Bacillus thuringiensis* GM-1/s digeridas con Tripsina sobre la respuesta inmune humoral de ratones Balb/c

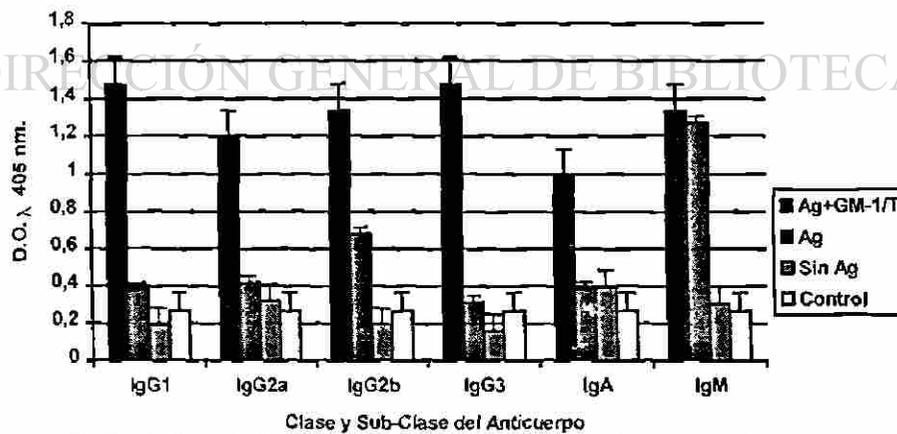
Proteínas de GM-1/s 2.5 mg/kg	●Células Formadoras de Placa/10 ⁶ Células de Bazo		
Tiempo de aplicación respecto al antígeno	Tratados	No Tratados	Diferencia en %
48 horas antes	*2586±956	1387±701	86
24 horas antes	1978±1025	1387±701	43
Al mismo tiempo	*3373±956	1387±701	143
24 horas después	1202±303	1387±701	-13

La proteína GM-1/s fue digerida con 500 µg/mg de Tripsina por ½ h. a temperatura ambiente

●Media ± desviación estandar

*p≥0.05 Distribución "U" Mann Whitney

Al investigar si se produce alguna diferencia en la clase o sub-clase de los anticuerpos producidos por las células plasmáticas de los ratones estimulados con la proteína de GM-1 digerida con tripsina, a una dosis de 2.5 mg/kg aplicada al mismo tiempo que el antígeno, en relación con los ratones no estimulados, encontramos que no hay diferencia estadística significativa en la concentración del anticuerpo IgM en ambos grupos, sin embargo, se encontró un marcado incremento ($\alpha = 0.05$), en la concentración de anticuerpo IgG1, IgG2a, e IgG3 y en menor proporción IgG2b e IgA en los ratones tratados con la proteína de GM-1, a diferencia de los inmunizados solamente con los E.C. (gráfica #3).



Gráfica #3. Anticuerpos Secretados Por las Células de Bazo al ser Estimuladas con la 2.5 mg/kg de la Proteína Tripsinizada de GM-1, administrada al mismo tiempo que el antígeno E.C..

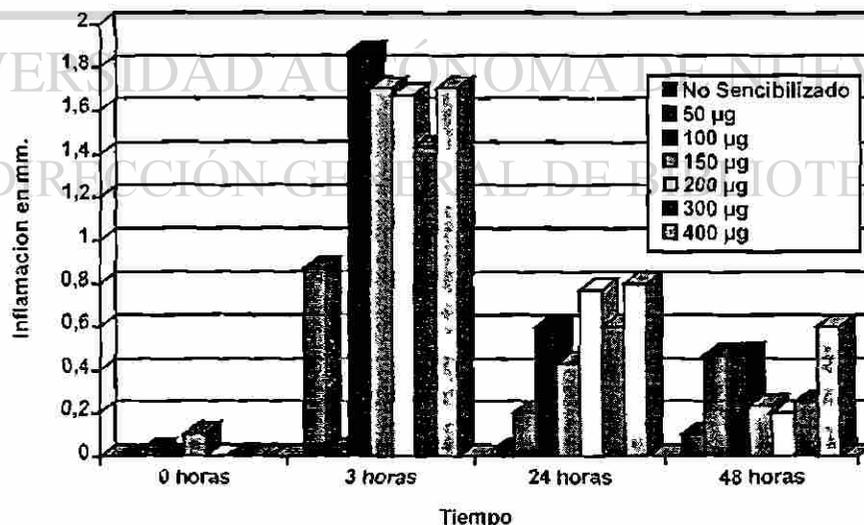
$\alpha = 0.05\%$ Mann Whitney

IV. ACTIVIDAD DE LAS PROTEÍNAS DEL CRISTAL DE *Bacillus thuringiensis* GM-1 SOBRE LA RESPUESTA INMUNE CELULAR. RESPUESTA DE HIPERSENSIBILIDAD EN RATONES BALB/c.

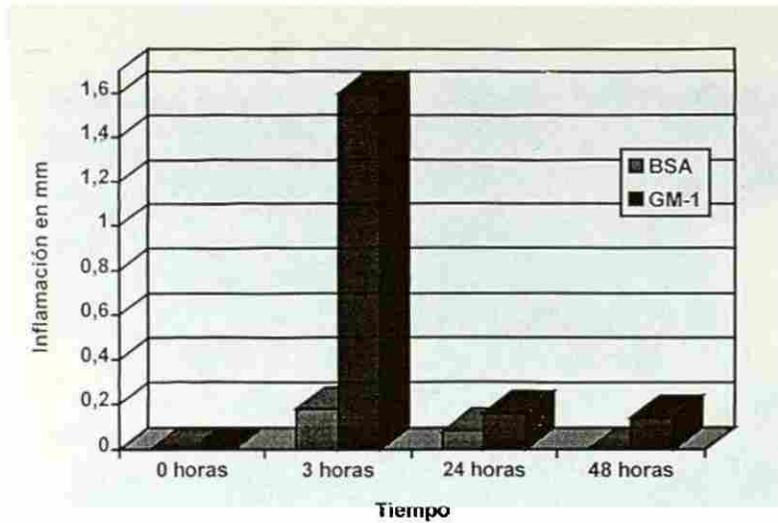
Para producir una reacción de inflamación en ratones Balb/c, se evaluaron 6 diferentes dosis para la sensibilización y una dosis para el reto con las proteínas tripsinadas de GM-1. Después se midió la respuesta de hipersensibilidad a diferentes tiempos. Se encontró, que GM-1 induce una *inflamación pura* en el cojinete plantar, superior a 1.6 mm de diámetro 3 h. después del reto (fig. # 12a; gráfica # 4), con una fuerte infiltración de leucocitos polimorfonucleares, como se juzgo en la observación microscópica (fig # 13 y 17a,b y c).

No se encontró diferencia significativa en la inflamación inducida con las diferentes dosis de sensibilización probadas en este tiempo, ($\alpha \geq 0.05\%$, gráfica. #4). Por otro lado, se observó, que la magnitud de la inflamación disminuye significativamente a las 24 h., aunque el infiltrado de células persiste, pero en una menor intensidad (gráficas # 4 y 5; fig. #15) y con una tendencia de la inflamación a desaparecer a las 48 h. (gráficas # 4 y 5) así como las células en el infiltrado (fig. #16). Se encontró que los ratones sensibilizados con la proteína de GM-1 tripsinada y retados con solución salina estéril, a las tres horas después del reto, además de que no ocurrió inflamación del cojinete plantar, no se observó infiltración celular (fig.#14)

Se demostró que la reacción de inflamación es específica de el antígeno, ya que en los ratones que fueron sensibilizados con la proteína de GM-1 y posteriormente retados con BSA no ocurre una inflamación, incluso a las 3 horas, que es el tiempo de máxima respuesta observado (gráfica #5).



Gráfica #4. Respuesta Inflamatoria en Ratones Balb/c al ser Sensibilizados con Diferentes Dosis de la Proteína Tripsinada de GM-1. Reto con 25 µg de la Proteína Tripsinada de GM-1 en el Cojinete Plantar.



Gráfica #5. Respuesta Inflamatoria Especifica de Antígeno en Ratones Balb/c. Sensibilización con 200 µg de las Proteínas de GM-1. Reto con 25 µg de la Proteína Tripsinada en el Cojinete Plantar.

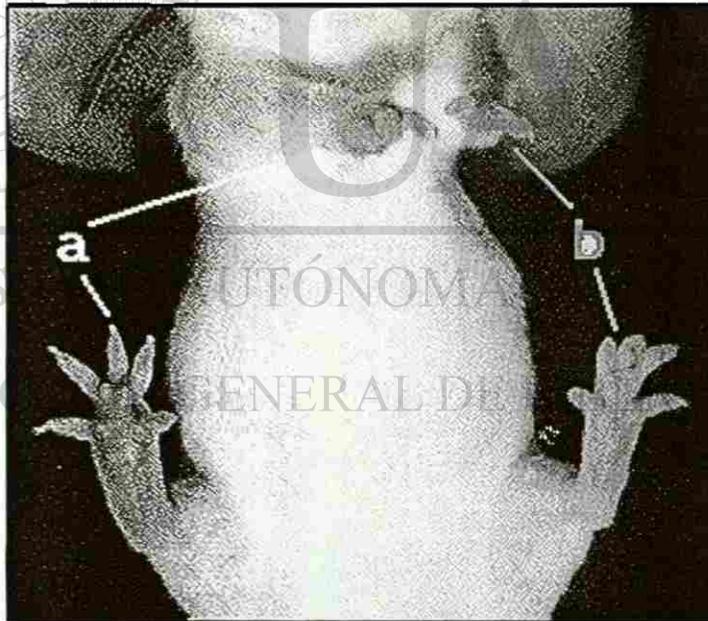


Figura # 12. Reacción de Inflamación en Ratones Balb/c Después de ser Retados con 25 µg de la Proteína Tripsinada en el Cojinete Plantar. Sensibilización con : 200µg de Proteína de GM-1 por la Base de la Cola. Lectura a las 3 horas después del reto : a = 25µg GM-1; = b Sol. Salina.



Figura # 13. Fotografía del Cojinete Plantar de un Ratón Balb/c Después de ser Sensibilizados con 200 μ g de la Proteína de GM-1. y Posteriormente Retados con 25 μ g de la Proteína Tripsinada Corte Histológico, 3 h. Después del Reto. Tinción con Hematoxilina y Eosina. Obsérvese la abundancia de células presentes en el tejido conectivo durante la inflamación aguda (Flechas). 250X de aumento.

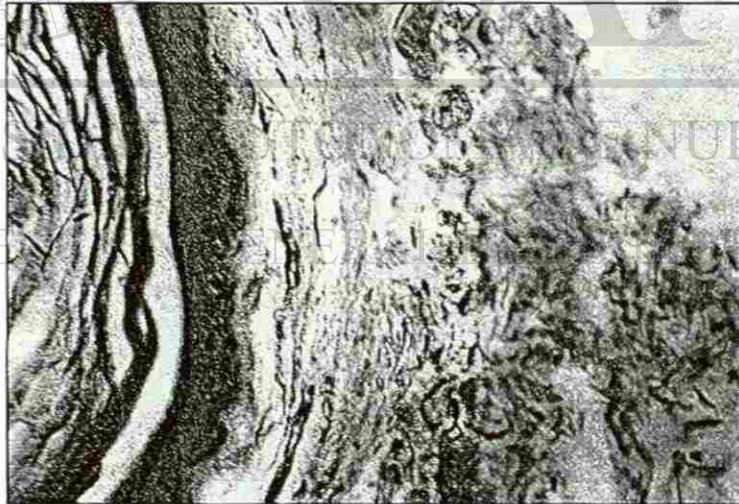


Figura # 14. Fotografía del Cojinete Plantar de un Ratón Balb/c Después de ser Sensibilizado con 200 μ g de la Proteína de GM-1 y Posteriormente Retados con 25 μ l de solución salina. (CONTROL NEGATIVO). Corte histológico, 3 h. Después del Reto. Tinción con Hematoxilina y Eosina. Obsérvese la ausencia de células inflamatorias presentes en el tejido conectivo. 400X de aumento

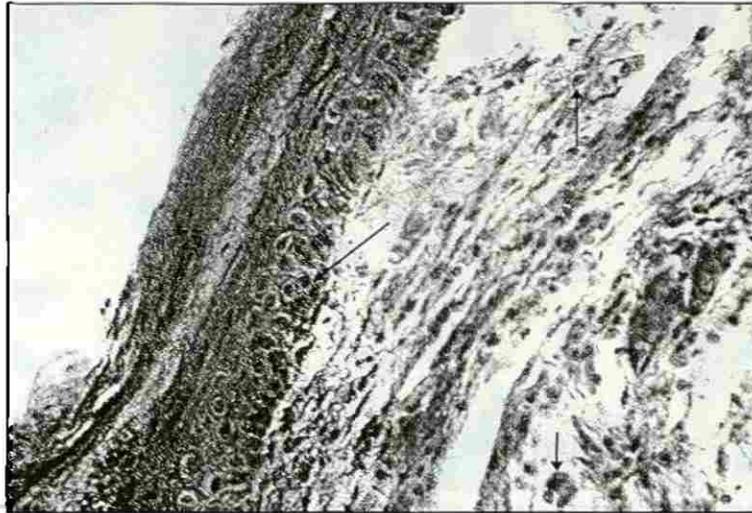


Figura # 15. Fotografía del Cojinete Plantar de un Ratón Balb/c Después de ser Sensibilizado con 200 μ g de la Proteína de GM-1 y Posteriormente *Retados* con 25 μ g de la Proteína *Tripsinada*. Corte histológico, 24 h. Después del Reto. Tinción con Hematoxilina y Eosina. Obsérvese la escasa presencia de células en el tejido conectivo con respecto a la fig #13 (*Flechas*). 400X de aumento.



Figura #16. Fotografía del Cojinete Plantar de un Ratón Balb/c Después de ser Sensibilizados con 200 μ g de la Proteína de GM-1 y Posteriormente *Retado* con 25 μ g de la Proteína *Tripsinada*. Corte histológico, 48 h. después del reto. Tinción con Hematoxilina y Eosina. Obsérvese la ausencia de células en el tejido conectivo. 400X de aumento

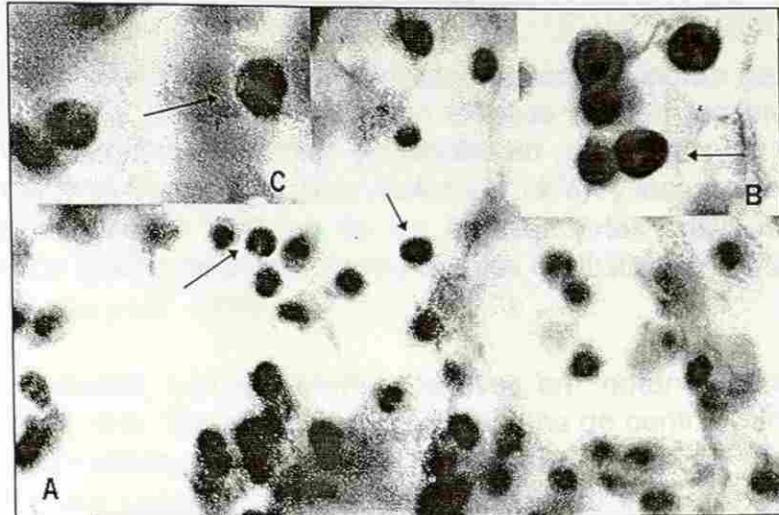
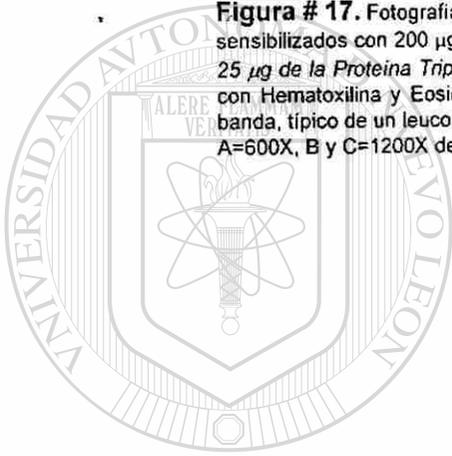


Figura # 17. Fotografía del Cojinete Plantar de un Ratón Balb/c Después de ser sensibilizados con 200 μ g de la Proteína de GM-1 y Posteriormente Retado con 25 μ g de la Proteína Tripsinada. Corte Histológico, 3 h. Después del Reto. Tinción con Hematoxilina y Eosina. Obsérvese la presencia de células con el núcleo en banda, típico de un leucocito polimorfonuclear (Neutrofilo) -*Flecha Azul*- A=600X, B y C=1200X de aumento



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

DISCUSIONES

Diferentes métodos de purificación de cristales y esporas de *B.t.* han sido reportados, dentro de los cuales destacan los que utilizan las propiedades de flotación y sedimentación de esporas y cristales en gradientes de centrifugación con sales inorgánicas (Fast, 1972; Ang y Nickerson., 1978) y los que se basan en los diferentes coeficientes de partición de las esporas y los cristales en sistemas acuosos bifásicos a base de polietilenglicol y sales de fosfato de potasio (Goodman y col., 1967 ; Guereca y col., 1994).

Ambos métodos, son igualmente efectivos en obtener cristales con una pureza superior al 95%. Sin embargo, con gradientes de centrifugación con NaBr, se obtiene un rendimiento de un 15% a un 20% de cristales puros (Ang y Nickerson., 1978), en cambio, en el presente trabajo se encontró, que el sistema bifásico a base de polietilenglicol tubo un rendimiento en la purificación de cristales de entre un 20% a un 35% de proteínas con respecto al complejo espora-cristal original. Este resultado, es semejante al 42% de rendimiento máximo reportado por Guereca y col. en 1994 para este mismo sistema bifásico a base de polietilenglicol. Además, el sistema bifásico presenta la ventaja de ser adaptado en el laboratorio para purificar grandes volúmenes de complejo espora cristal, en tiempos cortos, sin requerir de centrifugas con rotores especiales y de altos costos, como lo reportó Ang y Nickerson.

Los resultados obtenidos al caracterizar las proteínas que forman el cristal de GM-1, nos indican que las condiciones de solubilización, tales como el pH y tiempo, así como la digestión enzimática, determinaron el número y tamaño de las proteínas que se obtienen del cristal. La solubilización de los cristales de GM-1, con NaOH-Glicina a pH12, por 5 horas, no generó ninguna banda en los geles de poliacrilamida al 12% y 15%, este resultado difiere de lo encontrado por Bulla y col., en 1979, quienes determinaron una proteína de 68 kDa en los cristales de *B.t. kurstaki*, solubilizados bajo estas mismas condiciones. Sin embargo, la solubilización de los cristales de GM-1 en la misma solución, pero a pH10 por 3 horas, produjo un banda de 98 kDa de peso molecular relativo (Mr). Esta proteína difiere en tamaño de la protoxina de 130 kDa encontrada para la misma cepa de GM-1, la cual se obtiene cuando los cristales se solubilizan en una solución de tris SDS y β -mercaptoetanol a pH 10.0, calentados en baño maría a ebullición por 3 mín. Esta proteína de 130 kDa, conocida con el nombre de protoxina, corresponde en tamaño con la protoxina de 131 kDa reportada para *B.t. var. aizawai*, cepa IPL-7, referida por Hoffte y Witeley en 1989 (Tabla #2). Así mismo, estos autores reportan que la protoxina de *B.t. aizawai* presenta los genes que codifican para las proteínas CryIA(a) y CryIA(b), lo cual de acuerdo a nuestros resultados corresponde en parte a lo encontrado en las proteínas de GM-1, reconocidas por los anticuerpos CryIA(b) y CryIA(c). Esto nos indica que nuestra proteína (GM-1) comparte en el cristal con el serotipo aizawai, al cual pertenece serologicamente,

parte de su composición proteica. Para confirmar realmente si GM-1 presenta los genes cryIA(a), cryIA(b) o cryIA(c) y conocer en cual radica la actividad adyuvante, será necesario aislar los plásmidos que codifican para el cristal de GM-1 y confirmarlo mediante estudios de hibridación, clonación y expresión.

Cuando se determinó la capacidad adyuvante que tienen los cristales y las proteínas solubilizadas y tripsinadas de 98 y 62 kDa de *B.t.* respectivamente, en ratones Balb/c, encontramos que el incremento en el # de C.F.P. anti-E.C. ocurre en un rango que va del 60% al 140 % con respecto al control, con diferentes dosis de toxina que van del 0.1 a 2.5 mg/kg de peso del ratón. Estos resultados son semejantes a lo encontrado por Prasad y Shetna en 1975, quienes reportaron que los cristales de *B.t. var. thuringiensis* incrementan los niveles de anticuerpos hemaglutinantes y hemolíticos contra E.C. en ratas. De acuerdo con lo publicado por diversos autores, diferentes productos de origen bacteriano (toxinas, MDP, LPS, hps,) resultan ser potentes estimuladores de la respuesta inmune (Barrios y col., 1994; Bowen y col., 1994; Petrov y col., 1994; Kahn y col., 1994), lo que hace de estas sustancias, fuertes prospectos de adyuvantes para vacunas.

El incremento máximo en el # de placas líticas reportado en este trabajo ocurre cuando se aplican 2.5 mg/kg de proteína tripsinada al mismo tiempo que el antígeno, en cambio Prasad y Shetna (1975) lo reportaron con esta misma dosis, 24 h. después que el estímulo antigénico. Sin embargo, no encontramos efecto alguno al administrar la proteína tripsinada a esta dosis y en este tiempo, pero si se observó un incremento considerable con la proteína (graf. # 2, barra azul - soluble-), el cual es de 104% de incremento en el # de C.F.P., este efecto resultó superior al efecto observado con BSA. pero menor al que produjo el LPS que fue superior al 160%. Este resultado era de esperarse, ya que la cepa de ratón Balb/c es altamente respondedora a LPS, además, es conocido el efecto sobre la respuesta humoral y celular que presenta esta molécula, la cual ha sido reportada como un mitógeno de linfocitos B, que induce la producción de citoquinas tales como: interferón gama ($INF-\gamma$), factor de necrosis de tumor alfa ($TNF-\alpha$), factor estimulador de la colonia de granulocito-macrófago (GM-CSF), interleucina 1 alfa ($IL-1-\alpha$) e interleucina 6 ($IL-6$) (Lise y Audibert., 1989; Petrov y col., 1994), además, interleucina 4 ($IL-4$) y el factor de crecimiento transformante beta ($TGF-\beta$) (Siebenkotten y Radbruch, 1995).

Actualmente, es bien conocido el efecto que tienen ciertas citoquinas para inducir el cambio ("Switch") de isotipo de inmunoglobulina por un linfocito B $mIgM^+$. Para antígenos timo dependientes, 3 lífcinas secretadas por linfocitos T de ratón son primordiales en inducir el cambio de clase de inmunoglobulina *in vitro*: $INF-\gamma$, producida por lífcitos T_H1 , induce el cambio a los isotipos $IgG2a$ e $IgG3$; $IL-4$ producida por linfocitos T_H2 , induce el cambio a $IgG1$ e IgE y el $TGF-\beta$ induce el cambio a $IgG2b$ e IgA (Snazper y Mond, 1993). En el presente trabajo, se encontró que las proteínas digeridas con tripsina, producen en una respuesta primaria de

anticuerpos *in vivo*, un incremento significativo de anticuerpos específicos de E.C. en los isotipos IgG1, IgG2a, , IgG3 y en menor proporción IgG2b e IgA, pero no los de IgM. Estos resultados nos hacen suponer que esta proteína pudieran estimular simultáneamente poblaciones de linfocitos T_H1 y T_H2 . A este respecto, los procesos de control de la respuesta inmune indican que una respuesta T_H1 inhibe la respuesta T_H2 y viceversa (Moll, 1993), por lo que, la respuesta observada con GM-1 en el cambio e incremento de isotipo de Ig's no correspondería a una respuesta regulada por este mecanismo, ya la proteína tripsinada de GM-1 incrementa todos los isotipos de IgG's e IgA. Sin embargo, otras células no linfoides producen también éstas citoquinas (Snapper y Mond, 1993) y otros productos de la activación de linfocitos T, tales como la IL-10 (Oward y O Garra, 1992), IL-12 (Trinchieri y Scott, 1994) e IL-13 (Zurawski y de Vries, 1994) también determinan el cambio de Ig's y pudiera este ser un mecanismo que explique el incremento en los isotipos de IgG's e IgA por la proteína de GM-1, o bien que la proteína tuviera un efecto de manera directa o indirecta en una activación policlonal de los linfocitos B. Finalmente, este resultado obtenido en una respuesta primaria de anticuerpos, resulta interesante y nos permite plantearnos la necesidad de estudiar mas cuidadosamente el efecto que tiene esta proteína en inducir el cambio de isotipo de anticuerpos en la respuesta de linfocitos B.

Por otro lado, una reacción de hipersensibilidad retardada involucra una respuesta inmune mediada por células y se caracteriza por que se presenta en un periodo de tiempo que sobrepasa las 12 h., con la presencia de eritema, induración y algunas veces edema y eczema, en donde la principales células en el sitio donde se encuentra el antígeno son linfocitos, monocitos y macrófagos (Roitt y col., 1993). En el presente trabajo se encontró, que las proteínas digeridas con tripsina provocan una reacción de inflamación (hipersensibilidad) que tiene su máxima respuesta a las 3 h., independientemente de la dosis de antígeno utilizada en la sensibilización de los ratones. Se observó, que la respuesta inflamatoria es mediada principalmente por el arribo de leucocitos polimorfonucleares al sitio del antígeno y no persiste a las 24 o 48 h. después. Este resultado nos demuestra que esta proteína por si sola no ejerce un efecto de hipersensibilidad retardada, fenómeno que está mediado por linfocitos T_H1 (Romagnani, 1992), pero no se descarta la posibilidad de que linfocitos T_H1 activados por la proteína de GM-1, sean los responsables de provocar la migración de los polimorfonucleares al sitio de la inflamación.

CONCLUSIONES

- 1.- Con el sistema acuoso bifásico se obtuvo el mejor rendimiento, de hasta un 35% en la purificación de los cristales de GM-1.
- 2.- Los cristales de GM-1 están formados, aparentemente por una proteína única (protoxina) de 130 kDa de peso molecular relativo (Mr).
- 3.- La digestión enzimática con papaína y tripsina de la protoxina y la proteína solubilizada a pH10, genera una toxina con un Mr. de 62 kDa.
- 4.- Las proteínas del cristal de GM-1, son reconocidas por los anticuerpos CryIA(a) y la CryIA(b), pero no por los anticuerpos CryIIIA, CryIIIC y α -Otp.
- 5.- El mejor efecto adyuvante encontrado, fue de 143% en el # de C.F.P. anti-E.C., con respecto al control cuando se inocularon por vía I.P., 2.5 mg/kg de la proteína digerida con tripsina al mismo tiempo que el antígeno.
- 6.- Se incrementaron notablemente los anticuerpos específicos para el antígeno, de las subclases IgG1, IgG2a e IgG3 y en menor proporción IgG2b e IgA.
- 7.- Las proteínas del cristal digeridas con tripsina inducen una reacción de hipersensibilidad que tiene su máxima respuesta a las 3 h. y está mediada por leucocitos polimorfonucleares.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



PERSPECTIVAS

El presente trabajo cumple con los objetivos propuestos y confirma la hipótesis planteada, de que los cristales, pero más notablemente las proteínas del cristal de B.t. GM-1 son capaces de incrementar la respuesta de anticuerpos a un antígeno, en este caso E.C.. Esto pudiera significar el uso potencial de estas proteínas en el desarrollo de vacunas, al incrementar la respuesta a antígenos de poca inmunogenicidad. Sin embargo, para cualquier tipo de aplicación biotecnológica en este aspecto, se requiere más información del efecto que ejercen las proteínas sobre el sistema inmune por lo que se proponen las siguientes perspectivas :

1. Establecer el efecto adyuvante de las proteínas de GM-1 sobre otros antígenos timodependientes de baja inmunogenicidad diferentes a los E.C.
2. Analizar el papel de los liposomas o Iscom como "vehículos de transporte" de las proteínas de GM-1.
3. Determinar la función de los linfocitos T_H en el reclutamiento de leucocitos polimorfonucleares en las reacciones de hipersensibilidad.
4. Establecer el patrón de citoquinas T_H1 y T_H2 en los tejidos donde se inocula el antígeno, así como en sangre periférica, como posibles mecanismos de estimulación de la inmunidad humoral y celular.
5. Realizar estudios de dosis/respuesta con las proteínas del cristal de GM-1, para determinar probables efectos citotóxicos, tanto in vitro como in vivo.
6. Determinar si las proteínas de GM-1 combinadas con un antígeno de la línea celular tumoral L-5178Y en un sistema acarreador de liposomas, ejercen algún efecto que se manifieste por regresión del tumor o incremento en el tiempo de vida, en un modelo experimental con ratones Balb/c.
7. Aislar los plásmidos y clonar los genes que codifican para las proteínas del cristal de GM-1, y establecer la actividad adyuvante en la proteína recombinante.

LITERATURA CONSULTADA

Aggarwal, B y M.C. Rodriguez-Padilla. 1996. Nouvel antiproliferative Protein from *B. thuringiensis* var. *th.* D5789. Patente # WO 9638477.

Allison, A.C. y G. Gregoriadis. 1974. Liposome as Immunological adjuvants. *Nature*. **233**: 330.

Allison, A.C. y N.E. Byars. 1991. Immunological adjuvant: Desirable properties and side-effects. *Mol. Immunol.* **28**: 274-284.

Allison, A.C. y N.E. Byars. 1990. Adjuvant formulations and their mode of action. *Seminars in Immunology*. **2**: 369-374.

Allison, A.C. y N.E. Byars. 1991. Immunological adjuvant: Desirable properties and side-effects. *Mol. Immunol.* **28**: 274-284.

Ang, B.J. y K.W. Nickerson. 1978. Purification of the protein crystal from *Bacillus thuringiensis* by zonal gradient centrifugation. *Appl. and Environment. Microbiol.* **36**: 625-626.

Arevalo-Niño, K. y L.J. Galán-Wong. 1994. Uso de un método sencillo para la detección de *b*-exotoxina en cepas de *Bacillus thuringiensis*. *Southwestern Entomologist*. **19**: 385-391.

Arnon, R y R.J. Horwitz. 1992. Synthetic peptides as vaccines. *Current Opinion in Immunology*. **4**: 449-453.

Aronson A.I., W. Beckman y P. Dune. 1986. *Bacillus thuringiensis* and related insect pathogens. *Microbiol. Rev.* **50**: 1-24.

Aronson, A. 1995. The protoxin composition of *Bacillus thuringiensis* insecticidal inclusions affects solubility and toxicity. *Appl. Environment. Microbiol.* **61**: 4057-4060.

Bach, J.F.. 1984. *Inmunología*. Ed. Limusa, S.A. México 1 D.F. pp. 851-859.

Barrios, C., C. Tougne, B.S. Polla, P.H. Lambert, y G. del Giudice. 1994. Specificity of antibodies induced after immunization of mice with the mycobacterial heat shock protein of 65 kd. *Clin. Exp. Immunol.* **98**: 224-228.

Belfiore, C.J., R.K. Vadlamudi, Y.A. Osman y L.A. Bulla, Jr. 1994. A specific binding protein from *Tenebrio molitor* for the insecticidal toxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *tenebrionis*. *Biochem. Biophys. Reserch. Commun.* **200**: 359-364.

Belfiore, C.J., R.K. Vadlamudi, Y.A. Osman y L.A. Bulla. 1994. A specific binding protein from *Tenebrio molitor* for the insecticidal toxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *tenebrionis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **200**: 359-364.

Bietlot, H., P.R. Carey, C. Choma, H. Kaplan, T. Lessard y M. Pozsgay. 1989. Facile preparation and characterization of the toxin from *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*. *Biochem. J.* **260**: 87-91.

Bomford, R. 1984. Relative adjuvant efficacy of $Al(OH)_3$ and saponin is related to the immunogenicity of the antigen. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* **75**: 280-281

Bone, L.W., K.P. Bottjer y S.G. Gill. 1985. *Trichostrongylus colubriformis*: eggs lethality due to *Bacillus thuringiensis* crystal toxin. *Experimental Parasitology.* **60**: 314-322.

Bone, L.W., K.P. Bottjer y S.G. Gill. 1986. *Trichostrongylus colubriformis*: isolation and characterization of ovicidal activity from *Bacillus thuringiensis israelensis*. *Experimental Parasitology.* **62**: 247-253.

Bone, L.W., y K.P. Bottjer. 1988. Factors affecting the larvicidal activity of *Bacillus thuringiensis israelensis* toxin for *Trichostrongylus colubriformis* (Nematoda). *J. of Invertebr. Pathol.* **52**: 102-107.

Bottjer, K.P., L.W. Bone y S.G. Gill. 1985. Nematoda. Susceptibility of the eggs to *Bacillus thuringiensis* toxins. *Experimental Parasitology.* **60**: 239-244.

Bottjer, K.P. y L.W. Bone. 1987. Changes in morphology of *Trichostrongylus colubriformis* eggs and juveniles caused by *Bacillus thuringiensis israelensis*. *J of Nematology.* **19**: 282-286.

Bowen, J.C., S.K. Nair, R. Reddy y B.T. Rouse. 1994. Cholera toxin acts as potent adjuvant for the induction of cytotoxic T-lymphocyte responses with non-replicating antigens. *Immunology.* **81**: 338-342.

Bulla, Jr., L.A., L.I. Davidson, K.J. Kramer y B.L. Jones. 1979. Purification of the insecticidal toxin from the parasporal crystal of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*. *Biochem. Biophys. Reserch. Commun.* **91**: 1123-1130.

Convents, D., M. Cherlet, J. Van Damme, I. Lasters y M. Lauwereys. 1991. Two structural domains as a general fold of the toxic fragment of the *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins. *Eur. J. Biochem.* **195**: 631-635.

Cowles, E.A. y Yunovitz, J.F. (1995), Compararison of toxin overlay and solid-phase binding assays to identify diverse CryIA(c) toxin-binding proteins in *Heliothis virescens* midgut. *Appl. Environment. Microbiol.* **61**: 2738-2744.

Crickmore, N. 1996. *Bacillus* genetic Stock Center. Departament of Biochemistry. The Ohio State Univ., <http://epunix.biols.susx.ac.uk/HOME/NEIL-Crickmore/B.t./index.html>.

Cunninham, A.J. y Szenberg, A. 1968. Futher improvements in the plaque technique for detecting single antibody forming cells. *Immunology*: **54**: 599-600.

Chiller, J.M., B.J.Skidmore, D.C.Morrison y W.O.Weigle. 1973. Relationship of the structure of bacterial lipopolysaccharides to its functions in mitogenesis and adyuvanticity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **70**: 2129-2135.

Choma, C.T., W.K. Surewicz, P.R. Carey, M. Pozsgay, T. Raynor y H. Kaplan. 1990. Unusual proteolysis of protoxin and toxin from *Bacillus thuringiensis*. structural implications. *Eur. J. Biochem.* **189**: 523-527.

Davenport, M., H. Albert y B.A. Frederic. 1968. Lack of adyuvant effect of $AlPO_4$ on purified influenza virus hemagglutinins in man. *J. of Immunol.* **100**: 1139-1140.

De Barjac, H & A. Bonnefoi. 1962. Essai de classification biochemique et serologique de 24 souches de *Bacillus thuringiensis* du type *B. thuringiensis*. *Entomophaga*, VII: 5-30.

De Barjac, H.. 1978. Une nouvelle variètè de *Bacillus thuringiensis* très toxique pour les moustique: *B. thuringiensis* var. *Israelensis* setotype 14. *C.D.Acad. Sci. Ser. D.* **286**: 797-800.

De Barjac, H. y E. Frachon. 1990. Classification of *Bacillus thuringiensis* strains. *Entomophaga*. **35**: 233-240.

De Lucca, A.J. 1984. Lectin grouping of *Bacillus thuringiensis* serovars. *Can. J. Microbiol.* **30**: 1100-1104.

Delafield, F.P., H.J. Sommerville y S.C. Rittenberg. 1968. immunological homology between crystal and spore protein of *Bacillus thuringiensis*. *J. of Bacteriol.* **96**: 713-720.

Denolof, P. S. Jansens, M. Peferoen, D. Degheele y J. Van Rie. 1993. Two different *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin receptors in the midgut brush border membrane of the european corn borer, *Ostrinia nubilalis* (Hübner) (Lepidoptera: Pyralidae). *Appl. Environment. Microbiol.* **59**: 1828-1837.

Drummond, J., D.K. Miller y D.E. Pinnock. 1992. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* against *Damalinea ovis* (Phthiraptera: Mallophaga). *J. of Invertebr. pathol.* **60**: 102-103.

Dulmage, H.T. y K.Aizawai. 1982. Distribution of *Bacillus thuringiensis* in nature. In : *Microbiol. and Viral Pesticides*, E. Kurstak (ed.); Marcel Dekker. New York, N.Y. pp. 209-237

Edelman, R. 1980. Vaccine adjuvant. *Rev. Infect. Dis.* **2**: 370-380.

Ellouz, F., A. Adam, R. Ciobaru y E. Lederer. 1974. minimal structure requirements for adjuvant activity of bacterial peptidoglycan derivatives. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **59**: 1317-1325.

Estrada, U. y J. Ferre. 1994. Binding of insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis* to the midgut brush border of the cabbage looper, *Trichoplusia ni* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae), and selection for resistance to one of the crystal proteins. *Appl. Environment. Microbiol.* **60**: 3840-3846.

Feitelson J.S., J. Payne y L. Kim. 1992. *Bacillus thuringiensis*: Insects and beyond. *Bio/Technology.* **10**: 271-275.

Fox, J.L. 1995. News & Commentary. EPA okays Bt corn; USDA eases plant testing. *Biotechnology.* **13**: 1035-1036.

Lorence-Quiñones, A y R. Quintero-Ramirez. 1996. Mecanismo Molecular de Acción de las δ -Endotoxinas de *Bacillus thuringiensis*. Avances recientes en la biotecnología de *Bacillus thuringiensis*. Editores : Galán-Wong, L.J., C. Rodriguez Padilla y H.A. Luna-Olvera, Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, México. Primera Ed. pp. 63-113.

Galán-Wong, L.J., C. Rodriguez-Padilla, R.S. Tamez-Guerra, M. Gómez-Treviño y H.T. Dulmage. GM-2 a new subspecies of *Bacillus thuringiensis* (n. subsp. *coahuilensis*) with an unusual form of parasporal inclusion body. *Publ. Biol.,-FCB, UANL.* **4**: 53-58.

Gazit, E. y Y. Shai. 1993. Structural and functional characterization of the $\alpha 5$ segment of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin. *Biochemistry.* **32**: 3429-3436.

Gazit, E. y Y. Shai. 1995. The assembly and organization of the $\alpha 5$ and $\alpha 7$ helices from the pore-forming domain of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin. *J. of Biol. Chem.* **270**: 2571-2578.

Ge, A.Z., D. Rivers, R. Milne y D.H. Dean. 1991. Functional domains of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins. Refinement of *Heliothis virescens* and *Trichoplusia ni* specificity domains on CryIA(c). *J. of Biological Chemistry.* **266**: 17954-17958.

Gery, I., J.Kruger y S.Spisel. 1972. Stimulation of B lymphocytes by endotoxin reaction of thymus deprived mice and karyotype analysis of dividing cells in mice bearing T6T6 thymus grafts. *J. of Immunol.* **108**: 1088-1091.

Gill, S.S., E.A. Cowles y V. Francis. 1995. Identification, isolation and cloning of a *Bacillus thuringiensis* CryIAC toxin-binding protein from the midgut of the Lepidopteran insect *Heliothis virescens*. *J. of Biol. Chem.* **270**: 27277-27282.

Glenny, A.T., C.G.Pope, H.Weddintong y U.Wallace. 1926. The antigenic value of toxoid precipitated by potassium alum. *J. of Pathol. Bacteriol.* **29**: 38-46.

Gomez-Flores, R., C. Rodriguez-Padilla, R. T. Mehta, L. Galán-Wong, E. Mendoza-Gamboa, and R. Tamez-Guerra. 1997. Nitric Oxide and TNF- α Production by Murine Peritoneal Macrophages Activated with a Novel 20 kDa Protein Isolated from *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* Parasporal Bodies. *The J. of Immunology*, **158**: 3796-3799.

Goodman, L.E. y G. Alderton. 1961. Behavior of bacterial spores in aqueous polymer two-phase systems. *J. of Bacteriol.* **82**: 331-341.

Goodman, N.S., R.J. Gottfried y M.H. Rogoff. 1967. Biphasic system for separation of spores and crystals of *Bacillus thuringiensis*. *J. of Bacteriol.* **94**: 485-492.

Gregoriadis, G. 1976. The carrier potential of liposomes in biology and medicine. *N. Engl. J. of Med.* **295**: 704-710.

Gregoriadis, G. 1985. Liposomes for drugs and vaccines. *Trends in Biotechnology.* **3**: 235-241.

Gregoriadis, G. 1990. Immunological adjuvants: a role for liposomes. *immunology Today.* **11**: 89-97.

Grochulski, P., L. Masson, S. Borisova, M. Pusztai-Carey, J.L. Schwartz, R. Brousseau y M. Cygler. 1995. *Bacillus thuringiensis* CryIA(a) insecticidal toxin: Crystal structure and channel formation. *J. Mol. Biol.* **254**: 447-464.

Güereca, L., A. Bravo & R. Quintero. 1994. Design of an aqueous two-phase system for the purification of ICP from *Bacillus thuringiensis*. *Process Biochemistry*. **29**: 181-185.

Heath, T.D., D.C. Edwards y B.E. Ryman. 1976. The adjuvant properties of liposomes. *Biochem. Biophys. Acta*. **457**: 259-264.

Hebert, W.J. 1968. The mode of action of mineral-oil emulsion adjuvants on antibody production in mice. *Immunology*. **14**: 301-318.

Herrnstadt, G., G.G. Soares, E.R. Wilcox y D.L. Edwards. 1986. A new strain of *Bacillus thuringiensis* with activity against coleopteran insects. *Biotechnology*. **4**: 305-308.

Himeno, M. 1987. Mechanism of action of δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis*. *J. of Toxicol. Toxin. Reviews* **6**: 45-71

Hodgman, T.C., Y. Ziniu, S. Ming, T. Sawyer, C.M. Nicholls, y D.J. Ellar. 1993. Characterization of *Bacillus thuringiensis* strain which is toxic to the housefly *Musca domestica*. *FEMS Microbiology Letters*. **114**: 17-22.

Hoffmann, C., H. Vanderbruggen, H. Höfte, J. Van Rie, S. Jansens, y H.V. Mellaert. 1988. Specificity of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin is correlated with the presence of high-affinity binding sites in the brush border membrane of target insect midguts. *Proc. Natl. Acad. Sci. Usa*. **85**: 7844-7848.

Höfte, H. y H.R. Whiteley. 1989. Insecticidal crystal protein of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiological Reviews*. **53**: 242-255.

Höfte, H., J. Van Rie, S. Jansens, A.V. Houtven, H. Vanderbruggen y M. Vaeck. 1988. Monoclonal antibody analysis and insecticidal spectrum of three types of Lepidopteran-specific insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Environment. Microbiol.* **54**: 2010-2017.

Howard, M. y A. O'Garra. 1992. Biological properties of interleukin 10. *Immunol. Today*. **13**: 198-200.

Jaquet, F., R. Hütter y P. Lüthy. 1987. Specificity of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin. *Appl. Environment. Microbiol.* **53**: 500-504.

Jerne, N.K. y A.A. Nordin. 1963. Plaque formation in agar by single antibody producing cells. *Science*. **140**: 405-407.

Johnson, A.G., S. Gaines y M. Landy. 1956. Studies on the O antigen of *Salmonella typhosa* V. Enhancement of the antibody response to protein antigens by the purified lipopolysaccharide. *J. Exp. Med.* **103**: 225-231.

Juarez-Perez, V.M., P. Jaquemard y R. Frutos. 1994. Characterization of the type strain of *Bacillus thuringiensis* subsp. *cameroun* serotype H32. *FEMS Microbiology Letters.* **122**: 43-48.

Kahn, J.O., F. Sinangil, J. Baenziger, N. Mucar, D. Wynne, R.L. Coleman K.S. Steimer, C.L. Dekker y D. Chernoff. 1994. Clinical and immunological responses to human immunodeficiency virus (HIV) type 1SF2 gp120 subunit vaccine combined with MF59 adjuvant with or without muramyl tripeptide dipalmitoyl phosphatidylethanolamine in non-HIV-infected human. *J. Infect. Dis.* **170**: 1288-1291.

Kenney, J.S., B.W. Huges, M.P. Masada y A.C. Allison. 1989. Influence of adjuvants on the quantity, affinity, isotype and epitope specificity of murine antibodies. *J. of Immunol. Methods.* **121**: 157-166.

Knight, P.J.K., N. Crickmore y D.J. Ellar. 1994. The receptor for *Bacillus thuringiensis* CryIA(c) delta-endotoxin in the brush border membrane of the lepidopteran *Manduca sexta* is aminopeptidase N. *Mol. Microbio.* **11**: 429-436.

Knight, P.J.K., B.H. Knowles y D.J. Ellar. 1995. Molecular cloning of an insect aminopeptidase N that serves as a receptor for *Bacillus thuringiensis* CryIA(c) toxin. *J. of Biol. Chem.* **270**: 17765-17770.

Knowles, B.H., M.R. Blatt, M. Tester, J.M. Horsnell, J. Carrol, G. Menestrina y D.J. Ellar. 1989. A cytolytic δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* forms cation-selective channels in planar lipids bilayers. *Febs Letters.* **244**: 259-262.

Knowles, B.H., W.E. Thomas y D.J. Ellar. 1984. Lectin-like binding of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* lepidopteran-specific toxin is an initial step in insecticidal action. *Febs Letters.* **168**: 197-202.

Kramp, W.J., H.R. Six y J.A. Kasel. 1982. Post-immunization clearance of liposome-entrapped adenovirus type 5 hexon. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **169**: 135-139.

Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **227**: 680-685.

Lambert, B. y M. Peferoen. 1992. Insecticidal promise of *Bacillus thuringiensis*. Facts and mysteries about a successful biopesticide. *BioScience.* **42**: 112-122.

Lecadet, M.M. 1994. Collection of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus sphaericus*. (Classified by H serotypes). Inter. Entomopath. Bacillus Centr. Cat. N°1. Institut Pasteur, Paris, France.

Lee, H.H., J.A. Lee, K.Y. Lee, J.D. Chung, H. de Barjac, J.F. Charles, V.C. Dumanoir y E. Frachon. 1994. New serovars of *Bacillus thuringiensis*. *B. thuringiensis* ser. *coranensis* (serotype H25), *B. thuringiensis* ser. *leesis* (serotype H33), and *B. thuringiensis* ser. *konkukian* (ser H34). J. of Invertebr. Pathol. **63**: 217-219.

Lee, M.K., R.E. Milne, A.Z. Ge, y D.H. Dean. 1992. Location of a *Bombyx mori* receptor binding region on a *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin. J. Biol. Chem. **267**: 3115-3121.

Lereclus, D., M.M. Lecadet, J. Ribier y R. Dedonder. 1982. Molecular relationships among plasmids of *Bacillus thuringiensis*: conserved sequences through 11 crystalliferous strains. Mol. Gen. Genet. **186**: 391-398.

Li, J., J. Carroll y D.J. Ellar. 1991. Crystal structure of insecticidal δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5 Å resolution. Nature. **353**: 815-821.

Lilley, M., R.N. Ruffell y H.J. Somerville. 1980. Purification of the insecticidal toxin in crystals of *Bacillus thuringiensis*. J. of General. Microbiol. **118**: 1-11.

Lise, L.D. y F. Audibert. 1989. Immunoadyuvants and analogs of immunomodulatory bacterial structures. Curr. Opin. Immunol. **2**: 269-274.

Lomedico, P.T., U. Gluber, C.P. Hellmann, M. Dukovich, T.G. Giri, Y.E. Pan, K. Collier, R. Semionov, A.B. Chua y S.B. Mizel. 1984. Cloning and expression of murine interleukin-1 cDNA in *Escherichia coli*. Nature. **312**: 458-462.

Lorence-Quñones, A. y R. Quintero-Ramirez. 1996. Mecanismo molecular de acción de las δ -endotoxinas de *Bacillus thuringiensis*. Avances Recientes en la Biotecnología de *Bacillus thuringiensis*. Editores : L.J. Galán-Wong, C. Rodríguez-Padilla, H.A. Luna-Olvera, Universidad Autónoma de Nuevo León. 1a Ed., México

Lovgren, K. y B. Morein. 1991. The iscom: an antigen delivery system with built-in adjuvant. Molec. Immunol. **28**: 285-286.

Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr y R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. **193**: 265-275.

Male, D., B. Champion y A. Cooke. 1987. Advanced immunology. J.B. Lippincott Company Philadelphia. GMP.. London, N.Y.

Manabe, H., U. Utsami, T. Kusama y A. Hamada 1989. The immunopotentiating property of lipophilic muramyl dipeptide and its molecular state in liposomal membranes: plaque-forming cell responses and ESR studies. *T. Biochem.* **105**: 861-863.

Martinez-Ramirez, A.C., S. Gonzalez-Nebauer, B. Escriche y M.D. Real. 1994. Ligand blot identification of *Manduca sexta* midgut binding protein specific to three *Bacillus thuringiensis* CryIA-type ICPs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **201**: 782-787.

Mathavan S., P.M. Sudha y S.M. Pechimuthu. 1989. Effect of *Bacillus thuringiensis israelensis* on the midgut cells of *Bombyx mori* larvae: a histopathological and histochemical study. *J. Invertebr. Pathol.* **53**: 217-227.

McGuire, M. R., L.J. Galan-Wong y P. Tamez-Guerra. 1997. Bacteria: Bioassay of *Bacillus thuringiensis* against lepidopteran larvae. *Manual of techniques in Insect Pathology*. Edited by L.A.Lacey. Academic Press Limited. **III-3**:91-99.

McLaughlin, C.A., S.M. Schwartzman, B.L. Horner, G.H. Jones, J.G. Mofatt, J.J. Nestor y D.Tegg. 1980. Regression of tumors in guinea pigs after treatment with synthetic muramyl dipeptides and threulose dimicolate. *Science.* **208**: 415-416.

Milne, R y H. Kaplan, 1993. Purification a characterization of a trypsin-like digestive enzyme from spruce budworm (*Choristoneura fumiferana*) responsible for the activation of delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis*. *Insect. Biochem. Mol. Biol.* **23**: 663-673.

Moll, H. 1993. Development of helper T cell subsets : a central role for interleukin 12. *Trends in Microbiol.* **1**: 209-210.

Morein, B., K.L. Vgren, S.H. glund y B. Sundquist. 1987. Iscom an immunostimulating complex. *Immunology Today.* **8**: 333-338.

Murray, R., P. Cohen y M.C. Hardegee. 1972. Mineral oil adjuvants: biological and chemical studies. *Ann. Allergy.* **30**: 146-149.

Murty, M.G., G. Srinivas, R.S. Bora y V. Sekar. 1994. A simple method for separation of the protein crystals from *Bacillus thuringiensis* using carboxymethyl cellulose column chromatography. *J. of Microbiol, Methods.* **19**: 103-110.

Nagamatsu, Y., Y. Ital, C. Hatanaka, G. Funatsu y K. Hayashi. 1984. A toxic fragment from entomocidal cristal protein of *Bacillus thuringiensis*. *Agric. Biol. Chem.* **48**: 611-619.

Norris, J.R. y H.D. Burges. 1965. The identification of *Bacillus thuringiensis*. *Entomophaga*. **10**: 41-47.

Nunberg, J.H., M.V. Doyle, S.M. York y C.J. York. 1989. Interleukin-2 acts as an adjuvant to increase the potency of inactivated rabies virus vaccine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **86**: 4240-4245.

Oddou, P., H. Hartmann y M. Geiser. 1991. Identification and characterization of *Heliothis virescens* midgut membrane proteins binding *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins. *Eur. J. Biochem.* **202**: 673-680.

Ogunuki, H., S. Hashizume y H. Abe. 1966. Histopathological tests of tissues in the sites of local reactions caused by the injection of oil adjuvant cholera vaccine. *Symp. Ser. Immunobiol. Stand.* **6**: 125-129.

Ohba, M. y K. Aizawai. 1989. New flagellar (H) antigenic subfactors in *Bacillus thuringiensis* H serotype 3 with description of two new subspecies, *Bacillus thuringiensis* subsp. *sumiyoshiensis* (H serotype 3a:3d) and *Bacillus thuringiensis* subsp. *fukuokaensis* (H serotype 3a:3d:3e). *J. of Invertebr. Pathol.* **54**: 208-212.

Ohba, Y.M. y K. Aizawai. 1988. Occurrence of non-insecticidal *Bacillus thuringiensis* flagellar serotype in the soil of Japan. *System. Appl. Microbiol.* **11**: 85-89.

Ohta, M., I. Nakashima and N. Kato. 1982. Adjuvant action of bacterial lipopolysaccharide in induction of delayed-type hypersensitivity to protein antigens II. Relationship of intensity of the action to that of other immunological activities. *Immunobiology*. **163**: 460-464.

Orduz, S., W. Rojas, M.M. Correa, A.E. Montoya y H. de Barjac. 1992. A new serotype of *Bacillus thuringiensis* from Colombia toxic to mosquito larvae. *J. of Invertebr. Pathol.* **59**: 99-103.

Osterhaus, A., K. Weijer, F. Uytendaele, O. Jarrett, B. Sundquist y B. Morein. 1985. Induction of protective immune response in cats by vaccination with feline leukemia virus iscom. *J. of Immunol.* **135**: 591-596.

Pendleton, I.R. y R.B. Morrison. 1966. Separation of the spores and crystal of *Bacillus thuringiensis*. *Nature*. November **12**: 728-729.

Petrov, A.V., V.M. Kolenko, N.V. Koshkina, M.M. Zakirov, L.V. Bugaev, I.B. Semenova, E.J. Wiertz y J.T. Poolman. 1994. Non-specific modulation of the immune response with liposomal meningococcal lipopolysaccharide: role of different cells and cytokines. *Vaccine*. **12**: 1064-1070.

Prasad, S.S.S.V. y Y.I.Shethna. 1975. Enhancement of immune reponse by the proteinaceous crystal of *Bacillus thuringiensis* var *thuringiensis*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **62**: 517-523.

Prasad, S.S.S.V. y Y.I.Shethna. 1974. Purification, crystallization and partial characterization of the antitumour and insecticidal protein subunit from the δ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis* var *thuringiensis*. *Biochem. Biophys. Acta.* **363**: 558-566.

Prasad, S.S.S.V. y Y.I.Shethna. 1976. Biochemistry and biological activities of the proteinaceous crystal of *Bacillus thuringiensis*. *Biochemical Reviews.* **47**: 70-76.

Prasad, S.S.S.V. y Y.I.Shethna. 1976. Mode of action of a purified protein from the proteinaceous crystal of *Bacillus thuringiensis* subsp. *thuringiensis* on Yoshida Ascites Sarcoma cells. *Antimicrob. Agents and Chemoth.* **10**: 293-298

Prince R.C. 1990. At least one *Bacillus thuringiensis* toxin forms ion-selective pores in membranes. *Tibs.* **15**: 2-3.

Rahman, S.M.J., M.Y.Pu, H.Yi, K.Ohkuzu, M.Kato, K.I.Isobe, R.Taguchi, H.Ikesawa y I. Nakashima. 1995. Promotion of cytotoxic T-cell generation in mixed leucocyte culture by phosphatidylinositol-specific phospholipase C from *Bacillus thuringiensis*. *Infection and Immunity.* **63**: 259-263.

Rao, C.D. y Y.I. Shethna. 1980. A simple technique for purification of the parasporal crystal (δ -endotoxin) of *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis*. *J. Indian Inst. Sci.* **62**: 1-11.

Ribi, E., J.L.Cantrell, K.Takamaya, N.Qureshi, J.Peterson y H.O.Ribi. 1984. Lipid A and Immunotherapy. *Rev. Infect. Dis.* **6**: 567-578.

Richards, R.L., M.D.Hayre, W.T.Hockmeyer y C.R.Alving. 1988. Liposomes, Lipid A and Aluminum Hydroxide enhance the immune response to a synthetic malaria sporozoite antigen. *Infect. Immun.* **56**: 682-686.

Rodriguez-Padilla, C., L. Galan-Wong, H. de Barjac, E. Roman-Calderon, R. Tamez-Guerra y H. Dulmage. 1989. *Bacillus thuringiensis* subsp. *neoleonensis* serotype H-24, a new subspecies which produces a triangular crystal. *J. of Invertebr. Pathol.* **56**: 280-282.

Rodriguez-Padilla, C. 1996. Una nueva proteína de *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* con actividad citotóxica contra células tumorales humanas. Tesis Doctoral. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, I.P.N.

Rodríguez-Padilla, C., E. Román-Calderón y R.S. Tamez-Guerra. 1996. Clasificación de *Bacillus thuringiensis*. Avances Recientes en la Biotecnología de *Bacillus thuringiensis*. Editores: L.J. Galán-Wong, C. Rodríguez-Padilla, H.A. Luna-Olvera, ed. Grafo Print, S.A., 1a Ed., México. pp. 51-61.

Roitt, I., J. Brostoff y D. Male. 1993 *Immunology*. 3a. Ed. Mosby-Year Book Europe Ltd., London, England. pp : 22.1-22.11.

Romagnani, S. 1992. Induction of T_H1 and T_H2 responses : a key role for the "natural" immune response. *Immunology Today*. **13**: 379-380.

Saito, R. S. Nagao, M. Takamoto, K. Sugiyama y A. Tanaka. 1977. Adjuvanticity (Immunity-inducing property) of cod factor in mice and rats. *Infect. Immun.* **6**: 725-729.

Sangadala, S., F.S. Walters, L.H. English y M.J. Adang. 1994. A mixture of *Manduca sexta* aminopeptidase and phosphatase enhances *Bacillus thuringiensis* insecticidal CryIA(c) toxin binding and (Rb⁺, K⁺) Rb86 efflux invitro. *J. of Biological Chemistry*. **269**:10088-10092.

Sarafov, D., B. Trifonov, A. Ivanov, E. Kamberov, Z. Zaprianov, P. Pavlov y E. Georgieva. 1992. Effect of phosphatidylinositol-specific phospholipase C from *Bacillus thuringiensis* on solid spinocellular carcinoma. *Toxicom.* **30**: 187-195.

Sekijama, Y. y K. Ono. 1982. Grouping of *Bacillus thuringiensis* by heat-stable somatic antigens. *Appl. Ent. Zool.* **17**: 393-397.

Seppala, I.J.T. y O. Makela. 1984. Adjuvant effect of bacterial LPS and/or alum precipitation in response to polysaccharide and protein antigens. *Immunobiology*. **58**: 827-532.

Sharpe, E.S., K.W. Nickerson, L.A. Bulla, Jr. y J.N. Aronson. 1975. Separation of spores and parasporal crystal of *Bacillus thuringiensis* in gradients of certain X-ray contrasting agents. *Appl. Microbiol.* **30**: 1052-1053.

Shek, P.M., B.Y.K. Young y N.Z. Stanacev. 1983. Comparison between multilamellar and unilamellar liposomes in enhancing antibody formation. *Immunobiology*. **49**: 37-42.

Siebenkotten, G y A. Radbruch. 1995. Towards a molecular understanding of immunoglobulin class switching. *The Immunologist*. **3/4**: 141-145

Snapper, C.M. y J.J. Mond. 1993. Towards a comprehensive view of immunoglobulin class switching. *Immunology Today*. **14**: 15-17.

Staruch, M.J. y D.D. Wood. 1983. The adjuvanticity of Interleukin-1 in vivo. *J. of Immunol.* **130**: 2191-2194.

Taguchi, R., Y. Asahi. y H. Ikesawa. 1980. Purification and properties of phosphatidylinositol-specific phospholipase C of *Bacillus thuringiensis*. *Biochem. Biophys. Acta.* **619**: 48-57.

Taniguchi, T., H. Matsui, T. Fujita, C. Takoaka, N. Kashima, R. Yoshimoto y J. Jamuro. 1984. Structure and expression of a cloned cDNA for human interleukin-2. *Nature.* **302**: 305.

Thiery, I y E. Frachon. 1997. Identification, Isolation, culture and preservation of entomopathogenic bacteria. *Manual of techniques in Insect Pathology.* Edited by L.A. Lacey. Academic Press Limited. III-1:55-77.

Thomas, W.E. y D.J. Ellar. 1983. *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* crystal δ -endotoxin: effects on insect and mammalian cells in vitro and in vivo. *J. Cell Sci.* **60**: 181-197.

Tojo, A. y K. Aizawa. 1983. Dissolution and degradation of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin by gut juice protease of silkworm *Bombyx mori*. *Appl. Environment. Microbiol.* **45**: 576-580.

Trinchieri, G. y P. Scott. 1994. The role of interleukin 12 in the immune response, disease and therapy. *Immunol. Today.* **15**: 460-463.

Tyrell, D.A., T.D. Heath, C.M. Colley y B.B. Ryman. 1976. New aspect of liposomes. *Biochem. Biophys. Acta.* **457**: 259-263.

Vadlamudi, R.K., T.H. Ji y L.A. Jr. Bulla. 1993. A specific binding protein from *Manduca sexta* for the insecticidal toxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *berliner*. *J. Biol. Chem.* **268**: 12334-12340.

Van Rie, J., S. Jansens, H. Höfte, D. Degheele y V. Mellaert. 1989. Specificity of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins. Importance of specific receptors on the brush border membrane of the mid-gut of target insects. *Eur. J. Biochem.* **186**: 239-247.

Van Rie, J., S. Jansens, H. Höfte, D. Degheele y H.V. Mellaert. 1990. Receptors on the brush border membrane of the insect midgut as determinants of the specificity of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin. *Appl. Environment. Microbiol.* **56**: 1378-1385.

Van Rooijen, N. y R. Van Nieuwenegen. 1983. Use of liposomes as biodegradable and harmless adjuvant. *Methods. Enzymol.* **93**: 83-95.

Warren, H.S. y I.A. Chedid. 1988. Future prospects for vaccines adyuvants. Crit. Rev. Immunol. **2**: 83-101.

Wolfersberger, M.G. 1990. The toxicity of two *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins to gypsy moth larvae is inversely related to the affinity of binding sites on midgut brush border membranes for the toxins. *Experienta* **46**: 475-477.

Wu, S.J. y D.H. Dean. 1996. Functional significance of loops in the receptor binding domain of *Bacillus thuringiensis* CryIIIA δ -endotoxin. *J. Mol. Biol.* **255**: 628-640.

Yamamoto, T. y R.E. McLaughlin. 1981. Isolation of a protein from the parasporal crystal of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* toxic to the mosquito larva, *Aedes taeniorhynchus*. *Biochem. Biophys. Reserch. Commun.* **103**:414-421.

Yokoyama, Y., I. Ohmori, K. Kohda and Y. Kawazoe. 1988. Potentiation of the cytotoxic activity of anti-cancer drugs against cultured L1210 cells by *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* toxin. *Chem. Pharm. Bull.* **36**: 4499-4504.

Yokoyama, Y., I. Ohmori, K. Kohda y Y. Kawazoe. 1991. Potentiation of antitumor activity of bleomycin towards solid tumors in mice by *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* toxin. *Anticancer Reserch.* **11**: 1625-1628.

Zhu, Y.S., A. Brookes, K. Carlson y P. Filner. 1989. Separation of protein crystals from spores of *Bacillus thuringiensis* by ludox gradient centrifugation. *Appl. and Environment. Microbiol.* **55**:1279-1281.

Ziegler, H.K., L.K. Staffileno y P. Wentworth. 1984. Modulation of macrophage Ia-expression by lipopolysaccharide I. Induction of Ia expression in vivo. *J. of Immunol.* **133**:1825-1835.

Zurawski, G., y J. E. de Vries. 1994. Interleukin 13, an interleukin a-like cytokine that acts on monocytes and B cells, but not on T cells. *Immunol. Today.* **15**: 19-26.

APENDICE DE SOLUCIONES Y REACTIVOS

I. Producción de los cristales

1. Solución de Lavado 1 (pH7.0)

☐ KH_2PO_4	0.1M
☐ K_2HPO_4	0.1M
☐ NaCl	1.0M
☐ Tritón X-100	0.01%

2. Solución de Lavado 2 (pH7.0)

- ☐ A partir de la solución de lavado 1 se prepara una solución 0.2 M de NaCl que contenga 0.01% de Tritón X-100.

II. Purificación de los Cristales

1. Solución de Fosfatos 3M

☐ K_2HPO_4	1.76 moles
☐ KH_2PO_4	1.24 moles

- ▲ Nota: A partir de esta solución 3 M. se prepara por dilución la solución 1M.

2. Polietilenglicol 3350 (Sigma Chem. Co. P3640)

- ☐ Se toman 11.18 g del polvo,
☐ Se agregan en un tubo de centrifuga de 50 ml.

III. Solubilización de los cristales

1. Solución inhibidora de proteasas de Serina (Tripsina) (Fenilmetilsulfonil fluoruro, Sigma # 7626)

- | | |
|---|--------|
| ☐ PMSF (P.M. 174.2) | 10 mM. |
| ☐ Etanol absoluto | |
| ☐ Utilizar en la muestra a una concentración final de 1 mM. | |

2. Solución de Solubilizado N

☐ Trizma base	64 mM
☐ SDS	1%
☐ β -mercaptoetanol	0.05%
☐ pH sin ajustar	10.0

IV. Determinación de Proteínas

1. Reactivo A

☐ Na_2CO_3 5%

2. Reactivo B

☐ $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.5%

☐ Tartrato de Sodio y Potasio 1%

☐ El sulfato de cobre se disuelve en la solución de Tartrato

3. Reactivo C

☐ A 50 mls. de reactivo A agregar 2 mls. de reactivo B

☐ Prepararse antes de hacerse la prueba.

4. Reactivo D

☐ Reactivo de Folin Ciocalteu 1 ml.

☐ Agua bidestilada 1 ml

V: Electroforesis de poliacrilamida con SDS

1. Acrilamida Mix:

☐ Acrilamida (PM 71.08) 60 g

☐ Bis acrilamida (PM 154.2) 1.6 g

☐ Agua bidestilada 200 ml.

☐ La solución es estable por mas de 3 meses en un frasco oscuro a 4°C.

✗ Precaución: la acrilamida es neurotóxica y debe de manejarse con cuidado

2. Solución del gel pH 8.8

☐ Tris (PM 121.1) 36.3 g

☐ Agua bidestilada 150 ml.

☐ ajustar el pH con HCl

☐ agregar agua bidestilada hasta 200 ml.

☐ La solución es estable por mas de 3 meses en un frasco oscuro a 4°C.

3. Solución del gel pH 6.8

☐ Tris (PM 121.1) 6.0 g

☐ Agua bidestilada 80 ml.

☐ Ajustar el pH con Hcl

☐ Agregar agua bidestilada hasta 100 ml.

- ☐ La solución es estable por mas de 3 meses en un frasco oscuro a 4°C.

4. SDS 10%

- ☐ SDS 10 g.
- ☐ Agua bidestilada 100 ml.
- ☐ Almacenar a temperatura ambiente por 6 meses.

5. Persulfato de amonio 10%

- ☐ Persulfato de amonio 1.0 g.
- ☐ Agua bidestilada 1.0 ml.
- ☐ Usar en fresco, no almacenarlo.

7. Solución de corrimiento pH 8.8 (10X)

- ☐ Glicina (PM 75.15) 144 g
- ☐ Tris (PM 121.1) 30.2 g
- ☐ SDS 10 g
- ☐ Agua bidestilada 600 ml.
- ☐ Una vez disueltas las sales, aforar a un litro.
- ☐ Utilizar una solución 1X para el corrimiento la cual debe de presentar un pH de 8.8 sin ajustarse.

9. Solucion de Tinción. (Azul Coomassie Brillante R 250)

- ☐ Azul Coomassie R 0.0625 g.
- ☐ Metanol 100 ml
- ☐ Agitar hasta disolver entonces agregar
- ☐ Ácido acético 17.5 ml
- ☐ Agua bidestilada hasta completar 250 ml.
- ☐ Almacenar a Temperatura ambiente por 6 meses

8. Solución para el tratamiento de las muestras (2X)

- ☐ Tris (PM121.1) 0.45 g
- ☐ SDS 1.2 g
- ☐ Glicerol 6.0 ml.
- ☐ β -mercaptoetanol 3.0 ml
- ☐ Agua bidestilada 21 ml.
- ☐ Agregar 1 parte de buffer y 1 parte de la muestra en un tubo eppendorf y calentar a baño maria a ebullición por 3 min.

9. Soluciones de decoloración de geles:

9.1 Solución I

- ☐ Metanol 400 ml

☐ Ac. Acético	70 ml
☐ H ₂ O bidestilada	hasta 1 lt

9.2 Solución II

☐ Ac Acético	70 ml
☐ Metanol	50 ml
☐ H ₂ O bidestilada	hasta 1 lt

Ambas soluciones I y II se almacenan indefinidamente a temperatura ambiente.

VI Soluciones para la Prueba de Cunninhan

1. Solución de Alsever's

☐ Glucosa	20.5 g
☐ Citrato de Sodio 2 H ₂ O	8.0 g
☐ Ácido Cítrico H ₂ O	0.55 g
☐ NaCl	4.2 g
☐ Agua bidestilada	1 lt
☐ pH final	6.1-6.5

2. Solución Salina de Hank's

☐ NaCl	8.0 g
☐ CaCl ₂	0.2 g
☐ MgSO ₄	0.2 g
☐ KCl	0.4 g
☐ KH ₂ PO ₄	0.1 g
☐ NaHCO ₃	1.27 g
☐ Glucosa	2.0 g
☐ Agua bidestilada	1 lt

3. Tinción de Núcleos con Cristal Violeta 0.1%

☐ Cristal Violeta	0.1 g
☐ Acido Cítrico	2.1 g
☐ Agua destilada	100 ml

Tabla # 13
SOLUCIONES PARA GELES DE ELECTROFORESIS
SDS-POLIACRILAMIDA.

6%	5ml	10 ml	15ml	20ml	25ml	30ml	40ml	50ml
H ₂ O	2.7	5.3	8.0	10.6	13.3	15.9	21.1	26.5
Acrilamida Mix 30%	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0	6.0	8.0	10.0
Tris 1.5M (pH8.8)	1.3	2.5	3.8	5.0	6.3	7.5	10.0	12.5
SDS 10%	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
PSA 10%	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
TEMED	0.004	0.008	0.012	0.016	0.02	0.024	0.032	0.04
8%	5ml	10 ml	15ml	20ml	25ml	30ml	40ml	50ml
H ₂ O	2.3	4.6	7.0	9.3	11.6	13.9	18.6	23.2
Acrilamida Mix 30%	1.3	2.7	4.0	5.3	6.7	8.0	10.7	13.4
Tris 1.5M (pH8.8)	1.3	2.5	3.8	5.0	6.3	7.5	10.0	12.5
SDS 10%	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
PSA 10%	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
TEMED	0.003	0.006	0.009	0.012	0.015	0.018	0.024	0.03
10%	5ml	10 ml	15ml	20ml	25ml	30ml	40ml	50ml
H ₂ O	2.0	4.0	5.9	7.9	9.9	11.9	15.8	20
Acrilamida Mix 30%	1.7	3.3	5	6.7	8.3	10.0	13.3	16.6
Tris 1.5M (pH8.8)	1.3	2.5	3.8	5.0	6.3	7.5	10.0	12.5
SDS 10%	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
PSA 10%	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
TEMED	0.002	0.004	0.006	0.008	0.01	0.012	0.016	0.02
12%	5ml	10 ml	15ml	20ml	25ml	30ml	40ml	50ml
H ₂ O	1.7	3.3	5.0	6.6	8.3	9.9	13.2	16.4
Acrilamida Mix 30%	2.0	4.0	6.0	8.0	10.0	12.0	14.0	20.0
Tris 1.5M (pH8.8)	1.3	2.5	3.8	5.0	6.3	7.5	10.0	12.5
SDS 10%	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
PSA 10%	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
TEMED	0.002	0.004	0.006	0.008	0.01	0.012	0.016	0.02
15%	5ml	10 ml	15ml	20ml	25ml	30ml	40ml	50ml
H ₂ O	1.2	2.3	3.5	4.6	5.7	6.9	9.2	11.4
Acrilamida Mix 30%	2.5	5.0	7.5	10.0	12.5	25.0	20.0	25.0
Tris 1.5M (pH8.8)	1.3	2.5	3.8	5.0	6.3	7.5	10.0	12.5
SDS 10%	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
PSA 10%	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
TEMED	0.002	0.004	0.006	0.008	0.01	0.012	0.016	0.02
Concentrador	1.0ml	2.0ml	3.0ml	4.0ml	5.0ml	6.0ml	8.0ml	10ml
H ₂ O	0.68	1.4	2.1	2.7	3.4	4.1	5.5	6.8
Acrilamida Mix 30%	0.17	0.33	0.5	0.67	0.83	1.0	1.3	1.7
Tris 1.5M (pH6.8)	0.13	0.25	0.38	0.5	0.63	0.75	1.0	1.25
SDS 10%	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.06	0.08	0.1
PSA 10%	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.06	0.08	0.1
TEMED	0.001	0.002	0.003	0.004	0.005	0.006	0.008	0.01

Tabla # 14

PODER DE RESOLUCION EN BASE AL PORCENTAJE DE POLIACRILAMIDA EN LA ELECTROFORESIS CON SDS.

Tipo de gel	% de Acrilamida	Rango-Resolucion
Tris-Glicina	4	100-400kDa
	6	60-300kDa
	8	40-250kDa
	10	30-200kDa
	12	10-120kDa
	14	6-80kDa
	16	5-60kDa
Tris-Tris	18	5-60kDa
	4-12	30-300kDa
	8-16	14-200kDa
	4-20	6-200kDa
	10-27	5-100kDa

VIII. Soluciones para la prueba de ELISA

1. PBS (Solución salina buferada de fosfatos 0.15 M pH 7.2)

NaCl	8 g
KCl	0.2 g
Na ₂ HPO ₄	1.15 g
KH ₂ PO ₄	0.2 g
Agua bidestilada	1 lt

2. Solución de Lavado

PBS	1 lt
Tween 20	0.5 ml

3. Buffer de Substrato

Dietanolamida	97 ml
Agua bidestilada	800 ml

- ☐ pH 9.8, ajustarlo con HCl
- ☐ Aforar a 1 lt de solución

4. Substrato

- ☐ p-nitrofenilfosfato 20 mg
(Sigma Chem. Co. N2765)
- ☐ Buffer de substrato 10 ml

IX. Soluciones para la prueba de Western Blot

1. Solución de Transferencia

- ☐ Tris (PM121.1) 3.03 g
- ☐ Glicina (PM 75.07) 14.4 g
- ☐ SDS 1.0 g
- ☐ Agua bidestilada 800 ml.
- ☐ El pH sin ajustarse debe de ser aproximadamente entre 8.2 y 8.4
- ☐ L-Metanol 200 ml.

2. Solución de TBS (10X)

- ☐ Tris (PM 121.1) 100 mM
- ☐ NaCl 15 M

3. Solución de lavado : (TBS.Tween 20 0.05%)

- ☐ TBS 10X 50 ml.
- ☐ Agua bidestilada 450 ml
- ☐ Tween 20 0.25 ml.

4. Solución de Bloqueo (Tween 20 al 2%)

- ☐ Tween 20 2% en TBS 2.5 ml
- ☐ Buffer TBS 97.5 ml

5. Solución para el Substrato de Fosfatasa Alcalina

- ☐ Tris base 0.36 g
- ☐ NaCl 0.17 g
- ☐ MgCl₂ 6H₂O 0.3 g

☐ Agua bidestilada 30 ml.

6. Substrato para Fosfatasa Alcalina

☐ Solución para el Substrato 15 ml
☐ BCIP 10 μ l.
☐ NBT 10 μ l

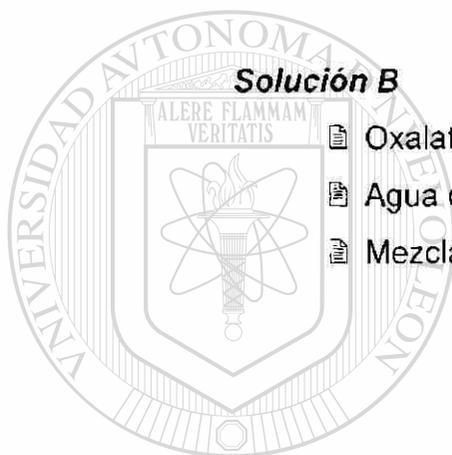
X. Tinción simple de las bacterias con cristal violeta

Solución A :

☐ Cristal Violeta 2 g.
☐ Etanol al 95% 20 ml.

Solución B

☐ Oxalato de Amonio 0.8 g.
☐ Agua destilada 80 ml.
☐ Mezclar las soluciones A y B, filtrar con papel.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



