

# El nuevo adyuvante de mucosas Cry1Ac potencia la capacidad de células mononucleadas humanas de inhibir el crecimiento bacteriano

Alain R. Rodríguez-Orozco,\* Francisco Ayala-Mata,\*\* Rebeca Tinoco-Martínez,\*\* Lorena Cabrera-Navarro\*\*

\* Laboratorio de Posgrado de Inmunología. Facultad de Medicina Dr. Ignacio Chávez.

\*\* Escuela de Quimicofarmacobiología. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

## INTRODUCCIÓN

Existen pocas sustancias capaces de ejercer un potente efecto adyuvante en las mucosas y que, por otro lado, sean bien toleradas por el hombre. La búsqueda de sustancias con estas propiedades beneficiaría el manejo de las infecciones y el diseño de vacunas.<sup>1</sup> Cry1Ac de *Bacillus thuringiensis* es una protoxina con acciones inmunogénica y adyuvante tan potente como toxina del cólera.<sup>2</sup> Se ha reportado que Cry1Ac no es tóxica en humanos a las dosis en que se usa convencionalmente como biopesticida, es resistente a la proteólisis y es estable a pH alcalino<sup>3,4</sup> y recientemente ha llamado la atención para ser conjugada o coadministrada con otros antígenos y ser usada como acarreadora de péptidos vacunales.

Este trabajo se realizó para conocer si sobrenadantes de cultivo de células mononucleadas humanas tratadas con la toxina Cry1Ac podrían inhibir el crecimiento de bacterias reconocidas como importantes patógenos de mucosas.

## MATERIAL Y MÉTODOS

La toxina Cry1Ac recombinante usada en el estudio fue donada por el profesor Benito Pereira, de la Universidad Autónoma de Nuevo León, con 99.6% de pureza y examinada en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) para confirmar la calidad del producto obtenido. Las células mononucleadas humanas se

obtuvieron de donantes sanos, por aislamiento en gradientes de Ficoll-Hypaque ( $d = 1077$ ) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). Se tomaron las células de la interfase y se lavaron tres veces en solución amortiguadora de fosfatos. La suspensión celular se ajustó a  $2 \times 10^6$  células/mL en medio RPMI 1640 enriquecido con suero fetal bovino 10%.  $100 \mu\text{L}$  de la suspensión celular se depositaron en placas de cultivo de 96 pocillos (Corning, CA, USA), un grupo de células recibió Concanavalina A ( $5 \mu\text{g/mL}$ ), otro grupo fue tratado con concentraciones dobles seriadas de Cry1Ac partiendo de  $250 \mu\text{g/mL}$  y como control un grupo de células permaneció en medio de cultivo sin recibir tratamiento alguno. Muestras y controles fueron procesados por triplicado e incubados a  $37^\circ\text{C}$ , con 5%  $\text{CO}_2$  en ambiente húmedo por 72 horas y luego los sobrenadantes fueron recolectados y depositados sobre discos de papel Whatman número 40, los cuales fueron posteriormente incubados a  $35^\circ\text{C}$  24 horas.

Las bacterias usadas en los ensayos fueron aisladas de pacientes con infecciones recurrentes de mucosas en el Hospital Infantil de Morelia "Eva Sámano" de la Secretaría de Salud. El crecimiento bacteriano tuvo lugar en medio Soya-triptasa a  $37^\circ\text{C}$  por un periodo de cuatro a seis horas y las cepas fueron transferidas a Agar Muller Hinton; luego los discos se colocaron sobre el agar y se constató la inhibición del crecimiento bacteriano a las 24 horas, por difusión en el agar. Se calcularon los diámetros

**Cuadro 1.** Efecto inhibitorio máximo del crecimiento bacteriano inducido por sobrenadantes de cultivo de células mononucleadas humanas tratadas con Cry1Ac.

Cepa aislada/ dilución Cry1Ac	Inhibición respecto a antibiótico (%)	Inhibición respecto a células no tratadas (%)	Inhibición respecto a células con ConA (%)
<i>S. aureus</i> /1:4	50 ± 4	125 ± 16.1	111.1 ± 7.5
<i>P. mirabilis</i> /1:4	100 ± 8.5	171.4 ± 12	133.3 ± 8.1
<i>P. aeruginosa</i> /1:16	70.5 ± 8.2	171 ± 12.2	150 ± 8.3
<i>Salmonella sp</i> /1:2	66.6 ± 5.4	114.2 ± 8.4	100 ± 7.4

Se eligió como antibiótico de referencia amikacina, por ser de los antibióticos probados (ampicilina 10 mg, ácido nalidixico 30 mg, trimetropín-sulfametoxazol 1.25 mg/ 23.75 mg, amikacina 30 mg) el que mostró mayor efecto inhibitor del crecimiento bacteriano en las cepas estudiadas, con diámetros promedio de los halos inhibitorios siguientes: *S. aureus* (14 mm), *P. mirabilis* (11 mm), *P. aeruginosa* (13 mm) y *Salmonella sp* (12 mm).

Se utilizaron como cepas controles *P. aeruginosa* ATCC 27853 y *S. aureus* ATCC 25923.

de los halos de inhibición y los resultados fueron informados como por ciento de inhibición del crecimiento bacteriano de los sobrenadantes de células mononucleadas tratadas con Cry1Ac respecto a sobrenadantes de células mononucleadas no tratadas, respecto a sobrenadantes de células mononucleadas tratadas con ConA y respecto al antibiótico al que las cepas bacterianas resultaron más sensibles (amikacina). Los experimentos se hicieron por triplicado y se usó la *t* de Student para evaluar la significación estadística, la cual se aceptó cuando fue mayor al 95%.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Ni Cry1 Ac pura, ni sobrenadantes de cultivos de células no tratadas inhibieron el crecimiento bacteriano y la inhibición del crecimiento bacteriano fue mayor en células tratadas con Cry1Ac que en células tratadas con un mitógeno policlonal ( $P < 0.05$ ) para *P. aeruginosa*, *P. mirabilis* y *S. aureus*. El cuadro 1 muestra los efectos inhibitorios máximos del crecimiento bacteriano obtenidos con los sobrenadantes de cultivos de células mononucleadas humanas tratadas con Cry1Ac. Este efecto estuvo en relación con la dosis de Cry1Ac aplicada y con la cepa bacteriana estudiada y estuvo ligado a la producción de mediadores solubles por células tratadas con Cry1Ac porque dicho efecto se atribuyó al sobrenadante de cultivo de células mononucleadas tratadas con Cry1Ac y no a la toxina *per se*. La cantidad y tipo de mediadores solubles parecen tener un efecto selectivo sobre el crecimiento de cada una de las cepas bacterianas estudiadas y, por otro lado, la inhibición del crecimiento bacteriano inducido en células mononucleadas humanas tratadas con Cry1Ac fue

superior al alcanzado cuando células mononucleadas se enfrentaron a un mitógeno policlonal; esto parece indicar que la estimulación antígeno específica con Cry1Ac tiene mayor impacto sobre los mecanismos de defensa inespecífica de células mononucleadas que el que se obtiene cuando estas células son tratadas con un mitógeno policlonal. Estos datos están en relación con el hecho que Cry1Ac induce potentes estallidos respiratorios en monocitos que llevan a la liberación de especies reactivas del oxígeno e hipocloritos que tienen acción bactericida<sup>5</sup> y que induce la activación de múltiples poblaciones celulares implicadas en la defensa contra patógenos de mucosa que culminan con la producción de altos títulos de IgA e IgG tanto en compartimientos sistémicos como de mucosas.<sup>2</sup> La obtención de mayor inhibición con antibiótico al que las cepas aisladas resultaron sensibles que con sobrenadantes de células tratadas con Cry1Ac apunta a la necesidad de caracterizar en los sobrenadantes los factores responsables de este efecto a fin de obtener una respuesta más potente. Aun cuando como limitación del estudio tenemos que se probaron un pequeño número de antibióticos, los datos resultaron útiles para demostrar que Cry1Ac indujo un efecto similar al obtenido con antibióticos.

Recientemente en nuestro laboratorio hemos encontrado que Cry1Ac induce citocinas específicas y posibilita la sobreexpresión de moléculas del sistema mayor de histocompatibilidad en monocitos y linfocitos y que estos mecanismos pueden estar involucrados en los efectos adyuvantes e inhibitorio del crecimiento bacteriano que tienen como blanco importante a fagocitos profesionales (datos enviados a publicación). Concluimos que Cry1Ac potencia mecanismos de respuesta del organismo contra bacterias

en células mononucleadas humanas. Este efecto es atribuible a factores solubles producidos por estas células luego de ser activadas con Cry1A y que favorecen la eliminación de antígenos provenientes de bacterias patógenas en las mucosas. Se sugiere caracterizar los factores solubles involucrados en estos efectos por su aplicación para la formulación de nuevos adyuvantes y antimicrobianos.

#### REFERENCIAS

1. Rodríguez-Orozco AR. The difficulty of obtaining immunologic response at mucosae. Use of adjuvants. *Rev Alerg Mex* 2003; 50: 161-5.
2. Vázquez RI, Moreno-Fierros L, Nery-Bazán L, de la Riva GA, López-Revilla R. *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac protoxin is a potent systemic and mucosal adjuvant. 1999. *Scand J Immunol* 1999; 49: 578-84.
3. McClintock JT, Schaffer CR, Sjoblad RD. A comparative review of the mammalian toxicity of *Bacillus thuringiensis*-based pesticides. *Pestic Sci* 1995; 45: 95-105.
4. Hofte H, Whiteley H. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol Rev* 1989; 53: 242-55.
5. Rodríguez-Orozco AR, Rico-Rosillo G, López Revilla R. The effect of Cry1Ac on human monocytes and neutrophil activation. 2005. *Allergy Clin Immunol Int-J World Allergy Org* 2005; 17: 64-5.

*Reimpresos:*

**Dr. Alain R. Rodríguez-Orozco**

Laboratorio de Posgrado de Inmunología.  
Facultad de Medicina Dr. Ignacio Chávez  
Retorno del Colegio Militar No. 145  
Col. Chapultepec Sur  
58260, Morelia, Mich.  
Correo electrónico: arorozco@hotmail.com

*Recibido el 17 de julio de 2006.  
Aceptado el 21 de febrero de 2007.*