

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 tuvo 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-mercaptopropanoalcohol a pH 10.0, calentados en baño maría a ebullición por 3 min. 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 serológicamente,

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- γ), factor de necrosis de tumor alfa (TNF- α), factor estimulador de la colonia de granulocito-macrófago (GM-CSF), interleucina 1 alfa (IL-1- α) 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- β) (*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 linfoquinas secretadas por linfocitos T de ratón son primordiales en inducir el cambio de clase de inmunoglobulina *in vitro*: INF- γ , producida por linfocitos 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- β induce el cambio a IgG2b e IgA (*Snijders 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 isótipos 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 isótipo de Ig's no correspondería a una respuesta regulada por este mecanismo, ya la proteína tripsinada de GM-1 incrementa todos los isótipos de Ig'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 Fries, 1994*) también determinan el cambio de Ig's y pudiera este ser un mecanismo que explique el incremento en los isótipos 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 isótipo 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.

PERSPECTIVAS

El presente trabajo cumple con los objetivos propuestos y confirma la hipótesis planteada, de que los cristales, pero mas 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 mas 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. Aislart 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 adyuvants. Nature. **233**: 330.

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

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

Allison,A.C. y N.E.Byars. 1991. Immunological adyuvant: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 *Tenibrio molitor* for the insecticidal toxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *tenebrionis*. Bichem. 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 adyuvant 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 larvical 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), Comparison 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>.

Cunningham, A.J. y Szenberg, A. 1968. Further 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 adjuvanticity. 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 adjuvant effect of AlPO₄ on purified influenza virus hemagglutinins in man. J. of Immunol. **100**: 1139-1140.

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

De Barjac,H.. 1978. Une nouvelle variété de *Bacillus thuringiensis* très toxique pour les moustiques: *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 *Damalinia 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 adyuvant. *Rev. Infect. Dis.* **2**: 370-380.

Ellouz,F., A.Adam, R.Ciobaru y E.Lederer. 1974. minimal structure requirements for adyuvant 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.

Lorenzo-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. Rodríguez Padilla y H.A. Luna-Olvera, Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, México. Primera Ed. pp. 63-113.

Galán-Wong, L.J., C. Rodríguez-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 α5 segment of *Bacillus thuringiensis* δ-endotoxin. *Biochemistry*. **32**: 3429-3436.

Gazit, E. y Y. Shai. 1995. The assembly and organization of the α 5 and α 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 adyuvants: a role for liposomes. immunology Today. **11**:89-97.

Grochulski, P., L. Masson, S. Borisova, M. Puszta-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.Edwars y B.E.Ryman. 1976. The adjuvants 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. Hüttner 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 adyuvants 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 cytolitic 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. Kleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. **27**: 680-685.

Lambert, B. y M. Peferoen. 1992. Insecticidal promise of *Bacillus thuringiensis*. Facts and mysteries abaut 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. Nº1. 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. *konukian* (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. Opn. 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.

Lorenz-Quiñones, A. y R. Quintero-Ramirez. 1996. Mecanismo molecular de accion 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 Autonoma de Nuevo León. **1a Ed.**, México

Lovgren, K. y B. Morein. 1991. The iscom: an antigen delivery system with built-in adyuvant. 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 dimalonate. *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.Hardegree. 1972. Mineral oil adyuvants: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 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. Uytdehaag, 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. Koskina, 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.Shetna. 1976. Mode of action of a purified protein from yhe proteinaceous crystal of *Bacillus thuringiensis* subsp. *thuringiensis* on Yoshida Ascites Sarcoma cells. *Antimicr. 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.Aliving. 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. Rodriguez-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. Adyuvanticity (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. Zapryanov, P. Pavlov y E. Georgieva. 1992. Effect of phosphatidylinositol-especific 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. Adyvant effect of bacterial LPS and/or alum precipitation in response to polysaccharideand 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 adyuvanticity 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 preservatiot of entomophatogenic 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. Enviroment. 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.

Tyrrell, 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. *berlineri*. 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. Enviroment. Microbiol. **56**:1378-1385.

Van Rooijen, N. y R.Van Nieuwnegeen.1983. Use of liposomes as biodegradable and harmless adyuvant. 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. Experientia **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 af 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. Antcancer 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 Iudox 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 ₂ PO ₄	0.1M
□ K ₂ H PO 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 ₂ HPO ₄	1.76 moles
□ KH ₂ PO 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 centrífuga de 50 ml.

III. Solubilización de los cristales

1. Solución inhibidora de protesas 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-mercaptopropanoal	0.05%
□ pH sin ajustar	10.0

IV. Determinación de Proteínas

1. Reactivo A

Na₂CO₃ 5%

2. Reactivo B

CuSO₄•5H₂O 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-mercaptopetanol 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
□ Ácido Cítrico	2.1 g
□ Agua destilada	100 ml

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

	5ml	10 ml	15ml	20ml	25ml	30ml	40ml	50ml
6%								
H ₂ O	2.7	5.3	8.0	10.6	13.3	15.9	21.1	26.5
AcrilamidaMix 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%								
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%								
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%								
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%								
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								
H ₂ O	1.0ml	2.0ml	3.0ml	4.0ml	5.0ml	6.0ml	8.0ml	10ml
Acrilamida Mix 30%	0.68	1.4	2.1	2.7	3.4	4.1	5.5	6.8
Tris 1.5M (pH6.8)	0.17	0.33	0.5	0.67	0.83	1.0	1.3	1.7
SDS 10%	0.13	0.25	0.38	0.5	0.63	0.75	1.0	1.25
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
	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

<input type="checkbox"/> Solución para el Substrato	15 ml
<input type="checkbox"/> BCIP	10 µl.
<input type="checkbox"/> NBT	10 µl

X. Tinción simple de las bacterias con cristal violeta

Solución A :

<input type="checkbox"/> Cristal Violeta	2 g.
<input type="checkbox"/> Etanol al 95%	20 ml.

Solución B

<input type="checkbox"/> Oxalato de Amonio	0.8 g.
<input type="checkbox"/> Agua destilada	80 ml.
<input type="checkbox"/> Mezclar las soluciones A y B, filtrar con papel.	

