



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

ESCUELA DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA

EFFECTO INHIBITORIO DE LA PROLIFERACIÓN BACTERIANA
DE LOS SOBRENADANTES DE CULTIVO DE CÉLULAS
MONONUCLEADAS HUMANAS ESTIMULADAS POR Cry 1Ac
“in vitro”.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
QUÍMICO FARMACOBIOLOGO

PRESENTA

FRANCISCO AYALA MATA

Asesor: Alain R. Rodríguez Orozco.

Morelia, Michoacán, Septiembre, 2005

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Biotecnología M-3 del CEMEB, Laboratorio de Microbiología y Laboratorio de Alimentos de la Escuela de Químico Farmacobiología de la U.M.S.N.H., bajo la asesoría del D.C. **Alain R. Rodríguez Orozco.**

Se agradece la asistencia de:

CEMEB y al DC. Marco Cajero por permitirme de trabajar en el Laboratorio de Biotecnología M-3.

Escuela de Químico Farmacobiología.

Hospital “Eva Sámano” y a la Q.F.B. Sandra por proporcionarme las cepas bacterianas.

Al Prof. Benito Pereira de la UANL, por proporcionarnos la Protoxina Cry 1 Ac.

De todo corazón agradezco a mis papás:

Lili

Y

Francisco

Y a mis hermanos: Alejandro y Jonathan

*Quienes siempre me apoyaron incondicionalmente, brindándome
cariño, paciencia y su confianza para seguir adelante en esta mi
nueva meta.*

Quiero agradecerle a todas las personas que de alguna manera me apoyaron y contribuyeron en la realización de este trabajo.

Al Dr. Alain Rodríguez, quién confió en mí y que me dio la facilidad de hacer y enseñarme la investigación.

A la M.C. Lidia Manzo por haber aportado sugerencias muy importantes y ayudarme en la redacción con la mejor disposición.

Además, quiero expresarle mi gratitud a mis amigos y compañeros de laboratorio, Héctor, Nicolás, Salvador y Karla, por sus valiosos comentarios, y sobre todo por brindarme su apoyo, amistad y momentos agradables dentro y fuera del laboratorio.

Y sin duda alguna a quién siempre estuvo a mi lado apoyándome y guiándome sin condición, que con sus duras y enérgicas críticas me motivo y fortaleció para no desistir, y que al final de aquellos días pesados de laboratorio, sus brazos me daban un tierno abrazo, y que además me daba de comer: Mi novia **Citlalli**.

Sabiendo que todos ellos son personas sumamente ocupadas y que, a pesar de ello, aceptaron formar parte del jurado y dedicaron su valioso tiempo a la revisión de este manuscrito aportando interesantes sugerencia, deseo manifestarles mi agradecimiento:

Q.F.B. Rebeca Tinoco

Q.F.B. Bertha Ballesteros

Q.F.B. Juan Bosco Guzmán

Í N D I C E

Índice	i
Índice de figuras	ii
Índice de tablas	iii
Resumen	iv
 Antecedentes	 1
Inmunidad Innata	1
Inmunidad adquirida	1
Mecanismos de acción para digerir el material fagocitado.	3
Inmunomodulación.	3
 <i>Bacillus thuringiensis</i> y sus toxinas	 6
Dominios de Cry 1Ac	7
 Antecedentes específicos	 9
Justificación	10
Hipótesis del trabajo.	11
Objetivos	12
 Parte Experimental	 13
Método de selección por gradiente utilizando Ficoll-Hypaque con densidad de 1.077	13
Determinación de viabilidad de células MN por exclusión con Azul de Tripano 4%.	13
Activación de células MN (monocitos) con la protoxina Cry 1 Ac.	13
Técnica de Kirby Bauer	14
 Discusión y Resultados	 15
Conclusiones	20
Bibliografía	21
Anexo: Preparación de reactivos	25

Índice de figuras

Figura 1. Fagocitos profesionales	3
Figura 2. Mecanismos oxidativos de los monocitos	4
Figura 3. Microfotografía de <i>Bacillus thuringiensis</i> en microscopio electrónico	6
Figura 4. Proteína Cry en forma de cristales	7
Figura 5. Estructura de Cry 1Ac	8
Figura 6. Pruebas de sensibilidad del <i>Staphylococcus aureus</i>	15
Figura 7. Pruebas de sensibilidad del <i>Proteus mirabilis</i>	16
Figura 8. Pruebas de sensibilidad en <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	17
Figura 9. Pruebas de sensibilidad de <i>Escherichia coli</i>	18
Figura 10. Pruebas de sensibilidad de <i>Salmonella</i> sp.	19

Tabla 1. Mecanismos de defensa y tipos de inmunidad	2
Tabla 2. Clasificación de las δ -endotoxinas de <i>Bacillus thuringiensis</i>	7
Tabla 3. Diluciones y controles	11
Tabla 6. Medidas de halos de inhibición de los sobrenadantes en <i>Staphylococcus aureus</i>	15
Tabla 7. Medidas de halos de inhibición de los sobrenadantes en <i>Proteus mirabilis</i>	16
Tabla 8. Medidas de halos de inhibición de los sobrenadantes en <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	17
Tabla 9. Medidas de halos de inhibición de los sobrenadantes en <i>Escherichia coli</i>	18
Tabla 10. Medidas de halos de inhibición de los sobrenadantes en <i>Salmonella sp.</i>	19

La investigación que se presenta responde a un estudio experimental que considera la acción adyuvante de Cry 1Ac en mecanismos celulares. Tuvo como objetivo general conocer el efecto bactericida “in Vitro” de los sobrenadantes de células mononucleadas activadas por Cry 1Ac en cepas bacterianas. Se utilizaron métodos teóricos para el análisis documental de las fuentes bibliográficas y métodos experimentales, separación de células mononucleadas por el método de selección por gradiente utilizando Ficoll-Hypaque con densidad de 1.077. Determinación de viabilidad de células MN (monocitos) por exclusión con Azul de Tripano 4%. Activación de células MN (monocitos) con la protoxina Cry 1 Ac. Técnica de Kirby Bauer. Antibiógramas, las bacterias utilizadas fueron: *Salmonella* sp. *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*. Por otra parte se obtuvieron los sobrenadantes de las células mononucleadas activadas con Cry 1 Ac, con las que se realizaron los antibiógramas. Los resultados obtenidos muestran que Cry 1 Ac no ejerce inhibición alguna *per se*, sin embargo se demuestra que los sobrenadantes de las células mononucleadas activadas con Cry 1 Ac ejercen efecto bactericida y fagocítico por la liberación de grandes cantidades reactivas del oxígeno como producto de la potente activación del estallido respiratorio. Aclarando que este efecto bactericida de cepa es restrictivo de cepa u especie, por lo que no actúa igual en cada bacteria.

Introducción

Pese a los innegables triunfos de la ciencia antimicrobiana, los “microbios”, quienes son los causantes de las enfermedades infecciosas, no han sido en absoluto “vencidos”; aun siguen produciendo infecciones que ocupan gran parte del tiempo de los investigadores. En efecto, el conocimiento en lo que respecta a nuevos agentes ya conocidos, a los mecanismos adicionales sobre génesis y persistencia de las infecciones, y al comportamiento de los agentes infecciosos en los niveles molecular, celular y orgánico, se está viniendo a un ritmo acelerado. Como resultado se presentan modificaciones en las bacterias que las hacen resistentes a ciertos fármacos.

En el proceso de curación, además de los fármacos intervienen mecanismos propios como el sistema inmunitario.

Biológicamente, la palabra **inmunidad** significa estar libre o exento de las enfermedades causadas por infecciones. La inmunidad de los seres vivos se obtiene a través de diversos mecanismos defensivos que sirven de protección contra microorganismos o sustancias del medio ambiente. De acuerdo a si están o no presentes desde el nacimiento, unos se denominan naturales o innatos y otros se llaman adquiridos o adaptivos. Los primeros forman una línea defensiva inespecífica. Los segundos son específicos y dependen de la respuesta del sistema inmune. **Tabla 1.**

Inmunidad innata

Algunos de estos mecanismos protegen sin la necesidad de ser estimulados, pero la mayoría son inducibles y ninguno actúa en una forma específica.

Inmunidad adquirida

Además de inmunidad innata, el cuerpo humano posee la capacidad de crear una inmunidad específica muy poderosa contra elementos invasores como las bacterias, virus, toxinas mortales. Además, también puede eliminar células envejecidas o alteradas por agentes físicos o químicos a través del intestino.

El tener inmunidad también implica reconocer los antígenos propios y desarrollar una respuesta negativa que ha sido denominada tolerancia.^{1,2,3,4}

<i>Características</i>	<i>Factores que proporcionan inmunidad</i>
<i>Inespecífica</i> • De vertebrados e invertebrados • Innata • Natural • Sin memoria • De especie <i>Específica</i> • Vertebrados • Adaptiva • Con memoria • Individual • Autoregulado	<i>Inmunidad Innata</i> • Piel y mucosas • Temperatura corporal • Oxígeno • Enzimas de los tejidos • Interferones • Sistema Complemento • Fagocitosis <i>Inmunidad Adquirida</i> • Sistema Inmunitario

Tabla 1. Mecanismos de defensa y tipos de inmunidad. ⁴

La piel es la primera barrera natural que el hombre tiene, cuando un virus o bacteria atraviesan esta barrera, la siguiente defensa es una *reacción inflamatoria*, donde participan, entre otros, los fagocitos. Los monocitos que forman parte de los fagocitos, son los precursores de los macrófagos, desempeñando una función importante en la iniciación y quizá también en la expresión de la respuesta inmunitaria⁴. Los fagocitos pueden atrapar moléculas solubles o microorganismos e introducirlos en vacuolas citoplasmáticas, donde las fusionan con los lisosomas y se forman los fagolisosomas, en donde comienza la actividad de los sistemas antimicrobianos que provocan la muerte de los microorganismos, que culminan con la expulsión del cuerpo residual. Los fagocitos profesionales tienen la capacidad de ejercer una potente acción fagocítica y están dotados de una alta densidad de receptores para el Complemento y para las porciones Fc de las inmunoglobulinas. **Fig. 1.**

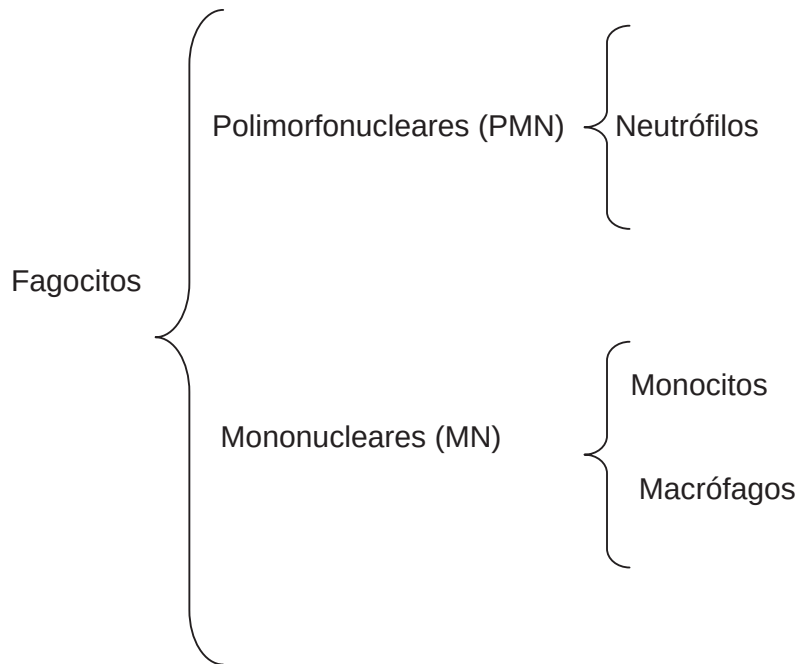


Figura 1. Fagocitos Profesionales.⁴

Inmunomodulación.

Las actividades del sistema inmunitario, que confieren la inmunidad específica deben ser ejecutadas sin alterar y las funciones de los diferentes tejidos del cuerpo. De modo que, para no representar un riesgo a la salud, los mecanismos inmunológicos de rechazo y de tolerancia deben ser *modulados* y, además, deben ser ejercidos en una forma coordinada con las funciones de otros sistemas del cuerpo, particularmente los sistemas nerviosos y endócrino.

La modulación de la inmunidad específica es necesaria, a fin de evitar la cronicidad del fenómeno inflamatorio y la aparición de enfermedades autoinmunes y alérgicas.⁴

Mecanismos de acción para digerir el material fagocitado.

Oxidativos { Son más eficientes e implican un aumento en el metabolismo de la glucosa con la consiguiente generación de H_2O_2 y formación de metabolitos del oxígeno (O_2 , $\cdot OH$, 1O_2 , $\cdot OCl$ y cloraminas).

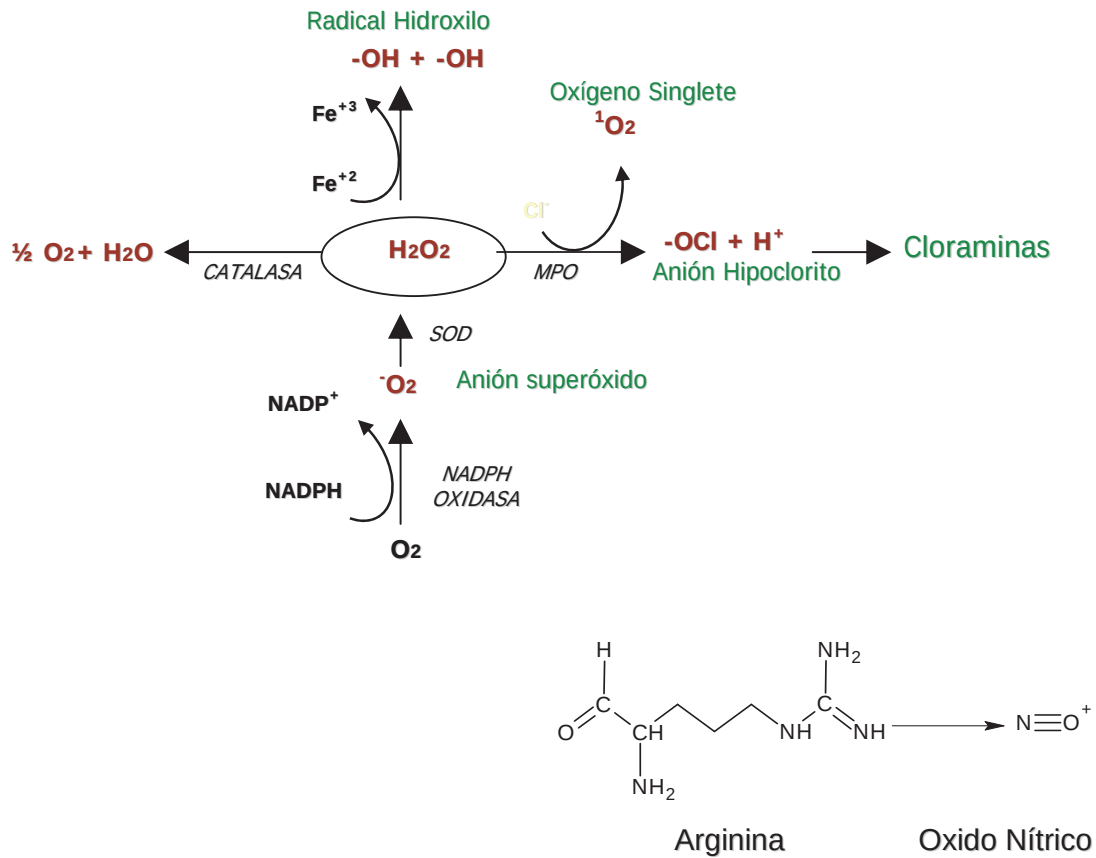


Figura 2. Mecanismos oxidativos de los monocitos.⁶

No oxidativos {

- Fusión del fagosoma con los lisosomas.
- Disminución del pH dentro del fagosoma.
- Síntesis de proteínas cationicas, lactoferrina o lisozima.^{4,5,6}

Estos mecanismos para fagocitar a los microorganismos se pueden incrementar significativamente al coadministrarse con ciertas sustancias llamadas *adyuvantes*.

Los *adyuvantes* son sustancias que al coadministrarse con el antígeno, aumentan la magnitud de la respuesta inmunológica con respecto a la que se obtendría cuando el antígeno se administra solo.⁷

La mayoría de ellas todavía se utiliza con fines experimentales exclusivamente, ya que su administración en humanos implica ciertos riesgos, particularmente la producción de reacciones de hipersensibilidad o la inducción de fenómenos de autoinmunidad.

La mayor parte de los antígenos ocasionan respuestas muy pobres al administrarse solos; la producción de nuevos coadyuvantes, como proteínas recombinantes y péptidos provenientes de patógenos, es un área de creciente interés.

En los últimos años se han investigado sustancias capaces de potenciar las respuestas inmunológicas, y que además, burlen el ambiente radical que imponen los mecanismos inespecíficos de defensa de los aparatos digestivo, respiratorio y reproductor, y se han diseñado antígenos encapsulados. Se han expresado de antígenos heterólogos en vectores, y en proteínas transportadoras; estas estrategias son muy costosas y pueden resultar tóxicas para los vertebrados, de modo que resulta atractiva la idea de desarrollar conjugados con sustancias capaces de adyugar a la respuesta inmunológica.^{8,9,10,}

Muchos adyuvantes afectan la especificidad de la respuesta de anticuerpos, pues logran alterar la selección de epítopes de antígenos completos hacia donde se dirige la respuesta de los anticuerpos.¹⁰ Si bien muchos adyuvantes han sido eficaces para potenciar respuestas humorales, sólo unos pocos han demostrado ser buenos inductores de inmunidad celular.¹¹

Los mecanismos generales de acción de los adyuvantes son los que explican el modo en que se ejercen su acción inmunoestimulante, y son: la liberación del antígeno durante periodos largos, generación de inflamación y activación de células presentadoras de antígenos, como macrófagos, localización selectiva del antígeno en áreas timo-dependientes, incremento de la captura del antígeno y de su presentación por células accesorias, alteración de las vías de procesamiento de antígenos, estimulación de células T cooperadoras, regulación de la producción de citocinas, regulación del cambio de clase de inmunoglobulinas y de la proliferación y diferenciación de células B, estimulación de maduración de precursores de células B y T y eliminación de células supresoras.¹²

***Bacillus thuringiensis* y sus toxinas.**

Bacillus thuringiensis (Bt) y toxinas Cry; Bt es una especie bacteriana grampositiva, aerobia estricta (**Fig. 3**), morfológicamente relacionada con *Bacillus cereus* y *Bacillus anthracis*. Estas tres especies bacterianas, durante su ciclo de vida, presentan dos fases principales, la fase de crecimiento vegetativo, en donde las bacterias se duplican por bipartición cada 30-90 min. dependiendo del medio de cultivo, y la fase de esporulación, en la cual se establece un programa de diferenciación de bacteria a espora.^{13,14,15,16}



Figura 3. Microfotografía de *Bacillus thuringiensis* en microscopio electrónico.

A Bt se le diferencia de *B. cereus* y *B. anthracis* por su capacidad para producir en el citoplasma, durante la esporulación, δ -endotoxinas, en forma de cristales.

Fig. 4. Dicho cuerpo paraesporal también conocido como proteínas Cry y Cyt, tienen propiedades insecticidas, usadas en agricultura.^{17,18,19,}

La clasificación de las protoxinas Cry esta basada en la especificidad del insecto que intoxican.²⁰

GEN	ESPECIFICIDAD	FORMA DEL CRISTAL	MEDIDA DE LA PROTEINA
<i>Cry I</i>	Lepidópteros (mariposas)	Bipiramidal	130 - 138 kDa
<i>Cry II</i>	Lepidópteros y dípteros (mosquitos)	Cuboidal	69 - 71 kDa

Cry III	Coleópteros (escarabajos)	Irregular	73 - 74 kDa
Cry IV	Dípteros	Bipiramidal	73 - 134 kDa
Cry V-IX	Variada_nemátodos	Variada	35 - 129 kDa

Tabla 2. Clasificación de las δ -endotoxinas de *Bacillus thuringiensis*.²⁰

Los síntomas que se observan a partir de que las larvas de insectos susceptibles ingieren los cristales de Cry 1Ac. El mecanismo de acción incluye varios pasos: Solubilización y procesamiento de la protoxina, unión al receptor, inserción en la membrana, formación de poro y citólisis.²⁰

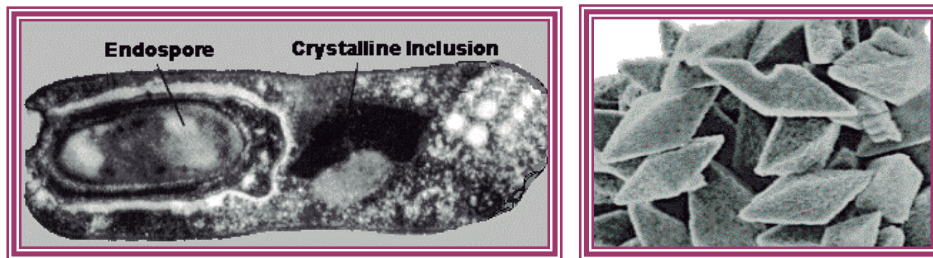


Figura 4. Proteína Cry en forma de cristales.¹⁶

Dominios de la toxina activada (Cry 1ac)

Esta proteína tiene 3 dominios:



Figura 5. Estructura de Cry 1Ac.²⁰

Dominio I (N-ter. 220 residuos): Dominio formador del canal. Es un complejo de 7 α -hélices, donde la hélice 5 (hidrófoba) está rodeada por las otras 6 α -hélices que son anfipáticas y suficientemente largas para atravesar la bicapa lipídica de la membrana de la célula del intestino medio del insecto.^{20,21,22,23}

Dominio II (central, 200 residuos): Está formado por tres láminas β -antiparalelas alrededor de un centro hidrófobo que terminan en asas ("loops 1, 2 y 3 ") en el vértice de la molécula formando un prisma. Este dominio determina la especificidad del receptor, mediante la unión con el receptor de membrana de las células del intestino medio.^{20,21,22,23}

Dominio III (C-ter. 150 residuos): Está menos definida funcionalmente, Es un complejo β -sandwich, de dos laminas β -plegadas antiparalelas arregladas en forma de emparedado una sobre otra, se piensa que transduce información desde el dominio II (de unión al receptor) hasta el dominio I (dominio de formación del canal). Además, parece que regula la actividad del canal, estabiliza la toxina y funciona junto al dominio II en la formación del canal.^{20,21,22,23}

Antecedentes Específicos

- ❖ Se reportó un aumento en la respuesta inmunológica contra hematíes de carnero provocada por cristales insecticidas de *Bt*, también se demostró que estos cristales tenían actividad antitumoral en el sarcoma ascítico de Yoshida, debido al probable aumento de la respuesta de defensa inespecífica en ratas tratadas con estos cristales. No se ha reportado actividad citotóxica de las proteínas Cry en células de mamíferos.^{24,25}
- ❖ Cry 1Ac es una protoxina con funciones inmunogénicas y adyuvante demostrada en mamíferos; al administrarse por vía nasogástrica e intraperitoneal a ratones Balb/c desencadenó una alta producción de anticuerpos de IgG, IgM y de IgA en contenido de lavado intestinal, en heces y en sangre periférica los investigadores comprobaron que la protoxina Cry1 Ac de *Bt* es un potente coadyuvante sistémico y de mucosas, esta adyuvancia depende de la vía de administración.^{26,27}
- ❖ Hace poco se demostró que los fagocitos profesionales y, en particular, los monocitos eran un blanco celular importante para explicar los efectos inmunogénicos y coadyuvantes de Cry 1Ac, se determinó que Cry 1Ac ejerce una potente activación y proliferación de monocitos, lo que está en relación con un incremento de los sucesos de procesamiento y presentación de antígenos por esta célula.^{28,29}
- ❖ Cry 1Ac es inocua para los vertebrados.³⁰

JUSTIFICACIÓN

Cry 1Ac es un adyuvante que potencia la actividad fagocítica-bactericida en monocitos.

HIPÓTESIS DEL TRABAJO

Cry 1Ac induce inmunomodulación en monocitos, aumentando su capacidad fagocítica y bactericida.

OBJETIVOS

Conocer el efecto bactericida “in Vitro” de los sobrenadantes de células mononucleadas activadas por Cry 1Ac en cepas bacterianas.

Parte experimental

Separación de células mononucleadas por el Método de selección por gradiente utilizando Ficoll-Hypaque con densidad de 1.077.

Las células totales obtenidas de sangre periférica de persona sana, se ponen en RPMI 1640 + SFBI al 10 % se depositarán cuidadosamente en un tubo conteniendo la mitad de solución 1:2 de Ficoll-Hypaque. Posteriormente el tubo se centrifugará a 2500 rpm durante 30 minutos (centrífuga Beckman TJ-6) a 4°C. El Ficoll-Hypaque tiene un gradiente de densidad igual al de las células MN pero menor que los eritrocitos y granulocitos. Los eritrocitos y polimorfonucleares (PMNs) formarán una pastilla en el fondo del tubo, mientras las células MN quedarán en la interfase del medio y el Ficoll. Las células MN se separarán y serán lavadas con PBS (amortiguador de fosfato de potasio 0.015 M pH 7.4, NaCl 0.15 M) (Natvig J.B., Perlmann P. And Wigzell, 1976).

Determinación de viabilidad de células MN (monocitos) por exclusión con Azul de Tripano 4%.

Esta prueba de exclusión refleja la integridad de la membrana plasmática, ya que colorantes como el Azul de Tripano no son permeables a la membrana íntegra en las células vivas (Klaus, 1987) Se determinará la viabilidad en un hemocitómetro por el porcentaje de células teñidas de azul (muertas) contra el porcentaje de células no teñidas (vivas).

Se aceptará la viabilidad celular igual a 95%. La suspensión celular se ajustará a una concentración final de 2×10^5 células/ml.

Poner una gota de células en el hemocitómetro, luego agregar una pequeña gota de azul de tripano 4% y observar al microscopio.

Activación de células MN (monocitos) con la protoxina Cry 1 Ac.

Se utiliza la protoxina a una concentración de 250 µg/ml, a partir de ella se hacen diluciones dobles seriadas 1:2, 1:4....1:32, en una caja de 96 posillos. Posteriormente se agregan las células MN obtenidas y se deja incubar durante 72 horas a 37°C, en una atmósfera con 5% de CO₂ y 95% de humedad relativa.

Al cabo de ese tiempo se transfieren los contenidos de cada pozo en un tubo Eppendorf y se centrifugarán 15 min. a 5000-7500 rpm.

Se obtiene el sobrenadante con micropipetas y se conserva el sobrenadante en alícuotas debidamente rotuladas para su uso en bioensayos.

	Células	(RPMI + SFBI al 10%)	PHA	Protoxina
Control (-)	100 µl	100 µl		-
Control (+)	100 µl	40 µl	60 µl	-
Muestras(diluciones)	100 µl	60 µl	-	40 µl

Tabla 3. Diluciones y controles. *PHA: fitohemaglutinina

Técnica de Kirby Bauer.

Sembrar 3-5 colonias en Caldo Soya Trypticasa, dejar incubar durante 4 – 6 hrs. para que las bacterias alcancen su fase exponencial (comparar turbidez con el tubo 0.5 de la Escala de Mc Farland). Al cabo de ese tiempo la cepa bacteriana se siembra masivamente en una placa con Agar Muller Hinton se coloca el unidisco impregnado previamente con 10 µl de los sobrenadantes y controles, se incuba a 35°C por 18-24 hrs. Durante este tiempo los antimicrobianos difunden a través del medio de cultivo, originando un gradiente de concentración capaz de inhibir el crecimiento de las cepas de acuerdo al grado de susceptibilidad bacteriana. Después de incubar se mide el halo de inhibición y se compara con los valores anotados en la tablas correspondientes.²

Discusión y Resultados.

Staphylococcus aureus



Figura 6. Pruebas de sensibilidad del *Staphylococcus aureus*

Conc.	mm
Pura	--
1:2	9
1:4	10
1:8	9
1:16	9
C+	9
C-	8
Amk	20

Tabla 4. Medidas de halos de inhibición de los sobrenadantes en *Staphylococcus aureus*

Proteus mirabilis



Figura 7. Pruebas de sensibilidad del *Proteus mirabilis*

Conc.	mm
Pura	--
1:2	11
1:4	12
1:8	9
1:16	12
C+	9
C-	7
Amk	13

Tabla 5. Medidas de halos de inhibición de los sobrenadantes en *Proteus mirabilis*

Pseudomonas aeruginosa

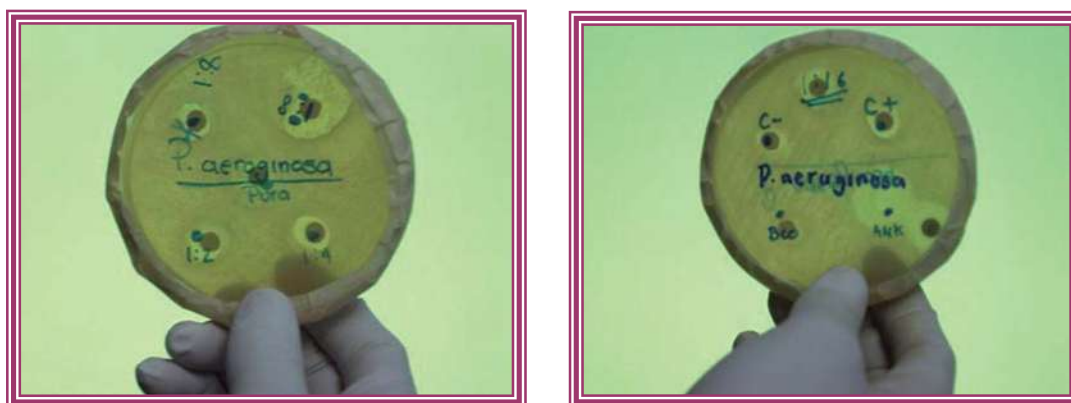


Figura 7. Pruebas de sensibilidad en *Pseudomonas aeruginosa*.

Conc.	mm
Pura	--
1:2	11
1:4	10
1:8	10
1:16	12
C+	8
C-	7
Amk	17

Tabla 6. Medidas de halos de inhibición de los sobrenadantes en *Proteus mirabilis*

Escherichia coli

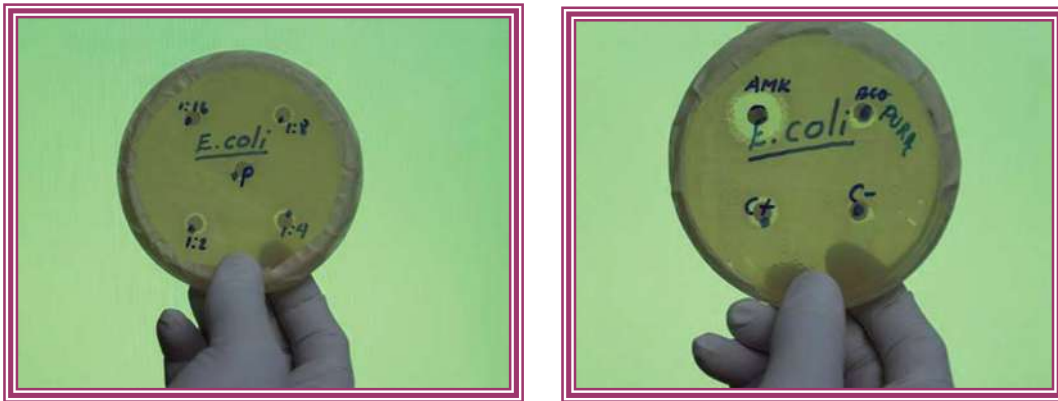


Figura 9. Pruebas de sensibilidad de *Escherichia coli*

Conc.	mm
Pura	--
1:2	7
1:4	7
1:8	--
1:16	--
C+	7
C-	--
Amk	15

Tabla 7. Medidas de halos de inhibición de los sobrenadantes en *Escherichia coli*.

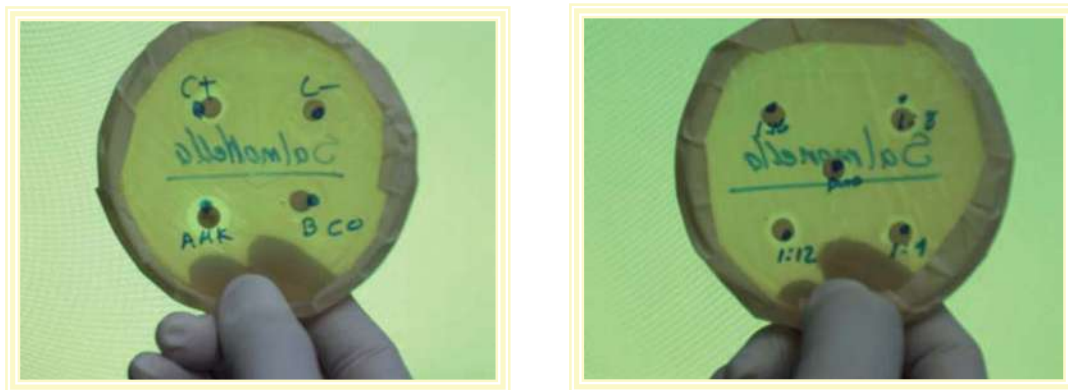


Figura 10. Pruebas de sensibilidad de *Salmonella* sp.

Conc.	mm
Pura	--
1:2	8
1:4	7
1:8	8
1:16	7
C+	8
C-	--
Amk	12

Tabla 8. Medidas de halos de inhibición de los sobrenadantes en *Salmonella* sp.

Conclusiones

Cry 1Ac no ejerce efecto bactericida por si sola en las bacterias *Salmonella sp*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* y *Pseudomonas aeruginosa*. Por otro lado, los sobrenadantes de células mononucleadas activadas con la protoxina Cry 1Ac si ejercen efecto inhibitor sobre el crecimiento bacteriano de algunas cepas patógenas (*Salmonella sp*, *Staphylococcus*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* y *Pseudomonas aeruginosa*) al humano. Este efecto es dependiente de la dosis del inmunomodulador empleado.

Varía entre una cepa y otra, y se debe a la estimulación de factores presentes en el medio de cultivo.

Por lo que hace falta caracterizar los factores que explican la acción bactericida y fagocítica de los sobrenadantes de células mononucleadas activadas. Con Cry 1Ac.

BIBLIOGRAFÍA REFERIDA

1. Joklik, Willett, Amos, Wilfert. Zinsser Microbiología. Editorial Médica Panamericana, Vigésima edición: 1998:p.11-5;
2. Koneman Elmer W., Allen S.D., Janda M.W., Schreckenber P.C.,Winn Washington C. Diagnóstico Microbiológico. Editorial Médica Panamericana, Quinta edición;1999:p. 3-4
3. Guyton Hall. Tratado de Fisiología Médica. Editorial Mc Graw Hill, Décima edición;2001:p. 489-490.
4. García TF. Los antígenos. Fundamentos de inmunología. México. Textos Universitarios UNAM. Primera edición; 1997:p.15,20-2.
5. Bach Jean Francois. Inmunología. Mexico. Limusa, Primera edición; 1984:p.18,63,114
6. Estrés Oxidativo: [serie en internet] [18julio05]. Disponible en: http://solea.quim.ucm.es/teach/biol/neuropatologia_040403/ESTRES_OXIDATIVO.pps
7. Hooper C. The new age of vaccines adjuvants. 1991 J NIH Res 3:21-23.
8. Eldridge JH, et al. Biodegradable microspheres as vaccine delivery system. Mol Immunol.1991;28:287-94.
9. Hackett J. Salmonella-based vaccine.1998:p.8:5-11.
10. Czersinsky C, Russell MW, Lycke N, Lindbland M, Holmgren J. Oral administration of streptococcal antigen coupled to cholera toxin B subunit evokes strong antibody response in salivary glands and extramucosal tissues. Infect Immun 1989;57:1072-1077.
11. Hui GSN, Chang SP, Gibson H, Hashimoto A, et al., Influence of adjuvants on the antibody specificity to the *Plasmodium falciparum* major merozoite surface protein, gp 195. J Immunol 1991;147:3935-41.
12. Rodríguez Orozco AR. El reto de obtener respuestas inmunogénicas en mucosas. Uso de coadyuvantes. México, D.F. 2003:161165
13. Elson CO, Dertzbaugh M. Mucosal adjuvants. In: Mucosal immunology. Washington: Academic Press, 1999;p 817-838.
14. Brousseau R, Masson L. *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal toxins: genes structure and mode of action. Biotechnol Adv 1988;6:697-724

15. Brown Kelly L. and Whiteley H. R. Isolation of the Second *Bacillus thuringiensis* RNA polymerase That Transcribes from a Crystal Protein Gene Promoter. USA; washington.1990:p.6682-6688.
16. Soberón M, Bravo Alejandra. *Bacillus thuringiensis* y sus toxinas insecticidas. [Serie en internet].[13junio05]. Disponible en: <http://biblioweb.dgsca.unam.mx/libros/microbios/Cap12/videos/c12an1.html>.
17. Cowles E.A. Yunovitz Hermona. Charles J.F. and Gill Sarjeet S. Comparison of Toxin Overlay and Solid-Phase Binding Assays to Identify Diverse Cry 1Ac Toxin-Binding Proteins in *Heliothis Virescens* Midgut. California.1995:p.2738-2744.
18. Lukac M.H. Jaquet Francoise. Luethy Meter. Huetter R. And Dietmar G.B. Characterization of Monoclonal Antibodies to a Crystal Protein of *Bacillus thuringiensis* subsp. *Kurstaki*. Switzerland, Zurich.1986:p.228-232.
19. Widner WR, Whiteley HR. Two Highly Related Insecticidal Crystal Proteins of *Bacillus thuringiensis* Subs. *Kurstaki*. Possess Different Host Range Specificities. 1988;965-974.
20. Custodio Alexandre M. *Bacillus thuringiensis*. [serie en internet]. 13junio05]. http://bioinformatica.uab.es/biocomputacio/treballs00-1/custodio/Bt_pag_ppal.htm.
21. Kasman M Laura. Lukowiak A.A. Garczynsky S.F. Mcnall R.J. Youngman Phil and Adang M.J. Phage Display of Biologically Active *Bacillus thuringiensis*. Toxin. USA. Georgia.1998:2995-3003.
22. Li J., Derbyshire D.J., Promdonkoy and Ellar D.J. Structural implications for the transformation of the *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins from water-soluble to membrane-inserted forms. USA, Cambridge.2001:p. 571-7.
23. Nachimuthu Saraswathy, Polimetla Ananda Kumar. Protein engineering of δ -endotoxins of *Bacillus thuringiensis*. Chile, Valparaíso. 2004; 178-188;
24. Prasad SSSV, Shetna YI. Enhancement of immune response by the proteinaceous crystal of *Bacillus thuringiensis*. Biochem Biophys Res Commun 1975;62:517.
25. Prasad SSSV, Shetna YI. Antitumor immunity against YAS after treatment with the proteinaceous crystal of *Bacillus thuringiensis*. Indian J Exp Biol 1976;14:285.

26. Vázquez RI, Moreno FL, Nery BL, et al. *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac protoxin is potent systemic and mucosal adjuvant. Scand J Immunol 1999;49:578-584.
27. Rodríguez AR, Carrazco-Daza D, Rico-Rosillo MG. The adjuvant *Bacillus thuringiensis* Cry 1Ac protoxin is a potent monocyte activator a mitogen. ACI international Supplement 2, 2000. Session Infection and Immunity "In XVII International Congress of Allergology and Clinical Immunology". Sidney, Australia. Seattle: Hogrefe and Publishers,2000;p 766.
28. Rodríguez Orozco Alain R. Rico Rosillo G. and López Revilla Rubén. The effect of Cry 1 Ac on Human Monocytes and Neutrophil Activation. México. D.F. 2005;p. 64-65.
29. Rodríguez-Orozco AR., Plaza A. Complement fixation and immune complexes formation are involved in the adjuvant activity induced by the novel adjuvant CryAc from Bt. International immun, 2004 in press.
30. McClintock JT, Shaffer CR, Sjoblad Rd. A comparative review of the mammalian toxicity of *Bacillus thuringiensis*-based pesticides. Pestic Sci 1995; 45:95-105.

Bibliografía consultada

31. A comparative review of the mammalian toxicity of *Bacillus thuringiensis*. Pestic Sci pesticides -based 1995;45:95-105.
32. García Yáñez J. Sánchez Yáñez J.M. y López Barbosa E.C. Produccion de bioinsecticida a base de *Bacillus thuringiensis*; minirevision. México, Morelia.2000;p.29-34
33. Magni RA. M.R. Inmunología e inmunoquímica fundamentos. Quinta edición.1996. Editorial Panamericana.
34. Rojas Hernandez S., Rodríguez Morroy M.A., López Revilla R., Resendiz Albor and Moreno Fierros L. Intranasal Coadministration of the Cry 1Ac Protoxina with Amoebal Lysates increases Protection Against *Naegleria floweri* Meningoencephalitis.2004; 4368-4375..

11. ANEXOS

Equipo y reactivos.

1) RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute) con L –glutamina)

Descripción:

Formulación estándar con D-glucosa y bicarbonato de sodio, puede complementarse individualmente con L-glutamina

Las aplicaciones:

RPMI 1640 es un medio de cultivo celular básico usado para una gama amplia de aplicaciones. Para perfeccionar el cultivo celular de ciertos tipos de células puede complementarse con el suero, vitaminas y aminoácidos.

Modo de Preparación.

1. Mida 5% menos de agua destilada del volumen total deseado de medio, usando un recipiente que pueda contener el volumen deseado.
2. Agregar el medio en polvo en agua a una temperatura de 15 – 30 °C (cuarto de temperatura) revolviendo con cuidado. (No usar agua caliente).
3. Enjuague dentro y fuera del paquete para remover todo los rastros de polvo que haya.
4. Agregar 2.0 g. de NaHCO_3 por cada litro de medio.
5. Diluir al volumen deseado con agua destilada hasta disolver.
6. Ajustar el pH* del medio a 0.2-0.3 debajo del deseado para trabajar. Se recomienda usar 1N NaOH o 1N HCl(agregar lentamente). Después de ajustar el pH, guardar el medio en un contenedor, hasta que este sea filtrado.

7. Esterilizar inmediatamente por filtración de membrana.

8. Esterilizar por filtración con un filtro milipore de 0.22µm

* Unidades de pH generalmente suben a 0.1 - 0.3 en filtración.

2) Agua bidestilada

Propiedades Químicas y Físicas.

Formula: H₂O

Densidad: 1g/ml³

pH : 7

Estado: Liquido

Color: Incolora

Olor: Inodora

Punto de Ebullición: 96°C

3) Alcohol 70 %

Modo de preparación.

Mezclar 700 ml de alcohol etílico absoluto con 300 ml de agua bidestilada.

4) Rojo de Fenol indicador pH 6.4 – 8.2

Propiedades Químicas y Físicas.

Formula: C₁₉H₁₄O₅S

Estado: Sólido

Color: rojo

Olor: débil

Solubilidad: Casi insoluble en agua.

5) Fenol 3 %

Propiedades Químicas y Físicas.

Formula: C_6H_6O

pH : 5 (50 g/l 20°C)

Estado: Sólido

Color: Incoloro

Olor: Característico

Punto de Fusión: 40.8 °C

Punto de ebullición: 181.8 °C

Solubilidad: Agua, etanol y cloroformo

Modo de Preparación.

Pesar 3 g. de cristales de fenol y disolverlos en 100 ml de agua bidestilada.

6) Azul de Tripano 4%

Propiedades Químicas y Físicas.

Formula: $C_{34}H_{24}N_6Na_4O_{14}S_4$

pH : 9.8

Estado: Sólido

Color: Azul oscuro

Olor: Característico

Punto de Fusión: 300 °C

Solubilidad: Agua e insoluble en etanol

Modo de Preparación.

Pesar 4 g. de Azul de Tripano y disolverlos en 100 ml de agua bidestilada.

7) Solución salina 0.85% (NaCl)

Propiedades Químicas y Físicas.

Formula: NaCl

Masa molar: 58.5 g/mol

Densidad: 1.03 g/ml³

pH: 7

Estado: Sólido

Color: Incoloro

Olor: Característico

Solubilidad: Agua

Modo de preparación.

Pesar 8.5 g de NaCl y aforar con agua bidestilada hasta 1000ml.

8) Ficol-Hypaque.

Densidad de 1.077 g/ml. Líquido, incoloro. Mantenerse a temperatura de 4°C.

9) PHA [2µg/ml].(Fitohemaglutinina)

Lectína o también denominada mitógeno que estimula la multiplicación *in Vitro* de diferentes estirpes celulares, cuando estas se encuentran en suspendidas en un medio de cultivo dentro de ellas los linfocitos.

10) Suero Fetal Bovino.

Inactivar el suero (desnaturalizar el sistema complemento) en un baño maría durante 30 min. A 55 °C. Esterilizar por medio de filtración con un filtro milipore de 0.22µm.

11) Extracción de sangre.

Se utilizo sangre periférica, extraída por punción venosa con vacutainer en un tubo con heparina.

12) Tubo 0.5 de la Escala de Mc Farland (estándar de sulfato de bario).

Modo de Preparación.

0.5 ml de BaCl₂ 0.048 M (1.175% peso/volumen de BaCl₂ 2H₂O) con 99.5 ml de H₂SO₄ al 1% v/v (0.36N), que es la mitad de la densidad estándar No.1 de la Escala. Este estándar corresponde aproximadamente a 1.5×10^8 UFC/ml.