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



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

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

PRESENTA:
Q.B.P. MAXIMO EUGENIO ROMAN CALDERON

TM Z5320 FCB 1997 R6



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



ACTIVIDAD ADYUVANTE DE LOS CRISTALES Y LAS PROTEINAS DE BACILLUS THURINGIENSIS GM-1 VAR AIZAWAI EFECTO SOBRE LA RESPUESTA INMUNE HUI/IORAL Y CELULAR

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

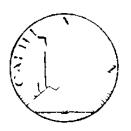
PRESENTA:

O.B.P. MAXIMO EUGENIO ROMAN CALDERON

MONTERREY, N. L.

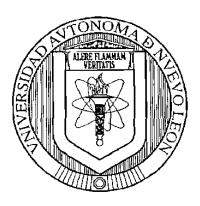
JULIO DE 1997

TM 75320 FCB 1997 RG



FONDO TESIS

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



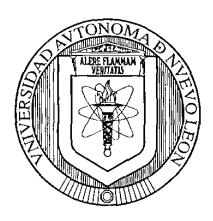
ACTIVIDAD ADYUVANTE DE LOS CRISTALES Y LAS PROTEÍNAS DE BACILLUS THURINGIENSIS GM-1 VAR. AIZAWAI. EFECTO SOBRE LA RESPUESTA INMUNE HUMORAL Y CELULAR

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

PRESENTA

Q.B.P. MAXIMO EUGENIO ROMÁN CALDERÓN

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON FACULTAD DE CIENCIAS BIOLOGICAS 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

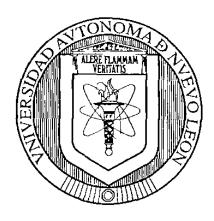
Dr. Luis J. Galán Wong Co-Director

Dra. Julia Verde Star Subdirectora de Postgrado Maringal Clerke Ster

MONTERREY. N.L.

9UL90 DE 1997

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



ACTIVIDAD ADYUVANTE DE LOS CRISTALES Y LAS PROTEÍNAS DE BACILLUS <u>THURINGIENSIS</u> 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 Charge of

MONTERREY. N.L.

JUL90 DE 1997

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

Leonardo da Vinci

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. Luís 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.

ÍNDICE DEL CONTENIDO

☞ Ubicación	pag. i
	٧
	vi
☞ Abreviaturas	vii
☞ Resumen.	viii
	X
☞ Introducción.	1
 ✓ Antecedentes. ♦ Adyuvantes No Bacterianos. ➤ Compuestos de Aluminio. ➤ El Adyuvante Incompleto de Freund. ➤ Los Liposomas. ➤ Complejos Inmunoestimulantes (ISCOM). ➤ Adyuvantes Sintéticos. 	3 3 4 4 5
Adyuvantes Mediadores del Hospedero.	5
 Adyuvantes Bacterianos. ➤ El Adyuvante Completo de Freund. ➤ El Lipopolisacarido o Endotoxina Bacteriana. 	5 6 6
 ▶ Bacillus thuringiensis. ➤ La Clasificación de B.t. ➤ La Purificación de los Cristales (δ-endotoxina) de B.t. ➤ Las Proteínas del Cristal de B.t. ➤ La Estructura de las Proteínas del Cristal de B.t. ➤ Actividades Tóxicas y el Modo de Acción de las δ-Endotoxinas de B.t. 	7 8 12 13
 El Receptor en la Membrana Epitelial y el Modo de Acción de la Toxina. Otras Actividades Biológicas de B.t. 	17 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. ➤ Método II. ➤ Método III. 	30 30 30
	 8. Digestión Enzimática de la Proteína Solubilizada. A. Digestión con Tripsina. B. Digestión con Papaína. 9. Determinación de la Concentración de Proteína. 	31 31 31
	10.Determinación del Peso Molecular SDS-PAGE.	32
	11.Western Blot (Inmunoelectrotransferencia).	32
	12.Determinación del Efecto de los Cristales y las Proteínas en la Inmunidad Humoral. 12.1 Método de Cunningham y Szenberg de 1968. 12.2 Ajuste de las Células Formadoras de Placa a un Millón de Células de Bazo. 12.3 Tinción de los Núcleos con cristal Violeta y	33 34 34
	Enumeración en la Cámara de Neubauer. 12.4 Determinación de la Viabilidad Celular por el Método de Azul Tripan.	35 35
	 13. Cultivo de las Células de Bazo para la Obtención y Caracterización de los Anticuerpos Producidos por las Células Plasmáticas. 13.1 Elisa Indirecto Dependiente de Antígeno para la Captura de Clase 	36 36
	 14. Estimulación de la Inmunidad Celular con las Proteínas de GM-1. Prueba de Hipersensibilidad en Ratones Balb/c. 14.1 Caracterización Morfológica de las Poblaciones Celulares Infiltrantes en la Inflamación. 	37 38
?	esultados 1. 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 B.t. GM-1 sobre la Respuesta Humoral de Anticuerpos.	44
IV.Actividad de las Proteinas del Cristal de B.t. GM-1 Sobre la Respuesta Inmune Celular.	50
	55
	58
✓ Perspectivas	59
✓ Literatura Consultada.	60
Apéndice de Soluciones y Reactivos.	74