

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



PURIFICACION Y CARACTERIZACION DE UNA  
PROTEINA ANTITUMORAL A PARTIR DE  
*Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis*

POR

EDGAR MENDOZA GAMBOA

Como requisito parcial para obtener el Grado de  
MAESTRIA EN CIENCIAS  
con Especialidad en inmunobiología

DICIEMBRE 1995



7

8

4

TM  
QR82  
.B3  
M4  
c.1



1080073246

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



PURIFICACION Y CARACTERIZACION DE UNA  
PROTEINA ANTITUMORAL A PARTIR DE  
*Bacillus thuringiensis* var.  
*thuringiensis*

Por:  
EDGAR MENDOZA GAMBOA

Como requisito parcial para obtener el Grado de MAESTRIA EN  
CIENCIAS con Especialidad en Inmunobiología

DICIEMBRE, 1995

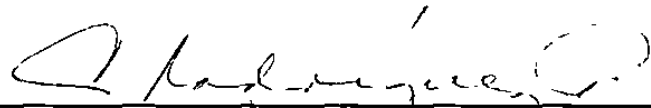
TM  
QR82  
.B3  
M4

Biblioteca Central Maguere  
UANL  
FONDO  
TESIS  
(73246)

B U Rauli Randal Fite  
UANL  
FONDO  
TESIS MAESTRIA


**PURIFICACION Y CARACTERIZACION DE UNA PROTEINA  
ANTITUMORAL A PARTIR DE *Bacillus thuringiensis* var.  
*thuringiensis*.**

Aprobación de la Tesis:



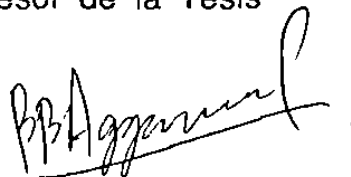
---

Dra. Cristina Rodríguez Padilla  
Director de la Tesis



---

Dr. Reyes S. Tamez Guerra  
Asesor de la Tesis



---

Dr. Bharat B. Aggarwal  
Director externo de la Tesis

**PURIFICACION Y CARACTERIZACION DE UNA  
PROTEINA ANTITUMORAL A PARTIR DE *Bacillus  
thuringiensis* var. *thuringiensis***

Comisión de tesis:

---

Dra. Cristina Rodríguez Padilla  
Presidente

---

Dr. Reyes S. Tamez Guerra  
Secretario

---

Dr. Luis J. Galán Wong  
Vocal

## DEDICATORIA

A mis padres:

Profr. Agustín Mendoza Delgadillo  
Sra. Ma. Elena Gamboa Cásarez

Porque gracias a su amor, esfuerzos y sacrificios he seguido adelante.

A mis hermanos:

Agustín

Laura Elena

Raúl y Dora

Julián Gerardo

Beatriz

Hugo César

Por su cariño y apoyo moral que siempre me han brindado.

Y muy especialmente, a la memoria de mi abuelo:

Sr. Raúl Gamboa Martínez

Por haber sido un ejemplo de honestidad, dedicación y entereza; y de quien guardo los mejores momentos.



## AGRADECIMIENTOS

Mi más sincero agradecimiento a la Dra. Cristina Rodríguez Padilla, por su valiosa asesoría y por haberme brindado la oportunidad de formar parte de su Línea de Investigación sobre *Bacillus thuringiensis* que se ha establecido en la Facultad de Ciencias Biológicas de la U. A. N. L.

Al Dr. Reyes S. Tamez Guerra, por su confianza y apoyo brindado para la realización de éste trabajo. La obtención de éste grado se debe en gran parte a su iniciativa y ayuda incondicional.

Al Dr. Bharat B. Aggarwal, agradezco su valiosa asesoría y por haberme permitido hacer uso de sus instalaciones en el Laboratorio de Investigación de Citocinas del Hospital de Cancerología M. D. Anderson de la Universidad de Texas en Houston, Texas.

Al Dr. Ricardo A. Gómez Flores, por su amistad y consejos brindados durante el desarrollo de éste trabajo.

A mis maestros, muchas gracias por sus enseñanzas y dedicación que contribuyeron en forma significativa a mi formación profesional.

A mis compañeros del Laboratorio de Inmunología y Virología, por su amistad y apoyo brindado durante el desarrollo de éste trabajo.

Agradezco a todas aquellas personas que de alguna u otra manera me apoyaron para la realización de éste trabajo, y que involuntariamente omito.

## TABLA DE CONTENIDO

| Capítulo   | Página |
|--|--------|
| 1. INTRODUCCION. . . . .   | 1      |
| 1.1 Breve Historia de <i>Bacillus thuringiensis</i> . . . . .                                    | 3      |
| 1.2 Clasificación de <i>Bacillus thuringiensis</i> . . . . .                                     | 5      |
| 1.3 Actividad Antitumoral del Cristal.<br>Proteico de <i>Bacillus thuringiensis</i> . . . . .    | 10     |
| 1.4 Objetivos . . . . .  | 13     |
| 2. MATERIALES Y METODOS . . . . .  | 14     |
| 2.1 Microorganismos y Condiciones de<br>Crecimiento . . . . .                                    | 14     |
| 2.2 Producción del Extracto de Cristales y<br>Esporas de <i>Bacillus thuringiensis</i> . . . . . | 15     |
| 2.3 Purificación del Cristal Proteico de<br><i>Bacillus thuringiensis</i> . . . . .              | 16     |
| 2.4 Solubilización del Cristal Proteico de<br><i>Bacillus thuringiensis</i> . . . . .            | 17     |
| 2.5 Cromatografía DEAE-Affigel blue . . . . .  | 18     |
| 2.6 Determinación de la Concentración de<br>Proteínas . . . . .                                  | 18     |
| 2.7 Electroforesis en Geles de Poliacrilamida . . . . .<br>Dodecil Sulfato de Sodio . . . . .    | 19     |
| 2.8 Líneas Celulares . . . . .   | 20     |
| 2.9 Ensayo de Citotoxicidad . . . . .  | 22     |
| 2.10 Efecto del pH en la Bioactividad de<br>la Oncotoxina . . . . .                              | 24     |
| 2.11 Efecto de la Temperatura en la Bioactividad . . . . .<br>de la Oncotoxina. . . . .          | 24     |

| <b>Capítulo</b>  | <b>Página</b> |
|--|---------------|
| 2.12 Efecto de las Enzimas Proteolíticas . . . . .<br>en la Bioactividad de la Oncotoxina . . . . .  | 25            |
| 3. RESULTADOS. . . . .   | 27            |
| 3.1 Electroforesis en Geles de Poliacrilamida . . . . .<br>Dodecil Sulfato de Sodio . . . . .        | 27            |
| 3.2 Ensayo de Citotoxicidad en Cultivos de . . . . .<br>Células Normales y Tumoraes Humanas. . . . . | 28            |
| 3.3 Propiedades Físicoquímicas de la Oncotoxina .  | 28            |
| 4. DISCUSION . . . . .   | 52            |
| 5. CONCLUSIONES. . . . .   | 56            |
| BIBLIOGRAFIA. . . . .  | 57            |

## LISTA DE FIGURAS

| Figura  | Página |
|---|--------|
| 1. Diseño Experimental. . . . .   | 30     |
| 2. Electroforesis en gel de Poliacrilamida Dodecil Sulfato . .<br>de Sodio al 15% del Cristal Proteico de <i>Bacillus</i> . . . . .<br><i>thuringiensis</i> var. <i>thuringiensis</i> Solubilizado . . . . .<br>con NaOH 1M . . . . .                                   | 31     |
| 3. Electroforesis en gel de Poliacrilamida Dodecil Sulfato . .<br>de Sodio al 15% de las Proteínas Purificadas del . . . . .<br>Cristal de <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>thuringiensis</i> . . . . .<br>por Medio de una Columna de DEAE-Affigel blue . . . . . | 32     |
| 4. Electroforesis en gel de Poliacrilamida Dodecil Sulfato . .<br>de Sodio al 15% de la Proteína de 20 kDa (Oncotoxina) . . . . .<br>Purificada a partir del Cristal de <i>Bacillus</i> . . . . .<br><i>thuringiensis</i> var. <i>thuringiensis</i> . . . . .           | 33     |
| 5. Efecto de la Oncotoxina en la Proliferación Celular de . . .<br>Líneas Tumorales de Macrófagos . . . . .   | 34     |
| 6. Efecto de la Oncotoxina en la Proliferación Celular. . . . .<br>del Carcinoma Hepático . . . . .   | 35     |
| 7. Efecto de la Oncotoxina en la Proliferación del Linfoma . .<br>de Células T (Jurkat) y Células B (Raji) . . . . .  | 36     |
| 8. Efecto de la Oncotoxina en la Proliferación Celular. . . . .<br>del Carcinoma Mamario . . . . .  | 37     |



| <b>Figura</b>  | <b>Página</b> |
|--|---------------|
| 9. Efecto de la Oncotoxina en la Proliferación Celular de . . .<br>la Eritroleucemia . . . . .                                 | 38            |
| 10. Efecto de la Oncotoxina en la Proliferación Celular. . . . .<br>del Carcinoma de Ovario. . . . .                           | 39            |
| 11. Efecto de la Oncotoxina en la Proliferación Celular. . . . .<br>de Líneas Tumorales del Sistema Nervioso Central . . . . . | 40            |
| 12. Efecto de la Oncotoxina en la Proliferación de Células . . . .<br>Normales de Fibroblastos . . . . .                       | 41            |
| 13. Efecto de la Oncotoxina en la Proliferación de Células. . . . .<br>Mononucleares Normales de Sangre Periférica. . . . .    | 42            |

## LISTA DE TABLAS

| Tabla   | Página |
|---|--------|
| 1. Efecto de la Oncotoxina en la Proliferación de Líneas . . . . .<br>de Células Normales y Tumorales Humanas . . . . .   | 48     |
| 2. Inhibición de la Proliferación Celular de Varias Líneas . . . . .<br>Tumorales Humanas por la Oncotoxina Derivada del . . . . .<br>Cristal Proteico de <i>Bacillus thuringiensis</i> var.. . . . .<br><i>thuringiensis</i> . . . . . | 49     |
| 3. Efecto del pH en la Bioactividad de la Oncotoxina. . . . .   | 50     |
| 4. Termoestabilidad de la Oncotoxina. . . . .   | 50     |
| 5. Efecto de las Enzimas Proteolíticas en la Bioactividad . . . . .<br>de la Oncotoxina . . . . .   | 51     |

## CAPITULO 1

### INTRODUCCION

La bacteria *Bacillus thuringiensis* es un bacilo del suelo, gram-positivo, aeróbico, esporulado, con flagelos peritricos, que se caracteriza porque después de terminar su crecimiento vegetativo, contiene además de la spora una inclusión cristalina de naturaleza proteica, en forma de diamante o bipiramidal, a la que en 1967 Heimpel designó como delta-endotoxina (1). Esta toxina presenta varias actividades biológicas; la primera y más ampliamente estudiada es su actividad tóxica específica contra larvas de insectos plaga de importancia agrícola y en Salud Pública sin afectar a mamíferos (2, 3), las inclusiones cristalinas de *Bacillus thuringiensis* disueltas en el intestino medio de los insectos liberan una o más proteínas insecticidas de 27 a 140 kilodaltones (kDa); la clasificación de los genes de las proteínas insecticidas del cristal se basa en su espectro insecticida además de la estructura primaria

de las proteínas, asignados en dos grupos: genes *cry* (proteínas insecticidas del cristal) y genes *cytA* (proteínas citolíticas del cristal). Los genes *cryI* codifican proteínas del cristal de 131-138 kDa con actividad específica hacia Lepidópteros, los genes *cryII* codifican proteínas de 70 kDa con actividad específica hacia Lepidópteros y Dípteros, los genes *cryIII* codifican proteínas del cristal de 73.1 kDa específicas hacia Coleópteros, los genes *cryIV* codifican proteínas del cristal de 72.4-134.4 kDa con actividad tóxica específica hacia Dípteros, los genes *cytA* codifican para una proteína de 27 kDa que presenta actividad citolítica contra una variedad de células de vertebrados e invertebrados (4). Se ha reportado una nueva clase de genes de las proteínas insecticidas del cristal; *cryV*, codifican proteínas de 81 kDa tóxicas a larvas de Lepidópteros y Coleópteros (5), y se han clonado dos tipos de genes *cryV*; *cryV<sub>1</sub>* y *cryV<sub>465</sub>* (6). La delta-endotoxina de *Bacillus thuringiensis* presenta actividad nematocida, ya que preparaciones del cristal proteico son letales a huevecillos y larvas de nemátodos zooparásitos tanto *in vivo* como *in vitro* (7, 8, 9, 10). El cristal proteico de *Bacillus thuringiensis* incrementa la respuesta inmune al actuar como adyuvante en ratas y cobayos que han sido inmunizados



a diversos antígenos (11, 12). Además se ha reportado su actividad antitumoral en modelos experimentales murinos que presentaban sarcoma ascítico de Yoshida, carcinoma pulmonar Lewis, leucemia L-1210, carcinoma de Ehrlich, melanoma B16 y fibrosarcoma meth A (13, 14, 15, 16, 17, 18, 19). En este trabajo estudiamos el efecto citotóxico que presenta una proteína purificada a partir del cristal proteico de *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* en cultivos de células normales y tumorales humanas; así también determinamos la estabilidad de dicha molécula a diferentes condiciones de pH, temperatura y digestión enzimática.

### **1.1 Breve Historia de *Bacillus thuringiensis***

El descubrimiento de la bacteria *Bacillus thuringiensis* se realizó en 1901 por el investigador japonés Ishiwata, quien la aisló a partir de larvas enfermas del gusano de seda *Bombix mori* y la denominó *Bacillus sotto* (1, 20). En 1911, el alemán Berliner aisló una bacteria similar a ésta a partir de larvas enfermas de la palomilla de la flor del mediterráneo *Anagasta kuhniella* y en 1915 la denominó *Bacillus thuringiensis*; la describe como un bacilo

esporulado, gram-positivo, con flagelos peritricos, observó que después de terminar su crecimiento vegetativo el bacilo contiene, además de la espora una inclusión parasporal a la cual designó como “Restkörper” o cuerpo de desecho, sugiriendo que estaba formado de material celular que no se requiere para la formación de la espora; también describió que éste cuerpo de desecho inicialmente era esférico incrementándose en tamaño hasta llegar a tener una forma romboidal (21). Mattes en 1927 confirmó las observaciones de Berliner y añadió que el crecimiento del cuerpo de desecho cambiaba el alineamiento de las esporas (22). Posteriormente en 1946 Smith, Gordon y Clarke describieron a *Bacillus thuringiensis* como una variedad de *Bacillus cereus*, porque aparte de su patogenicidad para ciertos insectos y de la forma oblicua de la espora en las células, el organismo era casi indistinguible de *Bacillus cereus* (23). Hannay en 1953, estudiando la esporulación de este microorganismo redescubre el “Restkörper” y confirma las observaciones de Berliner, reportando que las esporas fueron invariablemente acompañadas de cristales en forma de diamante (24). En 1954 Angus demostró que la toxicidad en el insecto estaba asociada principalmente con la inclusión cristalina del bacilo y requería ser solubilizada en soluciones alcalinas o jugo

intestinal del insecto para ser activa (25).

En 1955 Hannay y Fitz-James reportaron que la inclusión cristalina parasporal era de naturaleza proteica y su ingestión era suficiente para causar la muerte a larvas de insectos susceptibles. Las primeras fotografías al microscopio electrónico del cristal parasporal de *Bacillus thuringiensis* demostraron que tiene una forma bipiramidal cuya estructura superficial esta formada por estrías en dirección paralela a la base plana del cristal (26). Así en 1967 Heimpel agrupó a las bacterias cristalíferas como variedades de *Bacillus thuringiensis* y denominó a la toxina del cristal como delta-endotoxina (1).

## **1.2 Clasificación de *Bacillus thuringiensis***

El concepto de dividir a *Bacillus thuringiensis* en variedades fue propuesto por Toumanoff y Vago en 1951, cuando aislaron un microorganismo entomopatógeno formador de esporas a partir de larvas enfermas del gusano de seda, al que llamaron *Bacillus cereus* variedad *alesti* y sugieren que el aislado de Ishiwata y el de Berliner sean también considerados como variedades de *Bacillus cereus* (27).

En base a criterios morfológicos y bioquímicos; sugieren que el aislado de Berliner sea el cultivo tipo para la especie, nombrándolo *Bacillus thuringiensis* variedad *thuringiensis*, el de Ishiwata *Bacillus thuringiensis* variedad *sotto* y el de Toumanoff y Vago *Bacillus thuringiensis* variedad *alesti* (28).

En 1958 y 1959 Heimpel y Angus proponen que los cultivos entomopatógenos podrían estar relacionados con *Bacillus cereus*, sin embargo, presentaban dos diferencias importantes: eran patógenos a insectos y la presencia de un cuerpo parasporal dentro de la célula; lo cual permitió colocarla como una especie separada (29). La clasificación de Heimpel y Angus fue utilizada por varios años, hasta que en 1962 De Barjac y Bonnefoi establecieron los parámetros para la clasificación de *Bacillus thuringiensis* al realizar una serie de pruebas bioquímicas y serológicas con 24 cepas. Dicho estudio señaló que las pruebas básicas para cualquier clasificación eran en primer lugar, la producción de lecitinasa, seguida esta prueba por la utilización de diferentes azúcares. Mediante éstas pruebas se lograron distinguir 6 diferentes grupos de *Bacillus thuringiensis*. La identificación de éstas mismas cepas se efectuó mediante métodos serológicos utilizando antisueros específicos contra el antígeno



flagelar, también llamado "antígeno H", que poseen las células vegetativas móviles de éstas especies; quedando establecido por primera vez el criterio serológico para la clasificación de *Bacillus thuringiensis*. En base a éstos estudios establecieron 6 grupos, llamándolos serotipos H (H1-H6) (30).

J. R. Norris en 1964 realizó un estudio con 46 cepas de bacterias cristalíferas y las sometió a métodos de clasificación en base a pruebas bioquímicas, pruebas serológicas con antígeno H y análisis de esterasa en geles de almidón. Norris concluyó que las pruebas bioquímicas son insuficientes para establecer una clasificación debido a que solamente dan información acerca de las reacciones bioquímicas que pueden ser llevadas a cabo por bacterias, pero no proporcionan información acerca de la naturaleza molecular de las enzimas involucradas, por lo tanto no informan claramente si dos bacterias comparten una característica, ya sea porque están estrechamente relacionadas en algún momento de la evolución y producen enzimas idénticas, o porque simplemente muestran similitudes en la función de ciertas enzimas pero sus estructuras moleculares son diferentes. En cambio, el uso de las reacciones antígeno-anticuerpo de alta especificidad, son de gran importancia

en la taxonomía ya que dan información de la estructura de grandes moléculas; por ésta razón la clasificación basada en reacciones antigénicas tiene mayor significado en la taxonomía de éste tipo de bacterias. Por otra parte, el análisis electroforético de la enzima esterasa es de gran ayuda en la clasificación especialmente porque es más rápido que los métodos bioquímicos y serológicos (31).

En 1967 Heimpel propone que la toxina producida por *Bacillus thuringiensis* sea llamada delta-endotoxina, sin embargo, también se ha sugerido que sólo la porción activa del cristal debe de ser considerada como delta-endotoxina (32). En 1977 Krywienczyk reportó que los cristales podrían ser diferenciados serológicamente y propuso que la serotipificación del cristal sería una herramienta útil en la identificación de los aislados de *Bacillus thuringiensis* (33). Posteriormente en 1978-1981, demostró una correlación entre el tipo de cristal y el espectro de actividad insecticida de las variedades de *Bacillus thuringiensis*. Además se comprobó que el 85% de las cepas con antígenos del cristal idénticos, pertenecen a un serotipo "H" determinado (34). Igualmente realizó un amplio estudio serológico del cristal con 332 aislados de *Bacillus thuringiensis* el cual proporcionó características que permiten clasificarlos en

grupos diferentes (35).

La novena edición del Manual de Bergey, publicada en 1986, distingue a *Bacillus thuringiensis* de *Bacillus cereus* por su patogenicidad a larvas de lepidópteros y por la producción dentro de la célula de un cristal parasporal de naturaleza proteica, paralelo con la formación de la spora. *Bacillus thuringiensis* es clasificado de acuerdo al antígeno flagelar H, forma del cristal, número de antígenos, ciertas propiedades fenotípicas y patrones de ADN de plásmidos, éstos pequeños grupos han sido llamados variedades y subespecies. En 1986 Bergey utiliza el término de variedades para describir a grupos de cepas de *Bacillus thuringiensis* en base al antígeno flagelar, pero que de acuerdo al Código Internacional de Nomenclatura de Bacterias solamente el término subespecie es apropiado para subgrupos taxonómicos de *Bacillus thuringiensis*. Actualmente, H. De Barjac reporta 45 serotipos de *Bacillus thuringiensis* basados en el antígeno H, de los cuales algunos están divididos por subfactores antigénicos (36).

### **1.3 Actividad Antitumoral del Cristal Proteico de *Bacillus thuringiensis***

En 1974 Prasad y Shethna demostraron que la proteína purificada a partir del cristal proteico de *Bacillus thuringiensis* variedad *thuringiensis* inhibió el crecimiento del sarcoma ascítico de Yoshida tanto *in vivo* como *in vitro* (13). La administración de una dosis de proteína a una concentración de 0.1mg/kg durante cinco días por vía intraperitoneal a ratas Wistar que presentaban el sarcoma, resultó en una completa regresión del tumor. En condiciones *in vitro* se observó que a una dosis de la proteína de 1mg/ml reducía la viabilidad celular en un 60% (14). Además observaron que esta proteína inhibió la captación e incorporación de precursores marcados radioactivamente en las macromoléculas; por lo que limita el pool de precursores necesarios para la síntesis de ADN, ARN y proteínas al dañar la integridad de la membrana celular. Esto fue confirmado por la salida de constituyentes celulares marcados con <sup>32</sup>P, proteínas y material que absorbe a 260 nm a partir de las células tumorales que estaban en presencia de esta proteína. Estas observaciones sugieren que la actividad citotóxica de esta proteína

se efectúa al dañar la permeabilidad de la membrana de las células tumorales (15).

En 1985 Zamola y colaboradores observaron que al exponer cultivos de *Bacillus thuringiensis* variedad *thuringiensis* a radiación ultravioleta a 254 nm (60 $\mu$ W) durante 35 a 45 minutos, la actividad antitumoral de su proteína se incrementaba considerablemente en modelos experimentales murinos de la línea C 57BL-6 que presentaban carcinoma pulmonar Lewis (16).

En 1988 Yokoyama y colaboradores purificaron una proteína de 25 kDa a partir de la inclusión parasporal producida por *Bacillus thuringiensis* subespecie *israelensis*. Esta proteína inhibió el crecimiento del cultivo de células de leucemia murina L-1210 a una concentración inhibitoria del 50% de 0.9  $\mu$ g/ml. Interactuando con constituyentes lípidicos de la membrana celular, principalmente con fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina y esfingomiélin. Cuando esta proteína se utilizó en combinación con fármacos anticancerígenos, su actividad citotóxica se incrementó, siendo la de mayor efecto potenciador la bleomicina. El mecanismo de potenciación aún no está claro, pero la interacción entre la proteína de 25 kDa y los lípidos de la membrana celular puede jugar un papel

muy importante (17).

En 1991 Yokoyama y colaboradores evaluaron el sinergismo que existe entre la proteína de 25 kDa purificada a partir del cristal de *Bacillus thuringiensis* subespecie *israelensis* y la bleomicina en modelos experimentales de ratones que presentaban tumores sólidos; carcinoma de Ehrlich, melanoma B16 y fibrosarcoma meth A. Observando que aquella dosis de la proteína (0.3mg/Kg/día) inefectiva cuando se utilizaba por si sola, presentaba una apreciable inhibición del crecimiento del tumor al utilizarse en combinación con bleomicina. La citotoxicidad de esta proteína pudiera deberse a su interacción con fosfolípidos de la membrana celular formando poros que darían origen a una lisis osmótica coloidal (18).

En 1994 Yokoyama y Kohda determinaron que una proteína de 25 kDa purificada a partir de la delta-endotoxina de *Bacillus thuringiensis* subespecie *israelensis* incrementa la citotoxicidad *in vitro* de la bleomicina contra las células de la leucemia murina L-1210, aparentemente por un rompimiento en la cadena de ADN (19).

## 1.4 Objetivos

- 1.- Purificar las fracciones del cristal proteico de *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis*.
- 2.- Determinar en que fracción (es) del cristal proteico de *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* se encuentra la actividad citotóxica.
- 3.- Caracterizar la (s) fracción (es) citotóxicas del cristal proteico de *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis*.

## **CAPITULO 2**

### **MATERIALES Y METODOS**

#### **2.1 Microorganismos y Condiciones de Crecimiento**

La cepa de *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* fue proporcionada por el Laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la U. A. N. L. Se conservó mediante resiembras periódicas cada tres meses en tubos de ensaye con agar nutritivo inclinado pH=7.0 y mediante liofilización, utilizando como soporte leche desnatada estéril al 10% y se mantuvieron en refrigeración a 4°C.



## **2.2 Producción del Extracto de Cristales y Esporas de *Bacillus thuringiensis***

La cepa de *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* fue reactivada en tubos con agar nutritivo inclinado durante 18-24 horas a 30°C. Para la preparación del inóculo se tomó una asada, se sembró en un matraz con 100 ml. de caldo nutritivo, agitándolo constantemente a 200 rpm durante 18 horas a 30°C (Controlled Environment Incubator Shaker). Se tomó un volumen del inóculo y con él se cubrió la superficie del agar de las botellas planas de crecimiento. A partir de las 48 horas se hicieron frotis de los cultivos, hasta que en sus preparaciones se observaran un gran porcentaje de cristales libres y pocas formas vegetativas. El extracto de cristales y esporas se obtuvo a partir de la superficie del agar de las botellas planas de crecimiento con solución de NaCl 1M (Sodium Chloride. Sigma.S-9625). Se centrifugó a 10 000 rpm durante 30 minutos (Centrifuga Beckman J2-21). Se descartó el sobrenadante y el precipitado se lavó tres veces con la misma solución, para finalmente resuspenderlo en agua bidestilada pH=7.0, se guardó en congelación hasta su uso (37, 38).

### **2.3 Purificación del Cristal Proteico de *Bacillus thuringiensis***

El cristal proteico de *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* fue purificado por el método de centrifugación zonal en gradientes de densidad de bromuro de sodio. Se prepararon los gradientes de densidad de bromuro de sodio (Sodium Bromide. Sigma.S-9756) en tubos de centrifuga de polyallomero de 3 1/2" de largo X 1" de diámetro a una concentración de 30, 31.5, 33, 34.5, y 36%. Se mantuvieron en refrigeración durante toda la noche para que se formara el gradiente. Con la ayuda de una pipeta pasteur se adicionó de 1 a 1.5 gramos del extracto rico en cristales y esporas por las paredes del tubo. Se centrifugó a 25 000 rpm durante 90 minutos (Ultracentrifuga Beckman L5-50E, rotor SW-27). Se obtiene una interfase blanquesina que contiene los cristales en abundancia. Se separaron cada una de dichas bandas blanquesinas y se centrifugó a 30 000 rpm durante 30 minutos (Ultracentrifuga Beckman L5-50E, rotor Ty-30), se descartó el sobrenadante y se lavó el precipitado con agua bidestilada tres veces. Se dializó contra agua bidestilada (utilizando una membrana de diálisis Spectrapor membrane tubing

10-12 kDa, no. 132703) durante tres días con 3 a 4 cambios diarios. Se determinó la concentración de proteínas, se liofilizó y guardó en congelación hasta su uso (39).

#### **2.4 Solubilización del Cristal Proteico de *Bacillus thuringiensis***

A 100 mg del cristal purificado de *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* se le añadieron 20 ml de una solución de NaOH 1M (NaOH. Sigma S-5881) en buffer de glicina 0.1M (Glycine. Sigma. G-8898). Se mantuvo en agitación constante durante 5 horas a temperatura ambiente, con un pH inicial de 12.0. Se centrifugó a 20 000 rpm durante 30 minutos (Centrifuga Beckman J2-21). Se dializó el sobrenadante contra buffer de fosfatos salino pH=7.2 (Spectrapor membrane tubing, 10-12 kDa, no. 132703), durante 3 a 4 días con tres cambios diarios, finalmente la muestra presentó un pH=7.0 (40). Se determinó la concentración de proteínas de la muestra solubilizada, se liofilizó y guardó en congelación hasta su uso.

## **2.5 Cromatografía DEAE-Affigel blue**

Se aplicaron 2 mg/ml del cristal solubilizado de *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* a una columna de DEAE-Affigel blue (BIO-RAD, No. cat. 153-7307) de 1.0 X 6.5 cm en un volumen de 1 ml. Previamente equilibrada con 30 ml de buffer tris 20 mM pH=8.0 (Trizma Base. Sigma. T-6791). Posteriormente se lavó con 5 ml del mismo buffer. La elución de la proteína se efectuó al aplicar un volumen de 5 ml de NaCl al 0.05 M en buffer tris pH=8.0, seguido por la adición de 5 ml de cada una de las siguientes concentraciones de NaCl; 0.1, 0.15, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6 y 1.0 M en buffer tris pH=8.0, obteniendo fracciones de 5 ml cada una. Las fracciones eluidas se analizaron en geles de poliacrilamida dodecil sulfato de sodio (41).

## **2.6 Determinación de la Concentración de Proteínas del Cristal Proteico de *Bacillus thuringiensis***

Para determinar la concentración de proteínas de cada uno de los tratamientos anteriores del cristal de *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis*, se utilizó el procedimiento de Bradford (42), con el

reactivo de color concentrado de BIO-RAD (BIO-RAD, No. cat. 500-0006). El microensayo se realizó en microplacas, mezclando 10  $\mu$ l de la muestra ( blanco, estándar o muestra problema) con 250  $\mu$ l del reactivo de color, determinándose la densidad óptica a una longitud de onda de 595 nm (Spectrophotomer Dynatech DL-1000). Se utilizó la albúmina sérica bovina como estándar (Albumin. USB. Cat. 10868).

## **2.7 Electroforesis en Geles de Poliacrilamida Dodecil Sulfato de Sodio**

La electroforesis de cada uno de los tratamientos de la delta-endotoxina de *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* se realizó de acuerdo al procedimiento de Laemli (43), utilizando un gel separador al 15% y un gel concentrador al 5% de poliacrilamida dodecil sulfato de sodio. Se colocaron alícuotas de las muestras a analizar en el gel ya adaptado a la cámara de electroforesis (BIO-RAD Protean II Model 1000/500. Cat. No. 165-4710), bajo las siguientes condiciones; 150 volts, 5 watts, 30 ma durante 2 horas aproximadamente. Posteriormente el gel fue teñido en nitrato de plata (44). Para

determinar el peso molecular de cada una de las bandas polipeptídicas del cristal proteico de *Bacillus thuringiensis* observadas en el gel, se utilizaron marcadores de peso molecular conocido (kDa): fosforilasa b (97.4), albúmina sérica (66.2), ovalbúmina (45), anhidrasa carbónica (31), inhibidor de tripsina (21.5) y lisozima (14.4) (Molecular Low Weight. BIO-RAD. Cat. No. 161-0314) (45).

## **2.8 Líneas Celulares**

Se utilizaron las siguientes líneas celulares humanas: linfoma histiocítico (U-937), leucemia monocítica aguda (THP-1), leucemia promielocítica (HL-60), carcinoma hepatocelular (Hep-3B, Hep-G2), leucemia aguda de células T (Jurkat), linfoma de Burkitt (Raji), adenocarcinoma de mama ( MCF-7, CLO), leucemia mielocítica crónica (K-562), adenocarcinoma de ovario (OVCA-429, OVCA-432, OVCA-433), glioblastoma (U-251). Así como también células normales de fibroblastos de piel de humano (HFF), células mononucleares normales de sangre periférica de humano (PBMN).

Estas líneas celulares se obtuvieron del American Type Cell Culture Collection. El medio de cultivo utilizado para las líneas celulares Hep-3B, Hep-G2, U-251 y para los linfocitos de sangre periférica fue el Medio Esencial Mínimo Eagle (EMEM. Bio-Whittaker. Cat. No. 12-125B); mientras que para el resto de las líneas celulares se utilizó el medio RPMI-1640 (Bio-Whittaker. Cat. No. 12-702Q). Ambos medios fueron suplementados con suero fetal bovino al 10%, 50µg de gentamicina, 100 U/ml de penicilina, en frascos para cultivo de células de 175 cm<sup>2</sup> (Falcon 3028, Becton Dickinson). Se incubaron a 37°C en una atmósfera de 95% de O<sub>2</sub> y 5% de CO<sub>2</sub> (Incubator Forma Scientific). El medio de cultivo se cambió cada tres días y las células se subcultivaron una vez por semana. Para las pruebas de citotoxicidad, las células adherentes se disgregaron por un corto tratamiento con una mezcla de tripsina (0.05%) y EDTA (0.5 mM) durante 5 minutos a 37°C, tal como se utiliza rutinariamente para hacer subcultivos de dichas líneas celulares (46).

## 2.9 Ensayo de Citotoxicidad

La actividad citotóxica del cristal proteico de *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* se determinó en base a ensayos de proliferación celular de acuerdo a la incorporación de timidina tritiada por las células incubadas en presencia o ausencia de dicha proteína. Cada una de las líneas celulares se incubaron a una densidad de  $5 \times 10^3$  células en 200  $\mu$ l del medio de cultivo en placas de 96 pozos (Falcon, 3072, Becton Dickinson) durante toda la noche a 37°C, en una atmósfera de 95% O<sub>2</sub> y 5% de CO<sub>2</sub> (Incubator Forma Scientific). Posteriormente el medio de cultivo se desechó y 200  $\mu$ l de una dilución seriada de la proteína purificada del cristal proteico de *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* (oncotoxina) de 0, 10, 20, 40, 60, 80, y 100  $\mu$ g/ml se añadió a cada uno de los pozos. Las células se incubaron durante 72 horas a 37°C, en una atmósfera de 95% de O<sub>2</sub> y 5% de CO<sub>2</sub>. La proliferación celular se determinó por la adición de timidina tritiada ([methyl-<sup>3</sup>H] Thymidine, TRA 120 B361, Amersham Life Science) a una concentración de 0.5  $\mu$ Ci/pozo en un volumen de 50  $\mu$ l, 6 horas antes de cosecharlas. Después de que las células fueron marcadas radioactivamente, se desechó el medio de



cultivo, las células fueron disgregadas con una solución de tripsina (0.5%) con EDTA (5.3 mM) 100 µl/pozo (Trypsin-EDTA, Cat. No. 15400-013, Life Technologies, Gibco BRL). La suspensión celular fue cosechada utilizando el equipo Harvester (Packard A. Canberra Company, Filtermate 196) y lizada con lavados de agua destilada. La radioactividad unida al filtro (Glass fiber filters, Cat. No. 6005416, Packard) se determinó en el equipo Direct Beta Counter (Matrix 9600, Packard A. Canberra Company). El porcentaje de viabilidad celular relativa se calculó como la incorporación de timidina tritiada en cuentas por minuto (cpm) en aquellas células que estuvieron en presencia de alguna concentración de la oncotoxina dividido entre las cpm de las células que estuvieron solamente en el medio de cultivo correspondiente y se multiplicó por 100:

$$\%VCR = \frac{\text{cpm células + oncotoxina}}{\text{cpm células - oncotoxina}} \times 100$$

% VCR= porcentaje de viabilidad celular relativa.  
cpm = cuentas por minuto.

Cada una de las determinaciones se realizaron por triplicado y los resultados se expresan como la media ± la desviación estándar (46).

## **2.10 Efecto del pH en la Bioactividad de la Oncotoxina**

Se dializó la oncotoxina a una concentración de 1mg/ml en 50 ml de cada una de las siguientes soluciones; glicina 100 mM pH=2.0, acetato de sodio 100 mM pH=4.0, acetato de sodio 100 mM pH=6.0, trizma base 100mM pH=7.0, trizma base 100mM pH=8.0 e hidróxido de amonio 100 mM pH=10.0; durante 2 horas a temperatura ambiente, utilizando una membrana de diálisis con un poro de 6-8,000 de peso molecular (Spectra/por, molecularporous membrane tubing, MWCO: 6-8,000). Posteriormente se dializó en buffer trizma base 50 mM pH=7.4 durante 4 horas a temperatura ambiente e inmediatamente se estudió su bioactividad en cultivo de células de linfoma histiocítico (U-937), utilizando una concentración de 25 µg/200 µl. Cada una de estas determinaciones se realizaron por triplicado y los resultados se expresan como la media ± la desviación estándar (47).

## **2.11 Efecto de la Temperatura en la Bioactividad de la Oncotoxina**

Se utilizó 1mg/ml de la oncotoxina y se incubó bajo las siguientes

condiciones: -20°C/30 min., 4°C/30 min., 25°C/30 min., 37°C/30 min., 60°C/30 min., 90°C/30 min., 100°C/30 min. Posteriormente se estudió su bioactividad en cultivo de células de linfoma histiocítico (U-937), utilizando una concentración de 25 µg/200 µl. Cada una de estas determinaciones se realizaron por triplicado y los resultados se expresan como la media ± la desviación estándar (47).

## **2.12 Efecto de las Enzimas Proteolíticas en la Bioactividad de la Oncotoxina**

Se utilizaron 100 µl de oncotoxina a partir de una concentración de 1mg/ml, y se incubaron durante 24 horas a 37 °C con 10µl de cada una de las siguientes enzimas; tripsina (Trypsin, T-8642, SIGMA), quimiotripsina (Chymotrypsin, C-3142, SIGMA), pronasa (Protease, pronase E, P-6911, SIGMA) de una concentración de 1mg/ml en buffer tris 50 mM pH=8.0; quedando en una proporción de 10% (peso/peso). Posteriormente la reacción se detuvo por la adición de 100 µl de suero fetal bovino al 10%, e inmediatamente se estudió su bioactividad en cultivo de células de linfoma histiocítico (U-937),

utilizando una concentración de 25  $\mu\text{g}/200 \mu\text{l}$ . Cada una de estas determinaciones se efectuaron por triplicado y los resultados se expresan como la media  $\pm$  la desviación estándar (48).

## **CAPITULO 3**

### **RESULTADOS**

#### **3.1 Electroforesis en Geles de Poliacrilamida Dodecil Sulfato de Sodio**

El perfil electroforético del cristal proteico de *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* solubilizado en condiciones alcalinas nos revela la presencia de dos bandas polipeptídicas con un peso molecular aproximado de 25 y 20 kDa respectivamente (Figura No. 2). Las fracciones proteicas resultantes se separaron al pasarlas a través de una columna de DEAE-Affigel blue, previamente equilibrada con buffer tris 20 mM pH=8.0, la fracción proteica de 20 kDa fue eluída con NaCl al 0.05 M y la de 25 kDa con un gradiente de NaCl al 0.10 M (Figura No. 3).

### **3.2 Ensayo de Citotoxicidad en Cultivos de Células Normales y Tumorales Humanas**

Se estudió la actividad citotóxica de las fracciones de 25 y 20 kDa en cultivos de células tumorales, encontrándose que solamente la fracción de 20 kDa tiene actividad citotóxica, designándosele como oncotoxina. En la tabla No. 1 observamos los porcentajes de viabilidad celular relativa de cada una de las líneas celulares estudiadas, de acuerdo a la incorporación de timidina tritiada (cpm) a diferentes concentraciones de la oncotoxina. No se observó citotoxicidad sobre células normales dentro de las dosis utilizadas (Figuras No. 5 - 13). La tabla No.2 nos muestra la dosis de oncotoxina ( $\mu\text{g/ml}$ ) necesaria para inhibir en un 50% la proliferación celular ( $CI_{50}$ ) de cada una de las líneas tumorales estudiadas.

### **3.3 Propiedades Fisicoquímicas de la Oncotoxina**

Se estudió el efecto citotóxico de la oncotoxina expuesta a diferentes condiciones de pH, temperatura y digestión enzimática en cultivo de células de linfoma histiocítico (U-937). La oncotoxina fue

estable a un pH de 4.0 a 8.0 (Tabla No. 3), fue estable a temperaturas de -20°C a 100°C (Tabla No. 4), pero fue sensible a la digestión enzimática (Tabla No. 5).

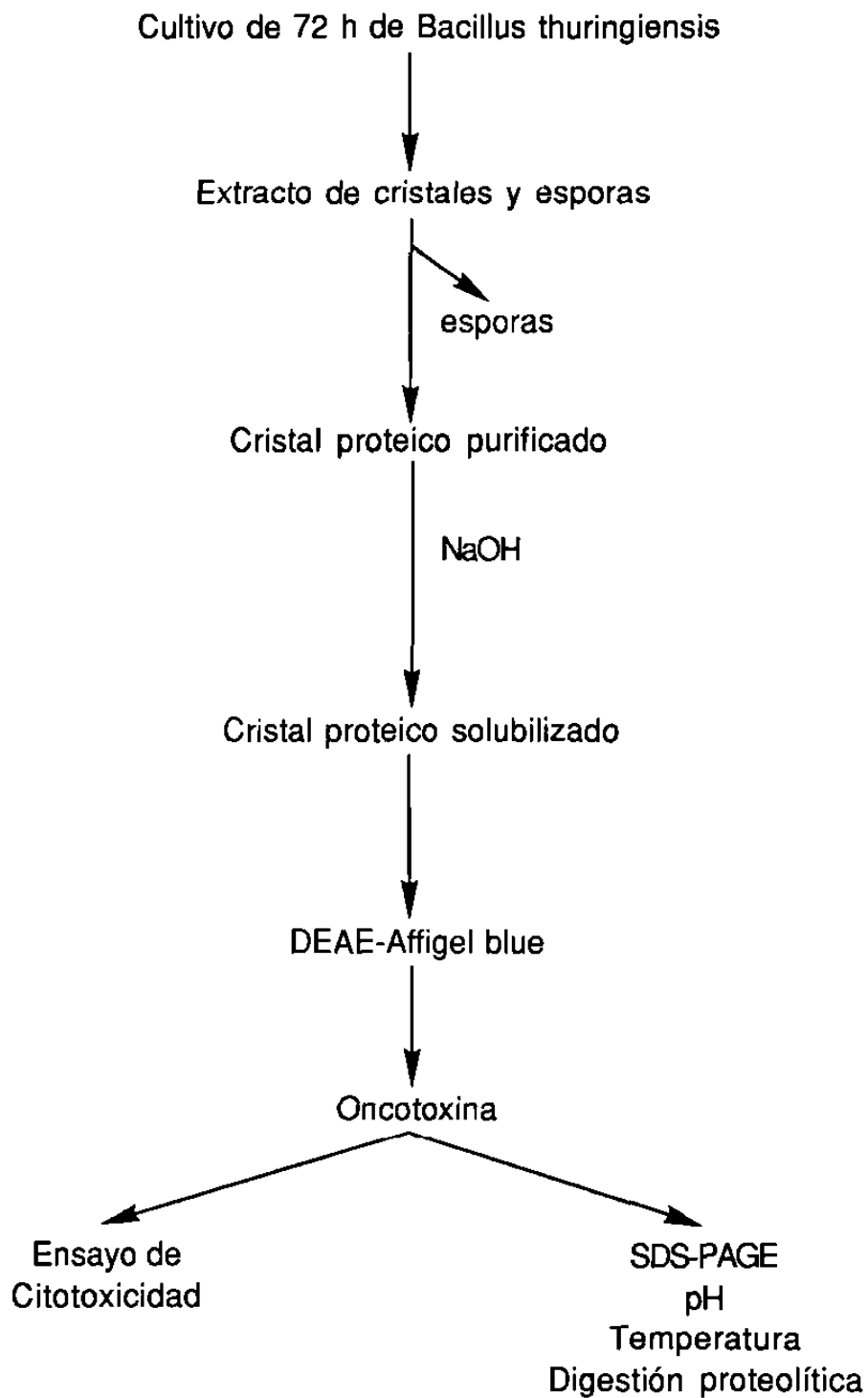


Figura 1. Diseño Experimental.



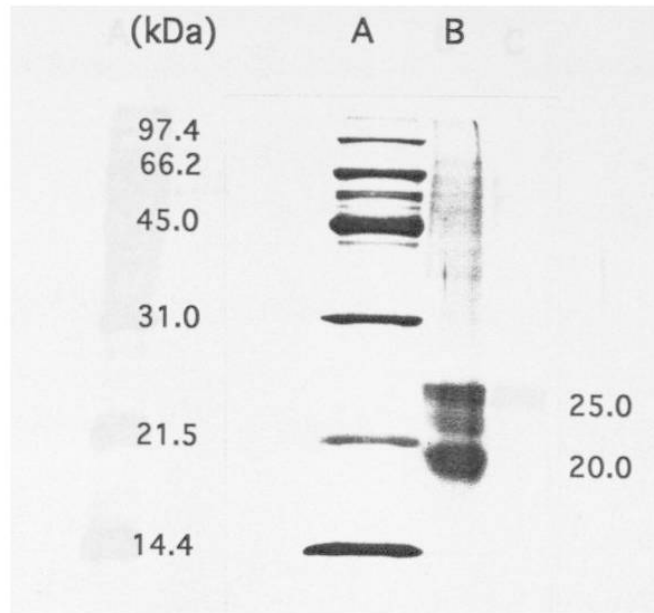


Figura 2. Electroforesis en gel de Poliacrilamida Dodecil Sulfato de Sodio al 15% del Cristal Proteico de *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* Solubilizado con NaOH 1M. A: marcadores de peso molecular (kDa); fosforilasa b (97.4), albúmina sérica (66.2), ovalbúmina (45), anhidrasa carbónica(31), inhibidor de tripsina (21.5) y lisozima (14.4). B: se observan dos bandas polipeptídicas con un peso molecular de 25 y 20 kDa respectivamente.

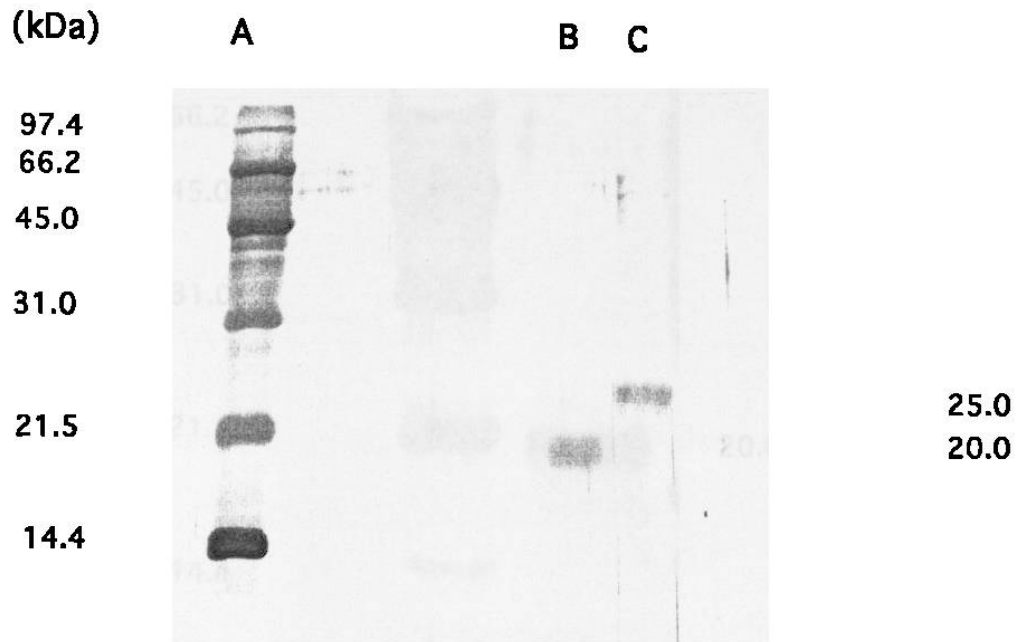


Figura 3. Electroforesis en gel de Poliacrilamida Dodecil Sulfato de Sodio al 15% de las Proteínas Purificadas del Cristal de *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* por Medio de una Columna DEAE-Affigel blue. A: marcadores de peso molecular (kDa); fosforilasa b (97.4), albúmina sérica (66.2), ovalbúmina (45), anhidrasa carbónica (31), inhibidor de tripsina (21.5) y lisozima (14.4). B: proteína purificada con un peso molecular de 20 kDa, eluída con 0.05 M de NaCl. C: proteína purificada con un peso molecular de 25 kDa, eluída con 0.10 M de NaCl.

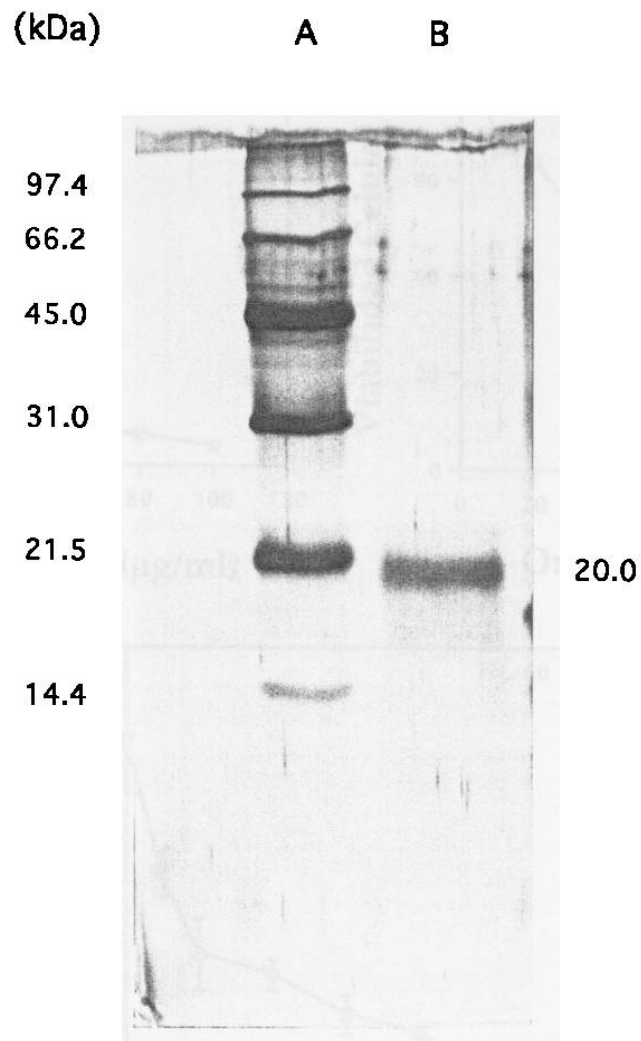


Figura 4. Electroforesis en gel de Poliacrilamida Dodecil Sulfato de Sodio al 15% de la Proteína de 20 kDa (Oncotoxina) Purificada a Partir del Cristal de *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis*. A: marcadores de peso molecular(kDa); fosforilasa b (97.4), albúmina sérica (66.2), ovalbúmina (45), anhidrasa carbónica (31), inhibidor de tripsina (21.5) y lisozima (14.4). B: Oncotoxina con un peso molecular de 20 kDa.

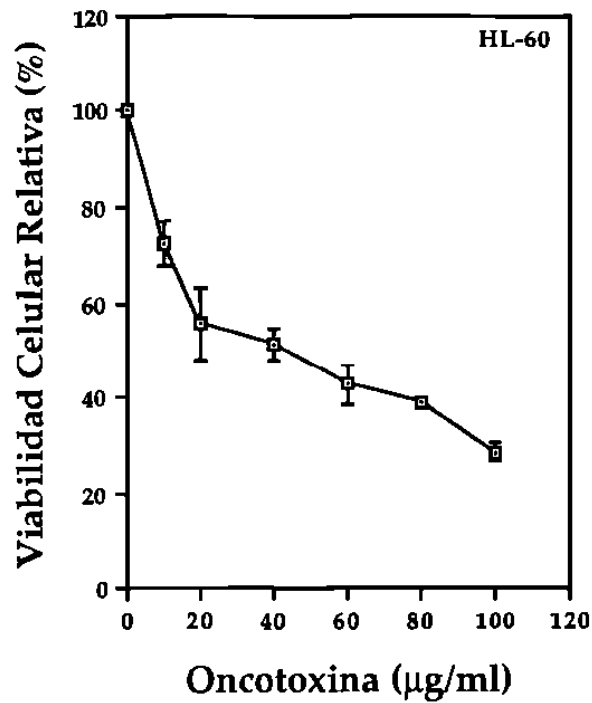
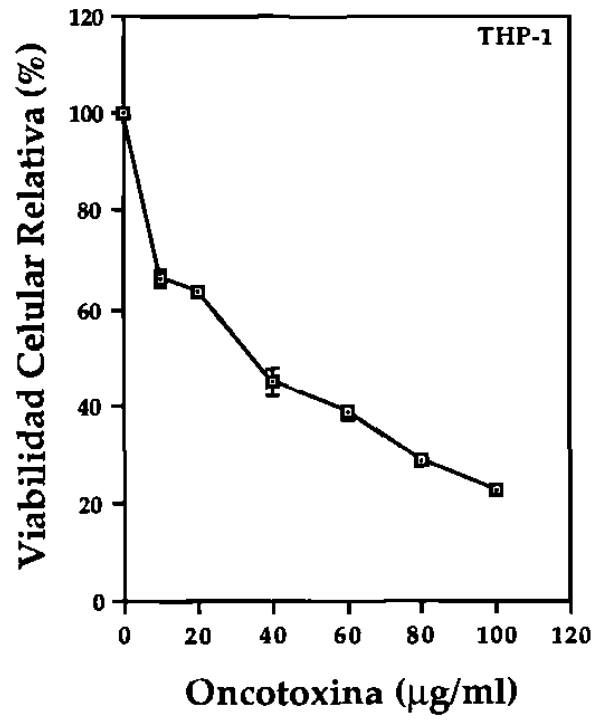
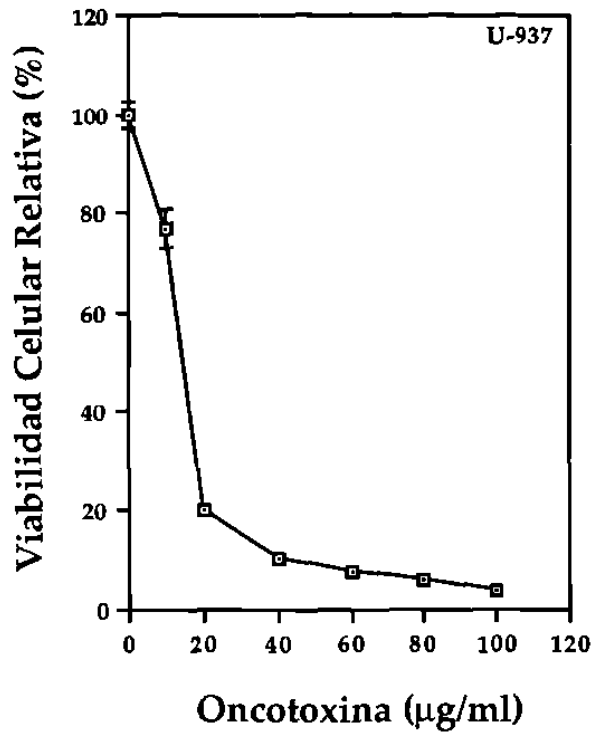


Figura 5. Efecto de la Oncotoxina en la Proliferación Celular de Líneas Tumorales de Macrófagos.

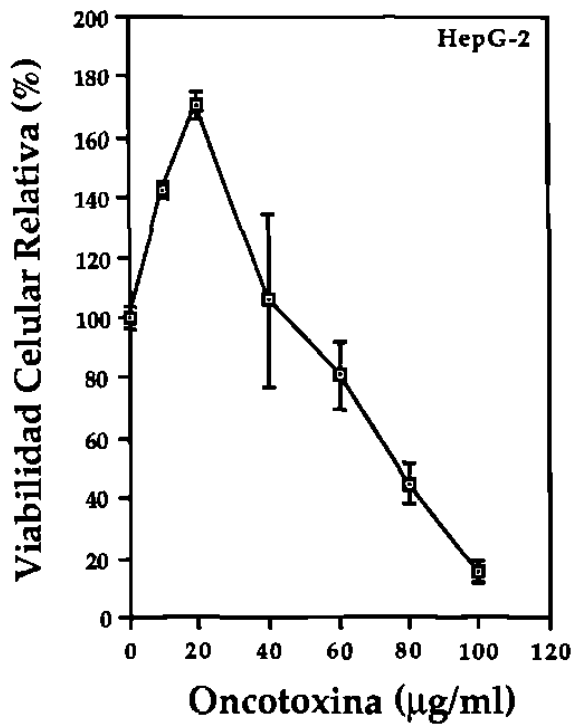
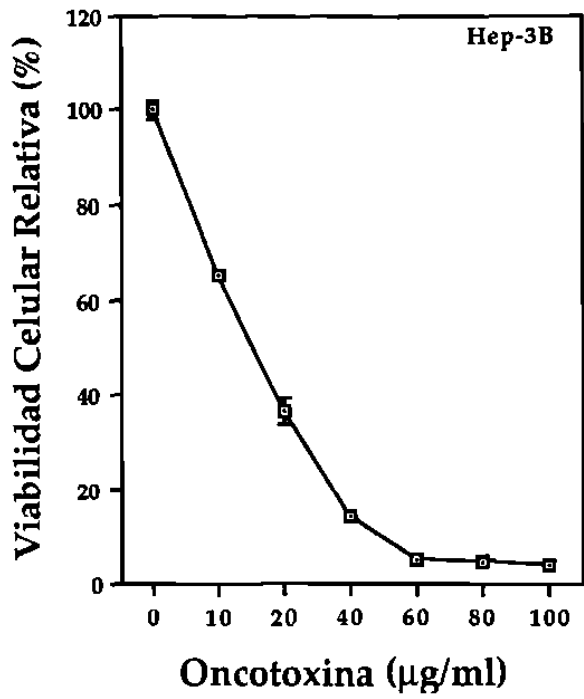


Figura 6. Efecto de la Oncotoxina en la Proliferación Celular del Carcinoma Hepático.

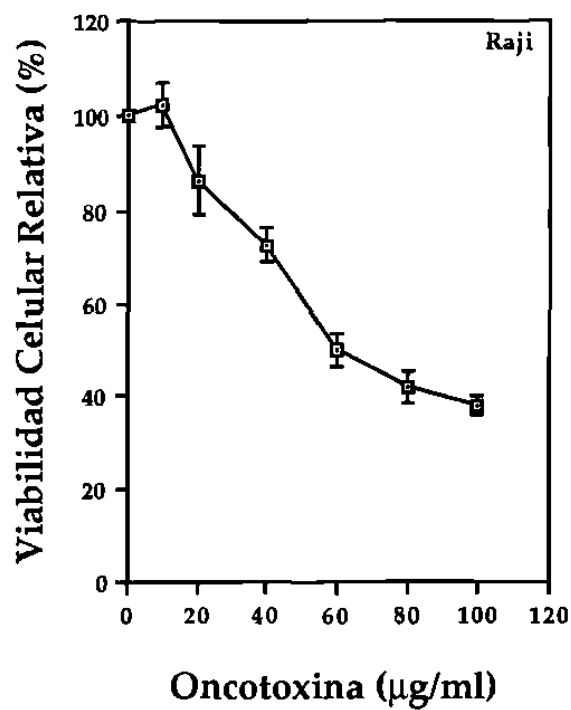
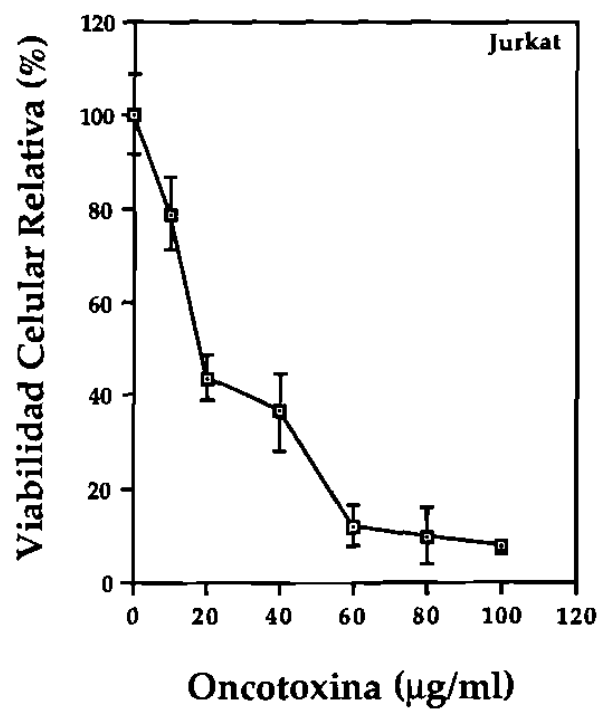


Figura 7. Efecto de la Oncotoxina en la Proliferación del Linfoma de Células T (Jurkat) y Células B (Raji).

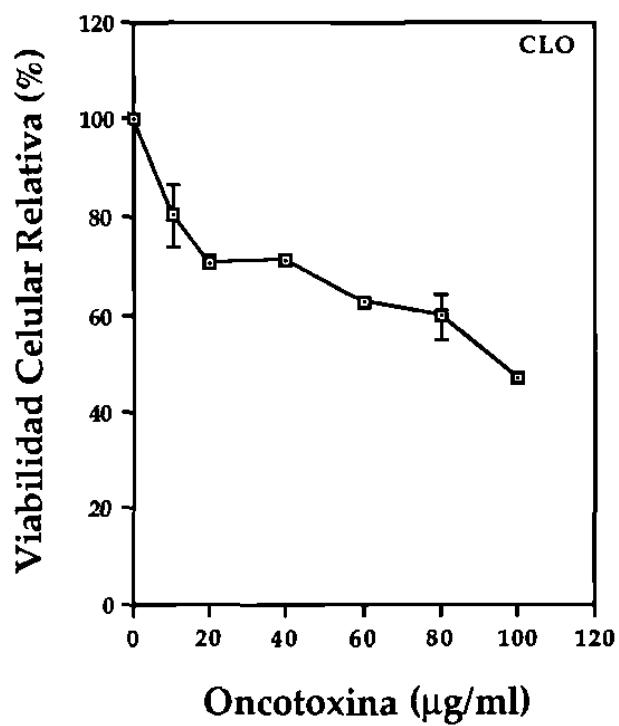
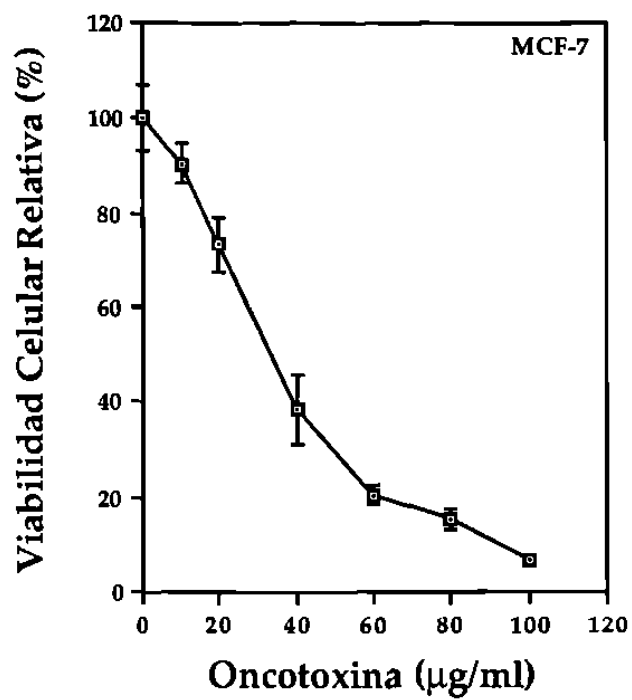


Figura 8. Efecto de la Oncotoxina en la Proliferación Celular del Carcinoma Mamario.

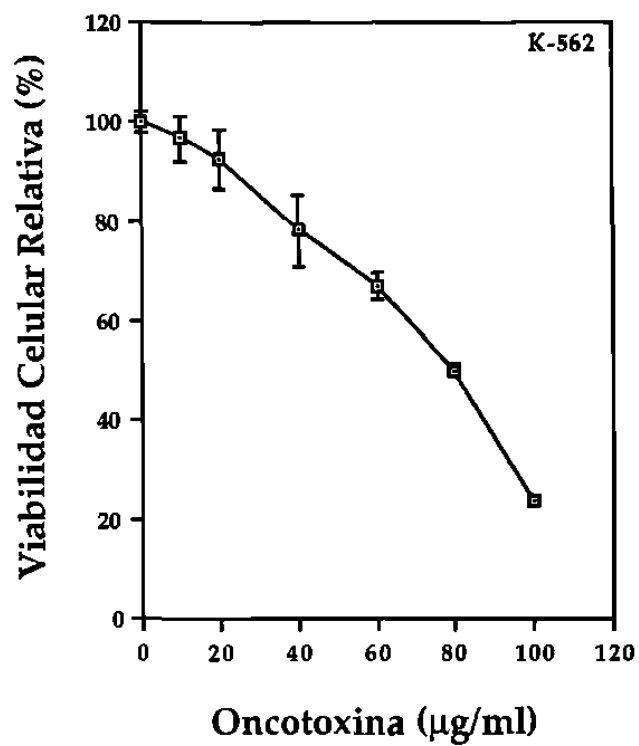


Figura 9. Efecto de la Oncotoxina en la Proliferación Celular de la Eritroleucemia.



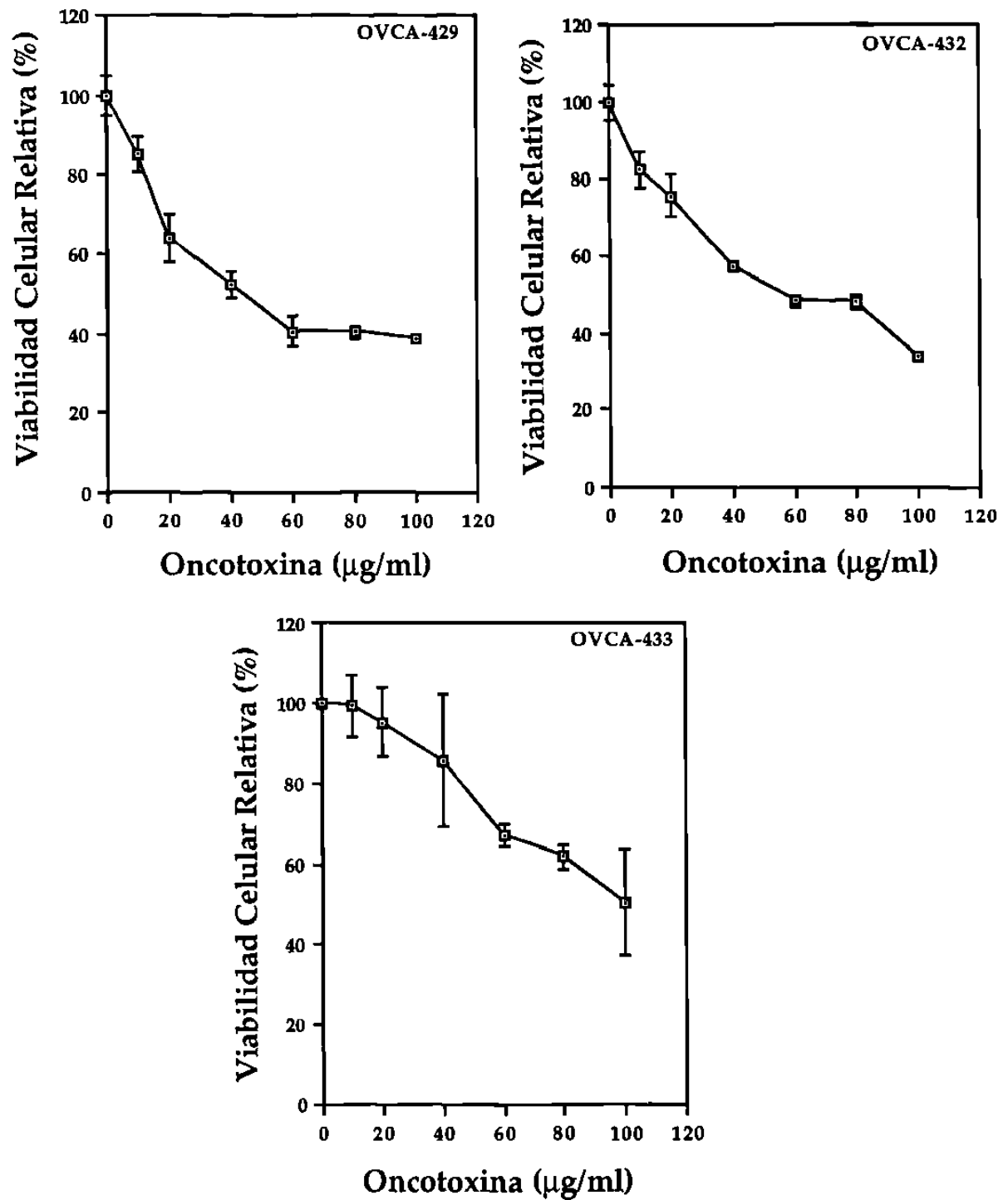


Figura 10. Efecto de la Oncotoxina en la Proliferación Celular del Carcinoma de Ovario.

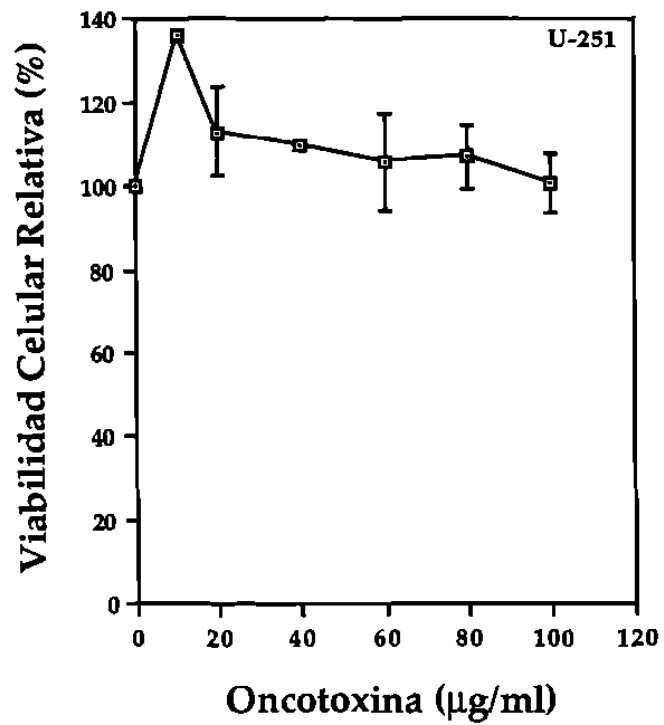


Figura 11. Efecto de la Oncotoxina en la Proliferación Celular de Líneas Tumorales del Sistema Nervioso Central.

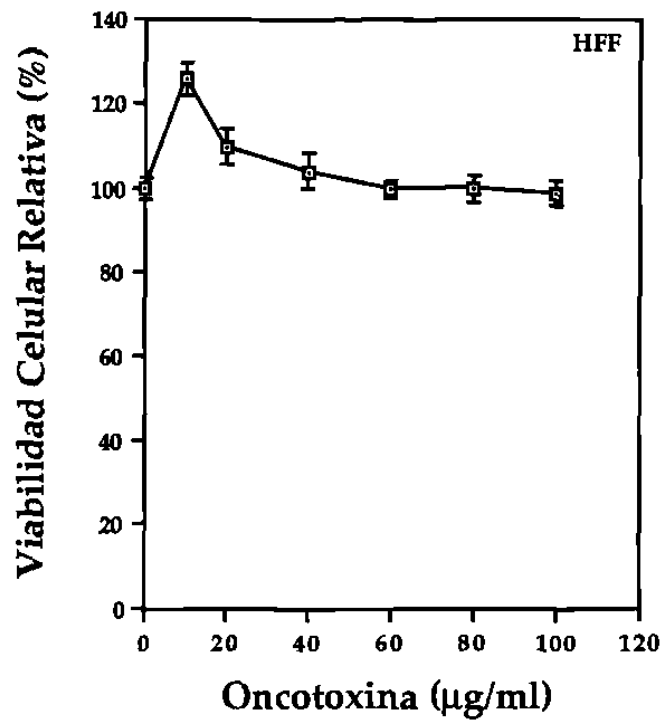


Figura 12. Efecto de la Oncotoxina en la Proliferación de Células Normales de Fibroblastos.

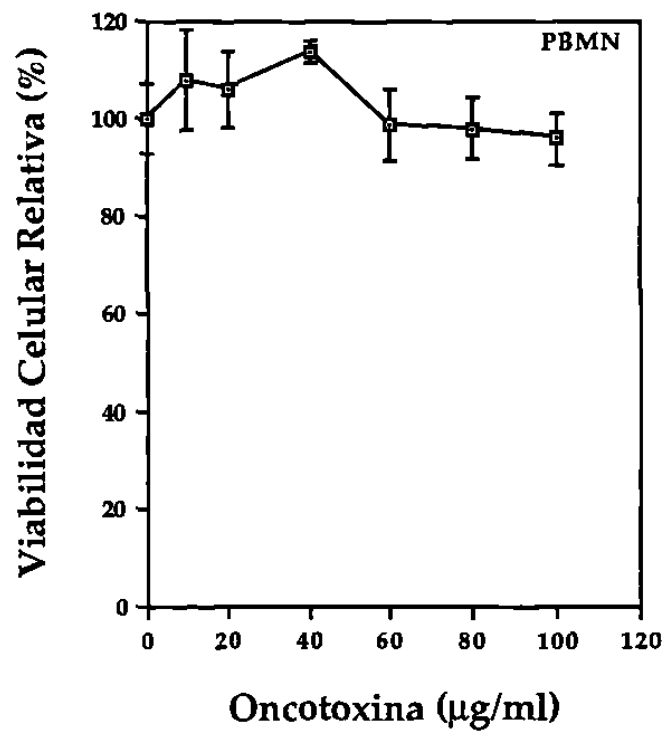


Figura 13. Efecto de la Oncotoxina en la Proliferación de Células Mononucleares Normales de Sangre Periférica.

| <b>LINEA CELULAR</b> | <b>ONCOTOXINA (<math>\mu\text{g/ml}</math>)</b> | <b>INCORPORACION DE TIMIDINA TRITIADA (cpm)</b> | <b>VIABILIDAD CELULAR RELATIVA (%)</b> |
|----------------------|---|---|--|
| <b><i>U-937</i></b>  | 0   | 32794 $\pm$ 1313                                | 100 $\pm$ 4                            |
|                      | 10  | 28712 $\pm$ 3828                                | 87.5 $\pm$ 11                          |
|                      | 20  | 8319 $\pm$ 1765                                 | 25 $\pm$ 5.3                           |
|                      | 40  | 3589 $\pm$ 240                                  | 10.8 $\pm$ 0.7                         |
|                      | 60  | 2903 $\pm$ 351                                  | 8.7 $\pm$ 1                            |
|                      | 80  | 2041 $\pm$ 211                                  | 6 $\pm$ 0.6                            |
|                      | 100   | 1170 $\pm$ 194                                  | 3.5 $\pm$ 0.5                          |
| <b><i>THP-1</i></b>  | 0   | 12721 $\pm$ 913                                 | 100 $\pm$ 7                            |
|                      | 10  | 8271 $\pm$ 1120                                 | 65 $\pm$ 8                             |
|                      | 20  | 7788 $\pm$ 196                                  | 61 $\pm$ 1.5                           |
|                      | 40  | 4943 $\pm$ 1467                                 | 39 $\pm$ 11                            |
|                      | 60  | 4479 $\pm$ 429                                  | 35 $\pm$ 3                             |
|                      | 80  | 3576 $\pm$ 223                                  | 28 $\pm$ 1.7                           |
|                      | 100   | 3050 $\pm$ 330                                  | 23.9 $\pm$ 2.5                         |
| <b><i>HL-60</i></b>  | 0   | 15755 $\pm$ 592                                 | 100 $\pm$ 3.7                          |
|                      | 10  | 11866 $\pm$ 737                                 | 75 $\pm$ 4.6                           |
|                      | 20  | 9250 $\pm$ 1148                                 | 58 $\pm$ 7                             |
|                      | 40  | 8656 $\pm$ 903                                  | 54 $\pm$ 5.7                           |
|                      | 60  | 7111 $\pm$ 738                                  | 45 $\pm$ 4.6                           |
|                      | 80  | 6363 $\pm$ 204                                  | 40 $\pm$ 1.2                           |
|                      | 100   | 4809 $\pm$ 539                                  | 30.5 $\pm$ 3.4                         |

| <b>LÍNEA CELULAR</b> | <b>ONCOTOXINA (µg/ml)</b> | <b>INCORPORACION DE TIMIDINA TRITIADA (cpm)</b> | <b>VIABILIDAD CELULAR RELATIVA (%)</b> |
|----------------------|---------------------------|---|--|
| <b>Hep-3B</b>        | 0                         | 10399 ± 246                                     | 100 ± 2.3                              |
|                      | 10                        | 6766 ± 1015                                     | 65 ± 9.7                               |
|                      | 20                        | 3826 ± 316                                      | 36.7 ± 3                               |
|                      | 40                        | 1444 ± 88                                       | 13.8 ± 0.8                             |
|                      | 60                        | 633 ± 138                                       | 6 ± 1.3                                |
|                      | 80                        | 525 ± 88.9                                      | 5 ± 0.8                                |
|                      | 100                       | 384 ± 21  | 3.6 ± 0.2                              |
| <b>Hep-G2</b>        | 0                         | 3146 ± 122                                      | 100 ± 3.8                              |
|                      | 10                        | 4506 ± 1591                                     | 143 ± 50                               |
|                      | 20                        | 4387 ± 1706                                     | 139 ± 54                               |
|                      | 40                        | 3332 ± 904                                      | 105.9 ± 28.7                           |
|                      | 60                        | 2543 ± 498                                      | 80.8 ± 15.8                            |
|                      | 80                        | 1414 ± 297                                      | 44.9 ± 9.4                             |
|                      | 100                       | 601 ± 235                                       | 19 ± 7.4                               |
| <b>Jurkat</b>        | 0                         | 4200 ± 340                                      | 100 ± 8                                |
|                      | 10                        | 3230 ± 320                                      | 77 ± 7.6                               |
|                      | 20                        | 2050 ± 520                                      | 49 ± 12.3                              |
|                      | 40                        | 1775 ± 610                                      | 42 ± 14                                |
|                      | 60                        | 575 ± 200                                       | 13.6 ± 4.7                             |
|                      | 80                        | 485 ± 100                                       | 11.5 ± 2.3                             |
|                      | 100                       | 355 ± 85  | 8.4 ± 2                                |

| <b>LÍNEA CELULAR</b> | <b>ONCOTOXINA (µg/ml)</b> | <b>INCORPORACION DE TIMIDINA TRITIADA (cpm)</b> | <b>VIABILIDAD CELULAR RELATIVA (%)</b> |
|----------------------|---------------------------|---|--|
| <b><i>Raji</i></b>   | 0                         | 6554 ± 889                                      | 100 ± 13.5                             |
|                      | 10                        | 6678 ± 837                                      | 101 ± 12.7                             |
|                      | 20                        | 5293 ± 629                                      | 80.7 ± 9.6                             |
|                      | 40                        | 4411 ± 531                                      | 67 ± 8.1                               |
|                      | 60                        | 3348 ± 308                                      | 51 ± 4.7                               |
|                      | 80                        | 2808 ± 279                                      | 42.8 ± 4.2                             |
|                      | 100                       | 2328 ± 249                                      | 35.5 ± 3.8                             |
| <b><i>MCF-7</i></b>  | 0                         | 17300 ± 2405                                    | 100 ± 13.9                             |
|                      | 10                        | 15714 ± 3650                                    | 90.8 ± 21                              |
|                      | 20                        | 12697 ± 1431                                    | 73 ± 8.2                               |
|                      | 40                        | 6660 ± 1278                                     | 38 ± 7.3                               |
|                      | 60                        | 3532 ± 504                                      | 20.4 ± 2.9                             |
|                      | 80                        | 2230 ± 1034                                     | 12.8 ± 5.9                             |
|                      | 100                       | 1221 ± 246                                      | 7 ± 1.4                                |
| <b><i>CLO</i></b>    | 0                         | 14133 ± 1044                                    | 100 ± 7.3                              |
|                      | 10                        | 10894 ± 863                                     | 77 ± 6.1                               |
|                      | 20                        | 9937 ± 615                                      | 70 ± 4.3                               |
|                      | 40                        | 10029 ± 530                                     | 70 ± 3.7                               |
|                      | 60                        | 8229 ± 352                                      | 58 ± 2.4                               |
|                      | 80                        | 8065 ± 628                                      | 57 ± 4.4                               |
|                      | 100                       | 6397 ± 924                                      | 45 ± 6.5                               |

| <b>LINEA CELULAR</b>   | <b>ONCOTOXINA (<math>\mu\text{g/ml}</math>)</b> | <b>INCORPORACION DE TIMIDINA TRITIADA (cpm)</b> | <b>VIABILIDAD CELULAR RELATIVA (%)</b> |
|------------------------|---|---|--|
| <b><i>K-562</i></b>    | 0   | 46657 $\pm$ 907                                 | 100 $\pm$ 1.9                          |
|                        | 10  | 43504 $\pm$ 3524                                | 93.2 $\pm$ 7.5                         |
|                        | 20  | 41570 $\pm$ 3753                                | 89 $\pm$ 8                             |
|                        | 40  | 37353 $\pm$ 3309                                | 80 $\pm$ 7                             |
|                        | 60  | 30233 $\pm$ 2171                                | 64 $\pm$ 4.6                           |
|                        | 80  | 22703 $\pm$ 1258                                | 48 $\pm$ 2.6                           |
|                        | 100   | 10891 $\pm$ 527                                 | 23 $\pm$ 1.1                           |
| <b><i>OVCA-429</i></b> | 0   | 4340 $\pm$ 238                                  | 100 $\pm$ 5.4                          |
|                        | 10  | 3720 $\pm$ 195                                  | 85.7 $\pm$ 4.4                         |
|                        | 20  | 2780 $\pm$ 263                                  | 64 $\pm$ 6                             |
|                        | 40  | 2278 $\pm$ 153                                  | 52 $\pm$ 3.5                           |
|                        | 60  | 1766 $\pm$ 160                                  | 40 $\pm$ 3.6                           |
|                        | 80  | 1748 $\pm$ 84                                   | 40 $\pm$ 1.9                           |
|                        | 100   | 2087 $\pm$ 347                                  | 48 $\pm$ 7.9                           |
| <b><i>OVCA-432</i></b> | 0   | 22514 $\pm$ 1036                                | 100 $\pm$ 4.6                          |
|                        | 10  | 18580 $\pm$ 1036                                | 82.5 $\pm$ 4.6                         |
|                        | 20  | 17049 $\pm$ 1265                                | 75 $\pm$ 5.6                           |
|                        | 40  | 12910 $\pm$ 268                                 | 57 $\pm$ 1.1                           |
|                        | 60  | 10859 $\pm$ 298                                 | 48 $\pm$ 1.3                           |
|                        | 80  | 10733 $\pm$ 391                                 | 47 $\pm$ 1.7                           |
|                        | 100   | 7677 $\pm$ 60                                   | 34 $\pm$ 0.2                           |



| <b>LINEA CELULAR</b> | <b>ONCOTOXINA (<math>\mu\text{g/ml}</math>)</b> | <b>INCORPORACION DE TIMIDINA TRITIADA (cpm)</b> | <b>VIABILIDAD CELULAR RELATIVA (%)</b> |
|----------------------|---|---|--|
| <b>OVCA-433</b>      | 0   | 1811 $\pm$ 151                                  | 100 $\pm$ 8.3                          |
|                      | 10  | 1763 $\pm$ 131                                  | 97.3 $\pm$ 7.2                         |
|                      | 20  | 1690 $\pm$ 155                                  | 93 $\pm$ 8.5                           |
|                      | 40  | 1524 $\pm$ 291                                  | 84 $\pm$ 16                            |
|                      | 60  | 1076 $\pm$ 211                                  | 59 $\pm$ 11.6                          |
|                      | 80  | 974 $\pm$ 229                                   | 53 $\pm$ 12.6                          |
|                      | 100   | 896 $\pm$ 237                                   | 49 $\pm$ 13                            |
| <b>U-251</b>         | 0   | 7722 $\pm$ 132                                  | 100 $\pm$ 1.7                          |
|                      | 10  | 10352 $\pm$ 37                                  | 134 $\pm$ 0.4                          |
|                      | 20  | 8615 $\pm$ 809                                  | 111.5 $\pm$ 10.4                       |
|                      | 40  | 8959 $\pm$ 1079                                 | 116 $\pm$ 13.9                         |
|                      | 60  | 8038 $\pm$ 885                                  | 104 $\pm$ 11.4                         |
|                      | 80  | 8126 $\pm$ 596                                  | 105 $\pm$ 7.7                          |
|                      | 100   | 7010 $\pm$ 1228                                 | 90.7 $\pm$ 15.9                        |
| <b>HFF</b>           | 0   | 5169 $\pm$ 72                                   | 100 $\pm$ 1.3                          |
|                      | 10  | 6434 $\pm$ 216                                  | 126 $\pm$ 4.1                          |
|                      | 20  | 5662 $\pm$ 243                                  | 109.5 $\pm$ 4.7                        |
|                      | 40  | 5354 $\pm$ 48                                   | 103.5 $\pm$ 0.9                        |
|                      | 60  | 5305 $\pm$ 23                                   | 100 $\pm$ 0.4                          |
|                      | 80  | 5180 $\pm$ 66                                   | 100 $\pm$ 1.2                          |
|                      | 100   | 5101 $\pm$ 121                                  | 99 $\pm$ 2.3                           |

| LÍNEA CELULAR | ONCOTOXINA ( $\mu\text{g/ml}$ ) | INCORPORACION DE TIMIDINA TRITIADA (cpm) | VIABILIDAD CELULAR RELATIVA (%) |
|---------------|---------------------------------|--|---------------------------------|
| <b>PBMN</b>   | 0                               | 11215 $\pm$ 837                          | 100 $\pm$ 7.4                   |
|               | 10                              | 12119 $\pm$ 1235                         | 108 $\pm$ 11                    |
|               | 20                              | 11860 $\pm$ 919                          | 106 $\pm$ 8.1                   |
|               | 40                              | 12794 $\pm$ 298                          | 114 $\pm$ 2.6                   |
|               | 60                              | 11060 $\pm$ 800                          | 99 $\pm$ 7.1                    |
|               | 80                              | 9848 $\pm$ 651                           | 94 $\pm$ 5.8                    |
|               | 100                             | 10771 $\pm$ 1299                         | 96 $\pm$ 11.5                   |

Tabla No. 1. Efecto de la Oncotoxina en la Proliferación de Líneas de Células Normales y Tumorales Humanas. Se utilizó una densidad celular de  $5 \times 10^3$  células/0.2 ml de cada una de las líneas celulares en placas de 96 pozos, incubadas durante 72 horas a  $37^\circ\text{C}$  con diferentes dosis de la oncotoxina. Durante las últimas 6 horas del tratamiento las células fueron marcadas con timidina tritiada. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado y los resultados se expresan como la media  $\pm$  la desviación estándar.

| LINEA CELULAR                        | CONCENTRACION INHIBITORIA DEL 50% DEL CRECIMIENTO ( $\mu\text{g/ml}$ ) |
|--------------------------------------|--|
| Mieloide y Linfoide                  |  |
| Linfoma histiocítico (U-937)         | 15   |
| Leucemia monocítica aguda (THP-1)    | 32   |
| Leucemia promielocítica (HL-60)      | 52   |
| Leucemia aguda de células T (Jurkat) | 25   |
| Linfoma de Burkitt (Raji)            | 63   |
| Leucemia mielocítica crónica (K-562) | 80   |
| Epitelial                            |  |
| Carcinoma hepatocelular (Hep-3B)     | 15   |
| Carcinoma hepatocelular (Hep-G2)     | 78   |
| Adenocarcinoma de mama (MCF-7)       | 35   |
| Adenocarcinoma de mama (CLO)         | 90   |
| Adenocarcinoma de ovario (OVCA-429)  | 40   |
| Adenocarcinoma de ovario (OVCA-432)  | 50   |
| Adenocarcinoma de ovario (OVCA-433)  | 100  |
| Glioblastoma (U-251)                 | >100   |

Tabla No. 2. Inhibición de la Proliferación Celular de Varias Líneas Tumorales Humanas por la Oncotoxina Derivada del Cristal Proteico de *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis*. Las células ( $5 \times 10^3/0.2$  ml) fueron incubadas en placas de 96 pozos durante 72 horas a 37°C con diferentes dosis de la oncotoxina. Durante las últimas 6 horas, las células fueron marcadas con timidina tritiada. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado y los resultados se expresan como la dosis necesaria de oncotoxina ( $\mu\text{g/ml}$ ) para inhibir en un 50% ( $CI_{50}$ ) la proliferación celular de varias líneas tumorales humanas.

| TRATAMIENTO                          | VIABILIDAD CELULAR RELATIVA (%) |
|--------------------------------------|---------------------------------|
| Glicina 100 mM (pH=2.0)              | 36.3 ± 1.9*                     |
| Acetato de sodio 100 mM (pH=4.0)     | 10.6 ± 1.1                      |
| Acetato de sodio 100 mM (pH=6.0)     | 10.0 ± 1.3                      |
| Tris 100 mM (pH=7.0)                 | 13.4 ± 5.6                      |
| Tris 100 mM (pH=8.0)                 | 16.3 ± 3.3                      |
| Hidróxido de amonio 100 mM (pH=10.0) | 21.7 ± 2.7*                     |

Tabla No. 3. Efecto del pH en la Bioactividad de la Oncotoxina. La oncotoxina se dializó en diferentes soluciones de pH durante 2 horas a temperatura ambiente, después fue dializada en buffer tris 50 mM pH=7.4 durante 4 horas e inmediatamente se estudió su bioactividad en cultivo de células de linfoma histiocítico (U-937). Todas las determinaciones se realizaron por triplicado y los resultados se expresan como la media ± la desviación estándar (\*=p < 0.05).

| TEMPERATURA (°C) | TIEMPO (MIN.) | VIABILIDAD CELULAR RELATIVA (%) |
|------------------|---------------|---------------------------------|
| -20              | 30            | 17 ± 0.56                       |
| 4                | 30            | 16.4 ± 2.44                     |
| 25               | 30            | 15.7 ± 1.42                     |
| 37               | 30            | 21.1 ± 2.9                      |
| 60               | 30            | 16.4 ± 1                        |
| 90               | 30            | 13.6 ± 2.66                     |
| 100              | 30            | 16 ± 1.16                       |

Tabla No. 4. Termoestabilidad de la oncotoxina. La oncotoxina fue incubada a diferentes temperaturas durante 30 minutos e inmediatamente se estudió su bioactividad en cultivo de células de linfoma histiocítico (U-937). Todas las determinaciones se realizaron por triplicado y los resultados se expresan como la media ± la desviación estándar.

| DIGESTION PROTEOLITICA        | VIABILIDAD CELULAR RELATIVA<br>( % ) |
|-------------------------------|--------------------------------------|
| Oncotoxina + medio de cultivo | 11 ± 5.9                             |
| Oncotoxina + tripsina         | 89 ± 1*                              |
| Oncotoxina + quimiotripsina   | 72.1 ± 4.3*                          |
| Oncotoxina + pronasa          | 83.3 ± 2.8*                          |

Tabla No. 5. Efecto de las Enzimas Proteolíticas en la Bioactividad de la Oncotoxina. La oncotoxina fue incubada con diferentes enzimas (10% p/p) durante 24 horas a 37°C, en buffer tris 50 mM pH=8.0, la reacción fue inhibida por la adición de suero fetal bovino al 10% e inmediatamente se estudió su bioactividad en cultivo de células de linfoma histiocítico (U-937). Todas las determinaciones se realizaron por triplicado y los resultados se expresan como la media ± la desviación estándar (\*=p < 0.05).

## Capítulo 4

### DISCUSION

La proteína de 20 kDa purificada de *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* se ha designado como **oncotoxina** por su capacidad para inhibir *in vitro* la proliferación celular de varias líneas tumorales humanas sin afectar células normales. La actividad de la oncotoxina, expresada como la concentración necesaria para inhibir en un 50% la proliferación celular, difiere para cada una de las líneas tumorales, lo que nos indica diferencias en especificidad (Tabla No. 2). El mayor efecto de la oncotoxina dentro del grupo de células tumorales de macrófagos se observó en el linfoma histiocítico (U-937); con una dosis de 15 µg/ml se logró inhibir en un 50%, a diferencia de la leucemia monocítica aguda (THP-1) y de la leucemia promielocítica (HL-60) que requirieron de una dosis de 32 y 52 µg/ml respectivamente (Figura No. 5). En el grupo de carcinoma hepático, la línea celular más sensible a la oncotoxina fue la (Hep-

3B); con 15  $\mu\text{g/ml}$  se inhibió en un 50%, mientras que la línea celular (Hep-G2) requirió de 78  $\mu\text{g/ml}$  (Figura No. 6). La leucemia aguda de células T (Jurkat) fue más sensible al efecto de la oncotoxina que las células B del linfoma de Burkitt (Raji); requirieron una dosis de 25 y 63  $\mu\text{g/ml}$  respectivamente para causar el 50% de inhibición (Figura No. 7). El principal efecto de la oncotoxina en la proliferación celular del adenocarcinoma de mama se observó en la línea celular (MCF-7); con una dosis de 35  $\mu\text{g/ml}$  se inhibió en un 50%, mientras que la línea celular (CLO) requirió de 90  $\mu\text{g/ml}$  (Figura No. 8). La viabilidad celular relativa al 50% de la leucemia mielocítica crónica (K-562) a la oncotoxina resultó en una dosis de 80  $\mu\text{g/ml}$  (Figura No. 9). Dentro del grupo de carcinoma de ovario, las líneas tumorales que presentaron mayor sensibilidad a la oncotoxina fueron la (OVCA-429) y (OVCA-432); que requirieron de una dosis de 40 y 50  $\mu\text{g/ml}$  respectivamente, a diferencia de la (OVCA-433) que requirió de hasta 100  $\mu\text{g/ml}$  (Figura No. 10). La línea tumoral del Sistema Nervioso Central, Glioblastoma (U-251) fue resistente al efecto de la oncotoxina con las dosis utilizadas (Figura No. 11). Bajo condiciones similares, células mononucleares normales de sangre periférica (PBMN) y células normales de fibroblastos (HFF) fueron

resistentes a la actividad de la oncotoxina aún a una dosis de 100  $\mu\text{g/ml}$ . (Figuras No. 12 y No. 13). Estos resultados indican que la oncotoxina es citotóxica solamente hacia células tumorales.

Se conoce muy poco acerca de la actividad antitumoral de las proteínas de *Bacillus thuringiensis*, estudiada solamente en modelos experimentales murinos. Prasad y Shethna, en 1974, estudiaron una proteína purificada a partir del cristal proteico de *Bacillus thuringiensis* variedad *thuringiensis*, la cual presentó actividad insecticida y antitumoral; esta proteína inhibió el crecimiento del sarcoma ascítico de Yoshida en ratas Wistar tanto *in vivo* como *in vitro*, pero a diferencia de la oncotoxina presenta un peso molecular de 13 kDa (13). El procedimiento de purificación de esta proteína difiere al nuestro, ya que la fracción activa la eluyeron con 0.27 M NaCl en una columna de DEAE celulosa y la oncotoxina se eluyó con 0.05M NaCl en una columna DEAE Affigel blue; la oncotoxina mantiene estable su actividad biológica a temperaturas de  $-20^{\circ}\text{C}$  a  $100^{\circ}\text{C}$ , y a un pH de 4.0 a 8.0, pero es sensible a la digestión enzimática. Por otro lado, se ha demostrado que la proteína de 25 kDa purificada a partir de la delta-endotoxina de *Bacillus thuringiensis* subespecie *israelensis* es citotóxica a células tumorales murinas e incrementa



el efecto citotóxico *in vitro* de ciertos agentes antitumorales contra las células de leucemia murina L-1210 (17, 18, 19). De entre varios agentes quimioterapéuticos el mayor sinergismo se observó con la bleomicina (18).

El mecanismo de acción de las proteínas de *Bacillus thuringiensis* sobre las células tumorales se desconoce, pero se ha demostrado que estas proteínas se unen a lípidos específicos de membrana celular, alterando la integridad de la misma, ocasionando citólisis (17, 18) y/o actuando directamente en la cadena de ADN (19). Desconocemos el mecanismo de acción de nuestra oncotoxina contra las células tumorales, sin embargo; hemos observado que la oncotoxina induce fragmentación del ADN, específicamente en el linfoma histiocítico (U-937), lo que nos sugiere un mecanismo de muerte celular por apoptosis (49), resultados no presentados en este trabajo.

Los resultados aquí descritos demuestran que *Bacillus thuringiensis* variedad *thuringiensis* presenta una proteína, denominada oncotoxina, con actividad antiproliferativa contra una amplia variedad de células tumorales humanas, por lo que es posible contemplar a esta proteína como un nuevo agente antitumoral que sería de gran valor en la terapia del cáncer.

## CAPITULO 5

### CONCLUSIONES

- 1.- Se obtuvieron dos fracciones proteicas purificadas a partir del cristal de *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis*, de 25 y 20 kDa respectivamente.
- 2.- La proteína de 20 kDa (**oncotoxina**) tiene actividad citotóxica hacia células tumorales humanas.
- 3.- La oncotoxina no tiene efecto citotóxico sobre células normales humanas.
- 4.- La actividad biológica de la oncotoxina se mantiene estable a un pH de 4.0 a 8.0, es termoestable y sensible a la digestión enzimática.
- 5.- La oncotoxina tiene especificidad de blanco.

## BIBLIOGRAFIA

1. Whiteley, H. R. and Schnepf, H. E. The molecular biology of parasporal crystal body formation in *Bacillus thuringiensis*. *Ann. Rev. Microbiol.* 40: 549-576. (1986).
2. Green, M., Heumann, M., Sokolow, R., Foster, L. R., Bryant, R. and Skeels, M. Public health implications of the microbial pesticide *Bacillus thuringiensis*: An epidemiological study, Oregon, 1985-86. *American Journal of Public Health.* 80 (7): 848-852. (1990).
3. Dixon, Bernard. Keeping an eye on *Bacillus thuringiensis*. *Bio/Technology.* 12:435. (1994).
4. Höfte, Herman and Whiteley, H. R. Insecticidal Crystal Proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiological Reviews.* 53:242-255. (1989).
5. Tailor, R., Tippett, J., Gibb, G., Pells, S., Pike, D., Jordan, L. and Ely, S. Identification and characterization of a novel *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin entomocidal to coleopteran and lepidopteran larvae. *Molecular Microbiology.* 6 (9): 1211-1217. (1992).
6. Byung-Sik Shin, Seung-Hwan Park, Soo-Keun Choi, Bon-Tag Koo, Sung-Taik Lee and Jeong-il Kim. Distribution of *cry V*-Type Insecticidal Protein Genes in *Bacillus thuringiensis*

and Cloning of *cry V-Type* Genes from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* and *Bacillus thuringiensis* subsp. *entomocidus*. Applied and Environmental Microbiology. 61 (6): 2402-2407. (1995).

7. Bottjer, K. P. and Bone, L. W. Changes in morphology of *Trichostrongylus colubriformis* eggs and juveniles caused by *Bacillus thuringiensis israelensis*. Journal of Nematology. 19 (3): 282-286. (1987).
8. Bone, L. W. and Bottjer, K. P. Factors affecting the larvicidal activity of *Bacillus thuringiensis israelensis* toxin for *Trichostrongylus colubriformis* (Nematoda). Journal of Invertebrate Pathology. 52: 102-7. (1988).
9. Meadows, J., Gill, S. S. and Bone, L. W. Factors influencing lethality of *Bacillus thuringiensis kurstaki* toxin for eggs and larvae of *Trichostrongylus colubriformis* (Nematoda). Journal of Parasitology. 75 (2): 191-194. (1989).
10. Bone, L. W. Activity of commercial *Bacillus thuringiensis* preparations against *Trichostrongylus colubriformis* and *Nippostrongylus brasiliensis*. Journal of Invertebrate Pathology. 53: 276-277. (1989).
11. Prasad, S. S. S. V. and Shethna, Y. I. Enhancement of immune response by the proteinaceous crystal of *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis*. Biochemical and Biophysical Research Communications. 62 (3): 517-523. (1975).

12. Prasad, S. S. S. V. and Shethna, Y. I. Biochemistry and biological activities of the proteinaceous crystal of *Bacillus thuringiensis*. *Biochemical Reviews*. 47: 70-76. (1976).
13. Prasad, S. S. S. V. and Shethna, Y. I. Purification, crystallization and partial characterization of the antitumor and insecticidal protein subunit from the  $\delta$ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis*. *Biochimica et Biophysica Acta*. 363: 558-566. (1974).
14. Prasad, S. S. S. V. and Shethna, Y. I. Biochemistry and biological activities of the proteinaceous crystal of *Bacillus thuringiensis*. *J. Scient. Ind. Res.* 35: 626-632. (1976).
15. Prasad, S. S. S. V. and Shethna, Y. I. Mode of action of a purified antitumor protein from the proteinaceous crystal of *Bacillus thuringiensis* subsp. *thuringiensis* on yoshida ascites sarcoma cells. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 10 (2): 293-298. (1976).
16. Zamola, B., Karminski, G., Fuks, Z., Kubovic, M. and Wrischer, M. Enhancement of intrinsic antitumor activity in spore-endotoxin mixtures of *Bacillus thuringiensis* by exposure to ultraviolet radiation. *Photochemistry Photobiology*. 41 (3): 361-365. (1985).
17. Yokoyama, Y., Ohmori, I., Kohda, K. and Kawazoe, Y. Potentiation of the cytotoxic activity of anticancer drugs against cultured L 1210 cells by *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* toxin. *Chem. Pharm. Bull.* 36 (11): 4499-4504. (1988).

18. Yokoyama, Y., Ohmori, I., Kohda, K. and Kawazoe, Y. Potentiation of antitumor activity of bleomycin towards solid tumors in mice by *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* toxin. *Anticancer Research*. 11: 1625-1628. (1991).
19. Yokoyama, Y. and Kohda, K. Enhanced cytotoxicity caused by increased DNA strand breakage resulting from synergistic potentiation of Bleomycin with *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*  $\delta$ -endotoxin. *Anticancer Research*. 14: 838-840. (1994).
20. Luthy, P. and Ebersold, H. R. The entomocidal toxins of *Bacillus thuringiensis*. *Pharmac Ther Pergoman Press*. Great Britain, 13: 257-283. (1981).
21. Hannay, C. L. and Fitz-James, P. The protein crystals of *Bacillus thuringiensis*. *Canadian Journal of Microbiology*. 1: 694-710. (1955).
22. Cauch, T. L. and Ross, D. A. Production and utilization of *Bacillus thuringiensis*. *Biotechnology and Bioengineering*. 22: 1297-1304. (1980).
23. Hannay, C. L. Crystalline inclusions in aerobic spore-forming bacteria. *Nature*. 127: 1004. (1953).
24. Prasad, S. S. S. V. and Shethna, Y. I. Biochemistry and Biological Activities of the proteinaceous crystal of *Bacillus thuringiensis*. *J. Scient. Ind. Res*. 35: 626-632. (1976).
25. Angus, T. A. A bacterial toxin paralysing silkworm larvae.

Nature. 173: 345-346. (1954).

26. Norris, J. R. The protein crystal toxin of *Bacillus thuringiensis*: Biosynthesis and physical structure. In microbial control of insects and mites. H. D. Burges and N. Y. Hussey, Eds. Academic Press. N. Y., 229-46. (1971).
27. Dulmage, H. T. and Aizawa, K. Distribution of *Bacillus thuringiensis* in nature. Microbial and viral pesticides. Edouard Kurstak Ed. Marcel Dekker, Inc. N. Y. and Basel. 4: 209-237. (1982).
28. De Barjac, H. and Bonnefoi, A. A classification of strains of *Bacillus thuringiensis* with a key their differentiation. Journal of Invertebrate Pathology. 11: 335-347.(1968).
29. Heimpel, A. M. and Angus, T. A. A taxonomic key proposed for the species of the "crystalliferous bacteria". Journal of Invertebrate Pathology. 9: 364-375. (1966).
30. De Barjac, H. and Bonnefoi, A. Essai de classification biochimique et serologique de 24 souches de *Bacillus thuringiensis*. Entomophaga. 7 (1): 5-31. (1962).
31. Norris, J. R. The classification of *Bacillus thuringiensis*. Journal Appl. Bacteriology. 27 (3): 439-447. (1964).
32. Lecadet, M. M. Microbial toxins. Vol. II, ed. by T. C. Montie and S. Kadis, Academic Press Inc., New York and London. 434-471. (1970).

33. Krywienczyk, J. and Angus, T. A. A serological comparasion of the parasporal bodies of three insect pathogens. *Journal of Insect Pathology*. 2: 411-417. (1960).
34. Krywienczyk, J., Dulmage, H. T. and Fast, P. G. Ocurrence of two serologically distinct groups within *Bacillus thuringiensis* serotype 3ab var. *kurstaki*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 31: 372-375. (1978).
35. Krywienczyk, J. Antigenic composition of  $\delta$ -endotoxin as an aid in identification of *Bacillus thuringiensis* varieties. *Insect. Pathology Research Department of Fisheries and the Enviroment. Canadian Forestry Servicie Sault Ste. Marie, Ontario, 1-11. (1977).*
36. De Barjac, H. International Entomopathogenic *Bacillus* Centre. Collection of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus sphaericus* (Classified by H serotypes). Catalogue No. 1. Unite des Bacteries Entomopathogenes. Institut Pasteur, Paris, France. (1994).
37. Yamamoto, T. and Mc Laughlin, R. E. Isolation of a protein from the parasporal crystal of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*: toxic to the mosquito larva, *Aedes taeniorhynchus*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 103 (2): 414-421. (1981).
38. Yamamoto, T. and Ilzuka, T. Two types of entomocidal toxins in the parasporal crystals of *Bacillus thuringiensis kurstaki*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 227 (1): 233-241. (1983).



39. Ang, B. J. and Nickerson, K. W. Purification of the protein crystal from *Bacillus thuringiensis* by zonal gradient centrifugation. *Appl. Environ. Microbiol.* 36: 625-626. (1978).
40. Chestukhina, G. G., Kostina, L. I., Mikhailova, A. L., Tyurin, S. A., Klepikova, F. S. and Stepanov, V. M. The main features of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin molecular structure. *Archives of Microbiology.* 132: 159-162. (1982).
41. Aggarwal, B. B. Human lymphotoxin. *Methods of Enzymology: Immunochemical Techniques.* Vol.116 (G. DiSabato, ed.), Academic Press, New York, 441-448. (1985).
42. Bradford, M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry.* 72: 248-254. (1976).
43. Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T<sub>4</sub>. *Nature.* 227: 680-685. (1970).
44. Oakley, B. R., Kirsch, D. R. and Morris, N. R. A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gels. *Analytical Biochemistry.* 105: 361-363. (1980).
45. Weber, K. and Osborn, M. The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate polyacrilamide gel electrophoresis. *The Journal of Biological Chemistry.* 244 (16): 4406-4412. (1969).

46. Freshney, R. I. Culture of animals cells. Second edition. Alan R. Liss, Inc., New York, p. 7-12, 227-256. (1988).
47. Aggarwal, B. B. and Kohr, W. J. Human Tumor Necrosis Factor. Methods of Enzymology: Immunochemical Techniques. Vol. 116 (G. DiSabato, ed.), Academic Press, New York, p. 448-456. (1985).
48. Aggarwal, B. B., Henzel, W. J., Moffat, B., Kohr, W. J. and Harkins, R. N. Primary structure of human lymphotoxin derived from 1788 lymphoblastoid cell line. The Journal of Biological Chemistry. 260 (4): 2334-2344. (1985).
49. Tomei, L. D. and Cope, F. O. Apoptosis: The Molecular Basis on Cell Death. Current Communications In Cell & Molecular Biology 3. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 5-29. (1991).



