

# La protoxina Cry1Ac de *Bacillus thuringiensis* es un potente adyuvante sistémico y de mucosas

Rubén López-Revilla<sup>a</sup> y Leticia Moreno-Fierros<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Biología Molecular, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, San Luis Potosí, S.L.P. [rlopez@ipicyt.edu.mx](mailto:rlopez@ipicyt.edu.mx) e <sup>b</sup>Inmunidad en Mucosas, UBIMED, FES-Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, Avenida de los Barrios 1, Los Reyes Iztacala, 54090 Tlalnepantla, Méx. [lemofi@servidor.unam.mx](mailto:lemofi@servidor.unam.mx)

Hace unos siete años Roberto Vázquez Padrón - investigador del Centro de Ingeniería y Genética y Biotecnología de La Habana que vino a iniciar la producción de esporas de *Bacillus thuringiensis* en el Departamento de Bioingeniería y Biotecnología del CINVESTAV- nos propuso iniciar una colaboración en el campo de la inmunología de mucosas, al que nos habíamos introducido por nuestro interés en la amibiiasis intestinal.

Las esporas de variedades selectas de *B. thuringiensis* son asperjadas sobre cultivos destinados para la alimentación humana o animal con el propósito de combatir insectos perjudiciales por el efecto entomocida de protoxinas de naturaleza proteínica que forman agregados con aspecto de cristales alrededor de las esporas y que por ello son denominadas proteínas “Cry”. Las protoxinas, activadas en el intestino de larvas que han comido fragmentos de hojas, debilitan a los insectos y disminuyen el daño a los cultivos. Algunos genes Cry han sido empleados con éxito para obtener plantas transgénicas (“Bt”) resistentes a insectos.

La propuesta de Roberto consistía en investigar si la Cry1Ac - protoxina inocua para humanos y animales aprobada hacía tiempo por la FDA y la EPA- serviría como vehículo para desarrollar vacunas orales. Esta idea se basaba en que 1) la Cry1Ac, como otras protoxinas similares, resiste la hidrólisis a su paso por el intestino de los mamíferos por lo cual podría ser un buen acarreador de epítomos para vacunas orales, 2) secuencias codificantes de epítomos relevantes podrían ser insertadas en el gen de Cry1Ac en clones de *Escherichia coli* inducibles que acumulan la protoxina recombinante en cuerpos de inclusión.

Llevamos a cabo un experimento preliminar para determinar si Cry1Ac efectivamente era inmunogénica por vía intragástrica, ya que solamente en este caso el proyecto sería viable. Para asegurar la inmunogenicidad de Cry1Ac por vía intragástrica, coadministramos Cry1Ac junto con toxina de cólera (CTX), el adyuvante de mucosas más potente conocido entonces. Los ratones de los tres grupos testigo recibieron sólo Cry1Ac, sólo CTX o ningún antígeno. Al determinar la respuesta de anticuerpos tuvimos dos gratas sorpresas: 1) en el grupo inmunizado sólo con Cry1Ac los títulos anti-Cry1Ac eran tan altos como los anti-CTX de los ratones que habían sido inmunizados sólo con CTX y 2) en los inmunizados con la mezcla Cry1Ac-CTX el título anti-CTX fue mayor que en los que recibieron sólo CTX. Estos hallazgos indicaron que Cry1Ac es inmunogénica por la vía oral pero además parecía ser un nuevo adyuvante de mucosas de potencia comparable a CTX.

Luego confirmamos que Cry1Ac induce respuestas inmunitarias por las rutas intragástrica, intranasal, rectal y vaginal y demostramos su actividad como adyuvante sistémico y de mucosas para dos antígenos proteínicos: 1) la seroalbúmina bovina y 2) la vacuna recombinante contra la hepatitis B.

Al conocer nuestro trabajo, el Dr. Jesús Kumate nos sugirió probar si Cry1Ac también es adyuvante para los polisacáridos de neumococos. Esta posibilidad era atractiva porque en caso de ser confirmada, la Cry1Ac podría ser empleada para obtener vacunas conjugadas de polisacáridos e

incluso permitir su coadministración por vía mucosa (intranasal, intratraqueal?). Con Saúl Piña y Josué Ruiz demostramos que no es necesaria la conjugación, porque la coadministración de Cry1Ac por vía sistémica e intranasal es igualmente potente como adyuvante para los polisacáridos de neumococos del tipo 6B y de la vacuna polivalente que contiene 23 serotipos diferentes.

Los tres estudiantes de doctorado que estamos terminando de codirigir (Rita Esquivel, Aldo Résendiz y Saúl Rojas) realizaron sus trabajos de tesis en Iztacala y en el Departamento de Biología Celular del CINVESTAV hasta junio de 2004.

La caracterización del efecto inmunogénico y adyuvante de Cry1Ac con ellos y otros colaboradores nos ha permitido

- Demostrar la actividad de la protoxina como adyuvante de un péptido candidato a vacuna contra la infección por HIV
- Determinar que un efecto central de la protoxina es el aumento en la actividad de presentación de antígenos
- Desarrollar un método mejorado para el aislamiento de linfocitos de las placas de Peyer y la lámina propia del intestino delgado y grueso, con el cual hemos caracterizado las subpoblaciones de linfocitos de estos compartimentos y los efectos de Cry1Ac
- Confirmar y extender el conocimiento sobre la regionalización del sistema inmune intestinal basada en las notables diferencias en la calidad de la respuesta y las subpoblaciones de linfocitos en el intestino delgado y grueso.

Recientemente publicamos un trabajo que no deja duda de la utilidad e importancia de Cry1Ac como adyuvante de mucosas y confirma la relevancia de la ruta de inmunización intranasal, ya que en él demostramos que la administración intranasal de la protoxina incrementa la inmunidad innata contra la meningoencefalitis experimental por *Naegleria fowleri*, en tanto que la coadministración de protoxina con lisados amibianos por la misma ruta ;induce inmunidad protectora total contra la infección!

### **Publicaciones pertinentes**

Vázquez RI, Moreno-Fierros L, Neri-Bazán L, de la Riva GA, López-Revilla R. *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac protoxin is a potent systemic and mucosal adjuvant. *Scand J Immunol* 49:578-584, 1999

Moreno-Fierros L, García N, Gutiérrez R, López-Revilla R, Vázquez-Padrón, RI. Intranasal, rectal and intraperitoneal immunization with protoxin Cry1Ac from *Bacillus thuringiensis* induces compartmentalized serum, intestinal, vaginal and pulmonary immune responses in Balb/c mice. *Microb Infect* 2:1-6, 2000

Moreno-Fierros L, López-Revilla R, Reséndiz-Albor AA. Differences between the large and small intestine in the immunodominant amoebic proteins recognized by IgG and IgA antibodies in BALB/*c* mice. *Scand J Immunol* 55:458-469, 2002

Moreno-Fierros L, Ruiz-Medina EJ, Esquivel R, López-Revilla R, Piña-Cruz S. Intranasal Cry1Ac protoxin is an effective mucosal and systemic carrier and adjuvant of *Streptococcus pneumoniae* polysaccharides in mice. *Scand J Immunol* 57:45-55, 2003

Rojas-Hernández S, Rodríguez-Monroy MA, López-Revilla R, Reséndiz-Albor AA, Moreno-Fierros L. Intranasal coadministration of the Cry1Ac protoxin with amoebal lysates increases protection against *Naegleria fowleri* meningoencephalitis. *Infect Immun* 72:4368-4375, 2004