

Efecto de la toxina Cry1Ac de *Bacillus thuringiensis* sobre el crecimiento de algunos hongos alergénicos aislados de pacientes con rinitis alérgica

Alain R. Rodríguez-Orozco^{1,2}

Héctor Ruiz-Reyes^{1,2}

Salvador Sánchez-Nafarrate^{1,2}

¹Laboratorio de Inmunología. División de Postgrado. Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas "Dr. Ignacio Chávez". Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán, México. ²Instituto de Investigación Científica en Temas de Familia, Alergia e Inmunología

Effect of the Cry1Ac toxin from *Bacillus thuringiensis* over the growth of some allergenic fungi isolated from patients whose suffer from allergic rhinitis

Abstract. Cry1Ac is a potent mucosal adjuvant. This work was undertaken to evaluate the effect of the Cry1Ac toxin from *Bacillus thuringiensis* over growth up of allergenic fungi. The fungi were isolated from nasal exudates in patients with diagnostic of allergic rhinitis and positive skin prick test to allergenic fungi. The fungi isolated were identified morphologic and by Biolog system and agar diffusion test was done to evaluate the effect of the Cry1Ac toxin over the fungi growth up. The following fungal genera were identified: *Absidia*, *Aspergillus*, *Alternaria*, *Penicillium*, *Eupenicillium*, *Fusarium* and *Cladosporium*. The highest inhibition of growth was obtained for *Alternaria* to a concentration 31.25 µg/mL of toxin. This inhibition corresponded to 100% of the inhibition achieved with Amphotericin B. We suggest to explore the inhibitory effect of Cry1Ac on the growth up of different genera and species of pathogenic fungi via molecular standardized assays.

Key words: Diagnostic, inhibitory effect, microbial identification.

Resumen. Cry1Ac es un potente adyuvante en mucosas. Este trabajo se realizó con el objetivo de evaluar el efecto de la toxina Cry1Ac de *Bacillus thuringiensis* sobre el crecimiento de hongos alergénicos. Los hongos fueron aislados de exudados nasales de individuos con diagnóstico de rinitis alérgica y que además habían presentado prueba de hipersensibilidad cutánea inmediata positiva a hongos, mediante la prueba de Prick. Los hongos aislados se identificaron morfológicamente y por sistema Biolog, posteriormente se evaluó el efecto que tenía Cry1Ac sobre su crecimiento en ensayos de sensibilidad por difusión en agar. Se identificaron los siguientes géneros fúngicos: *Absidia*, *Aspergillus*, *Alternaria*, *Penicillium*, *Eupenicillium*, *Fusarium* y *Cladosporium*. Se obtuvo la inhibición máxima del crecimiento de *Alternaria* a una concentración de 31.25 µg/mL de la toxina, esta inhibición correspondió con el 100% de la inhibición alcanzada con Anfotericina B. Sugerimos investigar de una manera más profunda el efecto inhibitorio de Cry1Ac en su forma pura, sobre el crecimiento de diferentes géneros y especies de hongos patógenos, mediante el uso de ensayos estandarizados a nivel molecular.

Palabras clave: diagnóstico, efecto inhibitorio, identificación microbiana.

Received 16 August 2008; accepted 12 June 2009.

Recibido 16 de agosto 2008; aceptado 12 de junio 2009.

Autor para correspondencia: Alain R Rodríguez-Orozco
arorozco69@yahoo.com.mx

Introducción

La rinitis alérgica es producida por la inflamación de las fosas nasales, y puede ser provocada por aeroalergenos provenientes de ácaros, epitelios de animales, pólenes y hongos. Los síntomas más frecuentes son rinorrea, prurito nasal, estornudos y obstrucción nasal. La inflamación de la mucosa nasal se caracteriza por un infiltrado celular que incluye; eosinófilos, células cebadas, linfocitos T y macrófagos, estas células liberan mediadores proinflamatorios como: histamina, leucotrienos, prostaglandinas y citocinas que modulan la respuesta alérgica (Sacre-Hazouri, 2008).

Los hongos como aeroalergenos

La inhalación de estructuras fúngicas (conidios, fragmentos de hifas) pueden inducir patología alérgica respiratoria, tanto de vías aéreas superiores como inferiores, en personas atópicas. Varias de las estructuras fúngicas presentes en el hábitat del paciente atópico (Martínez *et al.*, 2002) contienen moléculas como glucoproteínas, proteínas y polisacáridos, que desencadenan reacciones de hipersensibilidad de tipo I mediada por IgE, estas pueden ser reveladas a través de las pruebas de hipersensibilidad cutánea que tradicionalmente realiza el médico alergólogo. Algunos de los géneros de mayor interés alergológico en México son: *Alternaria*, *Cladosporium*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Helminthosporium*, *Fusarium*, *Mucor*, *Rhizopus* y *Absidia* (Ruiz-Reyes y Rodríguez-Orozco, 2006).

Bacillus thuringiensis (Bt)

Bt es una bacteria Gram positiva, aerobia estricta, durante su ciclo de vida presenta dos fases bien diferenciadas: la de crecimiento vegetativo y la de esporulación. Durante esta última la bacteria produce proteínas en forma de inclusiones cristalinas (endotoxinas Cry) con actividad insecticida, o que

ha permitido su uso amplio en la agricultura (Sauka *et al.*, 2007). La protoxina Cry1Ac se inserta en la membrana de células epiteliales del intestino medio de varios insectos, generando poros que inducen la entrada y salida de diferentes iones y cationes, esto conduce a shock osmótico y muerte del insecto (Ruiz de Escudero *et al.*, 2006).

Efecto inmunogénico y adyuvante de Cry1Ac

Inmunogenicidad es la capacidad que tienen los antígenos de interactuar con efectores de la respuesta inmunológica y desencadenar una respuesta inmunitaria, por otra parte, los coadyuvantes 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. Las mucosas son un sistema difícil para la obtención de respuestas inmunogénicas y la búsqueda de adyuvantes de mucosas potentes e inocuos es una meta en el desarrollo de vacunas y en la lucha contra patógenos que invaden las mucosas (Rodríguez-Orozco, 2003). En un estudio realizado por Rojas-Hernández *et al.* (2004), observaron que la coadministración intranasal de la protoxina Cry1Ac con lisados de amibas incrementa la inmunidad protectora contra ratones infectados con *Naegleria fowleri*, aumentando los niveles de inmunoglobulina G e inmunoglobulina A (Rojas-Hernández *et al.*, 2004). Por otra parte, se obtuvo una potente respuesta de proliferación de monocitos cuando se administró la protoxina Cry1Ac junto con un lisado de *Streptococcus pyogenes* que cuando solo se administró el lisado bacteriano (Rodríguez-Orozco, 2006). Este estudio mostró que la protoxina Cry1Ac potencia la respuesta celular contra patógenos de mucosa; esto resulta importante en el diseño de vacunas y el manejo de infecciones. Se ha señalado que las dosis a las que se usa Cry1Ac como pesticida en la agricultura no inducen toxicidad en modelos marinos y que su toxicidad se ejerce preferencialmente sobre insectos como coleópteros y lepidópteros (McClintock *et al.*, 1995). Los costos de

producción de Cry1Ac son relativamente bajos, y resulta atractiva la idea de disponer de un nuevo agente capaz de inhibir el crecimiento de patógenos que se asocian a reacciones de hipersensibilidad en el huésped atópico como sucede con las especies de hongos alergénicos. El presente trabajo se realizó con el objetivo de evaluar el efecto de la toxina Cry1Ac de Bt sobre el crecimiento de algunos hongos alergénicos aislados en individuos atópicos.

Materiales y métodos

Participaron 30 pacientes provenientes del Hospital Vasco de Quiroga del ISSSTE, en la Ciudad de Morelia, Michoacán, en los que se realizó diagnóstico clínico de rinitis alérgica por un médico alergólogo y que además tuvieron prueba de hipersensibilidad cutánea positiva a algún género fúngico.

Pruebas de hipersensibilidad cutánea

Para la realización de las pruebas cutáneas se utilizaron extractos alergénicos en concentración 1:20 p/v (Allerstand, México D.F.) de los siguientes hongos: *Alternaria* sp., *Aspergillus* sp., *Candida* sp., *Helminthosporium* sp., *Cladosporium* sp., *Mucor* sp., *Penicillium* sp., *Eupenicillium* sp., *Absidia* sp. y *Rhizopus* sp. Para la aplicación de los alérgenos se utilizaron lancetas Duotip-Test estériles Lincoln diagnostic, Inc. Decatur, Illinois 62525 EUA), introducidas por rotación a 360° para la penetración del alérgeno a la piel de la cara flexora del antebrazo. Se usaron como control positivo fosfato de histamina [1 mg/mL] y como control negativo solución amortiguadora de fosfatos. Las reacciones se interpretaron según sugerencias del proveedor.

Aislamiento e identificación de hongos

Los exudados nasales practicados en los pacientes fueron colectados con un hisopo estéril y transportados en un tubo

con medio de Stuart, (Bioxon, EUA) para su posterior procesamiento.

Elaboración del medio de cultivo BUG™

Se disolvieron 57 g de BUG™ (BIOLOG) Agar en 1000 mL de agua destilada, se calentó la mezcla a ebullición con agitación constante hasta la disolución, se dejó reposar a 25°C y se ajustó el pH a 7.2 con NaOH 1N o HCl 1N (Olsen, 1996). Se añadió maltosa (Sigma) al 2% con agitación constante, hasta su disolución, y se esterilizó con calor húmedo a 15 lb/pulgada durante 15 min.

Procesamiento de los aislamientos fúngicos

Los exudados fueron sembrados por estría masiva con un hisopo estéril en medios de cultivo sólido agar con dextrosa y papa (ADP) Bioxon, EUA. Las cajas se incubaron a 37°C y 26°C y fueron observadas cada 24 horas para detectar el eventual crecimiento de las colonias, durante no menos de 3 semanas. Las muestras con desarrollo se resembraron e incubaron en las condiciones descritas, para obtener un cultivo puro de cada uno de los hongos. El proceso de resiembra se repitió al menos dos veces y posteriormente los hongos aislados se tipificaron por sus características macroscópicas (aspecto de las colonias, tamaño, forma, color en la superficie o en el reverso, aspecto, textura, coloración, consistencia, rapidez de crecimiento y difusión del pigmento) y micromorfológicas. Para esto último se realizaron preparaciones por disociación montadas en azul de lactofenol, valorando el grosor, presencia o ausencia de septos, números de núcleos, forma y tamaño de esporas, talo y presencia del aparato conidiógeno del micelio. Se evaluó el índice de crecimiento micelial por medición diaria de los diámetros de los micelios por tres semanas (Barnett y Hunter, 1998).

Identificación de los hongos por sistema BIOLOG

Obtención del pre - inóculo: Una vez obtenidas las cepas de

hongos en forma pura en ADP, las células fúngicas aisladas se sembraron en el medio BUG™ (BIOLOG) agar, adicionado con maltosa al 2%, para hongos filamentosos. Se incubaron a 37 °C durante 5 a 10 días, hasta obtener un crecimiento abundante, se evitó la incubación excesiva y la entrada en la fase estacionaria de los hongos filamentosos, con pérdida de viabilidad y actividad metabólica.

Preparación de la suspensión

Una vez desarrollado el hongo filamentoso, se removió el micelio de la superficie de la placa de agar con una varilla de vidrio estéril y se colocó dentro de un tubo de vidrio seco. Se maceró el hongo hasta pulverizarlo en partículas pequeñas y se agregaron 3 mL del fluido FF suministrado por el proveedor (FF INOCULATING FLUID, BIOLOG, Hayward, CA94545, EUA).

Inoculación e incubación de los hongos filamentosos en las microplacas para BIOLOG

Se colocó la suspensión de hongos filamentosos sobre el reservorio multicanal estéril y se incubó a 26 °C, realizando la lectura tras 24, 48, 72 y 96 horas de incubación.

Identificación de los resultados obtenidos con el BIOLOG

Las reacciones positivas para hongos se pusieron de manifiesto por una reacción de turbidez. Los aislados procedentes de exudados nasales fueron recuperados e inoculados en solución salina fisiológica 0.85%, una vez observado el crecimiento de células fúngicas a las 48 horas, fueron sembrados masivamente en medios de cultivo ADP (Bioxon, EUA) a 28°C, durante 5 días. Posteriormente se identificó la morfología de las cepas fúngicas por microcultivo en portaobjetos y tinción con azul de lactofenol. La biotipificación de los aislados fúngicos se complementó en equipo BIOLOG como ha sido propuesto por Praphailong *et al.* (1997). Se seleccionaron solo los géneros que presentaron prueba cutánea positiva en los pacientes estudiados para

evaluar el efecto, que sobre el crecimiento de estos hongos tenían sobrenadantes de cultivo de células mononucleadas estimuladas con Cry1Ac y Cry1Ac *per se*.

Obtención de Cry1Ac

La toxina Cry1Ac recombinante, fue donada por el Dr. Benito Pereyra de la Universidad Autónoma de Nuevo León, México. Ésta se clonó en una cepa transformada de *E. coli* (DH5) y su expresión fue inducida con isopropil -D tiogalactopiranosido (IPTG, EUA) (Vázquez Padrón *et al.*, 2000). La realización de electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) permitió corroborar el peso molecular de la toxina y su pureza del 99.6%.

Obtención de sobrenadantes de células mononucleadas (CMN) estimuladas con Cry1Ac

Las CMN se obtuvieron de sangre periférica de voluntarios sanos y fueron separadas en gradiente de separación Ficoll-paque d= 1.077 (Sarstedt, Inc, Newton, NC 28658, EUA). La viabilidad celular se determinó por exclusión con azul de tripano y se aceptó como suficiente cuando fue mayor al 95%. Las células se sembraron en placas de 96 pocillos de fondo plano a 2×10^5 células / pozo en medio RPMI-1640 completo y suero fetal bovino inactivado 10%, se trataron con concentraciones variables de Cry1Ac (500 µg/mL, 250 µg/mL, 125 µg/mL, 62.5 µg/mL, 31.25 µg/mL, 15.62 µg/mL, 7.81 µg/mL). Las placas se incubaron 72 horas a 37 °C, en una incubadora (CO₂ Incubator – SHEL LAB, EUA) con atmósfera húmeda de CO₂ al 5%. El control negativo consistió en células no tratadas con Cry1Ac. El sobrenadante de los cultivos fue almacenado a -20 °C para su uso posterior.

Valoración del efecto de Cry1Ac en forma pura

Se valoró el efecto de la toxina Cry1Ac en forma pura a concentraciones de 500 µg/mL, 250 µg/mL, 125 µg/mL, 62.5 µg/mL, 31.25 µg/mL, 15.62 µg/mL y 7.81 µg/mL, sobre las cepas de cada uno de los hongos aislados e identificados a

nivel de género.

Efecto de Cry1Ac sobre el crecimiento en agar de hongos alergénicos

Estas pruebas se realizaron por el método de difusión en agar, con un inóculo de $(5 \times 10^2 - 2.5 \times 10^3)$ UFC/mL suspendido en RPMI 1640, e incubación de 24–48 h a una temperatura de 35 °C (Cantón-Lacasa *et al.*, 2001). La técnica Kirby Bauer fue utilizada para la evaluación de los halos de inhibición, Se impregnaron discos de papel filtro con 25µL de: 1) Anfotericina B 50 g/mL (control positivo: sensible), 2) Fluticasona 2 mg/mL (control negativo: resistente), 3) Sobrenadantes de cultivo de células mononucleadas activadas con diferentes concentraciones de toxina Cry1Ac y 4) concentraciones variables de toxina Cry1Ac en forma pura (500 µg/mL, 250 µg/mL, 125 µg/mL, 62.5 µg/mL, 31.25 µg/mL, 15.62 µg/mL, 7.81 µg/mL), se dejaron difundir en el agar donde crecieron los hongos.

La inhibición del crecimiento del hongo se estimó como diámetro del halo de inhibición y se expresó en mm. Se calculó el porcentaje de inhibición del crecimiento de cada hongo obtenido con Cry1Ac respecto al alcanzado con Anfotericina B (antifúngico al que estos hongos fueron sensibles), según la fórmula:

Se utilizaron como cepas control: *Alternaria alternata* ATCC 44501, *Aspergillus niger* ATCC 16404,

Eupenicillium pinetorum ATCC 14770, *Absidia glauca* ATCC 22752 y *Cladosporium cladosporioides* ATCC 38495.

Para participar en el estudio todos los pacientes firmaron una hoja de consentimiento informado y el protocolo fue aprobado por el comité de ética de la División de Postgrado de la Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez” de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

Resultados

Luego de analizar morfológicamente las colonias y someter las muestras a análisis en equipo Biolog se identificaron los siguientes géneros: *Absidia*, *Aspergillus*, *Alternaria*, *Penicillium*, *Eupenicillium*, *Fusarium* y *Cladosporium*.

Ninguno de los sobrenadantes de cultivo de células mononucleadas estimulados con concentraciones variables de Cry1Ac inhibió el crecimiento de las cepas fúngicas evaluadas en los pacientes atópicos, sin embargo, la toxina Cry1Ac pura a una concentración de 31.25 µg/mL, inhibió el crecimiento de *Alternaria* en igual magnitud que 50 g/mL de Anfotericina B. *Absidia* y *Eupenicillium* fueron también inhibidos por Cry1Ac en igual magnitud que con 50 g/mL de Anfotericina B; con una dosis de 500 µg/mL de la toxina (Tabla 1). Se tomó como referencia Anfotericina B porque

Tabla 1. Porcentaje de inhibición del crecimiento fúngico inducido por Cry1Ac respecto al alcanzado con Anfotericina B

Aislado	Dilución de Cry1Ac µg/mL	Toxina Cry1Ac en forma pura respecto a Anfotericina B (%)
<i>Alternaria</i> sp.	31.25	100
	15.62	50
<i>Absidia</i> sp.	500	100
<i>Eupenicillium</i> sp.	500	100

Inhibición del crecimiento fúngico inducida con Cry1Ac respecto a la inhibición del crecimiento del mismo hongo alcanzada con 50 µg/mL de Anfotericina B (antifúngico de referencia al que las cepas resultaron sensibles). No se encontró inhibición del crecimiento a las dosis usadas de Cry1Ac, de los siguientes géneros fúngicos: *Cladosporium* sp., *Fusarium* sp. y *Aspergillus* sp. Se utilizaron como cepas control: *Alternaria alternata*, *Aspergillus niger*, *Eupenicillium pinetorum*, *Absidia glauca* y *Cladosporium cladosporioides*.

fue el antifúngico con el que se obtuvo la inhibición mayor del crecimiento de hongos alergénicos en experimentos previos realizados en nuestro laboratorio.

Discusión

Se conoce que las enfermedades alérgicas respiratorias como la rinitis alérgica pueden ser inducidas por inhalación de moléculas presentes en estructuras fúngicas. Como los hongos alergénicos son patógenos que entran al organismo a través de la mucosa nasal, resulta atractivo inhibir su adhesión, replicación y colonización en las mucosas (Ruiz-Reyes y Rodríguez-Orozco, 2006). En este trabajo, se estudió la capacidad de la toxina Cry1Ac de Bt para inhibir el crecimiento de hongos alergénicos aislados a partir de exudados nasales de pacientes con rinitis alérgica y que están sensibilizados con hongos alergénicos.

En estudios recientes se ha demostrado que fagocitos profesionales, en particular, los monocitos y neutrófilos son un blanco celular importante para explicar el impacto de Cry1Ac sobre el sistema inmune humano. En el año 2005 observamos que Cry1Ac ejercía una potente activación de monocitos y neutrófilos y que se alcanzaba un máximo en los estallidos respiratorios de estas células cuando eran tratadas con 3.9 g/mL y 7.8 g/mL de Cry1Ac respectivamente y este efecto es importante para explicar la actividad fagocítica inducida por la toxina (Rodríguez-Orozco *et al.*, 2005). Al enfrentar los aislados fúngicos provenientes de individuos atópicos a sobrenadantes de cultivo de células mononucleadas tratados con Cry1Ac no se redujo el crecimiento de estos hongos, lo que nos indica que la activación de la fagocitosis en monocitos no parece ser un mecanismo importante en la inhibición del crecimiento de los hongos aislados a diferencia de lo observado con bacterias (Rodríguez-Orozco *et al.*, 2007). Sin embargo, la toxina Cry1Ac en su forma pura indujo inhibición del crecimiento en

forma similar a la alcanzada con Anfotericina B en tres géneros fúngicos. Para obtener un efecto inhibitorio del crecimiento fúngico de los géneros *Eupenicillium* y *Absidia* se requirieron concentraciones de Cry1Ac 16 veces mayores que las requeridas para causar una inhibición similar a la obtenida en *Alternaria*. Llama la atención que el efecto más potente se ha relacionado sobre la reducción del crecimiento fúngico se haya logrado en el género *Alternaria* el cual puede asociarse a rinitis alérgica persistente y asma de difícil control en nuestro medio y suele ser este el principal género al que se dirige la inmunoterapia desensibilizante alergenoespecífica, de tal suerte contar con un preparado capaz de inhibir su crecimiento puede ofrecer nuevas alternativas a la terapia convencional de la enfermedad alérgica en individuos sensibilizados con ese género de hongos.

Con respecto al posible mecanismo por el cual la toxina Cry1Ac inhibe el crecimiento de hongos alergénicos podríamos descartar que sea debido al incremento de especies reactivas del oxígeno (explosión oxidativa) por parte de monocitos (Rodríguez-Orozco *et al.*, 2005) debido a que los sobrenadantes de cultivo de células mononucleadas estimuladas con concentraciones variables de Cry1Ac no inhibieron el crecimiento de los hongos en agar. El efecto inhibitorio de Cry1Ac fue además selectivo sobre algunos hongos alergénicos, lo que depende de la interacción de la toxina con receptores en hongos aún no caracterizados. Sería conveniente estudiar la interacción de Cry1Ac con receptores en la superficie de algunos hongos, estudiar las vías de transducción de señales inhibitorias sobre el crecimiento de estos hongos y caracterizar el efecto de Cry1Ac sobre metabolitos importantes en el ciclo de vida de varios hongos patógenos, no sólo de aquellos en los que constatamos la inhibición del crecimiento en este estudio.

Algunos de los receptores que reconoce Cry1Ac pueden estar distribuidos en varios microorganismos, por ejemplo se conoce que la toxina Cry1Ac reconoce específicamente al carbohidrato N-acetilgalactosamina

(GalNAc) presente en el receptor N-aminopeptidasa (APN receptor) que se encuentra en larvas de insectos (*Maduca sexta*) y se ha propuesto que las toxinas Cry1A interactúan secuencialmente con un receptor a cadherina, que lleva a la formación de una estructura oligomérica del pre-poro que se une a glicosilfosfatidil-inositol anclada al receptor N-aminopeptidasa y que los residuos de triptófano son esenciales para la unión de Cry1Ac a la membrana (Gómez *et al.*, 2006). También se ha sugerido que múltiples toxinas Cry pueden tener el mismo blanco molecular en insectos (Sauka *et al.*, 2007). En estudios relacionados con la bioquímica de las toxinas Cry, se ha referido que la toxina se une con alta afinidad a glicoproteínas de entre 63 y 220 kDa, se cree que la interacción inicial sea entre la toxina y el carbohidrato del receptor, mientras que la unión irreversible esté asociada con una interacción proteína-proteína (Garczynski *et al.*, 1991). Sugerimos buscar si estas u otras proteínas filogenéticamente cercanas pueden explicar los blancos de interacción de Cry1Ac sobre la superficie de hongos patógenos. Por otro lado, sugerimos estudiar si la toxina Cry1Ac puede inhibir la captación de nutrientes por el hongo, a través de la modulación de vías metabólicas importantes para el desarrollo fúngico.

Sabemos que las pruebas de susceptibilidad *in vitro* de los hongos están influenciadas por el criterio para el punto de corte de la concentración inhibitoria mínima; para superar esta limitación nos hemos propuesto evaluar en un panel más extenso de hongos filamentosos el efecto de la toxina sobre el crecimiento de estos hongos según los lineamientos M38-P.

En este trabajo decidimos evaluar el efecto que sobre el crecimiento de los hongos tenían las mismas concentraciones de Cry1Ac que indujeron un aumento en la actividad oxidativa y la fagocitosis en monocitos (Rodríguez-Orozco *et al.*, 2005; 2007); por ser las monocinas y otros productos derivados de monocitos parte importante de los sobrenadantes de cultivo de células mononucleadas estimuladas con Cry1Ac y en los que previamente

comprobamos efectos inhibidores del crecimiento bacteriano (Rodríguez-Orozco, 2006; Rodríguez-Orozco *et al.*, 2007).

El efecto de inhibición de crecimiento de algunos géneros de hongos alergénicos inducido por Cry1Ac está relacionado con la acción directa sobre estos géneros fúngicos y no es mediado por la producción de moléculas provenientes de la interacción de la toxina con células mononucleadas al menos "in vitro".

Finalmente proponemos investigar de una manera más profunda el efecto inhibitorio de Cry1Ac en forma pura, sobre el crecimiento de especies de hongos patógenos mediante el uso de ensayos estandarizados a nivel molecular.

Agradecimientos

Agradecemos la colaboración del Dr. Benito Pereyra de la Universidad Autónoma de Nuevo León, México, por haber donado la toxina Cry1Ac.

Literatura citada

- Barnett H.L., B.B. Hunter 1998. Illustrated genera of imperfect fungi. 4th edition. American Phytopathological Society Press, Saint Paul 218 p.
- Cantón-Lacasa, E., M.E. Mazuelos, A. Ingroff-Espinel, S 2001. Pruebas estandarizadas para la sensibilidad a los antifúngicos. Revista Iberoamericana de Micología. Asociación Española de Micología. Disponible en www.guia.reviveroammicol.com. Capítulo 15.pdf. Consultado 8 de Mayo del 2008.
- Garczynski, S.F., J.W. Crim, M.J. Adang, 1991. Identification of putative insect brush border membrane-binding molecules specific to *Bacillus thuringiensis* d-endotoxin by protein blot analysis. Applied Environmental Microbiology 57: 2816-2820.
- Gómez, I., C. Rausell, J. Sánchez, M. Soberon, A. Bravo, 2006. Structural changes of the Cry1Ac oligomeric pre-pore from *Bacillus thuringiensis* induced by N-acetylgalactosamine facilitates toxin membrane insertion. Biochemistry 45: 10329-10336.
- Martínez, R.V., C. Castañeda, G. Esquivel, S.J. Lazo, V. Velasco, 2002. Fungosporas en el hábitat del paciente asmático en una zona semidesértica en México. Revista Alergia México 49: 2-7.
- McClintock J.T., T.B. Stone, R.D. Sjoblad, 1995. A comparative review of the mammalian toxicity of *Bacillus thuringiensis*-based pesticides. Pesticide Sciences 45: 95-105.
- Olsen W.P., 1996. Automated microbial identification and quantitation. Technologies for the 2000's. 1st edition CRC Press, New York, 13p.
- Praphailong, W., M. Van Gestel, G.H. Fleet, G.M. Heard, 1997. Evaluation of the BIOLOG system for the identification of food and beverage yeast. Letters in Applied Microbiology 24: 455-459.

- Rodríguez Mosquera M, 2000. Rinitis alérgica. Terapéutica del Sistema Nacional de Salud 24: 1-8.
- Rodríguez-Orozco, A.R, 2003. The difficulty of obtaining immunologic responses in mucosae: Use of coadjuvants. *Revista Alergia México* 50: 20-24.
- Rodríguez-Orozco, A.R, 2006. Adjuvant effect of the Cry1Ac protoxin on cellular immunity when is coadministered with a good mucosal pathogen. *Revista Alergia México* 53: 125-129.
- Rodríguez-Orozco, A.R., F. Ayala-Mata, R. Tinoco, L. Cabrera-Navarro, 2007. El nuevo adyuvante de mucosas Cry1Ac potencia la capacidad de células mononucleadas humanas de inhibir el crecimiento bacteriano. *Revista Investigación Clínica* 59: 161-163.
- Rodríguez-Orozco, A.R., G. Rico Rosillo, R. López Revilla, 2005. The effect of Cry 1Ac on human monocytes and neutrophil Activation. *Allergy and Clinical Immunology International Journal of the World Allergy Organization* 17: 64-65.
- Rojas-Hernández S., M.A. Rodríguez-Monroy, R. López-Revilla, A. Reséndiz-Albor, L. Moreno-Fierros, 2004. Intranasal coadministration of the Cry1Ac protoxin with amoebal lysates increases protection against *Naegleria fowleri* Meningoencephalitis. *Infection and Immunity* 72: 4368-4375.
- Ruiz de Escudero, I., A. Estela, M. Porcar, C. Martínez, J.A. Oguiza, B. Escriche, J. Ferré, P. Caballero, 2006. Molecular and insecticidal characterization of a cryII protein toxic to insects of the families Noctuidae, Tortricidae, Plutellidae, and Chrysomelidae. *Applied Environmental Microbiology* 72: 4796-4804.
- Ruiz-Reyes, H., A.R. Rodríguez-Orozco, 2006. Allergic fungi: importance of the standardization of fungal extracts and their application on clinical practice. *Revista Alergia México* 53: 144-149.
- Sacre-Hazouri J.A, 2008. Antagonistas de leucotrienos en el tratamiento de la rinitis alérgica y enfermedades concomitantes. *Revista Alergia México* 55: 164-75.
- Sauka, D.H., J Sánchez , A. Bravo , G.B. Benintende, 2007. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins against bean shoot borer (*Epinotia aporema* Wals.) larvae, a major soybean pest in Argentina. *Journal Invertebrae Pathology* 94: 125-129.
- Vázquez Padrón R., L. Moreno Fierros , L. Neri- Bazán, A.F. Martínez Gil , G.A. de la Riva , R. López-Revilla, 2000. Characterization of the mucosal and systemic immune response induced by Cry1Ac protein from *Bacillus thuringiensis* HD 73 in mice. *Brazilian Journal of Medicine Biological Research* 33: 147-155.

