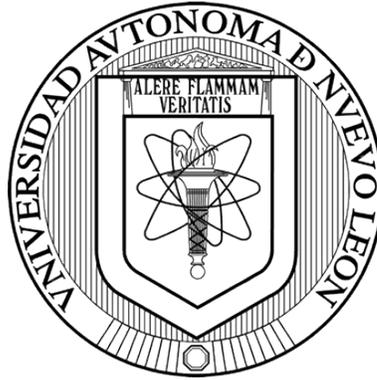


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA DE PARASPORINAS EN CEPAS  
NATIVAS DE *Bacillus thuringiensis*

Por

ASTRID NALLELI ESPINO VÁZQUEZ

Como requisito parcial para obtener el Grado de  
DOCTOR EN CIENCIAS  
CON ESPECIALIDAD EN BIOTECNOLOGÍA

CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA DE PARASPORINAS EN CEPAS  
NATIVAS DE *Bacillus thuringiensis*



Comité de Tesis

A blue ink signature of Dr. Benito Pereyra Alférez, consisting of a large, stylized 'B' followed by 'P' and 'A'.

---

Dr. Benito Pereyra Alférez  
Director de la tesis

A blue ink signature of Dr. Hugo Alberto Luna Olvera, featuring a stylized 'H' and 'L'.

---

Dr. Hugo Alberto Luna Olvera  
Secretario

A blue ink signature of Dr. Luis Jesús Galán Wong, showing a stylized 'L' and 'G'.

---

Dr. Luis Jesús Galán Wong  
Vocal

A blue ink signature of Dra. María del Socorro Flores González, with a stylized 'M' and 'F'.

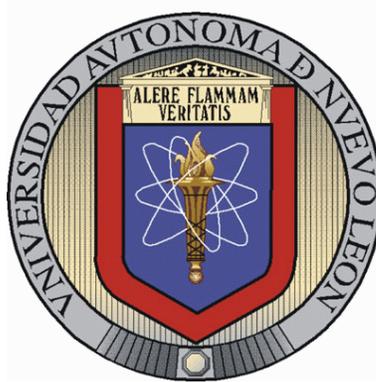
---

Dra. María del Socorro Flores González  
Vocal

A blue ink signature of Dr. Jesús Alberto Gómez Treyiño, featuring a stylized 'J' and 'G'.

---

Dr. Jesús Alberto Gómez Treyiño  
Vocal



ESTE TRABAJO SE LLEVÓ A CABO EN EL LABORATORIO 4 DEL INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS BAJO LA DIRECCIÓN DEL DR. BENITO PEREYRA ALFÉREZ, ASÍ COMO EN EL LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR DE LA FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS BAJO LA ASESORÍA DEL DR. JESÚS ALBERTO GÓMEZ TREVIÑO.

## AGRADECIMIENTOS

Al CONACYT por el financiamiento mediante el proyecto 106061 y el otorgamiento de la beca de doctorado. De igual manera al PAICYT-UANL, por el financiamiento mediante el proyecto CN 1008-11.

Al Dr. Benito Pereyra por ser un guía excelente durante mi formación académica, pero más aún por su amistad y consejos de vida invaluable.

Al Dr. Alberto Treviño por su gran ayuda con los cultivos celulares, así como al Dr. Luis Jesús Galán Wong, Dra. María del Socorro Flores González y Dr. Hugo Alberto Luna Olvera que integran mi comité tutorial.

A los doctores Eiichi Mizuki y Shiro Okumura por proporcionarnos las cepas de referencia y los anticuerpos policlonales para las PS1 y PS4.

Al Dr. Jorge Ramírez y al M. en I.B.B. Simón Guzmán León de la Unidad de Microarreglos de DNA, Instituto de Fisiología Celular UNAM, por la realización de los microarreglos y asesoramiento durante el análisis de los mismos.

A la M.C. Jessica Giselle Herrera Gamboa por su gran ayuda con los geles de doble dimensión. También a la Q.B.P. Claudia Berenice López por su apoyo técnico durante las inmuno detecciones.

Al Dr. Hamlet y Dra. Susana por recibirme tan amablemente en su laboratorio y dejarme hacer uso de sus instalaciones y equipos.

A la M.C. María Lara Banda por las microscopías electrónicas en el Centro de Investigación e Innovación en Ingeniería Aeronáutica, FIME.

## DEDICATORIAS

Vive como si fueras a morir mañana. Aprende como si fueras a vivir siempre.

Mahatma Gandhi (1869-1948)

Brindo mi primer dedicatoria y agradecimiento a la **Vida**. Sobra expresar mi gran admiración hacia ella y ha sido una enorme satisfacción poder dedicar en ella el ejercicio de mi profesión.

También dedico especialmente éste y tantos logros a mi **mamá** Susana Vázquez, quien además de darme la vida, me ha dado muchas razones para vivirla, disfrutarla y afrontarla.

Agradezco como siempre el apoyo de toda mi **familia**, especialmente a Nirvana, Citlalli, Nachito y Tío Nacho, Papá Memo, Margarita y Magaly, Lino, el tío Ubaldo, los Cosain, Alejo, Luzma y Albita, mías tías Sandy, Elvi, Toly, Susy Blanco, Nena, las primas Perlita, Ruby, Jazmín, Liz, Karina, Api y mi madrina Cristy. Sin dejar de lado a **Alonso** que ha sido mi familia en Monterrey y a donde quiera que voy.

A mis **ángeles** guardianes: Tin y Bitá, la Tía Grace, el Tío Arturo, Mikol, Maye y la querubín Romina.

Y por último y no menos importantes a los **amigos, compañeros y compas** (muy importante aclarar), quienes me hacen reír, reflexionar, des estresarme, me aceptan como soy y no terminan de sorprenderme día a día. Los de Durango: Rosita y Micha (que ya son tapatías) Miko, Job, Chuy, Fer, Huicho, Tere, Gera, Richard y Milli. Los del lab: Jessie, Laura, Claus, Xihuitl, Will, Zanya, Saúl, Hugo, Chuy y Fátima. Y los misceláneos: Alvarito, Tere, Juan, Liz, Juanito (Pedro) y Mickey.

# TABLA DE CONTENIDO

Sección	Página
AGRADECIMIENTOS .....	iv
DEDICATORIAS .....	iv
TABLA DE CONTENIDO.....	vi
LISTA DE TABLAS .....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	x
NOMENCLATURA .....	xii
RESUMEN.....	xiv
ABSTRACT .....	xv
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. HIPÓTESIS .....	3
3. OBJETIVOS .....	4
3.1 Objetivo general.....	4
3.2 Objetivos particulares .....	4
4. ANTECEDENTES .....	5
4.1 Datos sobre el cáncer .....	5
4.1.1 Nuevas estrategias terapéuticas.....	6
4.2 <i>Bacillus thuringiensis</i> como recurso biotecnológico.....	7
4.3. Parasporinas .....	9
4.3.1 Estructura de las principales parasporinas .....	11
4.3.2 Espectro citotóxico.....	145
4.3.3 Modo de acción.....	17
4.3.3.1 Receptores de membrana .....	17
4.3.3.2 Apoptosis .....	18
4.3.3.3 Necrosis .....	19
5. MÉTODOS .....	22
5.1 Material biológico.....	22
5.1.1 Cepas de <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	22
5.1.2 Líneas celulares.....	24
5.2 Microscopía electrónica.....	24
5.3 Detección de PS por PCR múltiple.....	24
5.3.1 Extracción de ADN genómico .....	24
5.3.2 Diseño de iniciadores .....	26
5.3.3 Condiciones de la PCR .....	26
5.3.4 Secuenciación nucleotídica de los amplicones .....	27
5.4 Activación de las inclusiones paraesporales.....	27
5.5 Análisis de los cristales paraesporales en geles de poliacrilamida .....	28
5.5.1 Geles de una dimensión .....	28

Sección	Página
5.5.2 Geles bidimensionales .....	29
5.6 Inmunodetección.....	29
5.7 Ensayos de citotoxicidad .....	30
5.7.1 Conteo directo.....	31
5.7.2 Conteo con kit de bioluminiscencia.....	31
5.7.3 Determinación de la concentración efectiva y efecto citotóxico .....	32
5.8 Determinación del modo de acción .....	32
5.8.1 Ensayo múltiple de Viabilidad, Necrosis y Apoptosis.....	32
5.8.2 Microarreglos de ADN .....	33
5.8.2.1 Condiciones de los tratamientos.....	33
5.8.2.2 Extracción de ARN .....	34
5.8.2.3 Marcaje e hibridación.....	35
5.8.2.4 Análisis de los datos.....	35
5.8.3 Validación de microarreglos .....	36
5.8.3.1 Diseño de iniciadores para qPCR.....	36
5.8.3.2 Extracción del RNA total y síntesis de ADNc .....	36
6. RESULTADOS .....	38
6.1 Selección de cepas de <i>B. thuringiensis</i> productoras de parasporinas .....	38
6.1.1 Identificación de genes de parasporinas .....	38
6.1.1.1 Diseño de iniciadores y estandarización de PCR múltiple.....	39
6.1.1.2 Detección por PCR múltiple .....	41
6.1.1.3 Secuenciación de los productos amplificados.....	43
6.1.2 Selección de cepas con actividad anti-cancerígena <i>in vitro</i> .....	43
6.1.2.1 Validación de los ensayos de citotoxicidad.....	46
6.1.2.2 Ensayos de selección con células de leucemia .....	48
6.2 Descripción de las cepas seleccionadas.....	50
6.3 Caracterización de los cristales paraesporales de las cepas seleccionadas.....	50
6.3.1 Morfología de los cristales.....	52
6.3.2 Perfiles proteicos.....	57
6.3.2.1. SDS-PAGE.....	57
6.3.2.2 Electroforesis en doble dimensión .....	62
6.4 Inmunodetección de parasporina-1 y parasporina-4.....	678
6.5 Actividad anticancerígena de los cristales paraesporales .....	74
6.5.1 Ensayos con células normales de piel.....	74
6.5.2 Ensayos contra las líneas de cáncer humano y murino.....	76
6.6 Modo de acción de los cristales paraesporales .....	79
6.6.1 Ensayo múltiple de modo de acción para todas las cepas.....	79
6.6.1.1 Viabilidad.....	79
6.6.1.2 Necrosis.....	80
6.6.1.3 Apoptosis.....	81
6.6.1.4 Análisis global del ensayo múltiple .....	81
6.6.2 Modo de acción de los cristales de IB84 sobre la línea MOLT-4 .....	83
6.6.2.1 Cinéticas de citotoxicidad .....	83

<b>Sección</b>	<b>Página</b>
6.6.2.2 Microarreglos de ADN.....	86
6.6.2.2.1 Análisis comparativo de los tres chips .....	86
6.6.2.2.2 Ontología de los genes anotados para el primer chip.....	88
6.6.2.2.3 Principales rutas implicadas en la respuesta a la PS4 .....	90
6.6.2.3 Validación por PCR cuantitativa.....	94
6.6.2.4 Modelo del mecanismo de acción de la PS4 .....	98
7. DISCUSIÓN .....	101
7.1 Incidencia de PS en cepas nativas.....	101
7.2 Caracterización de los cristales paraesporales .....	102
7.3 Actividad biológica.....	103
7.4 Modo de acción.....	104
7.4.1 Modo de acción de la PS4.....	105
7.4.2 Procesos intracelulares activados por TFP .....	105
7.4.3 Genes implicados en el modo de acción de la PS4.....	108
8. CONCLUSIONES .....	109
APÉNDICES .....	110
APÉNDICE A: Electroferograma de la secuencia nucleotídica de la cepa IB84. ....	110
APÉNDICE B: Electroferograma de la secuencia nucleotídica de la cepa IB88. ....	111
APÉNDICE C: Electroferograma de la secuencia nucleotídica de la cepa CL9-1 ..	112
APÉNDICE D: Electroferograma de la secuencia nucleotídica de la cepa CL9-21.112	112
APÉNDICE E: Electroferograma de la secuencia nucleotídica de la cepa CL9-3...113	113
APÉNDICE F: Electroferograma de la secuencia nucleotídica de la cepa GM18 ..	114
APÉNDICE G: Características de los iniciadores diseñados para qPCR .....	115
APÉNDICE H: Curvas de disociación de los amplicones de qPCR.....	116
LITERATURA CITADA.....	117
RESÚMEN BIOGRÁFICO .....	127

## LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
I. Principales tipos de cáncer para ambos sexo en el año 2012.....	6
II. Características principales de las parasporinas reportadas.....	10
III. Espectro citotóxico de las principales parasporinas .....	16
IV. Cepas de <i>Bacillus thuringiensis</i> analizadas en este estudio .....	23
V. Lista de líneas celulares del estudio .....	25
VI. Componentes para los ensayos de citotoxicidad .....	30
VII. Iniciadores diseñados para detección de PS por PCR múltiple .....	40
VIII. BLAST de los productos secuenciados contra todas las parasporinas .....	44
IX. Descripción de las cepas productoras de parasporinas de este estudio .....	51
X. CE <sub>50</sub> de los cristales paraesporales de las cepas seleccionadas contra las siete líneas .....	78
XI. Rutas implicadas en el modo de acción de la PS4 de la cepa IB84 .....	92
XII. Genes seleccionados para validación de microarreglos .....	96

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Página</b>
1. Diagrama conceptual de las actividades biológicas de <i>B. thuringiensis</i> .....	8
2. Esquematación de los fragmentos tóxicos de las principales parasporinas. ....	14
3. Modo de acción de las parasporina-1 .....	21
4. Modo de acción de las parasporina-2.....	21
5. Condiciones y diseño experimental de los 3 Microarreglos de ADN.....	37
6. Programa estandarizado para la programadas para la PCR múltiple .....	39
7. Productos de PCR de las cepas IB88, IB84, CL9-1, CL9-3 y CL9-21 .....	42
8. Localización de los fragmentos secuenciados de las cepas del estudio .....	45
9. Testigos de los ensayos de citotoxicidad en células MOLT-4 .....	47
10. Efecto citotóxico medio de los cepas de referencia contra MOLT-4.....	47
11. Ensayos preliminares de citotoxicidad con células MOLT-4 .....	48
12. Ensayos de selección con células de leucemia MOLT-4 y Jurkat .....	49
13. Microscopía electrónica de las esporas y cristales la cepa IB88.....	53
14. Microscopía electrónica de las esporas y cristales las cepas A1470 e IB84.....	54
15. Microscopía electrónica de las esporas y cristales las cepas IB79 y GM18.....	55
16. Microscopía electrónica de las esporas y cristales las cepas CL9-1 y CL9-3.....	56
17. Perfiles proteicos de los cristales de las cepas de referencia .....	59
18. Perfiles proteicos de los cristales de las cepas IB84, IB88, IB79 y GM18.....	60
19. Perfiles proteicos de los cristales de las cepas A1190, CL9-1, CL9-3 y CL9-21.....	61
20. Geles de 2D para los cristales de las cepas IB79 y A1470 .....	64
21. Geles de 2D para los cristales de la cepa IB88 .....	65
22. Geles de 2D para los cristales de la cepas IB84.....	66
23. Geles de 2D para los cristales de la cepa GM18.....	67

<b>Figura</b>	<b>Página</b>
24. Inmunodetección de PS1 para los cristales solubilizados de todas las cepas .....	70
25. Inmunodetección de PS1 para los cristales activados de todas las cepas .....	71
26. Inmunodetección de PS4 para los cristales solubilizados de todas las cepas .....	72
27. Inmunodetección de PS4 para los cristales activados de todas las cepas .....	73
28. Ensayos de una sola Dosis en tres líneas celulares .....	75
29. Efecto citotóxico de las cepas seleccionadas ante cinco líneas de cáncer .....	77
30. Modo de acción de los cristales paraesporales .....	82
31. Cinética de los tiempos letales para los cristales paraesporales de IB84.....	84
32. Cinética del modo de acción de los cristales de la cepa IB84.....	85
33. Diagramas de conjuntos para los genes y rutas encontrados en los tres chips.....	87
34. Ontología génica del primer chip de microarreglos .....	89
35. Interacciones de los genes implicados en las principales vías encontradas .....	93
36. Expresión génica relativa de los genes seleccionados para qPCR.....	97
37. Modelo del modo de acción de la parasporina 4.....	100

## NOMENCLATURA

$\alpha$	Alfa
ATP	Adenosín trifosfato
$\beta$ -TPF	Toxinas formadoras de poro beta
$\delta$	Delta
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ADNc	Ácido Desoxirribonucleico complementario
Am	Ampicilina
ARN	Ácido Ribonucleico
ARNt	Ácido Ribonucleico de transferencia
ATCC	American Type Culture Collection
ATF-6	Factor de transcripción activador 6
B2M	Beta 2 microglobulina
BLAST	“Basic Local Alignment Search Tool”
C	Cloramfenicol
CACN	Canal de calcio, subunidad 1 alpha
Caz	Ceftazidima
CE <sub>50</sub>	Concentración efectiva media
Cf	Cefalotina
CO <sub>2</sub>	Monóxido de carbono
Cro	Ceftriaxona
Ctx	Cefotaxima
Cxm	Cefuroxima
DAVID	“Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery”
Dc	Dicloxacilina
DMEM	Medio de Eagle Modificado de Dulbecco
DMSO	Dimetil Sulfóxido
DTT	Ditiotreitol
EC	Efecto citotóxico
EDTA	Dihidrato del Ácido Etilendiamino Tetraacético Disódico
Ex/Em	Excitación/Emisión
FDGFR	Receptor de factor de crecimiento derivado de plaquetas
Fep	Cefepime
g	Fuerza G
GADD45	Arresto del crecimiento y daño de DNA
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
IL12	Interleucina 12 $\beta$
IL29	Interleucina 29
IPTG	Isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido
IP3R	Receptor inositol 1,4,5-trifosfato
JNK	Quinasa c-Jun N-terminal
KEGG	Enciclopedia de Kioto de Genes y Genomas
LB	Medio Luria Bertani

LDH	Lactato deshidrogenasa
LLO	Listeriolisina O
M	Concentración Molar
MAPK	Proteína quinasa activada por mitógeno
MEM $\alpha$	Medio Mínimo Esencial alfa sin nucleósidos
ml	Mililitros
mQ	Agua de grado molecular
mTOR	Diana de rapamicina en células de mamífero
N	Concentración Normal
NaCl	Cloruro de Sodio
NaOH	Hidróxido de Sodio
NCBI	National Center for Biotechnology Information
nm	Nanómetros
P	Penicilina
PANTHER	Software “Protein ANalysis THrough Evolutionary Relationships”
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas $\alpha$
PES	Poliéter sulfona
pI	Punto isoeléctrico
PI3K	Fosfoinositol 3-quinasa
PKC	Proteína cinasa C $\alpha$
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PP3C	Fosfoproteína fosfatasa 3 (2B)
PS	Parasporinas
p38	Proteína quinasa activada por mitógeno p38
qPCR	PCR cuantitativa
Rpm	Revoluciones por minuto
RPMI	Medio del Instituto Roswell Park Memorial.
SDS	Sodecilsulfato Sódico
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con Sodecilsulfato Sódico
TBS	Buffer Tris Salino
TE	Tetraciclina
TFP	Toxinas Formadoras de Poros
TL	Tiempo letal
TNFR	Receptor de factor de necrosis tumoral
$\mu$ g	Microgramos
$\mu$ l	Micro litros
$\mu$ m	Micrómetros
$\mu$ M	Micro Molar
UPR	Respuesta a Proteínas Desplegadas
URF	Unidades relativas de fluorescencia
URL	Unidades Relativas de luminiscencia
VA	Vancomicina
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosido

## RESUMEN

Las parasporinas (PS) representan una nueva clase de proteínas de los cristales de *Bacillus thuringiensis* con actividad biológica hacia células de cáncer de diversos orígenes. Se caracterizan por presentar baja o nula citotoxicidad hacia células normales, además de inducir la apoptosis o necrosis de las células blanco. En este trabajo fueron detectadas siete cepas de *B. thuringiensis* productoras de PS, por medio de ensayos de *in vitro* de citotoxicidad y amplificación génica por PCR múltiple. Todas desplegaron actividad preferencial contra las diversas líneas celulares de cáncer y baja citotoxicidad hacia células normales de piel. Como resultado de la caracterización de las proteínas paraesporales, fueron identificadas las siguientes parasporinas: PS1 (cepas CL9-1, CL9-3, IB79), PS2 (IB88, CL9-21), PS3 (CL9-21), PS4 (IB84, IB79, CL9-21). Únicamente no fue posible la caracterización del tipo de PS presente para la cepa GM18, ya que las proteínas de su cristal no mostraron relación con las PS de referencia en ninguna de las técnicas empleadas. Con respecto al modo de acción, la evidencia experimental sobre los cristales de GM18, CL9-1 y CL9-3 apunta a la inducción de apoptosis en las células de leucemia MOLT-4. Mientras que para las cepas restantes, se propone la muerte por necrosis, producida por pérdida de la integridad de membrana. Adicionalmente, por medio de microarreglos de ADN, se llevó a cabo un estudio más detallado del efecto de los cristales de IB84 en células MOLT-4. Mismo que reveló la activación de numerosas rutas implicadas en la respuesta celular a toxinas formadoras de poros (TFP). Entre las principales figuran la proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK), señalización por calcio, endocitosis e hipoxia. La validación reiteró la regulación de genes de importancia en dichas rutas que codifican para ciertos receptores y moléculas de membrana, así como algunos ligandos y moléculas de señalización intracelular. En conclusión, los resultados confirman la presencia de diversos tipos de PS en varios de nuestros aislados, que poseen características únicas de gran potencial para su aplicación como nuevos agentes terapéuticos.

## ABSTRACT

The parasporins (PS) represent a new class of crystal proteins from *Bacillus thuringiensis* with biological activity against cancer cells from different origins. They are characterized by having low or null cytotoxicity to normal cells as well as the induction of apoptosis or necrosis of target cells. In this study there were detected seven *B. thuringiensis* strains PS producers, through cytotoxic *in vitro* assays and genic amplification by multiplex PCR. All of them displayed preferential activity against diverse cancer cell lines and a low cytotoxicity on normal skin cells. As a result of parasporal protein characterization, there were identified the following parasporins: PS1 (CL9-1, CL9-3, IB79 strains), PS2 (IB88, CL9-21), PS3 (CL9-21), PS4 (IB84, IB79, CL9-21). Only it was not possible the PS type characterization for the GM18 strain, because their crystal proteins have no association to reference PS by any of the used techniques. In respect to the mode of action, the experimental evidence from GM18, CL9-1 and CL9-3 crystals suggests the apoptosis induction in MOLT-4 leukemia cells. Meanwhile, to the rest of the strains it is proposed the necrotic cell death by loss of membrane integrity. Additionally, through DNA microarrays we conducted a more detailed study of the effect of IB84 crystals on the MOLT-4 cells. That one revealed the activation of numerous pathways implicated in the cellular response to pore forming toxins (PFT). Among of the main pathways figure the mitogen activated protein kinase (MAPK), calcium signaling, endocytosis and hypoxia. The validation reiterates the regulation of importance genes from those pathways whose codify to certain receptors and membrane molecules, and ligands and signaling molecules as well. In conclusion, the results confirm the presence of diverse types of PS from some of our isolates which have unique characteristics of great potential for application as novel therapeutic agents.

## 1. INTRODUCCIÓN

El *Bacillus thuringiensis* es una bacteria capaz de sintetizar una gran cantidad y variedad de agentes con actividad citotóxica hacia una amplia gama de organismos, tanto procariotas como eucariotas. Entre los compuestos antimicrobianos que produce se encuentran: i) antibióticos como la zwittermicina A (Stabb *et al.*, 1994) y ii) bacteriocinas (Abriouel *et al.*, 2011). Entre los principales factores de virulencia contra eucariotas, se distinguen tres grupos de proteínas sintetizadas por *B. thuringiensis*: i) las proteínas VIP, que son producidas y excretas al medio durante la fase vegetativa (Selvapandiyar *et al.*, 2001); ii) exotoxinas, una serie de toxinas termolábiles o solubles que presentan actividad enzimática inespecífica (Perani *et al.*, 1998) y iii)  $\delta$ -endotoxinas, que son sintetizadas como inclusiones durante la fase de esporulación, y al término de esta, son liberadas como cristales de diferentes formas geométricas (de Maagd *et al.*, 2001).

Las  $\delta$ -endotoxinas comprenden a las proteínas Cyt, que son hemolíticas e inespecíficas, y a las proteínas Cry, que son altamente específicas y de una gran variabilidad entre las diferentes cepas de *B. thuringiensis*, así como un enorme espectro de organismos blanco (Schnepf *et al.*, 1998). Dentro del espectro de toxicidad, la actividad insecticida de las proteínas Cry, constituye la propiedad más explotada de *B. thuringiensis*.

Actualmente los formulados hechos a base de estas proteínas, integran la mayor parte de los productos empleados para el control biológico de plagas (de Maagd *et al.*, 2001). No obstante, en años más recientes se han encontrado proteínas Cry con propiedades igualmente interesantes y con un enorme potencial para otras áreas económicas. Entre ellas, se encuentran la actividad hacia hongos, nematodos, protozoarios y células cancerígenas de diferentes orígenes (Jouzani *et al.*, 2008; Bagley *et al.*, 1993; Kondo *et al.*, 2002; Mizuki *et al.*, 1999).

La actividad anti-cancerígena, desplegada por el grupo de proteínas Cry conocidas también como parasporinas, llama la atención por presentarse en condiciones completamente artificiales, que no podrían reproducirse en la naturaleza. En primer lugar, las proteínas paraesporales necesitan ser solubilizadas a pH muy alcalinos o ácidos y posteriormente, requieren de la hidrólisis proteolítica específica para la adquisición de su conformación tóxica (Mizuki *et al.*, 2000; Okumura *et al.*, 2006). Pese a esto, su aplicación en ensayos *in vitro* e *in vivo* ha sido exitosa, demostrando que las PS son altamente citotóxicas contra las células de cáncer y prácticamente inocuas para las células normales (Kim *et al.*, 2003; El-Hag y Safhi, 2011).

## **2. HIPÓTESIS**

Una o varias cepas de la colección de *B. thuringiensis* del Instituto de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Biológicas-UANL sintetizan proteínas Cry con actividad biológica *in vitro* contra células de cáncer.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo general

- Identificar y caracterizar las parasporinas presentes en las cepas de *Bacillus thuringiensis*, de la colección del Instituto de Biotecnología FCB-UANL.

#### 3.2 Objetivos particulares

- Detectar por PCR múltiple, genes de parasporinas en cepas de la colección de *B. thuringiensis* del Instituto de Biotecnología FCB-UANL.
- Realizar ensayos preliminares de citotoxicidad en células de leucemia, para evaluar el potencial anti-cancerígeno de las inclusiones de cepas negativas por PCR.
- Definir la Concentración Efectiva Media (CE<sub>50</sub>) y el Efecto Citotóxico (EC) de los cristales activados de las cepas seleccionadas, sobre siete líneas celulares.
- Determinar el modo de acción de los cristales de las cepas seleccionadas mediante ensayos múltiple de viabilidad, necrosis y apoptosis.
- Establecer un modelo de acción detallado para las inclusiones con un mayor EC, en base al análisis de la respuesta celular a nivel transcripcional.

## 4. ANTECEDENTES

### 4.1 Datos sobre el cáncer

El cáncer es un término genérico que designa un amplio grupo de enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del organismo. Inicia con la transformación de una sola célula que se divide de manera descontrolada hasta convertirse en una masa tumoral, y en procesos más avanzados, llegar a invadir partes adyacentes del cuerpo o propagarse a otros órganos. Su complejidad radica en que no se trata de una sola enfermedad, sino que engloba más de 200 tipos de padecimientos. Además, su desarrollo implica una gran cantidad de factores, desde genéticos hasta medio ambientales (Wong, 2012).

En la actualidad, el cáncer es una de las primeras causas de muerte a nivel mundial, tan solo en el 2012 se le atribuyeron 8,2 millones de muertes (OMS, 2012); en donde los de mayor incidencia se encuentran el cáncer de pulmón, seno y colorectal, como se describen en la tabla I (Ferlay *et al.*, 2013). También representa una de las enfermedades más costosas. En 2008 se invirtió 20% más en el tratamiento del cáncer que en otras enfermedades mayores (American Cancer Society and Livestrong, 2010). En los Estados Unidos, el costo en gastos médicos relacionados al cáncer fue de \$201.5 y ocasionó cerca de \$124 billones en pérdidas de productividad debido a muertes prematuras (Luo *et al.*, 2013). No obstante, en la actualidad más gente sobrevive al cáncer que en el pasado. Para el 2012 hubo casi 2 millones más de sobreviviente de lo estimado, superando las expectativas de sobrevivencia calculadas desde el 2008 para ese año. Esto, en gran medida como resultado de la inversión en investigación enfocada en el estudio, prevención y tratamiento de los diferentes tipos de cáncer (Siegel *et al.*, 2013).

TABLA I

Principales tipos de cáncer para ambos sexo en el año 2012

No.	Tipo de Cáncer <sup>a</sup>	%	No.	Tipo de Cáncer <sup>a</sup>	%
1.	Pulmón	13.0	15.	Labios, cavidad oral	2.1
2.	Seno	11.9	16.	Tiroides	2.1
3.	Colorectal	9.7	17.	Cerebro, sistema nervioso	1.8
4.	Próstata	7.9	18.	Ovario	1.7
5.	Estómago	6.8	19.	Melanoma de piel	1.6
6.	Hígado	5.6	20.	Vesícula biliar	1.3
7.	Cérvix	3.7	21.	Laringe	1.1
8.	Esófago	3.2	22.	Otros de faringe	1.0
9.	Vejiga	3.1	23.	Mieloma múltiple	0.8
10.	Linfoma (no Hodgkin)	2.7	24.	Nasofaríngeo	0.6
11.	Leucemia	2.5	25.	Linfoma de Hodgkin	0.5
12.	Páncreas	2.4	26.	Testículos	0.4
13.	Riñón	2.4	27.	Sarcoma de Kaposi	0.3
14.	Endometrio	2.3			

<sup>a</sup> Excluyendo el cáncer de piel no melanoma. Datos obtenidos del reporte de la International Agency for Research on Cancer para el 2013.

#### 4.1.1 Nuevas estrategias terapéuticas

Los principales procedimientos para la erradicación de los diferentes tipos de cáncer son la quimioterapia, radioterapia y la cirugía; que resultan muy invasivos y con un gran número de efectos secundarios o secuelas. Recientemente, nuevos métodos de detección, diagnóstico y tratamiento del cáncer, han surgido gracias a décadas de investigación. Entre las más prometedoras tecnologías se encuentran: i) la inmunoterapia, que utiliza moléculas que estimulan el sistema inmune para la destrucción de cierto tipo de tumores (Clynes *et al.*, 2000); ii) terapias moleculares, dirigidas hacia tipos específicos de células cancerosas, bloqueando su crecimiento anormal por interferencia en la señalización intracelular (Verma *et al.*, 2012) y iii) nanotecnología, para la implementación de fármacos por medio de nano partículas (Socinski *et al.*, 2012).

Dentro del desarrollo en investigación de nuevos fármacos, existe una rama dedicada al descubrimiento e implementación de compuestos de origen natural para el combate de células cancerosas. Específicamente, compuestos con actividades anti-cancerígena producidos por microorganismos, como las bacterias, presentan algunas ventajas sobre otras fuentes naturales. Una muy evidente, es su alta tasa de crecimiento, que favorece a una acelerada producción de compuestos, al igual que su versatilidad para crecer en medios de cultivo preparados a partir de residuos agroindustriales, lo que reduce costos de producción, sin dejar de lado su amplia biodiversidad, que aumenta el potencial para la búsqueda de nuevos compuestos. Adicionalmente, las bacterias pueden manipularse fácilmente e incluso modificarse genéticamente, para una incalculable cantidad de aplicaciones biotecnológicas (Harvey, 2008).

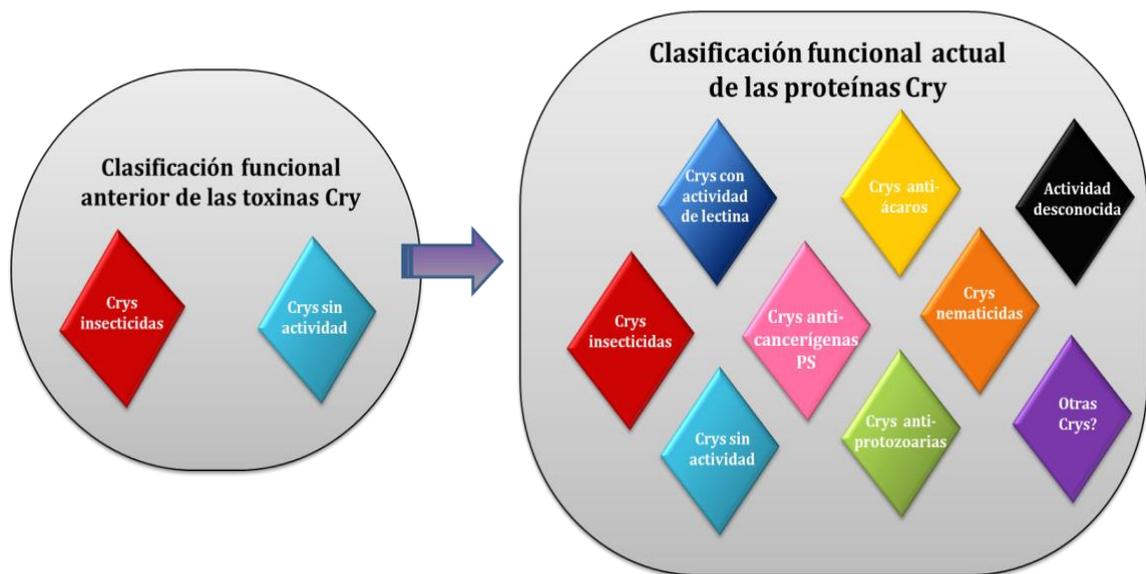
Es por todo esto, que este estudio está enfocado en la caracterización de nuevas proteínas bacterianas con actividad anti-cancerígena. Específicamente, aquellas denominadas parasporinas (PS) que son producidas por *B. thuringiensis*, una bacteria de gran interés biotecnológico.

#### **4.2 *Bacillus thuringiensis* como recurso biotecnológico**

El *B. thuringiensis* es una bacteria Gram positiva, aerobia facultativa y esporulada, que se caracteriza de otros bacilos estrechamente relacionados, como *Bacillus cereus* y *Bacillus anthracis*, por la formación de cristales de naturaleza proteica durante la fase de esporulación (Schnepf *et al.*, 1998). Esta es una característica destacable, ya que existe una amplia variedad de proteínas contenidas en los cristales, principalmente proteínas Cry, que exhiben efectos citotóxicos hacia un gran número de especies. La popularidad de las proteínas Cry ha radicado principalmente en su actividad biológica contra insectos (de Maagd *et al.*, 2001) y nemátodos (Jouzani *et al.*, 2008), y en menor medida, contra algunos ácaros y protozoarios (Bagley *et al.*, 1993; Kondo *et al.*, 2002).

Aunque existe una extensa variedad de proteínas Cry con actividad insecticida, un número importante de cepas de *B. thuringiensis* producen inclusiones proteicas que no manifiestan toxicidad hacia insectos, nematodos o protozoarios; representando incluso una mayor distribución en los ambientes naturales, que aquellas cepas que sí presentan actividad contra estos organismos (Meadows *et al.*, 1992; Ohba and Aizawa, 1986).

En años más recientes, el estudio de las proteínas Cry no insecticidas, ha revelado nuevas propiedades, como se esquematiza en la figura 1. Tal es el caso de las lectinas (Akao *et al.*, 1999), la actividad anti-tricomonas (Kondo *et al.*, 2002) y la anti-cancerígena (Mizuki *et al.*, 2000). Siendo esta última, la parte central de este estudio, ya que presenta un gran potencial terapéutico, mediante el uso de un nuevo grupo de proteínas Cry denominadas parasporinas, detalladas a continuación.



**Figura 1.** Diagrama conceptual de las actividades biológicas de *B. thuringiensis*

### 4.3. Parasporinas

Las parasporinas (PS) son definidas como un nuevo grupo de proteínas Cry sintetizadas por *B. thuringiensis* o bacterias relacionadas, que presentan actividad biológica específica contra células de cáncer y tienen baja o nula actividad hacia células normales (Mizuki *et al.*, 2000). Las principales características de las PS son: i) no presentan actividad insecticida conocida (Lee *et al.*, 2000); ii) son sintetizadas como protoxinas, es decir, necesitan ser hidrolizadas por proteasas en puntos específicos para su activación (Okumura *et al.*, 2006); iii) tienen una alta toxicidad a células humanas de cáncer, pero una baja o nula hacia células sanas (Ohba *et al.*, 2009) y 4) poseen bajos porcentajes de identidad con proteínas Cry insecticidas (Ichikawa *et al.*, 2007).

Las PS son clasificadas y nombradas por el “Comité para la Clasificación y Nomenclatura de Parasporinas” (Okumura, *et al.*, 2010), en base al mismo principio de clasificación de Cry, fundamentado en el grado de identidad de sus secuencias de amino ácidos (Crickmore *et al.*, 1998). Por lo tanto, estas proteínas poseen dos claves, PS y Cry.

Actualmente, existen seis grupos o familias de parasporinas PS1-PS6, y aunque hay 29 secuencias parciales o completas de PS reportadas en el Gen Bank, solo 19 cuentan con una nomenclatura oficial (Okumura *et al.*, 2010). En cuanto a su ubicuidad, el mayor número de aislados de *B. thuringiensis* productores de PS provienen de Asia, de países como Japón (Mizuki *et al.*, 1999; Uemori *et al.*, 2007), Vietnam (Yasutake *et al.*, 2008), Malasia (Nadarajah *et al.*, 2006) e India (Poornima *et al.*, 2010); pero también existen reportes más recientes de este tipo de cepas en el continente americano, como de islas de islas del Caribe (Gonzalez *et al.*, 2011), Canadá (Jung *et al.*, 2007) y México, en este estudio (Espino Vazquez, *et al.*, 2012).

TABLA II

Características principales de las parasporinas reportadas

Parasporina	No. Cry	Cepa	Gen (pb)	Pro-toxina	Punto	Toxina(s) kDa	País	Referencia
				kDa	Isoeléctrico			
PS1Aa1	Cry31Aa1	A1190	2,169	81	5.95	15 y 56	Japón	(Mizuki <i>et al.</i> , 2000)
PS1Aa2	Cry31Aa2	M15	2,226	83	5.93		Canadá	(Jung <i>et al.</i> , 2007)
PS1Aa3	Cry31Aa3	B195	2,169	81	5.95		Japón	(Uemori <i>et al.</i> , 2008)
PS1Aa4	Cry31Aa4	Bt 79-25	2,169	81	5.95		Vietnam	(Yasutake <i>et al.</i> , 2008)
PS1Aa5	Cry31Aa5	Bt 92-10	2,169	81	5.95		Vietnam	(Yasutake <i>et al.</i> , 2008)
PS1Aa6	Cry31Aa6	64-1-94, M15, M019	2,262	84	5.97	15 y 55	Japón, Caribe, Canadá	(Nagamatsu <i>et al.</i> , 2010)
PS1Ab1	Cry31Ab1	B195	2,178	82	5.97		Japón	(Uemori <i>et al.</i> , 2008)
PS1Ab2	Cry31Ab2	Bt 31-5	2,178	82	5.97		Vietnam	(Yasutake <i>et al.</i> , 2008)
PS1Ac1	Cry31Ac1	Bt 87-29	2,331	87	5.92		Vietnam	(Yasutake <i>et al.</i> , 2008)
PS1Ac2	Cry31Ac2	B0462	2,331	87	5.96	15 y 60	Japón	(Kuroda <i>et al.</i> , 2013)
PS1Ad1	Cry31Ad1	64-1-94, M15, M019	2,262	84	5.92	15 y 55	Japón, Caribe, Canadá	(Nagamatsu <i>et al.</i> , 2010)
PS1Ad2	Cry31Ad1	64-1-94*	2,277	85	5.92		Caribe	(GenBank AGO57767.1)
PS2Aa1	Cry46Aa1	A1547	1,014	37	5.91	28	Japón	(Ito <i>et al.</i> , 2004)
PS2Aa2	Cry46Aa2	A1470	1,011	37	5.90	30	Japón	(Okumura <i>et al.</i> , 2013)
PS2Ab1	Cry46Ab1	TK-E6	912	33	5.91		Japón	(Hayakawa <i>et al.</i> , 2007)
PS3Aa1	Cry41Aa1	A1462	2,475	94	6.00	64	Japón	(Yamashita <i>et al.</i> , 2005)
PS3Ab1	Cry41Ab1	A1462	2,487	94	6.00		Japón	(Yamashita <i>et al.</i> , 2005)
PS4Aa1	Cry45Aa1	A1470, T98*	2,487	30	5.99	26.8	Japón	(Okumura <i>et al.</i> , 2004)
PS5Aa1	Cry64Aa1	A1100*	918	34	5.79		Japón	(GenBank AB555650.1)
PS6Aa1	Cry63Aa1	64-1-94, M15, M019	2,259	85	5.98	14 y 59	Japón, Caribe, Canadá	(Nagamatsu <i>et al.</i> , 2010)

\* Datos no publicados

### 4.3.1 Estructura de las principales parasporinas

Las PS son sintetizadas como protoxinas y para adquirir su conformación tóxica, primero necesitan ser solubilizadas a pH alcalino (Mizuki *et al.*, 2000) o ácido (Okumura *et al.*, 2006) y posteriormente ser digeridas por serín proteasas, como la proteínasa K (Ohba *et al.*, 2009). Como se observa en la tabla II, solo se conocen los fragmentos tóxicos de algunas PS, ya que estos solo pueden ser determinados experimentalmente, mediante digestión, ensayos *in vitro* y secuenciación aminoacídica. A lo largo de esta sección, se detallarán las PS mejor caracterizadas en cuanto a su estructura y conformación tóxica (Fig. 2).

La PS1 fue identificada en los cristales de la cepa A1190. En su forma nativa, la constituye una protoxina de 81 kDa con la estructura típica de los tres dominios de proteínas Cry, cuya secuencia aminoacídica contiene los cinco bloques conservados, comúnmente descritos para las Crys insecticidas. Tras ser hidrolizada, son generados tres péptidos, dos de ellos tóxicos: uno pequeño de 15 kDa y otro de 56 kDa. Interesantemente, los dos fragmentos forman un heterodímero muy difícil de disociar, que compone el fragmento tóxico de la PS1Aa1 (Katayama *et al.*, 2005).

Las dos parasporinas del grupo 2, producidas por las cepas A1547 (PS2Aa1) y A1470 (PS2Aa2), son proteínas pequeñas de 37 kDa en su forma nativa, que no poseen ninguno de los bloques conservados típicos de las proteínas Cry (Kitada *et al.*, 2006). Se diferencian tan solo en cuatro residuos de aminoácidos y en el sitio de digestión con proteínasa K; donde al ser cortadas hacia los extremos amino y carboxilo terminal, se generan toxinas monoméricas de 26 y 30 kDa (Ito *et al.*, 2004; Okumura *et al.*, 2013). El análisis de la estructura tridimensional de la PS2Aa1, indica que está compuesta por tres dominios, conformados principalmente de barriles  $\beta$ . Esta estructura no se asemeja a la de tres dominios de las Cry's clásicas, sino a las toxinas formadoras de poros (TFP) del tipo de las aerolisinas (Akiba *et al.*, 2009).

Las dos parasporinas del grupo 3 (Cry41Aa1 y Cry41Ab1), son sintetizadas por la cepa A1462 y representan las de mayor masa molecular entre las PS, con un peso de 93 kDa. A diferencia de las anteriores, poseen los cinco bloques de secuencias conservadas características de las proteínas Cry y se predice que también tienen una estructura tridimensional de tres dominios. Tras ser digeridas hacia sus dos extremos, son generados tres fragmentos, en donde el más grande, corresponde a la toxina de 64 kDa (Yamashita *et al.*, 2005). Como dato interesante, las secuencias aminoacídicas de estas parasporinas, son similares a la hemaglutinina HA-33 de *Clostridium botulinum*, la bacteria causante del botulismo (Ohba *et al.*, 2009; Tsuzuki *et al.*, 1990).

Por otra parte, aunque existen tres secuencias nucleotídicas y aminoacídicas correspondientes a parasporinas del grupo 4 en el Gen Bank (No. Acceso: AB180980.1; KC832500.1; KC832499.1), solo una ha sido descrita y caracterizada. Esta corresponde a la PS4Aa1 producida por la cepa A1470, que es una proteína de 30 kDa en su forma nativa y de 27 kDa en su forma tóxica (Okumura *et al.*, 2004). Al igual que las PS2, no posee los bloques conservados de Cry, ni la estructura típica de tres dominios (Okumura *et al.*, 2005). Esta es la única parasporina que ha sido estandarizada a pH ácido, ya que tras ser solubilizada en HCl 10 mmol, se observó un incremento del 25% en su efecto citopático hacia varias líneas celulares, en comparación a su actividad tras la solubilización en buffer de carbonatos. También se ha visto que puede ser activada tanto con proteinasa K como con Pepsina (Okumura *et al.*, 2006).

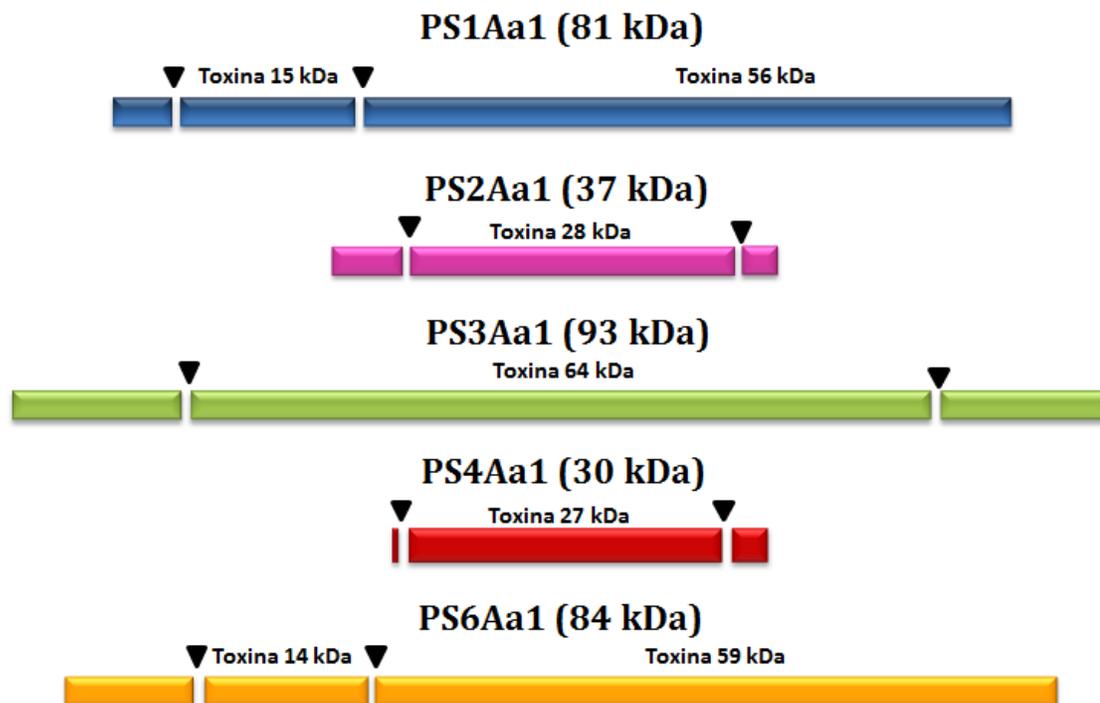
Con respecto a la PS5, solo se cuenta con su secuencia nucleotídica y aminoacídica correspondientes a la PS5Aa1, de la cual aún no hay publicaciones sobre su efecto citotóxico o modo de acción. Sin embargo, por medio de un alineamiento con la herramienta DELTA-BLAST, es posible determinar que es una toxina pequeña que comparte similitud con las TFP del tipo aerolisina y contiene un dominio conservado similar al de la toxina épsilon producida por *Clostridium perfringens*, el cual es el causante de la formación de canales en la membrana lipídica de las células (Knapp *et al.*, 2009).

El cuanto último grupo de parasporinas, solo se cuenta con un miembro correspondiente a la PS6Aa1, que es una proteína en algunos aspectos relacionada a la PS1. Las tres PS6Aa1 detectadas a la fecha, también se encuentran codificadas en cepas productoras de PS1Ad1 y PS1Aa6, aunque se presume que se encuentran codificadas en plásmidos diferentes. Las pro-toxinas de PS1 y PS6 comparten un secuencia conservada en sus primeros 50 residuos de aminoácidos y tras ser activadas por proteólisis, dos de sus tres péptidos generados, conforman un heterodímero tóxico (Gonzalez *et al.*, 2011; Nagamatsu *et al.*, 2010). Otro aspecto relevante, es que la PS6 también posee los tres dominios conservados de Cry y la toxina presenta un 56.4% de identidad con las proteínas insecticidas Cry2 (Nagamatsu *et al.*, 2010).

Además de las PS ya mencionadas, cabe destacar la detección de una PS producida por la cepa Bt 18 originaria de Malasia, la cual no cuenta con numeración de PS o Cry, ya que se desconoce su secuencia aminoacídica completa. Esta presenta actividad preferencial hacia células de cáncer, y aunque también tiene actividad contra *Aedes aegypti*, no fue tóxica hacia eritrocitos humanos o de rata (Chan *et al.*, 2007; Nadarajah *et al.*, 2006). Tras la solubilización y digestión de los cristales de Bt18 con Tripsina, se generan dos péptidos de 68 y 28 kDa, que al parecer se encuentran asociados formando un heterodímero tóxico, como en la PS1 (Chan *et al.*, 2012). Las secuencias N-terminal parciales de ambos fragmentos demostró que la proteína de 68 kDa presenta similitud hacia las Cry24Aa y Cry25Aa producidas por *B. thuringiensis* serovariedad *jegathesan*, mientras que el péptido de 28 kDa fue similar a la Cry15Aa de *B. thuringiensis* serovariedad *israelensis* (Nadarajah *et al.*, 2008). Esta toxina, se diferencia de la PS1 en que, tras ser disociada, el fragmento de mayor peso no pierde su citotoxicidad, sino que se modifica. Para dos líneas de leucemia la susceptibilidad disminuye ante la toxina de 68 kDa, mientras que en otra línea el efecto aparentemente se incrementa (Chan *et al.*, 2012).

En retrospectiva, podemos resumir que tras hacer el análisis general de la estructura de las PS, se observan dos grupos principales. El primero está integrado por las PS de mayor peso molecular (PS1, PS3, PS6), que tiene relación estructural con las proteínas Cry insecticidas, al contener los tres dominios de Cry o los cinco bloques de

secuencias conservadas. Y que en su conformación tóxica pueden estar constituidas por dos fragmentos de distinto peso molecular. El segundo grupo identificado, está integrado por las parasporinas de menor peso (PS2, PS4 y PS5), que no tienen tanta relación con las proteínas Cry clásicas, pero si están relacionadas estructuralmente y en modo de acción a TFP de otras especies como la toxina epsilon, la citolisina o la aerolisina.



**Figura 2.** Esquematización de los fragmentos tóxicos de las principales parasporinas

### 4.3.2 Espectro citotóxico

En esta sección será resumida la información disponible sobre actividad biológica de las PS mejor caracterizadas. Como se puede observar en la tabla III, las parasporinas tienen efecto citopático preferencial hacia cierto tipo de línea celular, más que por un tipo de cáncer en particular.

La PS1 no fue tóxica hacia la mayoría de las líneas contra las que fue probada; sin embargo presenta toxicidad alta hacia las células de cáncer cérvico uterino HeLa (Katayama *et al.*, 2005). De igual manera la PS4, que tuvo mayor citotoxicidad hacia las células de cáncer de colon (Okumura *et al.*, 2005) y la PS de Malasia, que parece tener selectividad hacia las células de leucemia (Chan *et al.*, 2007; Nadarajah *et al.*, 2008). Por otra parte, la PS2 parece ser la parasporina de mayor espectro citotóxico, ya que tuvo un importante efecto citopático hacia cinco de las nueve líneas celulares de cáncer probadas (Ito *et al.*, 2004). No obstante, también presentó toxicidad alta hacia las células T normales, lo cual indica que su selectividad no es tan buena.

Finalmente, la citotoxicidad de las PS3 y PS6 hacia las líneas probadas fue nula o baja (Nagamatsu *et al.*, 2010; Yamashita *et al.*, 2005). Aunque no se descarta un mayor efecto citopático hacia otras líneas celulares que no hayan sido probadas, como en el caso de la PS1.

TABLA III

Espectro citotóxico de las principales parasporinas

Línea celular	Descripción	PS1Aa1		PS2Aa1		PS3Aa1		PS4Aa1		PS6Aa1		PS Malasia	
		CE <sub>50</sub>	EC	CE <sub>50</sub>	EC	CE <sub>50</sub>	EC	CE <sub>50</sub>	EC	CE <sub>50</sub>	EC	CE <sub>50</sub>	EC
Células normales de humano													
Linfocitos T	Células T	>10.0	-	0.148	+++	>10.0	-	>2.0	-	Nd		>32.0	-
HC	Células hepáticas	>10.0	-	>10.0	-	>10.0	-	>2.0	-	>10.0	-	Nd	
UtSMC	Células de útero	>10.0	-	9.28	-	>10.0	-	>2.0	-	Nd		Nd	
MRC-5	Células de pulmón	>10.0	-	7.15	-	>10.0	-	>2.0	-	Nd		Nd	
Células de cáncer humano													
MOLT-4	Leucemia	2.2	+	0.044	++++	>10.0	-	0.47	++	Nd		Nd	
Jurkat	Leucemia	>10.0	-	0.015	++++	>10.0	-	>2.0	-	Nd		Nd	
HL-60	Leucemia	0.32	++	0.066	++++	1.32	+	0.73	+	Nd		Nd	
CEM-SS	Leucemia	Nd		Nd		Nd		Nd		Nd		0.122	+++
U-937-DE4	Linfoma	Nd		Nd		Nd		0.98	+	Nd		Nd	
K562	Leucemia	Nd		Nd		Nd		>2.0	-	Nd		Nd	
HepG2	Cáncer hepático	3.0	-	0.023	++++	2.8	+	1.9	+	2.3	+	Nd	
HeLa	Cáncer cervical	0.12	+++	>10.0	-	>10.0	-	>2.0	-	7.2	-	>0.5	++
Sawano	Cáncer endometrial	>10.0	-	0.041	++++	>10.0	-	0.25	++	nd		Nd	
TCS	Cáncer cervical	Nd		>10.0	-	>10.0	-	0.72	+	nd		Nd	
A549	Cáncer pulmonar	>10.0	-	>10.0	-	>10.0	-	>2.0	-	nd		Nd	
CACO-2	Cáncer de colon	>10.0	-	4.86	-	>10.0	-	0.12	+++	>10	-	Nd	

CE<sub>50</sub>, Concentración efectiva media ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ ); EC, Efecto citotóxico basado en las CE<sub>50</sub> (Mizuki *et al.*, 2000), en donde: +++++, extremadamente tóxico; +++, altamente tóxico; ++, moderadamente tóxico; +, poco tóxico; -, no tóxico. Nd: no determinado.

### **4.3.3 Modo de acción**

Como último punto a tratar sobre las PS, está el modo de acción. A este respecto existe poca literatura sobre la mayoría de las proteínas Cry clasificadas como PS, aunque la información existente es suficiente para dejar en evidencia que no todas actúan de la misma manera sobre las células cancerígenas susceptibles.

#### **4.3.3.1 Receptores de membrana**

La alta especificidad hacia un solo tipo de célula blanco, parece ser un comportamiento típico de las proteínas Cry. Esta característica ha sido ampliamente estudiada en Cry plaguicidas y es determinada por la interacción de las toxinas con un receptor de membrana específico. El receptor es definido como una molécula, generalmente una proteína, que se encuentra en la superficie celular y actúa en el primer paso de reconocimiento y unión de la toxina Cry a su célula blanco (Pigott and Ellar, 2007). La identificación de receptores ha sido un punto poco estudiado en las PS, pero se cree que al igual que las Cry plaguicidas, existe una interacción específica de PS-Receptor que confiere la especificidad hacia las células de cáncer.

Para la PS1Aa1, la molécula que actúa como receptor ha sido identificada y patentada para su uso como marcador de células susceptibles (Katayama *et al.*, 2011). Esta molécula es la beclina-1, que es una proteína que en células normales actúa intracelularmente en procesos como la autofagia, desarrollo y apoptosis; pero en las células HeLa, fue localizada extracelularmente y es reconocida de manera específica por la PS1Aa1 (Zhong *et al.*, 2009; Katayama *et al.*, 2011).

De igual manera, el receptor para la PS de Malasia fue identificado en células de leucemia CEM-SS. Inicialmente se demostró la adhesión y alta afinidad del fragmento de 68 kDa hacia la superficie de estas células por marcaje con biotina (Wong *et al.*, 2010) y un año después, fue identificado el Gliceraldehído 3-Fosfato Deshidrogenasa (GADPH) como la proteína de unión o receptor para esta parasporina. El GADPH es una enzima altamente estudiada, de gran importancia en el metabolismo celular, que en años

más recientes, también ha sido asociada a procesos de cáncer y muerte celular por apoptosis (Tsuchiya *et al.*, 2005).

Aunque se desconoce el porqué de la localización de estas moléculas en la membrana de las células blanco, y si aún conservan alguna función biológica en este estado, su ausencia o baja proporción en la superficie de las células normales, es la razón de la poca actividad de las parasporinas sobre estas.

#### **4.3.3.2 Apoptosis**

Históricamente las proteínas Cry generan la lisis de las células blanco; sin embargo un nuevo mecanismo de acción ha sido descrito para algunas de las Cry anti-cancerígenas. Este es el caso de la PS1Aa1 y la PS de malasia, en donde es observada la inducción de apoptosis en líneas celulares HeLa y CEM-SS (Chan *et al.*, 2007; Katayama *et al.*, 2007).

El modo de acción de la PS1 en células HeLa (Fig. 3) comienza por la unión al receptor (beclina 1), seguido por un aumento del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular desde los primeros minutos de exposición y en consecuencia una disminución de la síntesis global de DNA y proteínas. La muerte celular programada es puesta en evidencia a las 8 h por la activación de pro-Caspasa 3 y poli (ADP-ribosa) polimerasa (PARP). En este proceso, el  $\text{Ca}^{2+}$  parece ser un factor importante en el modo de acción, ya que tanto la inhibición de Caspasa 3, como del  $\text{Ca}^{2+}$  por agentes quelantes o eliminación del medio de cultivo, disminuyen considerablemente la actividad de la PS1Aa1 (Katayama *et al.*, 2007; Katayama *et al.*, 2011). Adicionalmente, en ningún punto fueron detectados cambios en el potencial de membrana (Katayama *et al.*, 2007).

Para la PS de Malasia, la muerte apoptótica inicialmente fue detectada por un aumento de células en la fase S, indicando el arresto del ciclo celular. Posteriormente, fue confirmada mediante ensayos de Caspasa 3 y estudios morfológicos por microscopía electrónica; en donde la activación de Caspasa 3 alcanzó su mayor índice a las 72 h y fueron observados los cambios morfológicos típicos de la apoptosis en las células de leucemia susceptibles a esta PS (Chan *et al.*, 2012).

#### 4.3.3.3 Necrosis

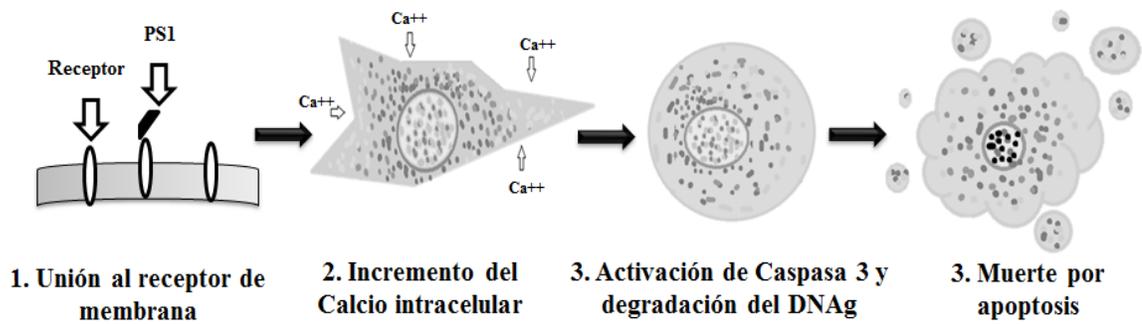
El segundo modelo de acción propuesto para las parasporinas es la necrosis, que es resultado de daños irreparables en la membrana plasmática. Este es el clásico mecanismo descrito para las proteínas Cry catalogadas como TFP, que en insectos y nematodos, lisan las células epiteliales del intestino medio (de Maagd *et al.*, 2003).

Típicamente, la formación de poros es llevada a cabo mediante los siguientes pasos: 1) unión de la toxina monomérica a receptor(es) de membrana específicos, 2) segunda unión (irreversible) a receptor(es) y activación del monómero, 3) oligomerización de las toxinas, 4) inserción de los oligómeros y formación de los poros en la membrana plasmática y finalmente 5) desequilibrio osmótico que da paso a la muerte celular (González *et al.*, 2008).

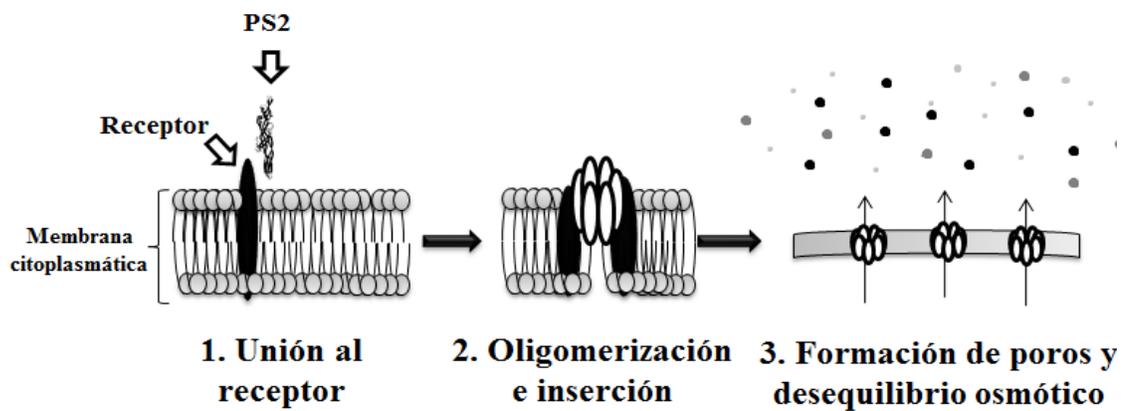
Para las parasporinas 2 y 4, se propone la muerte celular por necrosis (Fig. 4), apoyada en parte por su estructura tridimensional, altamente similar a  $\beta$ -TFP como la aerolisina o citolisina y sustentada por la evidencia experimental (Akiba *et al.*, 2004; Mahalakshmi y Shenbagarathai, 2010; Okumura *et al.*, 2011). Los datos que se tienen sobre la PS2Aa1 en células HepG2, es que se une a la superficie celular en presencia de proteínas de membrana, la bicapa lipídica y el colesterol. Posteriormente, forma oligómeros resistentes a dodecilsulfato sódico (SDS), de ca. 200 kDa, de manera dependiente de la temperatura. Esta oligomerización, no se lleva a cabo en la membrana citoplasmática de células poco susceptibles como HeLa o en membranas mitocondriales y del retículo endoplásmico (Abe *et al.*, 2008, 2005). Los cambios morfológicos para células adherentes HepG2, son la formación de “ampollas” en la periferia celular, dentro de los primeros minutos de exposición; hinchamiento a las 2 h; desprendimiento y lisis, a partir de las 4 h. Para las células en flotación MOLT-4, los cambios consistieron en hinchamiento y vacuolización, sin formación de ampollas. Adicionalmente, estas células expuestas a altas dosis de la PS2, no tuvieron activación de Caspasa 3/7 ni fragmentación del DNA cromosómico (Ito *et al.*, 2004; Kitada *et al.*, 2006).

En cuanto al mecanismo de la PS4Aa1, se ha demostrado su unión en membrana lipídica, aunque sin presencia de colesterol (Okumura *et al.*, 2011). Al igual que en la PS2, hay formación oligómeros resistentes a SDS, de 90–200 kDa, de forma exclusiva en la membrana de células susceptibles. Los cambios morfológicos inducidos en MOLT-4 y CACO-2, también comienzan desde los primeros minutos. En los primeros 10 min se observó condensación nuclear, la cual llegó a su máximo punto 1 h después; posteriormente ocurre el hinchamiento de las células a las 2 h aproximadamente, y la lisis dentro de las 24 h de exposición (Okumura *et al.*, 2005). Además, para las MOLT-4 también se han descrito encogimiento nuclear, formación de ampollas en la periferia celular y nuclear. Como evidencia sobre la necrosis como modo de acción, se demostró la permeabilización de la membrana en las susceptibles mediante la liberación de lactato deshidrogenasa (LDH) y la internalización de dextransos de diferentes pesos moleculares. Así mismo, no hubo activación considerable de Caspasas 3/7 (Okumura *et al.*, 2011).

Finalmente, para la PS3, también se sugiere que una muerte necrótica por la formación de poros de membrana, dada su estructura y gran relación a las proteínas Cry insecticidas. Como evidencia también fue observada una progresiva liberación de LDH, que fue inversamente proporcional a la tasa de sobrevivencia de células HepG2 (Yamashita *et al.*, 2005). Para el resto de las PS no existe evidencia experimental sobre su modo de acción.



**Figura 3.** Modo de acción de las parasporina-1



**Figura 4.** Modo de acción de las parasporina-2

## 5. MÉTODOS

### 5.1 Material biológico

#### 5.1.1 Cepas de *Bacillus thuringiensis*

Para este estudio fueron utilizadas 103 cepas de *B. thuringiensis* de la colección de microorganismos entomopatógenos del Instituto de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL (Tabla IV). Paralelamente, también fueron incluidas las cepas de referencia A1190 (PS1Aa1), A1547 (PS2Aa1), A1462 (PS3Aa1, PS3Ab1) y A1740 (PS2Aa2, PS4Aa1), como controles positivos de los experimentos, las cuales fueron amablemente proporcionadas por el Dr. Eiichi Mizuki del Biotechnology and Food Research Institute, Fukuoka Industrial Technology Center.

Todas las cepas fueron conservadas en criogenia a -20°C con 15% de glicerol, según lo descrito por Sambrook y Russell (2006). Para su activación, las cepas fueron inoculadas en agar nutritivo y para su propagación, las bacterias fueron sembradas en agar nutritivo suplementado con extracto de levadura (Thorne *et al.*, 1986) e incubadas a temperatura ambiente hasta su completa esporulación. El monitoreo de las inclusiones, se llevó a cabo mediante frotis bacterianos teñidos con cristal violeta y vistos en un microscopio óptico marca Leica a un aumento de 1,000X.

TABLA IV

Cepas de *Bacillus thuringiensis* analizadas en este estudio

No. Clave	No. Clave	No. Clave	No. Clave	No. Clave
1. GM2	22. HD968	43. IB20	64. IB68	85. IB83
2. GM7	23. IB2-1	44. IB21	65. IB69-1	86. IB84
3. GM10	24. IB2-2	45. IB22	66. IB69-2	87. IB88
4. GM13	25. IB5	46. IB23	67. IB70	88. J1
5. GM18	26. IB6	47. IB24	68. IB71-1	89. J12
6. GM18-B	27. IB8-1	48. IB25	69. IB71-2	90. J13
7. GM33	28. IB8-2	49. IB26	70. IB72	91. J3
8. GM34	29. IB10	50. IB27	71. IB74-1	92. J4
9. GM43	30. IB11-1	51. IB46	72. IB74-2	93. J5
10. GM58	31. IB11-2	52. IB48	73. IB75	94. J6
11. GM62	32. IB14-1	53. IB49	74. IB76-1	95. J7
12. GM109	33. IB14-2	54. IB50	75. IB76-2	96. J9
13. HD1	34. IB15-1	55. IB53	76. IB77-1	97. K1
14. HD2	35. IB15-2	56. IB57	77. IB77-2	98. 20034
15. HD12	36. IB16-1	57. IB62	78. IB78-1	99. 225-1
16. HD29	37. IB16-2	58. IB63	79. IB78-2	100. VEA
17. HD73	38. IB17-1	59. IB64	80. IB79	101. CL9-1
18. HD146	39. IB17-2	60. IB65	81. IB80-1	102. CL9-3
19. HD511	40. IB18	61. IB66	82. IB80-2	103. CL9-21
20. HD542	41. IB19-1	62. IB67-1	83. IB81	
21. HD567	42. IB19-2	63. IB67-2	84. IB82	

### **5.1.2 Líneas celulares**

La actividad biológica de los cristales fue evaluada sobre 7 líneas celulares, las cuales fueron adquiridas de la American Type Culture Collection (ATCC) y conservadas en criogenia a  $-70^{\circ}\text{C}$  con 5% de DMSO (Tabla V). Para su activación y propagación fueron utilizados los medios de cultivo recomendados por la ATCC y mantenidas en incubación a  $37^{\circ}\text{C}$  con 5% de  $\text{CO}_2$ .

### **5.2 Microscopía electrónica**

La morfología de los cristales paraesporales de algunas las cepas de *B. thuringiensis*, fue observada por microscopía electrónica de barrido en el centro de Centro de Investigación e Innovación en Ingeniería Aeronáutica (CIIA) de la UANL. Los cultivos esporulados fueron previamente suspendidos en agua destilada estéril y lavados dos veces por centrifugación y re suspensión. Posteriormente 10  $\mu\text{l}$  de cada suspensión fueron colocados en porta muestras y fijados por calor por unos segundos. Las muestras fijadas fueron cubiertas con partículas de oro en el CIIA y vistas en un microscopio marca FEI-NovanoSEM 200.

### **5.3 Detección de PS por PCR múltiple**

#### **5.3.1 Extracción de ADN genómico**

El ADN fue obtenido mediante la técnica descrita por Cheng y Jiang (2006), en donde el ADN bacteriano es extraído por lisis química con fenol y posteriormente purificado con lavados con cloroformo. El ADN genómico de todas las cepas fue almacenado a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

TABLA V

Lista de líneas celulares del estudio

No. ATCC	Nombre	Organismo	Morfología/Tejido	Propiedades	Enfermedad	Medio de Cultivo <sup>a</sup>
CRL-1634	Hs27	<i>Homo sapiens</i>	Fibroblasto/Piel	Adherente	Normal	DMEM
CRL-1619	A375	<i>Homo sapiens</i>	Epitelial/Piel	Adherente	Melanoma maligno	DMEM
CRL-1555	A431	<i>Homo sapiens</i>	Epitelial/Piel	Adherente	Carcinoma epidermoide	DMEM
CRL-1582	MOLT-4	<i>Homo sapiens</i>	Linfoblasto/Sangre	Suspensión	Leucemia linfoblástica aguda	RPMI-1640
TIB-152	Jurkat	<i>Homo sapiens</i>	Linfoblasto/Sangre	Suspensión	Leucemia linfoblástica aguda	RPMI-1640
CRL-2026	1c1c	<i>Mus musculus</i>	Epitelial/Hígado	Adherente	Hepatoma	MEM $\alpha$ S/N
CRL-2218	BpRc1	<i>Mus musculus</i>	Epitelial/Hígado	Adherente	Hepatoma	DMEM

<sup>a</sup> Todos los medios de cultivo fueron suplementados con 10% de Suero Fetal Bovino. Abreviaciones. DMEM: Medio de Eagle Modificado de Dulbecco; MEM $\alpha$ : Medio Mínimo Esencial alfa sin nucleósidos; RPMI: Medio del Instituto Roswell Park Memorial.

### **5.3.2 Diseño de iniciadores**

El sistema de PCR múltiple fue diseñado en base a los siguientes criterios: i) alta especificidad hacia todos los genes de PS, ii) temperaturas de hibridación de los iniciadores cercanas, iii) tamaños de amplicones diferentes, capaces de ser diferenciados fácilmente por electroforesis en gel de agarosa y iv) poca complementariedad entre iniciadores, con el fin de evitar homodímeros y heterodímeros.

Los programas utilizados para el diseño de iniciadores fueron el software libre GENTle para la identificación de regiones conservadas por medio de alineamientos múltiples, el Primer-BLAST del NCBI para el diseño de los iniciadores sobre las secuencias consenso obtenidas con el GENTle y para evaluar la especificidad de cada juego, se utilizó la herramienta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) de la página del NCBI, y para validar sus propiedades; tales como temperatura de hibridación, porcentaje de Guaninas/Citosinas, estructuras de horquilla, entre otras, se efectuó el análisis de cada iniciador con la herramienta en línea “Oligo Analyzer” de la página de la compañía Integrated DNA Technologies.

### **5.3.3 Condiciones de la PCR**

Para el análisis masivo de todas las muestras, fueron combinados los ADN de cuatro o cinco cepas y analizados en una sola reacción de PCR múltiple. Las mezclas de ADN que amplificaron alguna banda, fueron probadas por separado para identificar la cepa la que correspondía. Así mismo, las muestras positivas, fueron analizadas por PCR simplex para corroborar el tipo de parasporina amplificada.

Para determinar las condiciones óptimas para la PCR múltiple fueron hechos gradientes de temperaturas de hibridación en un termociclador Veriti® Thermal Cycler (Applied Biosystems), además de gradientes de concentración de iniciadores.

### **5.3.4 Secuenciación nucleotídica de los amplicones**

La secuenciación de los productos de PCR fue hecha directamente a partir de productos de PCR purificados con el estuche comercial (kit) Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) o por clonación en el vector pGEM-T easy (Promega). La transformación fue hecha por choque térmico con células de *E. coli* JM109 calcio competentes, “plaqueadas” en agar LB/IPTG/X-Gal suplementado con 100 µg ml<sup>-1</sup> de ampicilina, para la selección de colonias blancas (Sambrook y Russell, 2001). La presencia del inserto en las colonias transformadas, fue comprobada por PCR y el ADN plasmídico de las clonas con el inserto fue purificado con el kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification (Promega).

Los plásmidos y productos de PCR purificados fueron enviados para su secuenciación a la Unidad de Síntesis y Secuenciación del Instituto de Biotecnología de la UNAM o a Macrogen Corp. en Maryland, EUA. Las secuencias nucleotídicas fueron determinadas con nuestros iniciadores para los productos de PCR y con el iniciador universal T7 (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'). Los electroferogramas recibidos fueron analizados e interpretados con el programa GENTle y las secuencias fueron comparadas en la base de datos del GenBank.

### **5.4 Activación de las inclusiones paraesporales**

Los cristales paraesporales fueron solubilizados y digeridos proteolíticamente para su activación. Para la solubilización, se partió de cultivos en placa completamente esporulados, colectados y diluidos en agua bidestilada en tubos para centrífuga de 1.5 ml. El complejo cristal-espora recuperado, fue lavado dos veces con agua bidestilada estéril y re-suspendido en buffer de Carbonatos pH 10.5 (50 mM de NaCO<sub>3</sub>, 10 mM de DTT, 1 mM de EDTA) de acuerdo a Mizuki *et al.* (1999), a excepción de la cepa A1470, la cual fue solubilizada en Buffer de HCl 10 mM para una mejor eficiencia (Okumura *et al.*, 2006). Las muestras fueron incubadas durante 60 min a 37°C y posteriormente ajustadas a pH 8.0 con HCl o NaOH 1N.

Para la activación, los cristales solubilizados fueron digeridos con  $10 \mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$  de proteinasa K para las cepas de nuestra colección y la cepa de referencia A1470 (Okumura *et al.*, 2006). Para las cepas de referencia, se añadió la concentración de proteinasa K correspondiente a lo reportado como óptimo:  $30 \mu\text{g ml}^{-1}$  para la A1190 (Mizuki *et al.*, 2000),  $300 \mu\text{g ml}^{-1}$  para la A1547 (Kim *et al.*, 2000) y  $3 \mu\text{g ml}^{-1}$  para la A1462 (Yamashita *et al.*, 2000). Posteriormente, todas las muestras se pusieron a incubación por 90 min a  $37^{\circ}\text{C}$  y al término la digestión fue detenida con 1mM de PMSF. Consecutivamente, las esporas contenidas en los extractos crudos fueron eliminadas por centrifugación a 10,000 g por 5 min o por filtración en membranas de Poliéter sulfona (PES) de  $0.2 \mu\text{m}$ .

La concentración de proteína fue estimada por el método de Bradford (Bradford, 1976) y ajustadas a  $1 \text{ mg ml}^{-1}$ . Aquellas muestras que no alcanzaron la concentración necesaria, fueron dializadas en con membranas de tamaño de poro de 12,000 Da y concentradas en un concentrador CentriVap Benchtop Vacuum a  $40^{\circ}\text{C}$ . Finalmente, todos los cristales activados fueron alicuotados y conservados a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

## **5.5 Análisis de los cristales paraesporales en geles de poliacrilamida**

### **5.5.1 Geles de una dimensión**

Los perfiles de las proteínas de los extractos crudos fueron caracterizados por electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE). Estableciendo los pesos moleculares de las proteínas nativas, solubilizadas y digeridas (activadas) y haciendo un análisis comparativo en base a los patrones de los cristales solubilizados y activados de las cepas de referencia. Para la visualización de las bandas, los geles fueron teñidos con azul de coomassie R-250 al 1% (Laemmli, 1970). Todos los geles fueron foto documentados con un densitómetro GS-800 (Biorad) y analizados con el software Quantity One® (Biorad).

### **5.5.2 Geles bidimensionales**

Para el análisis de las proteínas paraesporales en geles de doble dimensión, los extractos solubilizados o activados fueron purificados con el kit 2-D Clean-Up (GE) a partir de 100  $\mu\text{g}$  de proteína total. Una vez purificadas, las proteínas fueron re suspendidas en 125  $\mu\text{l}$  de buffer DeStreak Rehydration Solution (GE) adicionado con 0.5% de IPG Buffer pH 3-10 (GE). La hidratación activa se hizo en tiras ReadyStrip™ IPG (Biorad) de 7 cm, cargadas con 125  $\mu\text{l}$  de solución a 20°C a 50 V hasta por 16 h. El isoelectroenfoco fue corrido a 200 V por 1h, 500 V 1 h y 1,000 V 1 h. La segunda dimensión se corrió en geles de poliacrilamida al 10%, teñidos con azul de coomassie R-250 o con Oriole Fluorescent Gel Stain (Biorad). Los geles fueron foto documentados y analizados con el software PD Quest 2-D (Biorad).

### **5.6 Inmunodetección**

La inmunodetección por Western blot fue realizada con los anticuerpos proporcionados por el Dr. Shiro Okumura del Biotechnology and Food Research Institute, Fukuoka Industrial Technology Center. Los anticuerpos poli-clonales de conejo anti-PS1 y anti-PS4, fueron levantados contra las proteínas solubilizadas de la cepa A1190 (protoxina PS1Aa1) y la PS4Aa1 digerida y purificada (activada).

Inicialmente las proteínas solubilizadas y activadas de los extractos fueron separadas en geles al 10% de poliacrilamida. Consecutivamente se hizo la electrotransferencia a membranas de nitrocelulosa durante 3 h a 300 mA. Después de un lavado de 15 min en Buffer Tris Salino (TBS) con 10mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, las membranas fueron bloqueadas con Tween 20 al 2%. Posteriormente se les dieron otros dos lavados de 5 min con Buffer TBS y se añadió la solución de anticuerpos (Anti-PS1 o Anti-PS4) a una dilución 2,000X en Buffer TBS. Tras 1 h d incubación, las membranas se lavaron dos veces con Buffer TBS, adicionado con Tween 20 al 0.05%.

Consecutivamente, las membranas fueron incubadas por otra hora con el conjugado Anti-IgG de conejo con fosfatasa alcalina (Sigma-Aldrich). Finalmente el resultado fue visualizado con solución cromogénica NBT/BCIP (Sigma-Aldrich).

### 5.7 Ensayos de citotoxicidad

Las proteínas activadas fueron probadas contra las líneas celulares en placas de 96 pozos, incluyendo los respectivos controles como se describe en la tabla VI. Todas las placas de los ensayos fueron incubadas por 24 h a 37 °C en incubadora con 5% de CO<sub>2</sub>.

TABLA VI

Componentes para los ensayos de citotoxicidad

Componente	Control positivo	Control negativo	Tratamiento	Blanco
Suspensión de $2 \times 10^4$ células $\text{ml}^{-1}$	90 $\mu\text{l}$	90 $\mu\text{l}$	90 $\mu\text{l}$	-
Cristales activados de nuestras cepas (1,000-0.01 $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	-	-	10 $\mu\text{l}$	
Cristales activados de las cepas de referencia (1,000-0.01 $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	10 $\mu\text{l}$	-	-	-
Medio de cultivo sin células	-	-	-	90 $\mu\text{l}$
Buffer de carbonatos pH 8.0 con proteinasa K	-	10 $\mu\text{l}$	-	10 $\mu\text{l}$

### 5.7.1 Conteo directo

En el caso de las células en suspensión, el conteo de las células viables fue directo en cámara de Neubauer, usando el azul de tripano como colorante vital, para la diferenciación de las células vivas de las muertas. Para el cálculo del número de células fue empleada la ecuación 1. Mientras que el porcentaje de sobrevivencia fue estimado en base al conteo de células sin tratamiento (testigos) como el 100 %, con la ecuación 2.

$$\text{Ecuación 1} \quad \text{Células ml}^{-1} = \frac{[\text{Sumatoria de células en 4 cuadrantes}][10^4]}{4}$$

$$\text{Ecuación 2} \quad \% \text{ Sobrevivencia: } \frac{[\text{No. de células tratadas con PS}] * 100}{(\text{No. de células sin Tratamiento})}$$

### 5.7.2 Conteo con kit de bioluminiscencia

El segundo tipo de conteo de células viables fue hecho con el kit CellTiter-Glo<sup>®</sup> Luminescent Cell Viability Assay (Promega) que estima la cantidad de células metabólicamente activas, por medio de la luminiscencia emitida en proporción a la cantidad de ATP de células viables. Adicionalmente, fueron incluidos pocillos con medio de cultivo sin células (S/C) y medio de cultivo con las inclusiones activas sin células (S/C-C/I) para estimar su luminiscencia basal.

La bioluminiscencia fue cuantificada en un luminómetro GloMax Multi+ Detection System con el Software Instinct (Promega). El porcentaje de sobrevivencia fue estimado en base a las unidades relativas de luminiscencia (URL) de las células sin tratamiento como el 100 % de sobrevivencia con la siguiente ecuación.

$$\text{Ecuación 3} \quad \% \text{ Sobrevivencia: } \frac{[(\text{URL de las células tratadas}) - (\text{URL del medio S/C-C/I})] * 100}{(\text{URL de células sin tratamiento}) - (\text{URL del medio S/C})}$$

### **5.7.3 Determinación de la concentración efectiva y efecto citotóxico**

Para los ensayos de una sola dosis con las líneas MOLT-4, Jurkat y Hs27, las concentraciones finales los cristales fueron de 10 y 5  $\mu\text{g ml}^{-1}$  para las células de leucemia y de 100  $\mu\text{g ml}^{-1}$  para las células normales. Para el resto de las líneas celulares, los cristales fueron probados a diferentes concentraciones (100-0.01  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) para la determinación de la Concentración Efectiva media ( $\text{CE}_{50}$ ). Estos datos fueron obtenidos con un análisis log-Probit (límites de confianza al 95%) con el Software SPSS Statistics 20.0.0 (International Business Machines Corporation, Armonk, State of New York, USA). Por medio de los valores de la  $\text{CE}_{50}$  se hizo una escala cualitativa del efecto citotóxico (EC), en base a estudios previos (Mizuki *et al.*, 1999), de acuerdo a los siguientes parámetros:  $\geq 100 \mu\text{g ml}^{-1}$  ningún efecto o muy baja citotoxicidad (-);  $< 100-10 \mu\text{g ml}^{-1}$ , poca citotoxicidad (+);  $< 10-1 \mu\text{g ml}^{-1}$  citotoxicidad moderada (++);  $< 1-0.1 \mu\text{g ml}^{-1}$  citotoxicidad alta (+++);  $\leq 0.01 \mu\text{g ml}^{-1}$  citotoxicidad extremadamente alta (++++).

### **5.8 Determinación del modo de acción**

El posible modo de acción de los cristales paraesporales fue evaluado por un ensayo múltiple con un kit comercial para todas las cepas seleccionadas y por microarreglos de ADN para los cristales de la cepa IB84. En todos los experimentos fueron incluidos cristales de las cepas de referencia para sustentar y validar los resultados.

#### **5.8.1 Ensayo múltiple de Viabilidad, Necrosis y Apoptosis**

Los ensayos múltiple de modo de acción fueron llevados a cabo con la línea MOLT-4 usando el kit ApoTox-Glo™ Triplex Assay (Promega), el cual, en un primer paso, utiliza la actividad de proteasas intracelulares de células intactas para definir la viabilidad y la actividad de proteasas liberadas por células que han perdido la integridad de membrana, para la determinación de la lisis por necrosis.

En un paso posterior, la muerte celular por apoptosis determinada por la activación de Caspasas 3/7. Los testigos consistieron en células sin tratamiento, medio sin células y medio sin células más cada uno de los tratamientos. Como control positivo de apoptosis se usaron los cristales de la cepa A1190 y como controles de necrosis los cristales de las cepas A1547 y A1470.

Estos ensayos fueron montado en placas de 96 pozos opacas con fondo claro, con 90  $\mu\text{l}$  de  $2 \times 10^4$  células  $\text{ml}^{-1}$  incubadas con los cristales activados a concentraciones de 100  $\mu\text{g ml}^{-1}$ . Los tres eventos fueron cuantificados a las 24 h con el GloMax Multi+ Detection System (Promega). Para la viabilidad y citotoxicidad, que son cuantificadas por fluorescencia, fueron usados filtros de  $\text{Ex}_{400}/\text{Em}_{505}$  nm y  $\text{Ex}_{485}/\text{Em}_{520}$  nm, respectivamente. Mientras que para la estimación de apoptosis fue usado el módulo de luminiscencia.

### **5.8.2 Microarreglos de ADN**

El modo de acción de la parasporina 4 de la cepa IB-84 se examinó a detalle identificando, por medio de Microarreglos de ADN, los procesos implicados en la respuesta celular de las células MOLT-4. En total fueron hechos 3 chips; en donde el primero consistió en la respuesta génica ante la actividad de los cristales de IB84, en el segundo se evaluó la respuesta ante los cristales de la cepa A1470 y en el tercero la comparación de la expresión génica provocada por los dos tipos de cristales.

#### **5.8.2.1 Condiciones de los tratamientos**

El primer punto para el establecimiento de las condiciones experimentales, consistió en una cinética del efecto citotóxico de la los cristales de IB84 para determinar los tiempos letales (TL). A partir de estos datos, el diseño experimental se ideó a partir de tres placas de cultivos con células MOLT-4 incubadas con las toxinas a un  $\text{TL}_{25}$ .

En la primera placa se colocaron únicamente 10 ml de células a una concentración final de  $2 \times 10^6$  como la condición basal. En la segunda, fueron colocados 9 ml de células más 1 ml de cristales activos de la cepa IB84 ( $1 \text{ mg ml}^{-1}$ ) y en la tercera, la misma cantidad de células más 1 ml de cristales de la cepa A1470 ( $1 \text{ mg ml}^{-1}$ ). Las placas fueron incubadas a  $37^\circ\text{C}$  hasta la  $TL_{25}$ . Posteriormente, las células fueron recuperadas transfiriendo todo el contenido de las placas en tubos de 15 ml y puestas en centrifugación a 1000 g durante 3 min. El sobrenadante fue descartado, el paquete celular re suspendido en 1 ml de TriReagent (Molecular Research Center, Inc.) y almacenado a  $-70^\circ\text{C}$  por hasta dos semanas.

#### **5.8.2.2 Extracción de ARN**

El ARN total de los tres tratamientos fue extraído siguiendo el protocolo del TriReagent (Chomczynski y Sacchi, 1993). La integridad del ARN total fue comprobada en un gel de agarosa al 1%, mientras que la concentración se determinó por espectrofotometría una  $OD_{260}$  y la calidad fue ratificada con la relación de las lecturas  $OD_{260}/OD_{280}$ . Una vez purificados, los ARN's fueron precipitados añadiendo un décimo del volumen de acetato de sodio 3M (pH 5.2) y 2.5 volúmenes de etanol frío absoluto a  $-70^\circ\text{C}$  por toda una noche. Al día siguiente se centrifugaron las muestras a máxima velocidad (14,000 rpm) por 15 min y fueron selladas con parafilm.

Los tubos con el ARN precipitado y el sobrenadante se enviaron a la Unidad de Microarreglos del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM en donde se realizaron los procesos restantes de síntesis, marcaje, hibridación de las sondas, la lectura y cuantificación de los chips.

### 5.8.2.3 Marcaje e hibridación

El marcaje de las sondas o ADN complementario (ADNc) se hizo de manera directa durante la retrotranscripción, con deoxinucleótidos marcados con Alexa<sub>555</sub> y Alexa<sub>647</sub> con el kit ChipShot™ Indirect Labeling System (Promega). Los tres chips usados fueron microarreglos de ADN con sondas para 35,764 genes (H35K). Las sondas marcadas con fluoróforos diferentes pertenecientes a dos condiciones experimentales, fueron combinadas en concentraciones equimolares e hibridadas en un mismo chip de acuerdo a la figura 5. Finalmente los chips fueron leídos en un ScanArray 4000 (Packard Biochips) y la cuantificación de la expresión génica se llevó a cabo con el programa GenArise (Instituto de Fisiología Celular UNAM) que arroja los datos de la cuantificación con anotadores ENSGXXXXXX (base de datos Ensemble EMBL - EBI).

### 5.8.2.4 Análisis de los datos

Los transcritos con cambios en su expresión mayor o menor a un Zscore de 1.5, fueron tomados en cuenta para el análisis ontológico por medio de agrupamientos (clustering) con el software DAVID 6.7 (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery) (Huang *et al.*, 2009). La identificación de las principales rutas implicadas en la respuesta a la PS4, fue hecha con el enriquecimiento de los genes anotados para la ontología de procesos biológicos y funciones moleculares usando las bases de datos de la Enciclopedia de Kioto de Genes y Genomas (KEGG) y la “Protein ANalysis THrough Evolutionary Relationships” (PANTHER), que se encuentran disponibles como herramientas del software DAVID (Kanehisa *et al.*, 2014; Thomas *et al.*, 2003). Las redes de relaciones génicas fueron hechas con el software Cytoscape 3.0, mientras que los diagramas de conjuntos con el software Venn Diagram Plotter.

### **5.8.3 Validación de microarreglos**

La validación de los resultados obtenidos por microarreglos consistió en la selección de varios genes, para la valoración de su expresión por medio de PCR cuantitativa (qPCR). El criterio de selección de los genes consistió en su importancia biológica dentro de las principales rutas encontradas, así como cambios importantes en su expresión ( $Zscore \geq 2.0$  ó  $\leq -2.0$ ). Paralelamente fueron seleccionados dos genes como constitutivos para el análisis de la expresión génica, sin cambios significativos en su expresión ( $Zscore \geq 0.1$  ó  $\leq -0.1$ ).

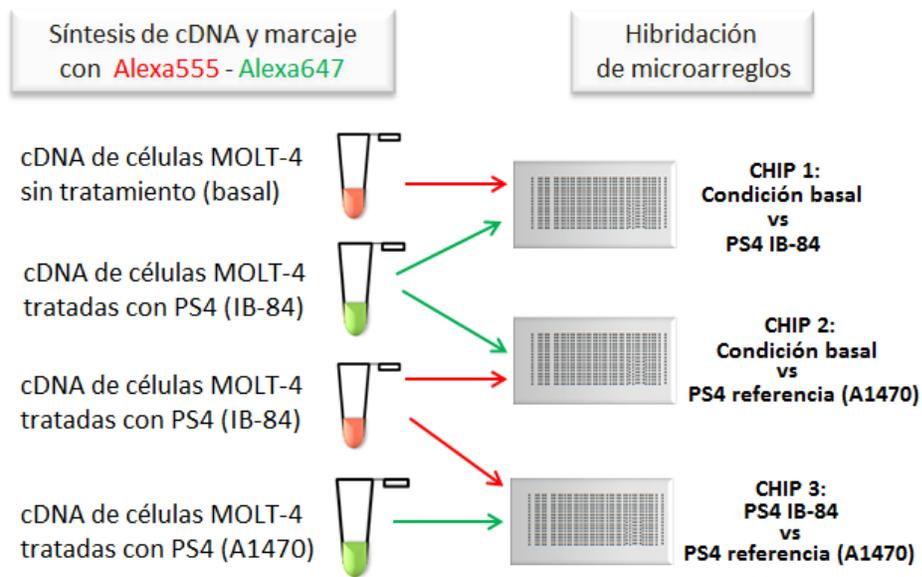
#### **5.8.3.1 Diseño de iniciadores para qPCR**

Los iniciadores fueron diseñados en base a las secuencias de los genes seleccionados reportadas en el GenBank (NCBI) con el programa Primer-BLAST (NCBI). Los criterios para el diseño fueron: especificidad, tamaños de amplicones de 50-200 pb, amplificación de todas las formas alternativas de splicing de los transcritos, temperaturas de hibridación  $\geq 60$  °C, contenido de GC alrededor de 50%, bajo nivel de apareamiento hacia sí mismos y su par ( $\Delta G < -3.0 \text{ kcal mol}^{-1}$ ) y baja formación de horquillas ( $< 30$  °C).

#### **5.8.3.2 Extracción del RNA total y síntesis de ADNc**

La extracción de los RNA's se hizo de la misma manera descrita en sección 5.7.5.5. La transcripción reversa fue hecha con el kit Reverse Transcription System (Promega) a partir de 1  $\mu\text{g}$  de RNA total con los siguientes componentes: 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1X Buffer Reverse Transcription, 1mM de cada dNTP, 1u  $\mu\text{l}^{-1}$  de inhibidor de RNAsas RNasin®, 15u  $\mu\text{g}^{-1}$  de transcriptasa reversa AMV); 0.5 $\mu\text{g}$  oligo (dT). Las mezclas fueron incubadas a 42°C durante 15 min, después a 95°C por 5 min y posteriormente a 5°C para la inactivación de la enzima. Los ADNc fueron almacenados a -20°C.

Las reacciones de PCR fueron montadas en placas de 96 blancas LightCycler® 480 Multiwell Plate 96 (Roche) con el kit Master Mix GoTaq® qPCR (Promega), que utiliza una sonda intercalante que emite fluorescencia a la misma longitud del SYBR Green. Los componentes de las reacciones fueron las siguientes: 1X Master Mix,  $10^6$ - $10^2$  pg ADNc y 0.5  $\mu$ M de cada iniciador, las cuales fueron. Las reacciones fueron corridas y cuantificadas en tiempo real con el termociclador Light Cycler 480 (Roche). Las curvas de disociación y el análisis de la expresión relativa fueron analizados con el Light Cycler 480 Software versión 1.5 (Roche).



**Figura 5.** Condiciones y diseño experimental de los 3 Microarreglos de ADN

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Selección de cepas de *B. thuringiensis* productoras de parasporinas

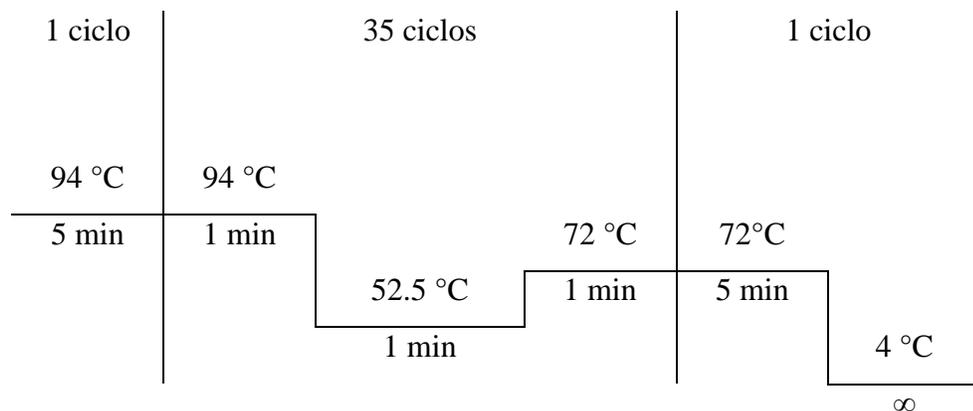
Para este estudio fueron consideradas un total de 103 cepas de la colección de entomopatógenos del Instituto de Biotecnología FCB-UANL para la detección de PS y posterior caracterización. La detección fue hecha por PCR múltiple y por ensayos preliminares de citotoxicidad con células de leucemia. Adicionalmente incluimos la cepa GM18, que inicialmente fue aislada de muestras de suelo de Guanajuato y nombrada como subespecie *neoleonensis*. No presentó actividad biológica contra seis especies de insectos (Rodríguez-Padilla *et al.*, 1990), pero nueve años después fue reportada como tóxica contra células de leucemia e inocua para eritrocitos de oveja (Mizuki *et al.*, 1999).

#### 6.1.1 Identificación de genes de parasporinas

Para una detección rápida de genes reportados para PS, inicialmente se intentó hacer un juego de iniciadores universales para todas las secuencias de PS reportadas. Sin embargo, no encontramos ninguna secuencia conservada exclusiva para todas las PS, que no se encontrase también en otras proteínas Cry. Así que optamos por el diseño de varios juegos de iniciadores para la amplificación de todas las PS reportadas en el GenBank (Agosto 2010).

### 6.1.1.1 Diseño de iniciadores y estandarización de PCR múltiple

En total fueron obtenidos seis juegos de iniciadores, descritos en la Tabla VII. Gracias a las cepas de referencia, fue posible comprobar la eficiencia y especificidad de los cuatro iniciadores dirigidos para los genes de las *ps1*, *ps2*, *ps3*, y *ps4*, mismos que fueron estandarizados al siguiente programa de PCR (Fig. 6). Las concentraciones finales ideales para cada reactivo fueron las siguientes: 1.5 mM de Buffer 5 X Green (Promega), 0.8 mM de dNTP Mix (Promega), 0.04  $\mu$ M de cada iniciador (12 iniciadores en total), 1U de GoTaq ADN Polimerasa (Promega) y 5 ng ml<sup>-1</sup> de ADN genómico como templado. Adicionalmente, durante la estandarización, también fueron incluidos juegos de iniciadores para *cry1* y *cry2*, como controles internos para las reacciones de PCR, usando el ADN genómico de la cepa HD1 que amplifica para ambos genes (resultados no mostrados) (Bravo *et al.*, 1998; Ibarra *et al.*, 2003).



**Figura 6.** Programa estandarizado para la programadas para la PCR múltiple

TABLA VII

Iniciadores diseñados para detección de PS por PCR múltiple

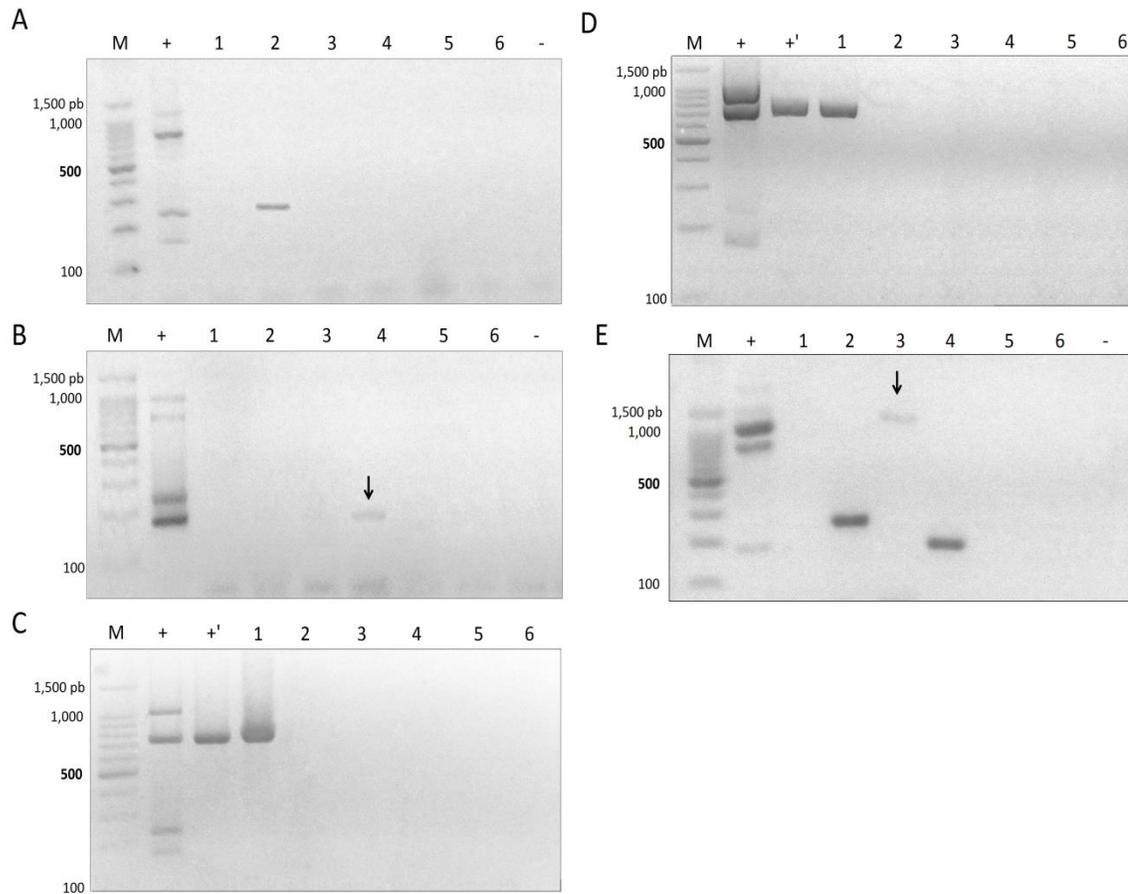
Nombre	Secuencia (5' - 3')	nt	Tm (°C)	% GC	Producto (pb)	Genes que amplifican
PS1	F TACAAGCAGGGCGTCCAG	18	57.5	61.1		<i>ps1Aa1, ps1Aa2, ps1Aa3, ps1Aa4,</i>
	R TCTGCTGGAATTTGCAATGCT	21	56.3	42.9	737	<i>ps1Aa5, ps1Aa6, ps1Ab1, ps1Ab2,</i> <i>ps1Ac1, ps1Ad1</i>
PS2	F TGTTGGGACTGTTCAGTACG	20	54.5	50	237	<i>ps2Aa1, ps2Aa2, ps2Ab1</i>
	R GTAGTAGAGAATGAACTTCTCCACC	26	54.7	42.3		
PS3	F TGGGCGAATACTGACGTCCT	20	58.3	55	1059 y 1071	<i>ps3Aa1, ps3Ab1</i>
	R GCAGTGCTTGTACCCGCTAC	20	58.5	60		
PS4	F GACAGAAACGTCTCGGAGTT	20	59.3	50	172	<i>ps4Aa1</i>
	R TACCAGTGTAACCAGGAGCA	20	59.1	50		
PS5	F CGGAGACAACAACAACAACAATG	24	65.8	41.7	414	<i>ps5Aa1</i>
	R CCAGCATAACCTGGTAAAGGCG	22	66.9	54.5		
PS6	F TACAAGCGAGTTAGCATC	20	53.6	45	647	<i>ps6Aa1</i>
	R GATAAAGTTCAACGGTTCCAGC	22	54.2	45.4		

Abreviaciones: nt, nucleótidos; Tm, temperatura de fusión, % GC, porcentaje de guaninas-citocinas; pb, pares de bases.

### 6.1.1.2 Detección por PCR múltiple

Una vez establecidas las condiciones para la PCR múltiple, 100 de las cepas fueron analizados por grupos de mezclas de ADN de 4 o 5 cepas, con el fin de hacer la detección más rápida. De estos grupos, solo el último con el ADN de las cepas IB82, IB83, IB84 e IB88, amplificó productos de PCR. El análisis de por separado de cada ADN, reveló que las cepas IB84 e IB88 amplifican productos los productos de PCR usando los iniciadores para PS4 y PS2, respectivamente.

Posteriormente, un nuevo grupo de 21 cepas recién aisladas de muestras de suelos de Nuevo León, fueron incorporadas al estudio ya que varias de ellas poseían cristales redondos o e irregulares que frecuentemente están asociados a actividades alternativas de *B. thuringiensis* como la anti-cancerígena (Ibarra, 2013). Dos de ellas con las claves CL9-1 y CL9-3 amplificaron productos correspondientes a los genes de las *ps1* y sorprendentemente una tercera con la clave CL9-21 amplificó para los genes de *ps2*, *ps3* y *ps4*. Aunque este resultado fue difícil de reproducir, ya que la eficiencia de las reacciones resultó muy baja con el ADN de esta cepa en particular. La amplificación de todas estas cepas se corroboró mediante reacciones de PCR simplex (Fig. 7), pero el bajo rendimiento y la baja reproducibilidad de los productos de la cepa CL9-21 también permanecieron incluso en estas condiciones.



**Figura 7.** Productos de PCR de las cepas IB88, IB84, CL9-1, CL9-3 y CL9-21.

A, reacción para la cepa IB84; B, reacción para la cepa IB88; C, reacción para la cepa CL9-1; D, reacción para la cepa CL9-3; E, reacción para la cepa CL9-21. Carriles: M, marcador de 100 pb; +, control positivo con PS1, PS2, PS3 y PS4; +', control positivo para la PS1; 1-6 reacciones simplex con iniciadores para PS1-PS6; -, control sin DNA. Las flechas indican los productos de PCR con menor concentración.

### **6.1.1.3 Secuenciación de los productos amplificados**

Los amplicones de las cepas IB84 (*ps4*), IB88 (*ps2*), CL9-1 (*ps1*), CL9-3 (*ps1*) y CL921 (*ps3*) fueron clonados en el vector pGEM-T easy y mandados a secuenciar. Todos los productos secuenciados mostraron un alto porcentaje de identidad con las PS reportadas, entre el 95 y 100% (Tabla VIII), confirmando la presencia de los genes de PS correspondientes. Aunque es necesario enfatizar que solo se secuenciaron correctamente pequeñas fracciones de los genes, correspondientes a regiones conservadas y por lo tanto no es posible determinar el número completo de las PS hasta no obtener las secuencias completas codificantes (Fig. 8).

Cabe señalar que durante el proceso, la cepa GM18 que anteriormente no había amplificado ningún producto de PCR, mostró una banda de baja intensidad al ser probada con los iniciadores PS1F-PS1R y una nueva ADN polimerasa de la marca GenScript. Aunque este producto no fue clonado, sí fue mandado secuenciar directamente como producto de PCR con los iniciadores PS1F. La secuencia obtenida no mostró ninguna homología con las PS reportadas, pero en cambio sí mostró un alto porcentaje de identidad (>92 %) con secuencias de ARN de transferencia (ARNt) de varias especies bacterianas del grupo de *B. cereus*, incluidas el *B. thuringiensis*. Como conclusión, la secuencia obtenida corresponde a un producto inespecífico, que pudo ser detectado al cambiar los reactivos y tener menor astringencia en la reacción.

### **6.1.2 Selección de cepas con actividad anti-cancerígena *in vitro***

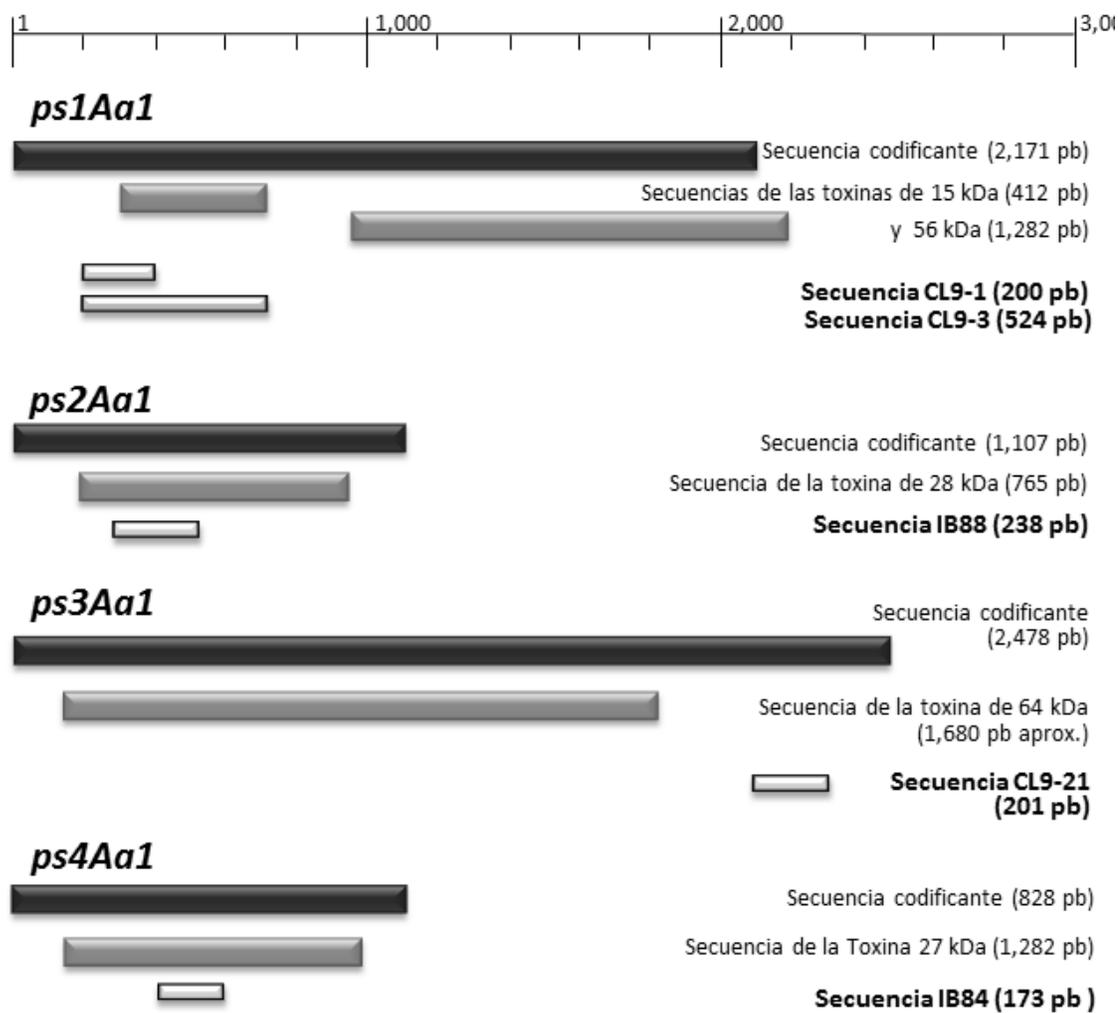
Además de la detección por PCR, se hicieron ensayos preliminares de toxicidad con células MOLT-4 para detectar posibles cepas productoras de nuevas parasporinas, así como para corroborar la actividad de las ya seleccionadas. El primer paso fue la validación de los ensayos con testigos y controles positivos de las PS.

TABLA VIII

BLAST de los productos secuenciados contra todas las parasporinas

Parasporina	Acceso	CL9-1		CL9-3		CL9-21		IB88		IB84	
		C	I	C	I	C	I	C	I	C	I
PS1Aa1	AB031065	95%	97%	97%	99%	-	-	-	-	-	-
PS1Aa2	AY081052	91%	95%	97%	98%	-	-	-	-	-	-
PS1Aa3	AB250922	95%	97%	97%	99%	-	-	-	-	-	-
PS1Aa4	AB274826	95%	97%	97%	99%	-	-	-	-	-	-
PS1Aa5	AB274827	95%	97%	97%	99%	-	-	-	-	-	-
PS1Aa6	AB375062	93%	95%	97%	99%	-	-	-	-	-	-
PS1Ab1	AB250923	95%	95%	97%	99%	-	-	-	-	-	-
PS1Ab2	AB274825	95%	95%	97%	99%	-	-	-	-	-	-
PS1Ac1	AB276125	93%	96%	97%	98%	-	-	-	-	-	-
PS1Ac2	AB731600	93%	96%	97%	98%	-	-	-	-	-	-
PS1Ad1	AB375062	93%	95%	97%	99%	-	-	-	-	-	-
PS1Ad2	KC914622	93%	95%	97%	98%	-	-	-	-	-	-
PS2Aa1	AB099515	-	-	-	-	-	-	100%	99%	-	-
PS2Aa2	AB454419	-	-	-	-	-	-	100%	99%	-	-
PS2Ab1	AB186914	-	-	-	-	-	-	100%	89%	-	-
PS3Aa1	AB116649	-	-	-	-	98%	98%	-	-	-	-
PS3Ab1	AB116651	-	-	-	-	98%	98%	-	-	-	-
PS4Aa1	AB180980	-	-	-	-	-	-	-	-	98%	99%
PS5Aa1	AB555650	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PS5Aa2	KC960014	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PS6Aa1	AB375063	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

C: Porcentaje de cobertura; I: Porcentaje de identidad.



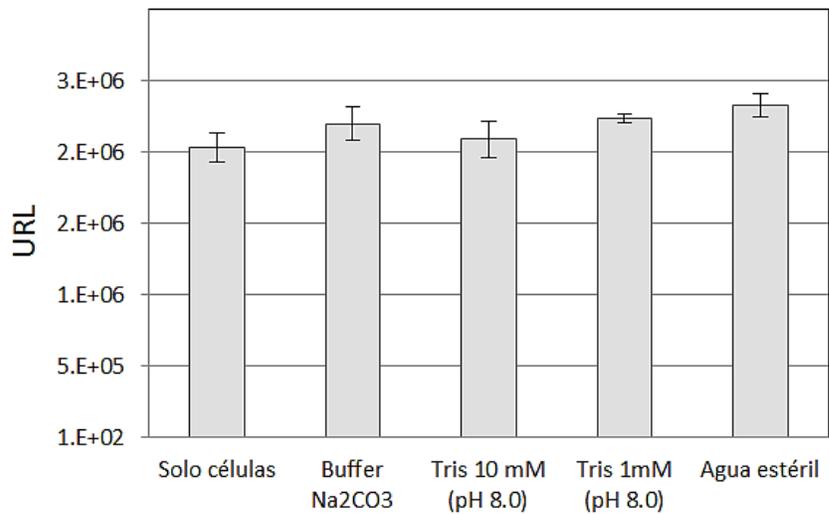
**Figura 8.** Localización de los fragmentos secuenciados de las cepas del estudio.

### 6.1.2.1 Validación de los ensayos de citotoxicidad

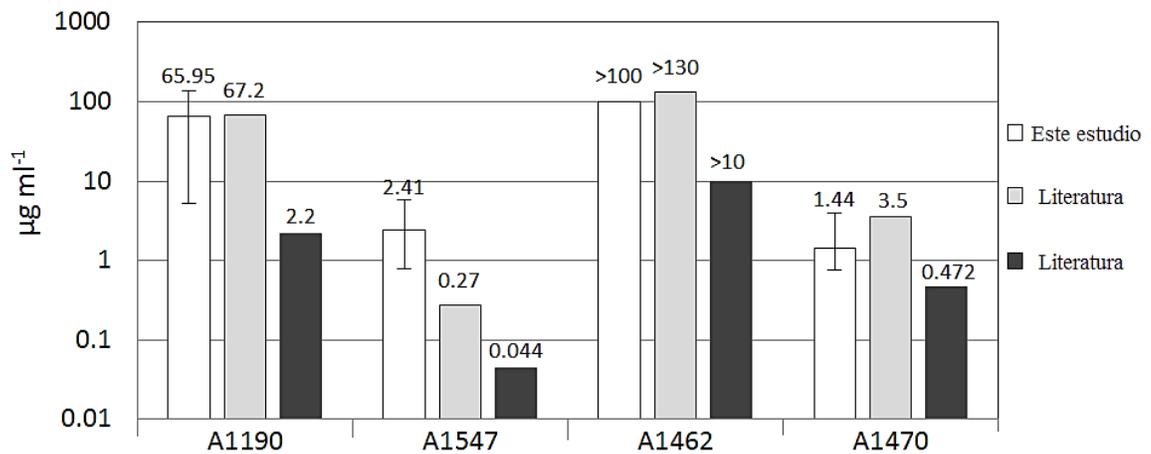
Los testigos para la validación de los ensayos de citotoxicidad consistieron en células de leucemia en suspensión MOLT-4 (90  $\mu$ l) expuestas con diferentes buffers (10  $\mu$ l), incluyendo el buffer de carbonatos con proteinasa K y PMSF con el que fueron activados los cristales paraesporales de todas las cepas. La viabilidad fue monitoreada con el kit CellTiter Glo (Promega) a las 24 h. También fueron incluidas células (100  $\mu$ l) sin ninguna solución o buffer adicional y células adicionadas con agua estéril (10  $\mu$ l). El resultado fue que no hubo diferencias significativas en ninguna de las condiciones, descartando que de los componentes usados para la activación de los cristales, interfirieran con la viabilidad de las líneas celulares de los ensayos posteriores (Fig. 9).

Los controles positivos usados para todos los ensayos de citotoxicidad fueron los cristales activados de las cepas de referencia A1190, A1547, A1462 y A1470. La  $CE_{50}$  fue calculada en base al efecto de diferentes diluciones de cristales activos sobre las células MOLT-4 (Fig. 10). La actividad anti-leucémica de estas cepas fue muy similar a lo reportado, ya que para los extractos crudos de este estudio se obtuvieron  $CE_{50}$  muy cercanas a lo descrito en la literatura (Lee *et al.*, 2000; Mizuki *et al.*, 2000; Yamashita *et al.*, 2000), con excepción de la cepa A1547 (Kim *et al.*, 2000), que en nuestros ensayos tuvo una  $CE_{50}$  mayor. No obstante, es necesario tomar en cuenta que al no estar reportados los límites de confianza en la literatura, no se puede hacer un análisis comparativo más preciso de estos resultados.

Por otra parte, la comparación de nuestros resultados con los reportados para las PS purificadas no es tan similar (Ito *et al.*, 2004; Katayama *et al.*, 2005; Okumura *et al.*, 2005; Yamashita *et al.*, 2005). Este es un comportamiento esperado debido a que la proteína total de los extractos crudos no necesariamente está constituida únicamente por parasporinas. En resumen, nuestros resultados confirman la correcta activación y conservación de los cristales paraesporales así como la inocuidad de los componentes para la activación de los mismos, respaldando los resultados de citotoxicidad de los ensayos posteriores.



**Figura 9.** Testigos de los ensayos de citotoxicidad en células MOLT-4.

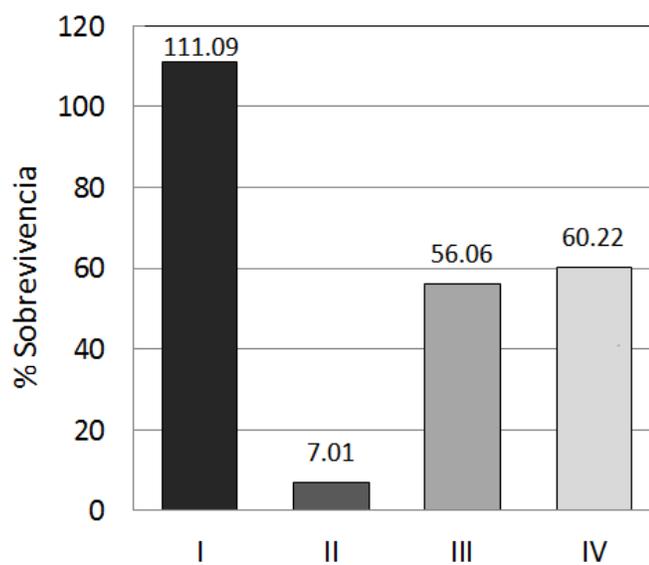


**Figura 10.** Efecto citotóxico medio de los cepas de referencia contra MOLT-4.

Las barras blancas indican las CE<sub>50</sub> obtenidas en este estudio con los extractos crudos; las barras grises indican las CE<sub>50</sub> reportadas en la literatura para extractos; las barras negras indican las CE<sub>50</sub> reportadas en la literatura para las PS purificadas.

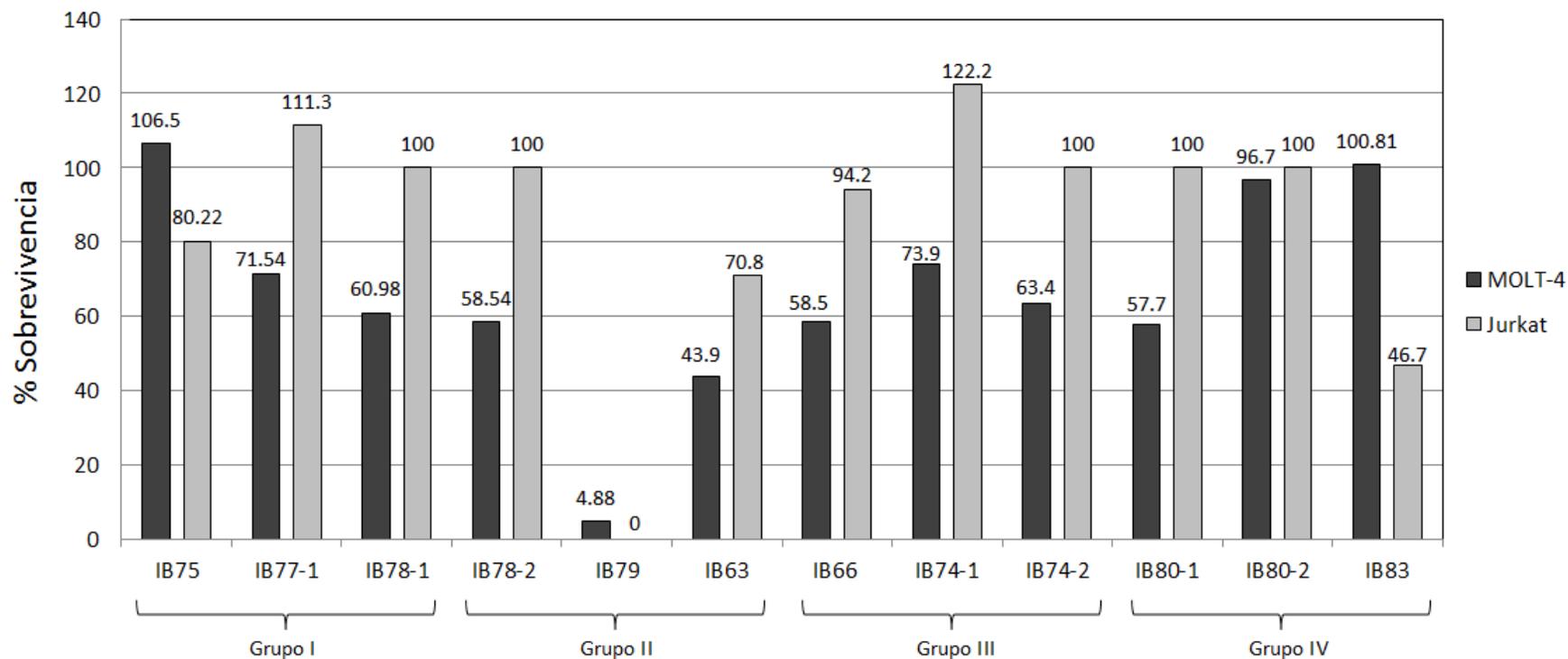
### 6.1.2.2 Ensayos de selección con células de leucemia

Una vez estandarizados y validados los ensayos, fueron realizados varios ensayos de citotoxicidad contra las líneas de leucemia MOLT-4 y Jurkat, para probar la actividad biológica de los extractos crudos activos de 12 cepas que dieron resultados negativos por PCR y que en estudios previos mostraron baja o nula actividad hacia *Spodoptera exigua* y *Trichoplusia ni* (Campos, 2007; Moreno, 2007). Inicialmente fueron probados contra MOLT-4, los extractos activos combinados de 3 cepas (Fig. 11). Como tres de las cuatro grupos de extractos mostraron <60 % de viabilidad, se procedió a analizar los cristales de cada cepa por separado tanto con MOLT-4 como con Jurkat (Fig. 12). La mayor actividad biológica contra las células de leucemia fue registrada por la cepa IB79, que tuvo una notable citotoxicidad incluso desde el primer ensayo en el que fue combinada con los cristales de IB78-2 e IB63. Como resultado, esta cepa también fue seleccionada para su caracterización y ensayos de citotoxicidad posteriores.



**Figura 11.** Ensayos preliminares de citotoxicidad con células MOLT-4.

El porcentaje de sobrevivencia fue calculado en base al conteo de células no tratadas como el 100 %.



**Figura 12.** Ensayos de selección con células de leucemia MOLT-4 y Jurkat.

Los cristales activados fueron suministrados a una concentración final de  $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ . El porcentaje de supervivencia fue determinado en base al conteo de células sin tratamiento como el 100%.

## **6.2 Descripción de las cepas seleccionadas**

En total fueron seleccionadas 7 cepas para este estudio: las cepas IB-84, IB-88, CL9-1, CL9-3 y CL9-21 que por PCR múltiple amplificaron genes para *ps1*, *ps2*, *ps3* y *ps4*; la cepa IB79 que mostró fuerte actividad anti-leucémica en los ensayos preliminares de citotoxicidad, y la cepa GM18, que en la literatura ha sido reportada con actividad anti-cancerígena y sin actividad insecticida (Mizuki *et al.*, 1999; Rodríguez-Padilla *et al.*, 1990).

En la tabla IX se resumen las principales características de las cepas seleccionadas para este estudio. Estas representan un grupo heterogéneo, ya que muestran diferencias tanto en el tipo de PS que producen, la morfología de sus cristales, espectro citotóxico y sensibilidad a antibióticos. En este último aspecto, destacó la cepa IB88 que fue la única en mostrar sensibilidad hacia ampicilina, una característica poco usual entre las gram positivas, en especial del género *Bacillus* (Luna *et al.*, 2007). También fue la única de nuestras cepas seleccionadas en sintetizar cristales bipiramidales, característica que será detallada más a fondo, junto a otras importantes, en las siguientes secciones.

## **6.3 Caracterización de los cristales paraesporales de las cepas seleccionadas**

La producción de cristales paraesporales fue constantemente monitoreada en los cultivos de las cepas seleccionadas y la mayoría mostró características muy particulares. Para su caracterización morfológica se usaron microscopía óptica y electrónica; para el análisis de sus proteínas se hicieron geles de poliacrilamida en una y dos dimensiones; la actividad anti-cancerígena fue puesta a prueba mediante ensayos de citotoxicidad contra células normales y de cáncer, mientras que el posible modo de acción fue analizado con ensayos múltiple de viabilidad, necrosis y apoptosis.

TABLA IX

Descripción de las cepas productoras de parasporinas de este estudio

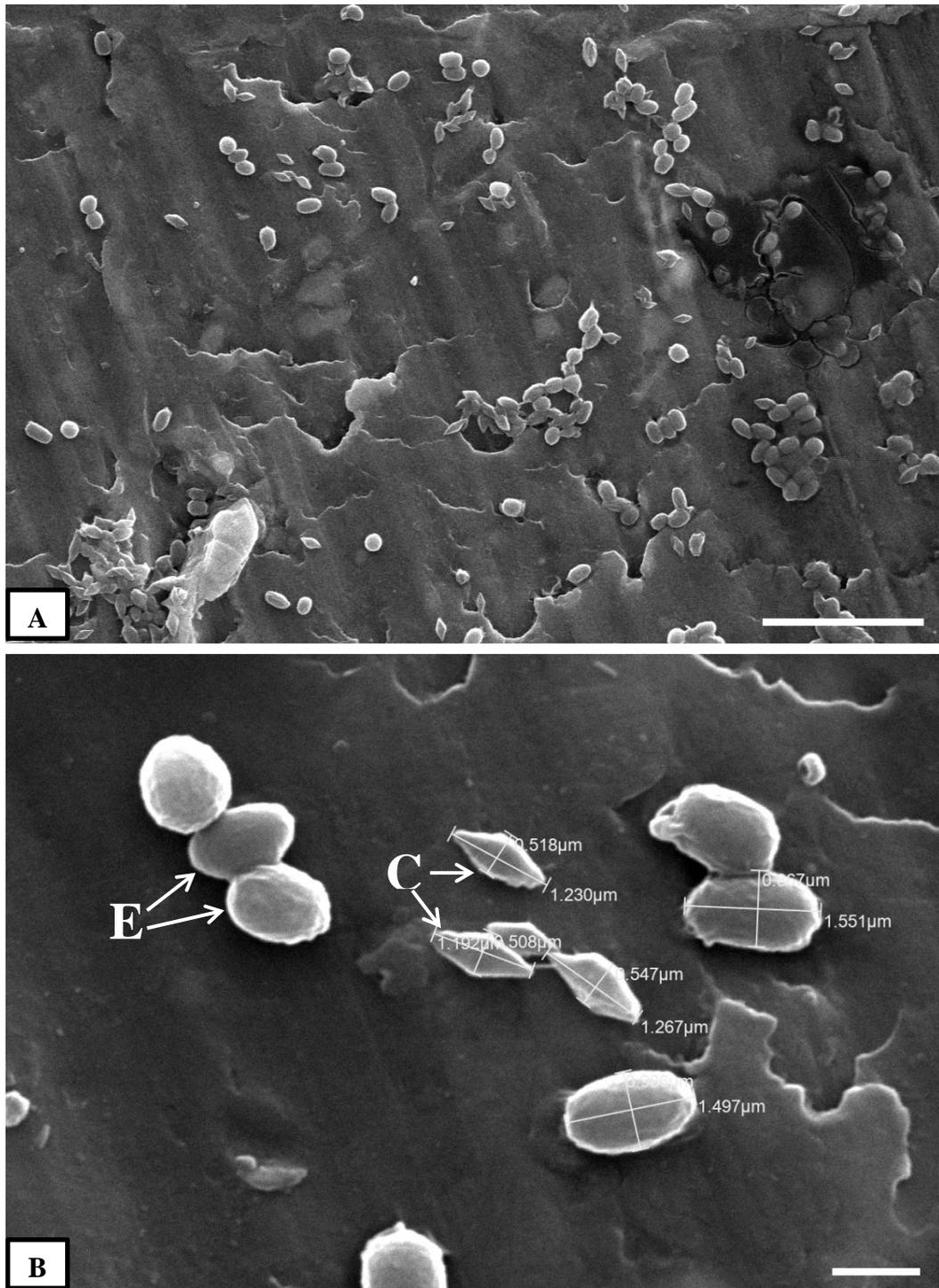
Clave de la cepa	Localidad de aislamiento	Parasporinas identificadas	Morfología del Cristal	Resistencia a antibióticos												
				Am	Cf	Fep	CTX	Caz	Cxm	Dc	P	Cro	C	TE	VA	
A1190 *	Hiroshima, Japón	PS1Aa1	Esférico	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	S	S	S
A1547 *	Fukuoka, Japón	PS2Aa1	Esférico	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	I	S	S
A1462 *	Tokio, Japón	PS3Aa1, PS3Ab1	Bipiramidal	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	S	I	I
A1470 *	Tokio, Japón	PS4Aa1, PS2Aa2	Irregular	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	S	I	S
IB-84	San Luis Potosí	PS4	Irregular	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	S	S	I
IB-88	San Luis Potosí	PS2	Bipiramidal	S	R	R	R	R	R	R	R	R	I	S	S	S
IB-79	San Luis Potosí	PS1/PS4	Irregular	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	I	S
GM18	Guanajuato	Nd	Irregular	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	I	I
CL9-1	Nuevo León	PS1	Esférico	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
CL9-3	Nuevo León	PS1	Esférico	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
CL9-21	Nuevo León	PS2, PS3, PS4	Irregular	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	S	I

\* Cepas de referencia. Abreviaciones: Nd, no determinado; R, resistente; S, sensible; I, intermedio; Am, ampicilina; Cf, cefalotina; Fep, cefepime; Ctx, cefotaxamina; Caz, ceftazidima; Cro, ceftriaxona; Cxm, cefuroxima; Dc, dicloxacilina; P, penicilina; C, cloramfenicol; TE, Tetraciclina; VA, vancomicina.

### 6.3.1 Morfología de los cristales

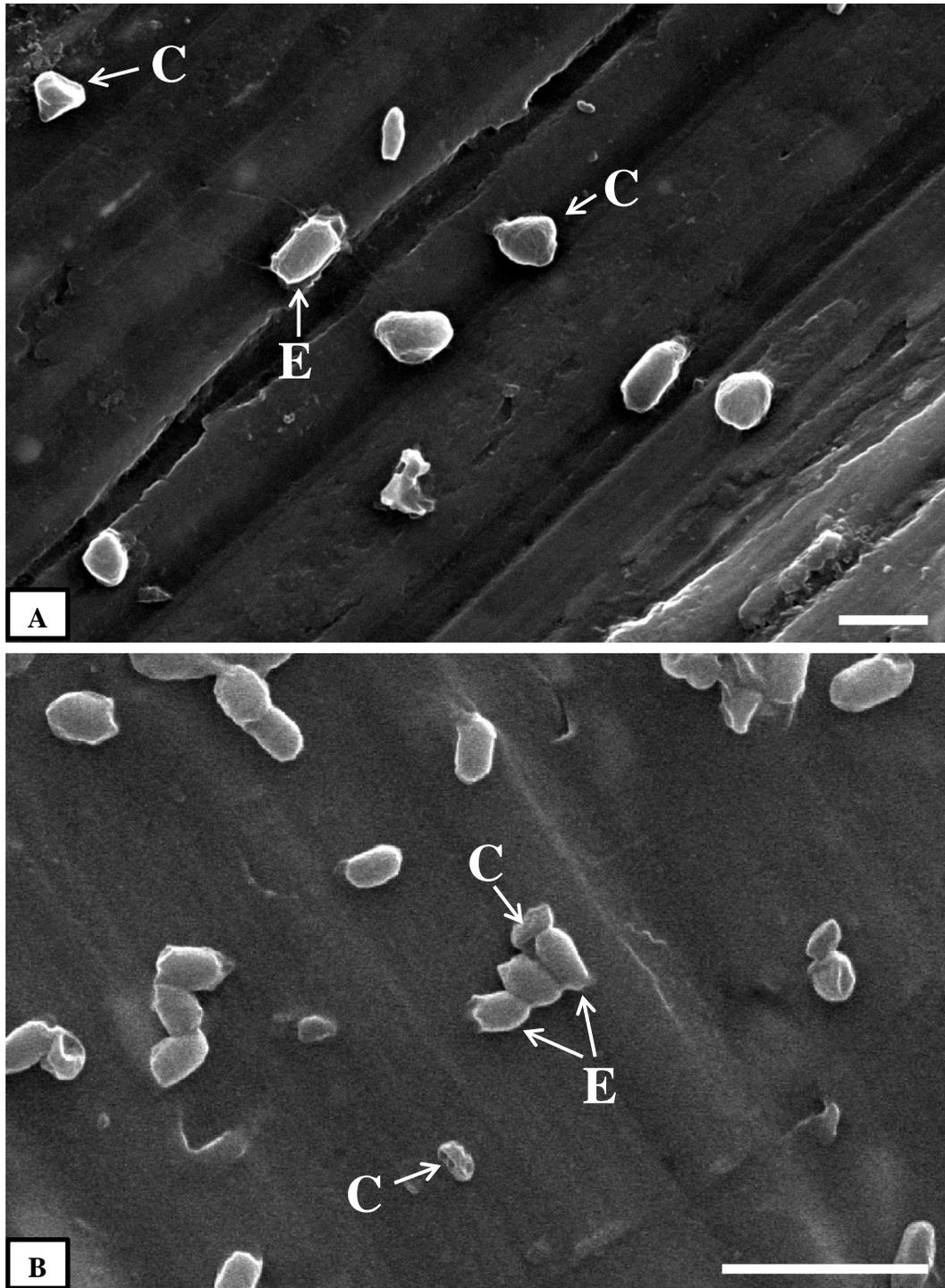
Los cultivos de las cepas fueron constantemente monitoreados al microscopio óptico y posteriormente también fueron vistas en microscopía electrónica de barrido, a excepción de la cepa CL9-21. La única cepa en mostrar cristales con la morfología bipiramidal típica fue la IB88, cuyos cristales son de un tamaño aproximado de 1.2 x 0.5  $\mu\text{m}$  (Fig. 13). Los cristales de la cepa IB84 y CL9-21 fueron los más difíciles de caracterizar debido al tamaño y baja proporción con respecto a la cantidad de esporas. Para ambas, los cristales vistos al microscopio óptico tuvieron formas irregulares muy pequeñas, frecuentemente se encuentran adheridos a uno de los polos de la espora. En el caso de la cepa IB84, la microscopía electrónica reveló cristales irregulares ligeramente alargados, igualmente, localizados hacia un polo de la espora. Aunque esta cepa codifica para la PS4, sus cristales fueron muy diferentes a los de la cepa de referencia A1470, que en la literatura también están reportados como irregulares (Lee *et al.*, 2000), y en nuestras imágenes fueron vistos con configuraciones ligeramente triangulares (Fig. 14).

Por otra parte, los cristales de las cepas IB79 y GM18 fueron los más peculiares. Mientras que al microscopio óptico, los cristales de la IB79 mostraban morfologías esféricas y los de la GM18 como de gotas de agua de tamaño medio; por microscopía electrónica de barrido, los cristales de ambas revelaron formas cóncavas irregulares (Fig. 15). En el caso de la IB79, los cristales tuvieron la apariencia de glóbulos y en la GM18, una morfología cercana a la piramidal. Cabe señalar que para esta cepa los cristales han sido reportados como triangulares, vistos por microscopía electrónica de transmisión (Rodríguez-Padilla *et al.*, 1990), pero en este estudio pudimos observar una estructura tridimensional piramidal cóncava o irregular. En el caso de las cepas CL9-1 y CL9-3 hubo mucha similitud con la cepa A1190 de referencia que también produce la PS1. Las tres cepas mostraron bacilos de formas polimórficas durante su crecimiento, especialmente en la fase de esporulación. Igualmente, los cristales producidos por estas cepas fueron de forma esférica, de tamaño grande (similar al de la espora), con poca afinidad hacia el colorante (cristal violeta) y generalmente adheridos hacia uno de los polos de las esporas (Fig. 16).



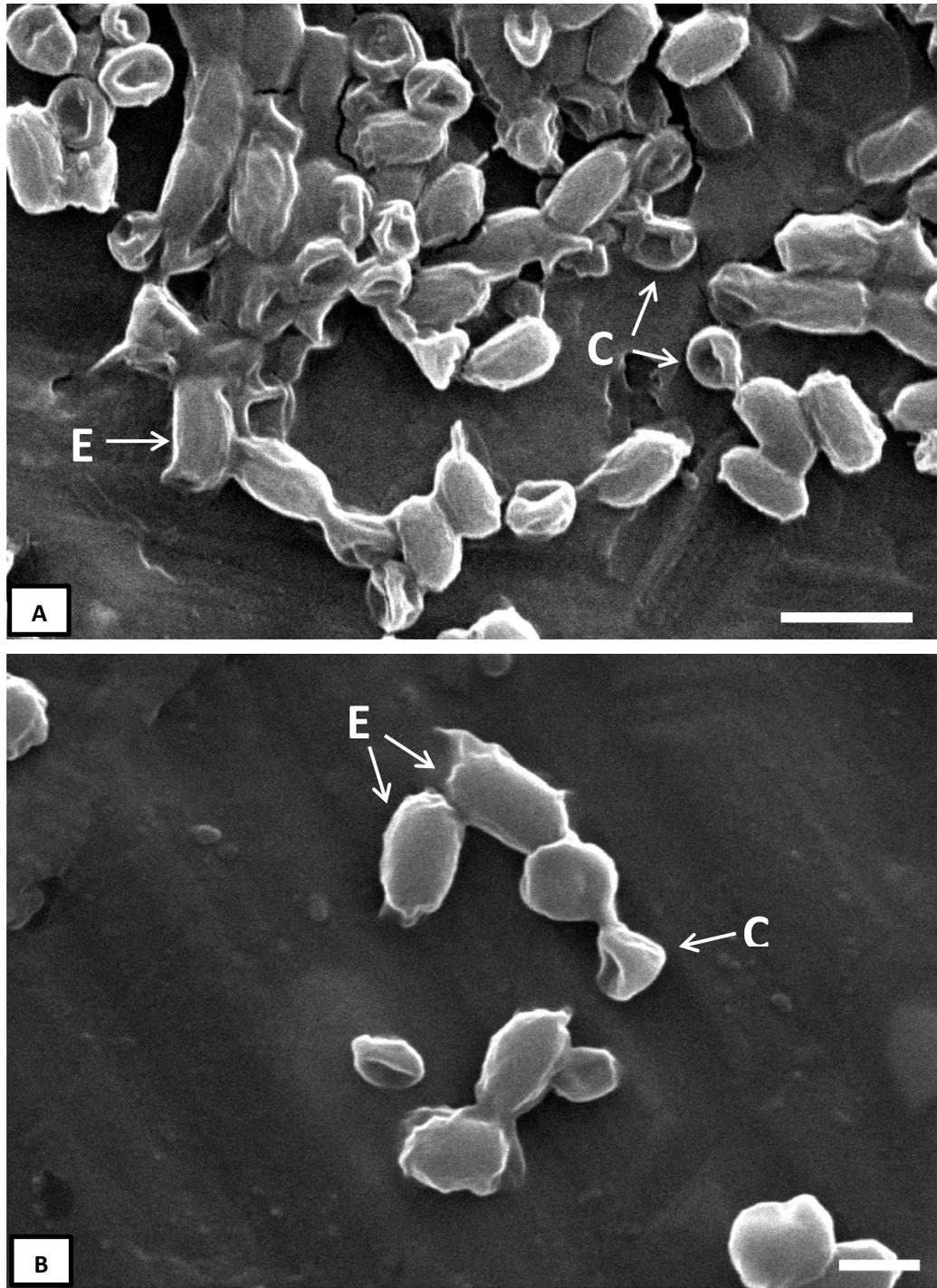
**Figura 13.** Microscopía electrónica de las esporas y cristales la cepa IB88.

A, aumento de 2,2000 x; B, aumento de 12,000 x; E, esporas; C, cristales. Las barras blancas en la esquina inferior derecha indican la longitud de 10 (A) y 1 μm (B).



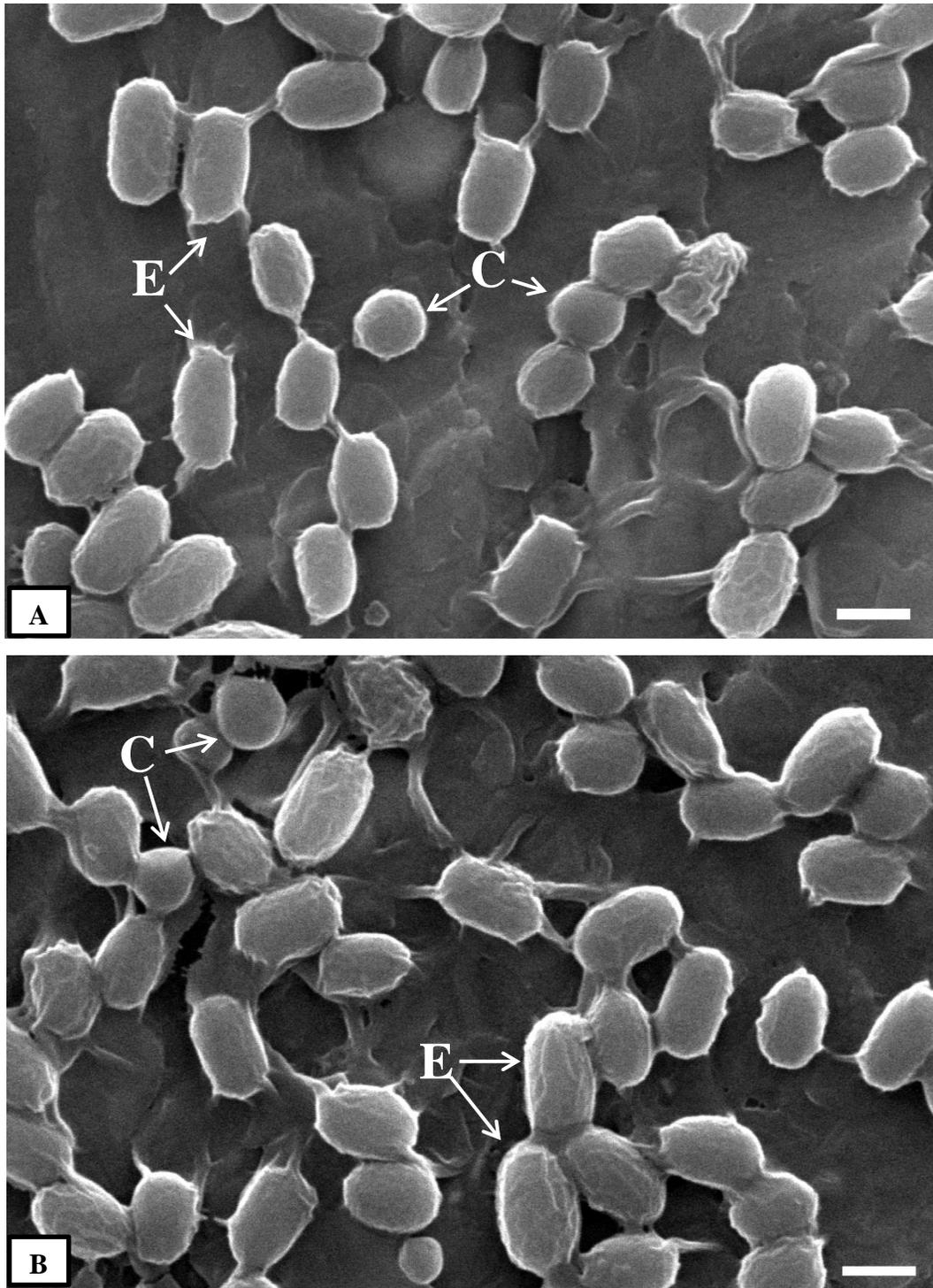
**Figura 14.** Microscopía electrónica de las esporas y cristales las cepas A1470 e IB84.

A, cepa A1479 (6,000X); B, cepa IB84 (3,500X); E, esporas; C, cristales. Las barras blancas en la esquina inferior derecha indican la longitud de 2 (A) y 5  $\mu\text{m}$  (B).



**Figura 15.** Microscopía electrónica de las esporas y cristales las cepas IB79 y GM18.

A, cepa IB79 (9,000X); B, cepa GM18 (11,000X); E, esporas; C, cristales. Las barras blancas en la esquina inferior derecha indican la longitud de 2 (A) y 1  $\mu\text{m}$  (B).



**Figura 16.** Microscopía electrónica de las esporas y cristales las cepas CL9-1 y CL9-3.

A, cepa CL9-1 (10,000X); B, cepa CL9-3 (10,000X); E, esporas; C, cristales. Las barras blancas en la esquina inferior derecha indican la longitud de 1 µm.

### 6.3.2 Perfiles proteicos

El análisis de los perfiles proteicos de los cristales paraesporales fue llevado con las siguientes finalidades: 1) monitorear la correcta activación de los cristales, para garantizar su actividad en los ensayos de citotoxicidad, 2) la caracterización de los perfiles de las proteínas mayoritarias solubilizadas y activadas, para definir sus tamaños moleculares y puntos isoeléctricos y 3) análisis comparativo con las PS de referencia.

#### 6.3.2.1. SDS-PAGE

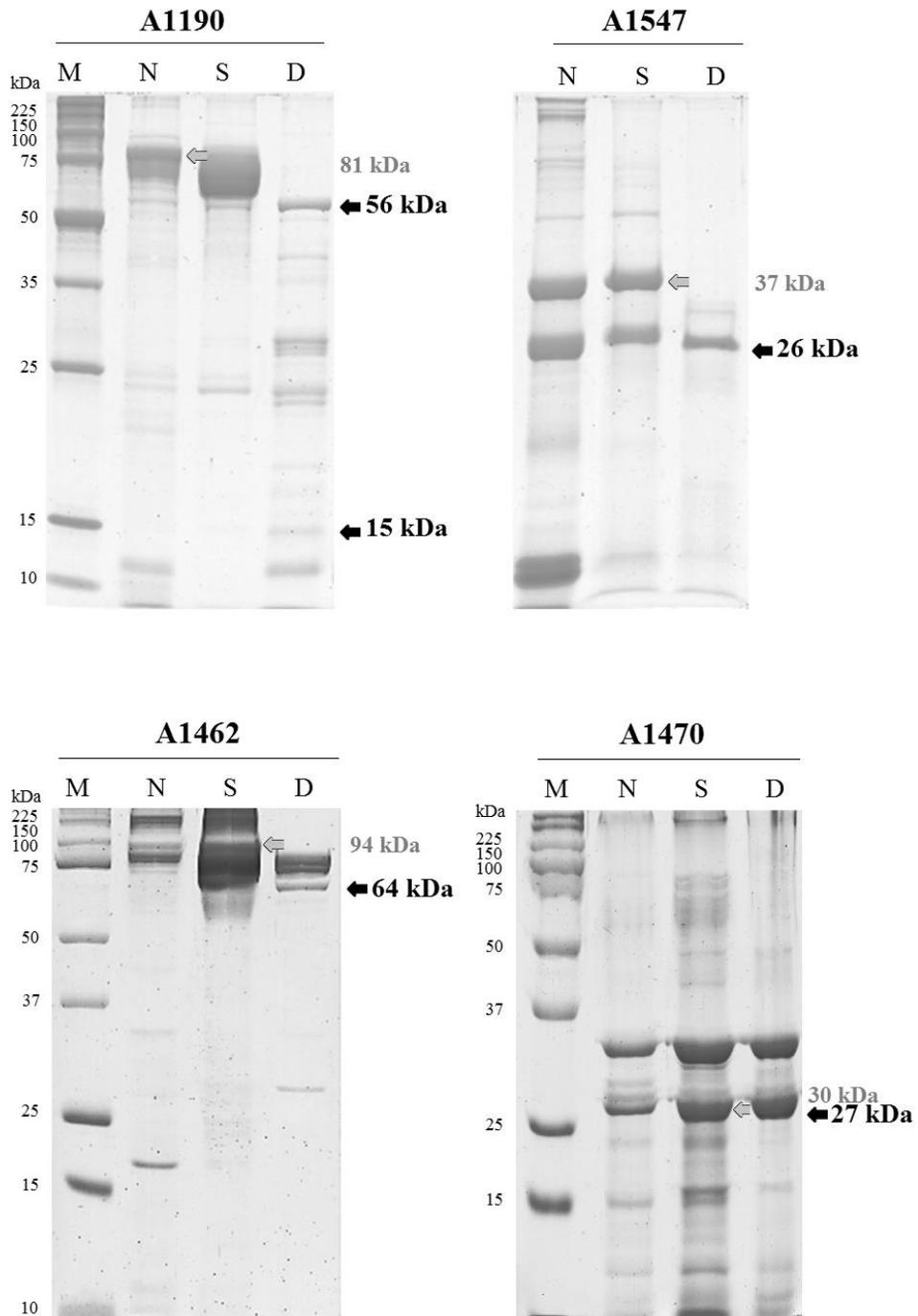
La validación de nuestro proceso de activación, fue reiterada mediante el análisis los perfiles proteicos de los cristales solubilizados y digeridos de nuestro estudio y lo reportado en la literatura (Kim *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2000; Mizuki *et al.*, 2000; Yamashita *et al.*, 2000). Básicamente fueron observados los mismos patrones y pesos moleculares, aunque con una mayor cantidad de bandas minoritarias, ya que se trabajó con los extractos crudos y no con las PS purificadas. En la figura 17 se resaltan los fragmentos tóxicos de las toxinas activas y sus respectivos pesos moleculares.

A excepción de las cepas CL9-1 y CL9-3, todas las demás cepas presentan patrones únicos, sobre todo en forma nativa y solubilizada. No obstante, el análisis comparativo de los perfiles de proteínas activadas, revela la presencia de bandas muy similares de entre los 26 y 29 kDa para las 5 de las 7 cepas seleccionadas. La cepa IB84 expuso proteínas de tamaños cercanos a los esperados para la protoxina y PS4 activa; sin embargo, no se igualó a la cepa A1470, ya que esta cepa además de la PS4Aa1, también sintetiza PS2Aa2. Extrañamente las proteínas solubilizadas de la cepa IB88, con tamaños >50 kDa, fueron totalmente diferentes a los de la cepa A1547, aunque tras ser digerida si presentó una banda cercana a la PS2 activa con ca. 27 kDa. Las proteínas nativas, solubilizadas y digeridas de CL9-1 y CL9-3 fueron prácticamente idénticas en pesos y densidades a los exhibidos por la cepa A1190 de referencia (Fig. 19).

Interesantemente, a pesar de que la cepa CL9-21 dio positivo por PCR a genes de *ps2*, *ps3* y *ps4*, los perfiles de sus proteínas no correspondieron a la producción de todas estas PS. En estado nativo y solubilizado resaltó una banda de ca. 42.5 kDa, mientras que digerida reveló una banda mayoritaria de ca. 29 kDa, las cuales únicamente pudieran relacionarse con PS2. Este patrón sugiere que la CL9-21 solo sintetiza un solo tipo de PS y posiblemente los demás genes PS que codifica se encuentran inactivos.

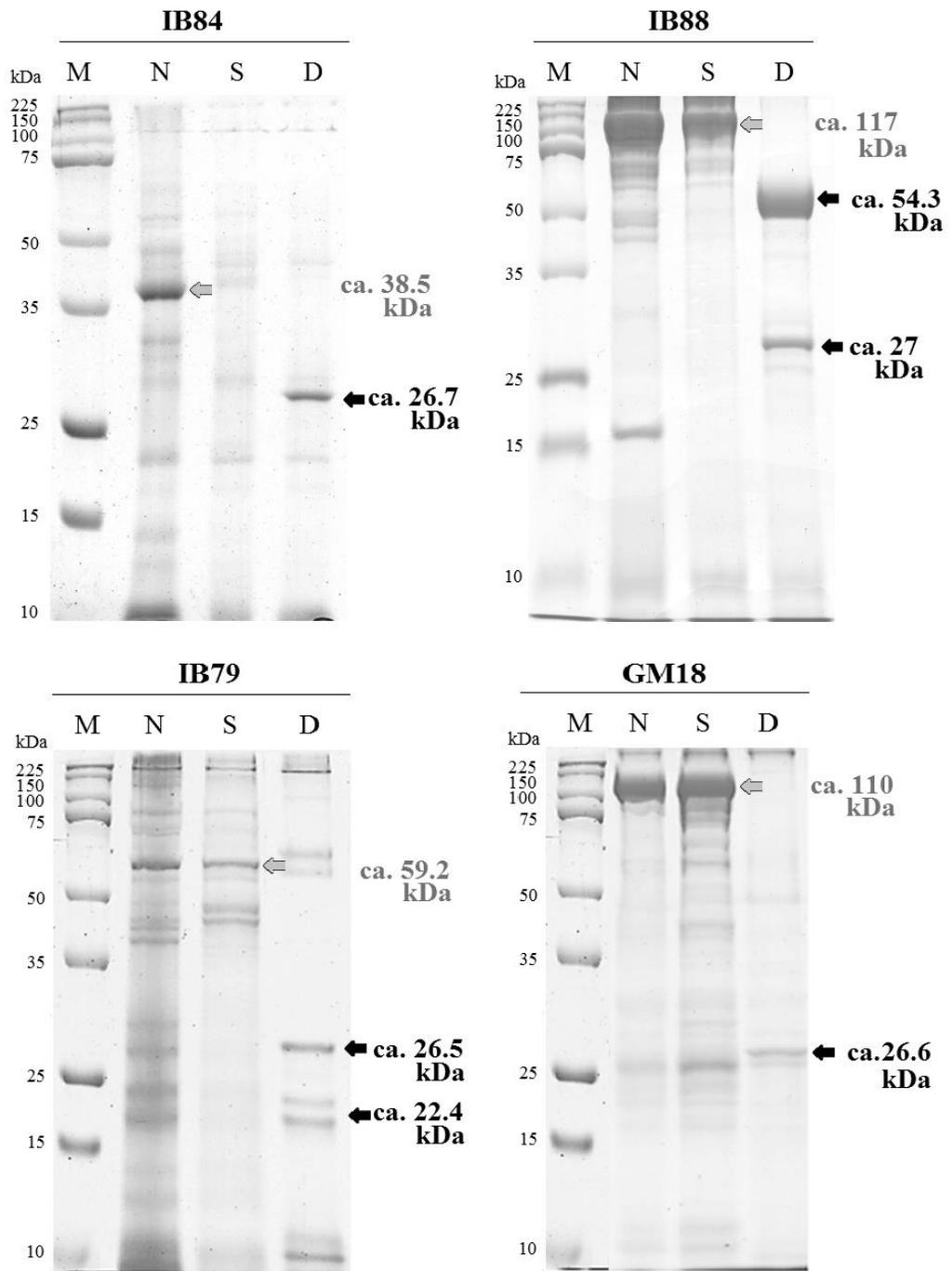
En cuanto a las cepas IB79 y GM18, cuyos tipos de PS no han sido establecidos, presentaron patrones de proteínas nativas y solubilizadas que no se pudieron relacionar a ninguna de las PS reportadas. Por otra parte, los perfiles de ambas en estado activo tuvieron una banda principal de ca. 26 kDa, que pudiera compararse tanto con PS2 como PS4. Aunque en la cepa IB79, esta banda estuvo acompañada de otras de mayor y menor peso con intensidades cercanas. En la figura 18 se resalta la banda de ca. 22.4 kDa, cuya densidad y peso molecular también pudiera estar relacionado a algún tipo de PS.

Por último, cabe mencionar las diferencias en rendimientos de proteína total obtenidas al final de la activación de nuestras cepas y las de referencia. Como recomendación del Dr. Eiichi Mizuki, la activación se hizo a partir de cultivos esporulados en medio sólido, crecidos en cajas Petri de 100 x 15 mm. En donde las cepas con mayor rendimiento fueron las A1190, A1547, A1462, IB88, CL9-1 y CL9-3, con las que fue posible alcanzar concentraciones de hasta 1 mg, a partir del cultivo esporulado de una sola caja Petri. En segundo plano fueron agrupadas las cepas A1470, IB79 y GM18, que mostraron rendimientos de 1 mg de proteína total a partir de 3 cajas Petri. Mientras que en último lugar quedaron las cepas IB84 y CL9-21, donde se requirieron hasta 10 cajas para lograr la concentración de 1 mg, por lo que invariablemente tuvieron que ser concentradas y dializadas lograr las concentraciones requeridas para los experimentos posteriores. El rendimiento observado para todas las cepas, incluidas las de referencia estuvo estrechamente relacionado al tamaño de los cristales paraesporales, ya que las cepas de menor rendimiento también fueron las productoras de los cristales más pequeños, mientras que las que tuvieron los cristales más grandes fueron con las que se recuperó la mayor cantidad de proteína final.



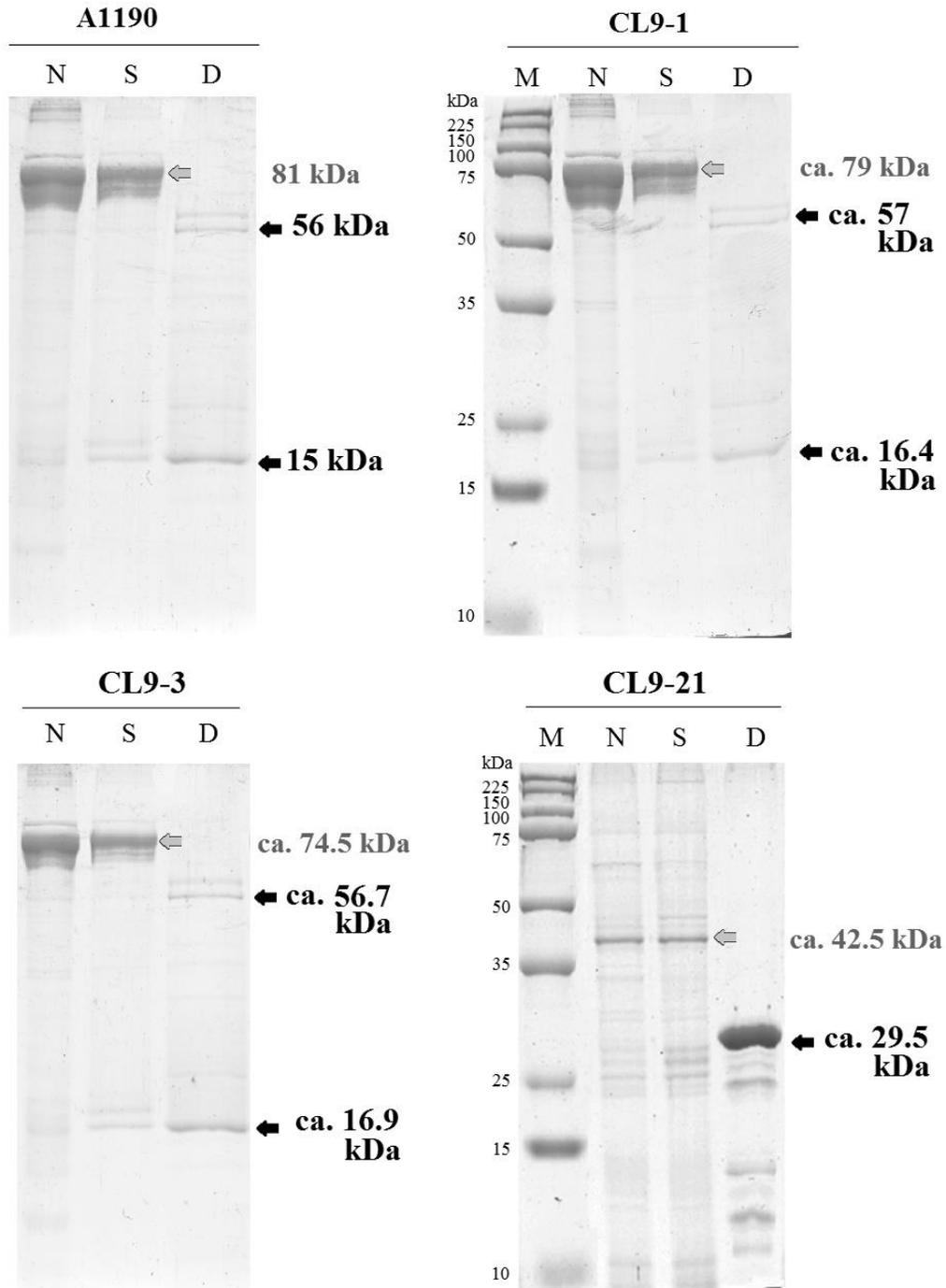
**Figura 17.** Perfiles proteicos de los cristales de las cepas de referencia.

M: marcador de peso molecular (225-10 kDa); N: proteínas nativas; S: proteínas solubilizadas; D: proteínas activadas. Las flechas grises señalan las protoxinas y las negras los fragmentos tóxicos.



**Figura 18.** Perfiles proteicos de los cristales de las cepas IB84, IB88, IB79 y GM18.

M: marcador de peso molecular (225-10 kDa); N: proteínas nativas; S: proteínas solubilizadas; D: proteínas activadas. Las flechas grises señalan las posibles protoxinas y las negras los posibles fragmentos tóxicos.



**Figura 19.** Perfiles proteicos de los cristales de las cepas A1190, CL9-1, CL9-3 y CL9-21.

M: marcador de peso molecular (225-10 kDa); N: proteínas nativas; S: proteínas solubilizadas; D: proteínas activadas. Las flechas grises señalan las posibles protoxinas y las negras los posibles fragmentos tóxicos.

### 6.3.2.2 Electroforesis en doble dimensión

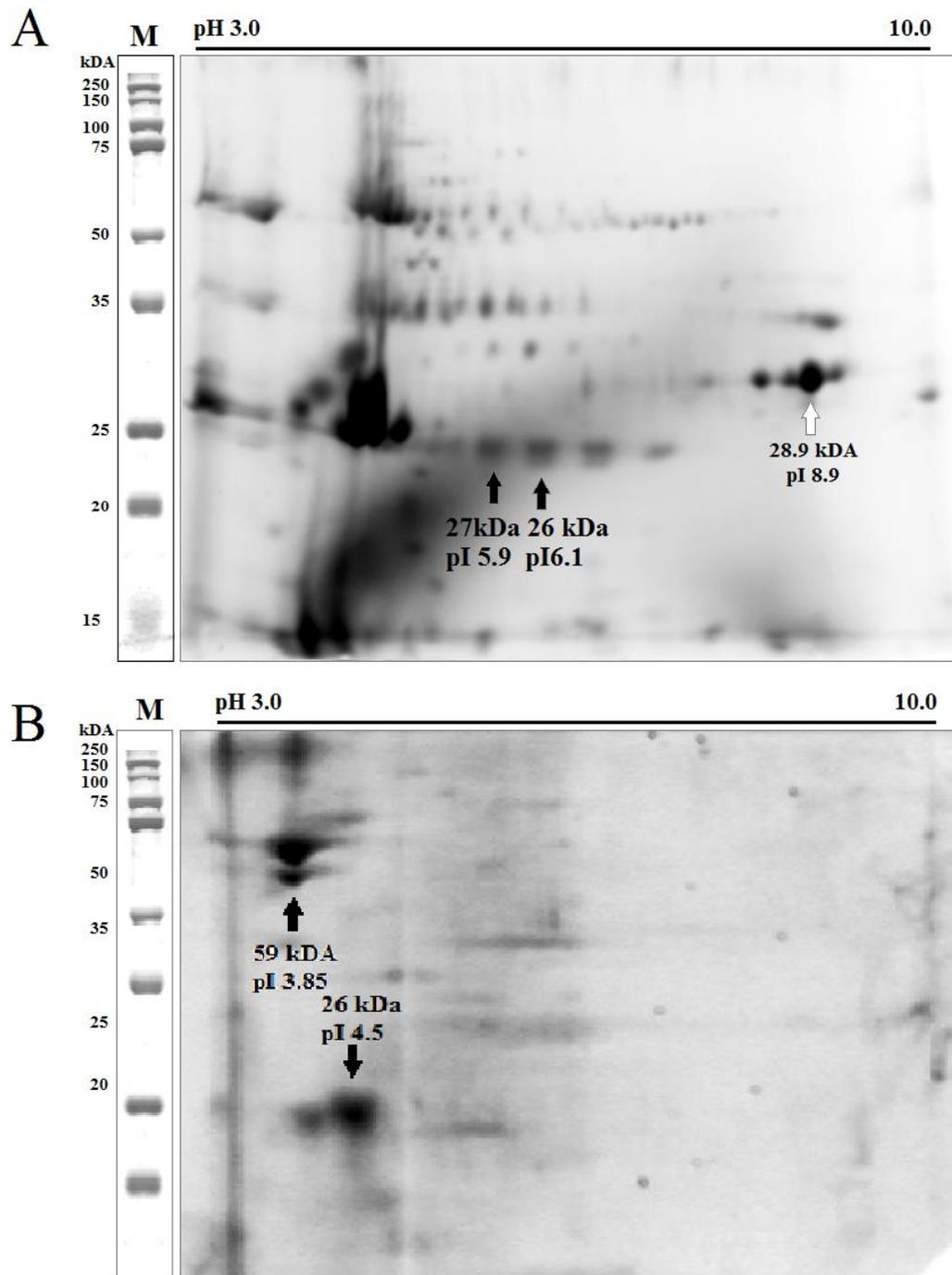
Los geles bidimensionales se corrieron para los cristales solubilizados de las cepas IB88, IB84, GM18 e IB79, y para los activados de IB88, IB84, GM18 y la A1470 como referencia. En esta última, aunque fueron observadas numerosas proteínas de diversos pesos y puntos isoeléctricos (pI), la resolución fue óptima ya que fue posible localizar y diferenciar las dos toxinas: PS2Aa2 de pI 5.9 (27kDa) y PS4Aa1 de pI 6.1 (26 kDa), así como la proteinasa K de pI 8.9 y 28.9 kDa (Fig. 20 A).

La visualización y conteo de los “spots” (puntos o manchas de proteínas) para las proteínas de las cepas IB79, IB88 e IB84, fue menor en comparación a la cepa de referencia. Para los cristales solubilizados de la cepa IB88, hubo un spot mayoritario entre los 50 y 75 kDa con un pI estimado de 5.2 y otro más pequeño de ca. 23kDa, pI 4.9 (Fig. 21 A). En este gel no es claro cuál corresponde a la pro-toxina, ya que ninguno de ellos se acerca al peso o pI estimado para las PS2 solubilizada, que se estima alrededor de un pH 5.9. No obstante, para en las proteínas digeridas se detectó un pequeño spot con características más cercanas a las PS2, de 28 kDa y pI 7.3 (Fig. 21 B). Y al igual que en el primer gel de IB88, es difícil establecer el spot de la pro-toxina en los cristales solubilizados de la cepa IB79 cuyos spots principales se posicionaron a pH ácido (Fig. 20 B), ya que todos los precursores de PS conocidas se localizarían alrededor del pH 6.

Por otra parte, los perfiles de los cristales de IB84 sí tuvieron spots con los atributos similares a los de la PS4, tanto en su forma solubilizada como en su forma activa (Fig. 22). Cabe señalar que en las proteínas solubilizadas se apreciaron varios spots consecutivos con los mismos pesos moleculares pero distintos pI (Fig.22 A).

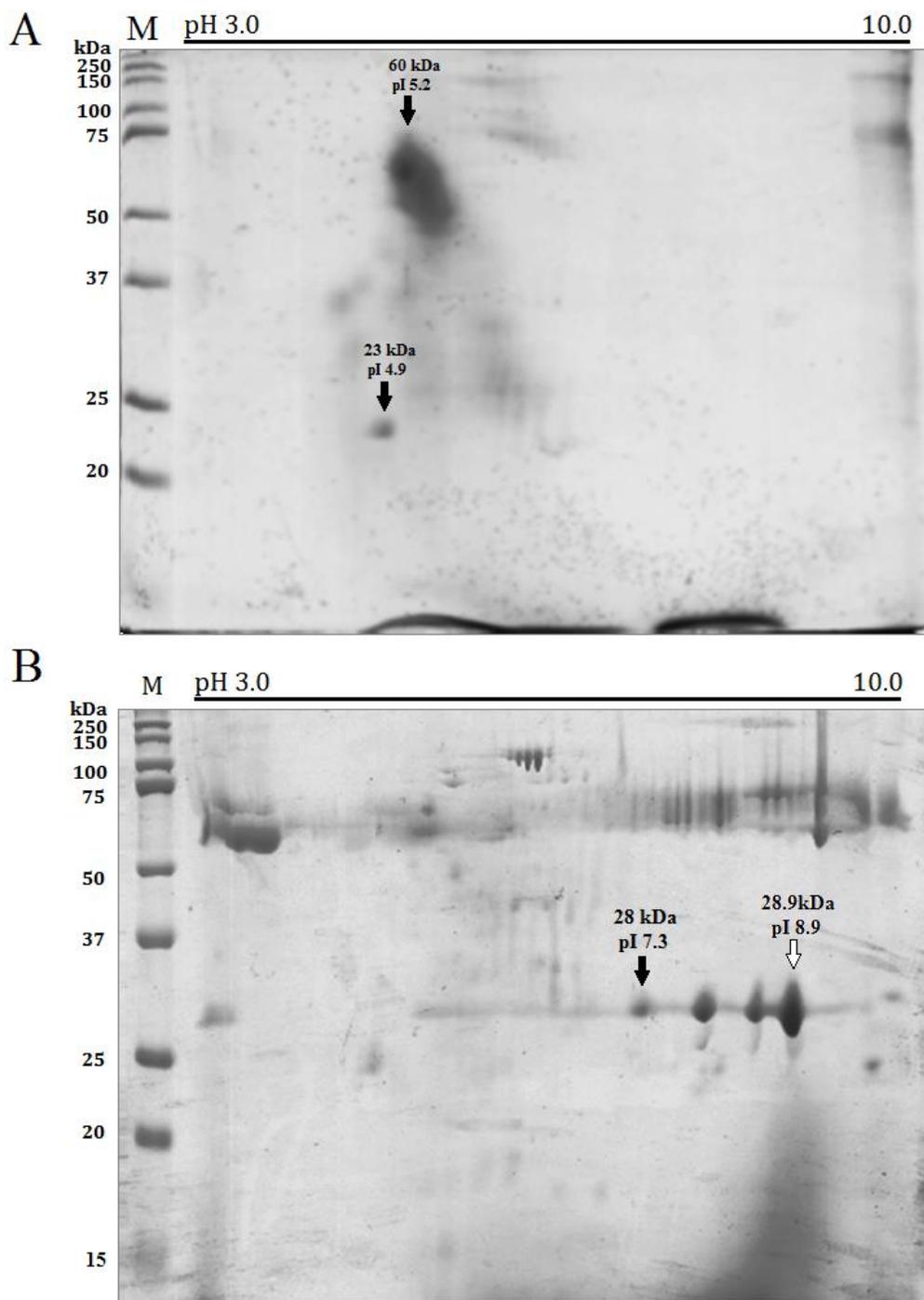
En donde, de acuerdo a la literatura, la pro-toxina correspondería al spot de pH 5.9. Sin embargo no se descartan los demás spots como para la posible pro-toxina, debido a que a lo largo de la caracterización de los cristales de IB84, hemos encontrado diferencias importantes con la cepa de referencia y la evidencia experimental apunta hacia la presencia de una PS4 distinta a la reportada.

En cuanto a los geles de la cepa GM18, se observaron numerosos “spots”, varios de ellos con características potenciales para PS. En las proteínas solubilizadas se señalan dos spots viables para ser pro-toxinas (Fig. 23 A), aunque no se encuentran bien definidas debido al traslape de la mayoría de los spots en esta parte del gel. Para este caso en particular, el perfil proteico pudiera ser mejorado en al cargar con una menor concentración de proteína para el isoelectroenfoco, y además se sugiere también el uso de tiras con diferente rango de pH, por ejemplo de 4 a 7, para la mejor separación de los “spots” de la parte central. Finalmente, en el gel de las pretinas activas de GM18, también vimos el traslape de varios de los spots, sobre todo a una altura de entre los 25 y 30 kDa, aunque en este caso no se aconsejaría el uso de tiras con diferente rango de pH por el rango más amplio de pI de los spots. Aun así, detectamos varios spots con un perfil factible para considerarse como la forma tóxica de una PS (Fig. 23 B).



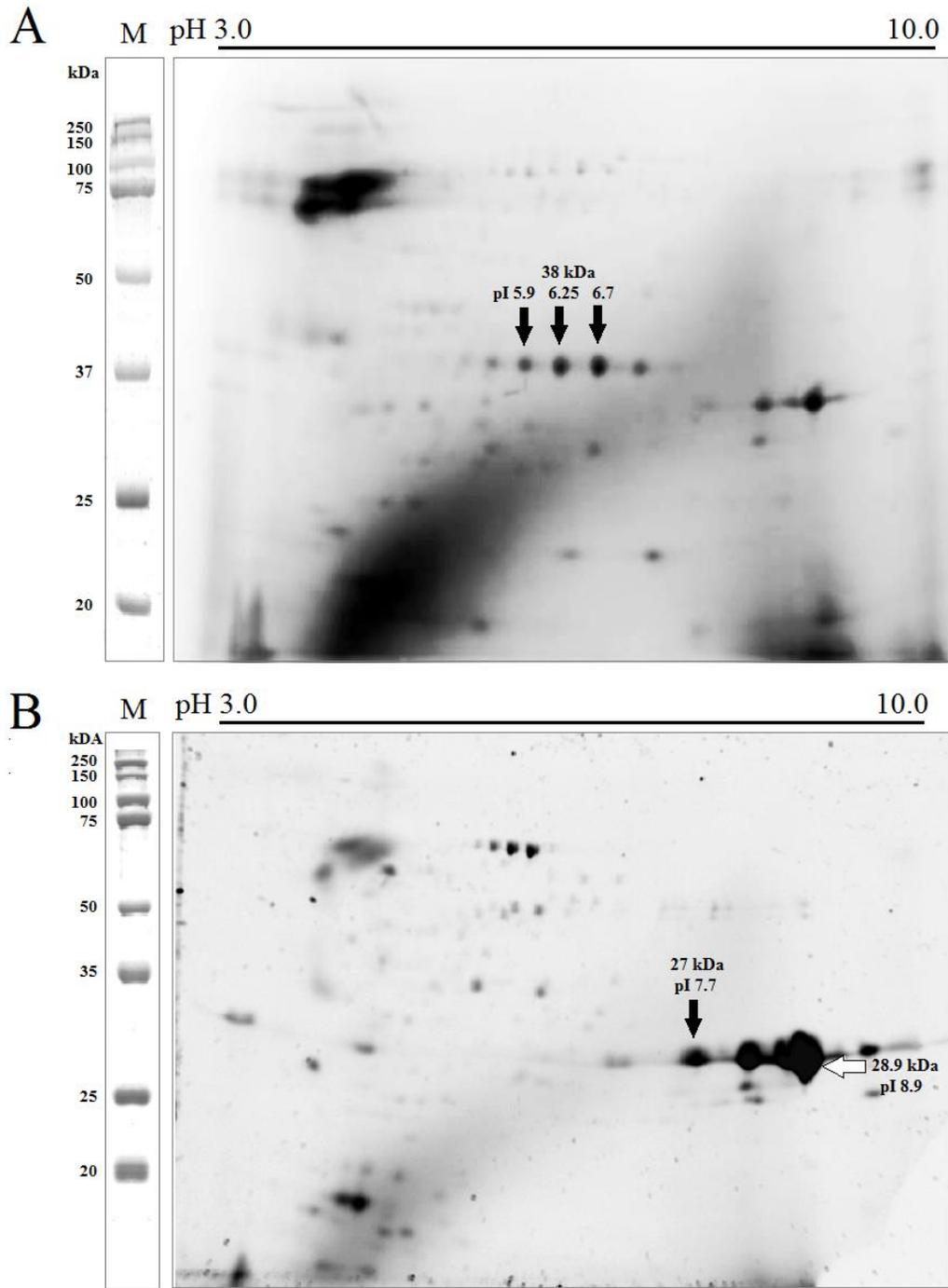
**Figura 20.** Geles de 2D para los cristales de las cepas A1470 e IB79.

A, proteínas activadas de A1470; B, proteínas solubilizadas de IB79, M, marcador de peso molecular. Las flechas negras indican las posibles PS y la blanca la proteinasa K.



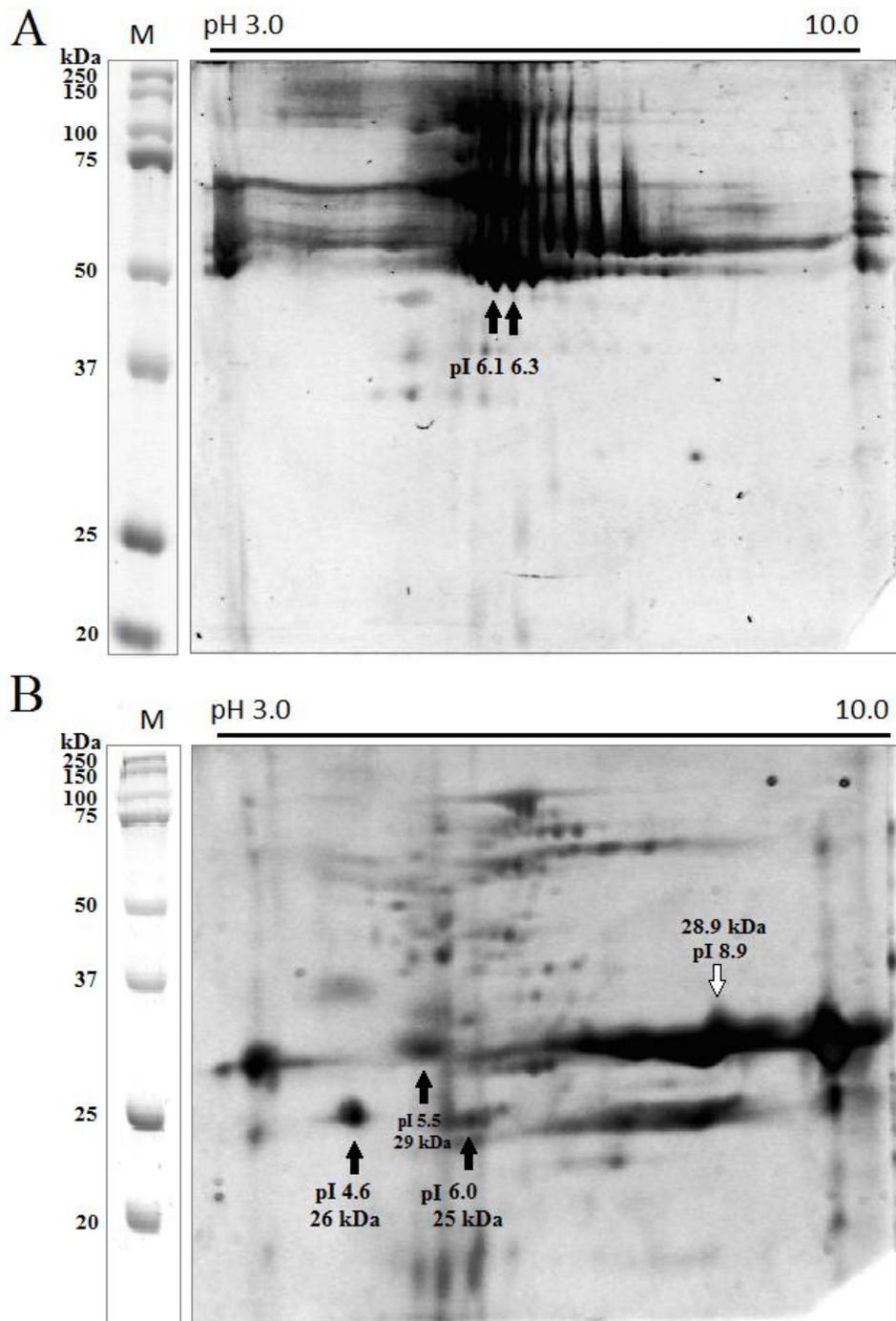
**Figura 21.** Geles de 2D para los cristales de la cepa IB88

A, proteínas solubilizadas; B, proteínas activadas; M, marcador de peso molecular. Las flechas negras indican las posibles PS y la blanca la proteinasa K.



**Figura 22.** Geles de 2D para los cristales de la cepa IB84.

A, proteínas solubilizadas; B, proteínas activadas; M, marcador de peso molecular. Las flechas negras indican las posibles PS y la blanca la proteinasa K.



**Figura 23.** Geles de 2D para los cristales de la cepa GM18.

A, proteínas solubilizadas; B, proteínas activadas; M, marcador de peso molecular. Las flechas negras indican las posibles PS y la blanca la proteinasa K.

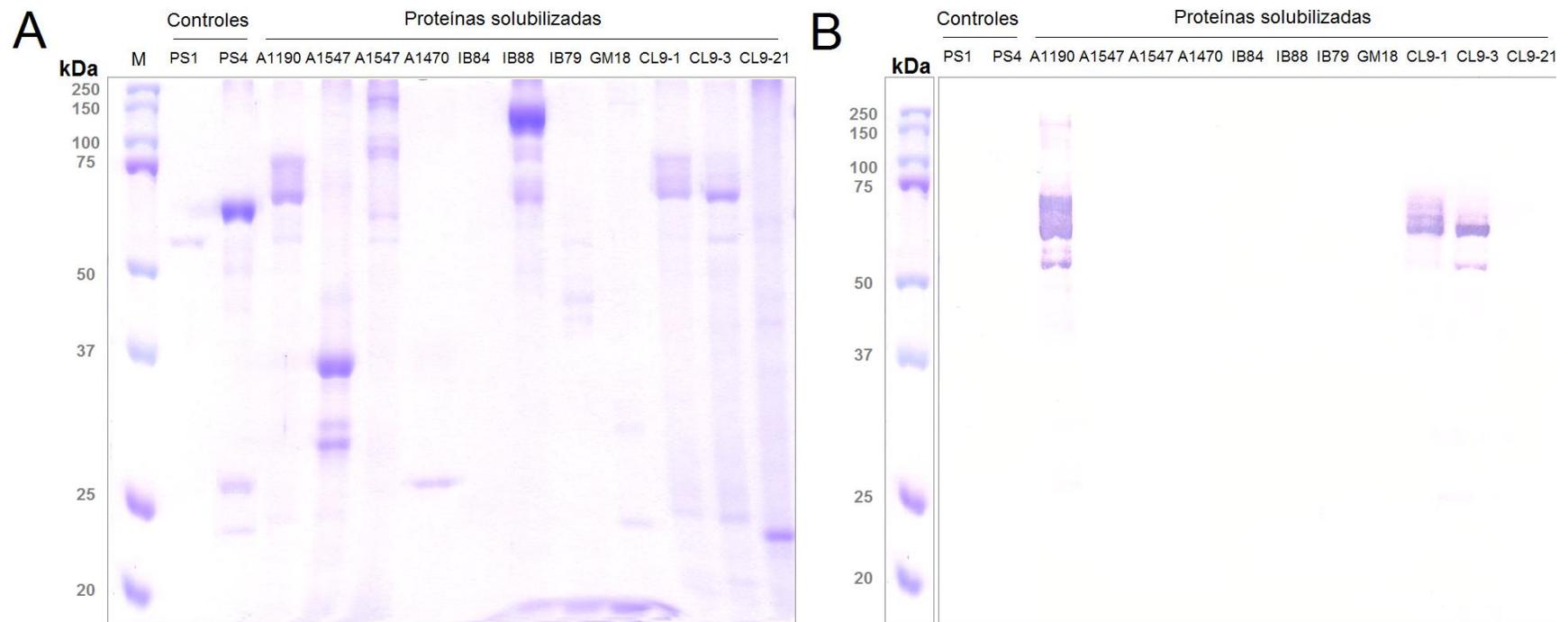
#### **6.4 Inmunodetección de parasporina-1 y parasporina-4**

La inmunodetección con los anticuerpos anti-PS1 fue positiva para los cristales solubilizados y digeridos de las cepas A1190 (control positivo), CL9-1 y CL9-3, con una clara señal de las proteínas con ca. 80kDa en las muestras solubilizadas y de ca. 56 kDa en las digeridas (Fig. 24-25). Las tres cepas fueron positivas por PCR y este resultado confirma que si expresan la PS1. Es importante mencionar que los anticuerpos anti-PS1 fueron levantados sobre las proteínas solubilizadas de la cepa A1190, y por lo tanto, reconocen más de una sola banda, como se demuestra en nuestras cepas y el control positivo.

Además de las tres cepas anteriores, el carril con las proteínas de los cristales digeridos de la cepa IB79, también tuvo una señal positiva. En esta muestra destaca que la banda detectada con los anticuerpos anti-PS1 es muy diferente a la PS1 de referencia, ya que tiene un peso molecular mucho menor, de ca. 26 kDa, en comparación a la banda de 56 kDa de la PS1Aa1. Otro punto a considerar, es que no fue posible la amplificación de ninguna PS por medio PCR, con el ADN de la cepa IB79. Sin embargo, la principal diferencia es que además de señal para PS1, también dio una clara señal positiva para la PS4 (Fig. 25, 27). En ambos casos, la detección se hizo en una banda cercana a los 25kDa, aunque no es posible determinar si se trata de la misma proteína o corresponde a proteínas distintas con pesos moleculares muy cercanos. En dado caso, sería necesario hacer el Western blot a partir de un gel bidimensional para determinar la o las proteínas positivas para cada señal.

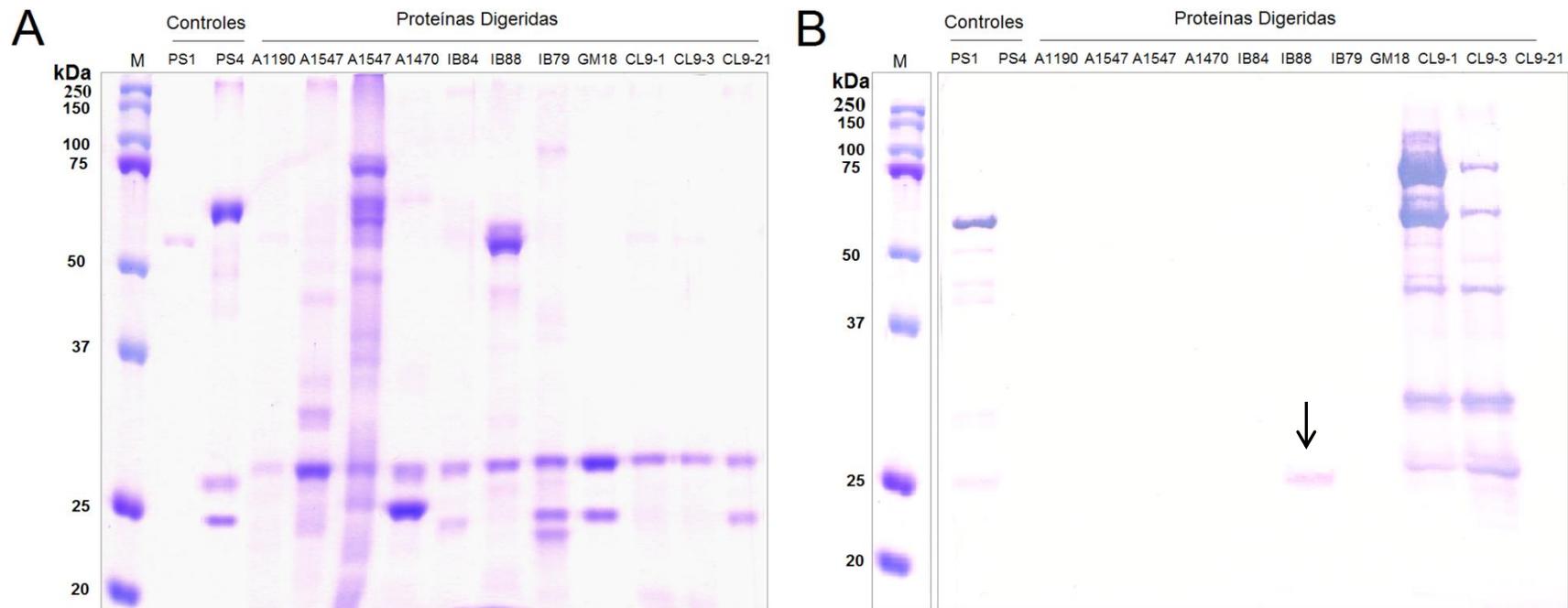
Continuando con la detección de PS4, además de la muestra digerida de IB79, solo obtuvimos señal en control positivo, el cual consistió en los cristales solubilizados y digeridos de la cepa A1470. En estos experimentos, llama la atención que las cepas IB84 y CL9-21, que fueron positivas por PCR para la PS4, no dieron señal en el Western blot. Esto pudiera ser producto de la síntesis de un tipo diferente de PS4, con variantes importantes a la secuencia reportada, lo que daría pie a la presencia de epítopes diferentes a los que son reconocidos por los anticuerpos usados.

Con este experimento se confirma, por una parte la presencia de PS1 en las cepas CL9-1 y CL9-3, y por otra, la presencia de proteínas paraesporales diferentes a la PS1 y PS4 de referencia para el resto de nuestras cepas. Específicamente, el caso de la cepa IB79 fue muy peculiar, ya que en su forma activa indicó epítopes similares a las PS1 y PS4, por lo que sintetiza una PS completamente diferente a las reportadas y posiblemente pudiera clasificarse dentro de un nuevo grupo o familia.



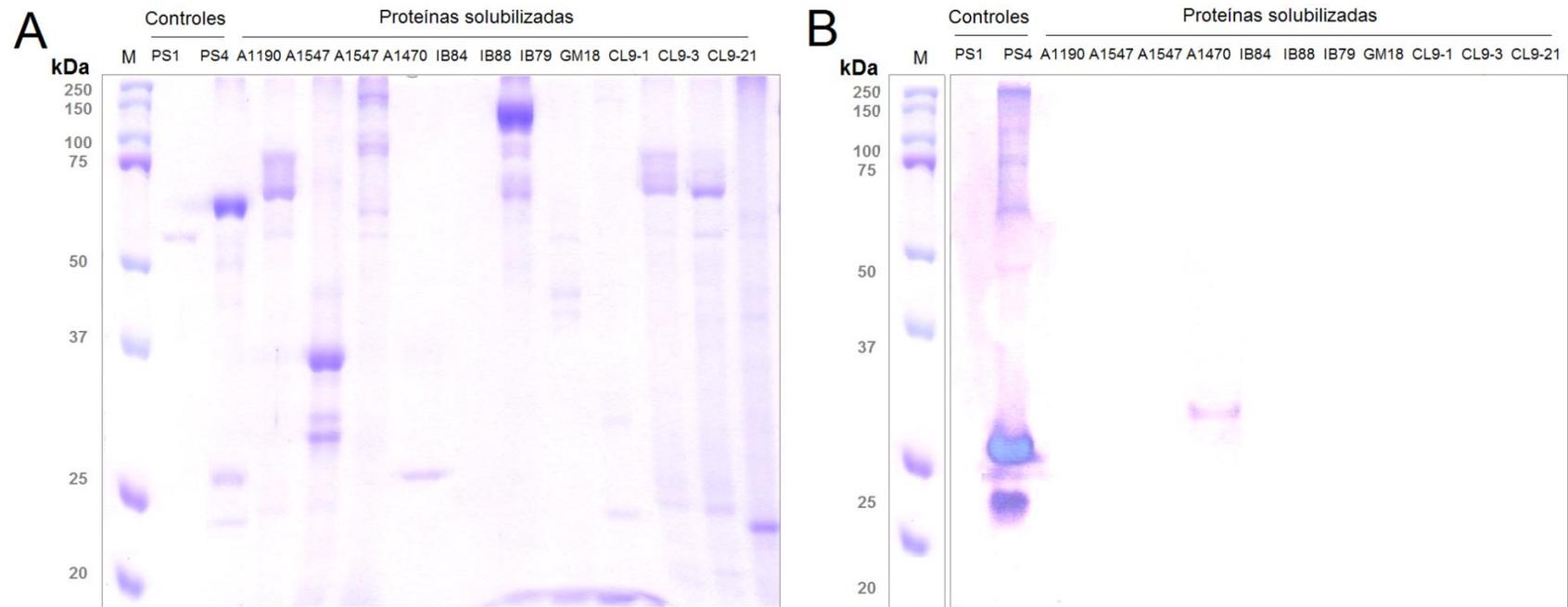
**Figura 24.** Inmunodetección de PS1 para los cristales solubilizados de todas las cepas.

A, gel de poliacrilamida teñido con azul de coomassie; B, membrana de nitrocelulosa incubada con anti-PS1; M, marcador de peso molecular. Los controles positivos consistieron en las PS1Aa1 y PS4Aa1 activadas y purificadas, proporcionadas por Okumura (2014).



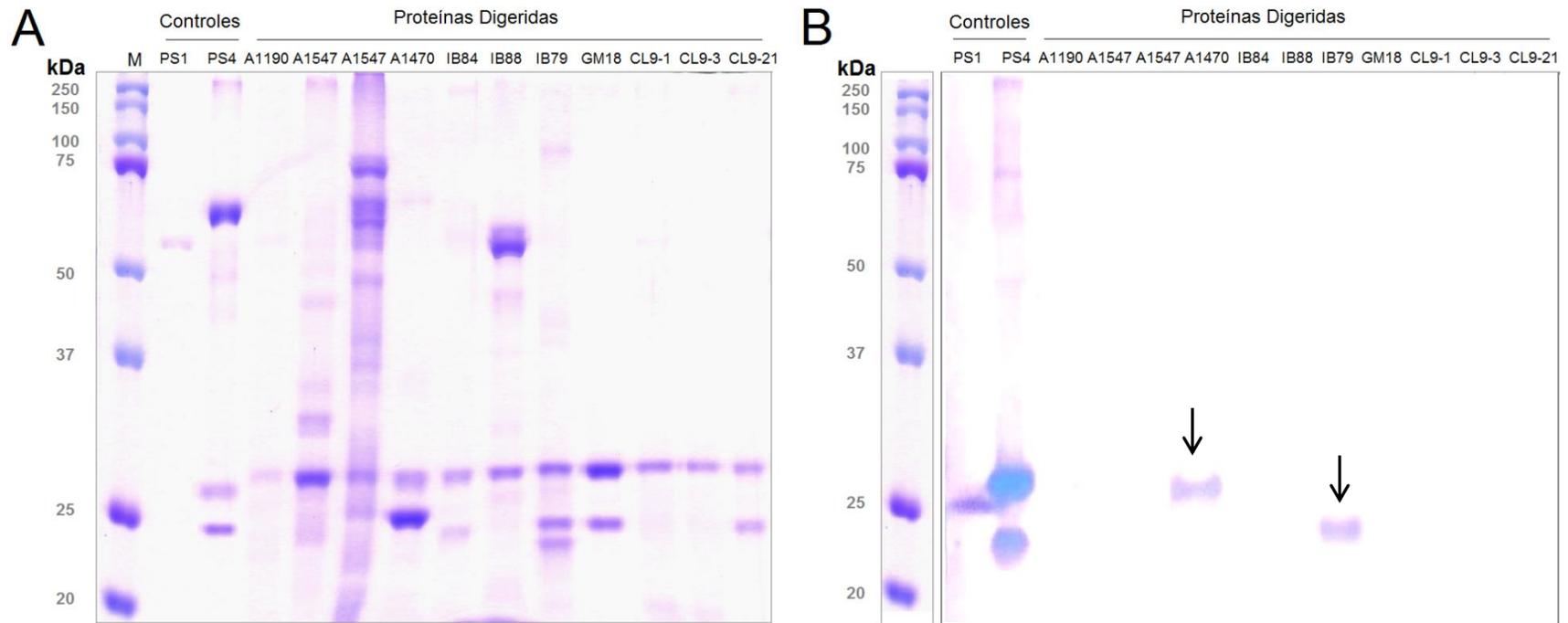
**Figura 25.** Inmunodetección de PS1 para los cristales activados de todas las cepas.

A, gel de poliacrilamida teñido con azul de coomassie; B, membrana de nitrocelulosa incubada con anti-PS1; M, marcador de peso molecular. Los controles positivos consistieron en las PS1 y PS4 activadas y purificadas, proporcionadas por Okumura (2014). La flecha indica la banda más tenue.



**Figura 26.** Inmunodetección de PS4 para los cristales solubilizados de todas las cepas.

A, gel de poliacrilamida teñido con azul de coomassie; B, membrana de nitrocelulosa incubada con anti-PS4; M, marcador de peso molecular. Los controles positivos consistieron en las PS1 y PS4 activadas y purificadas, proporcionadas por Okumura (2014). La fecha indica la banda más tenue.



**Figura 27.** Inmunodetección de PS4 para los cristales activados de todas las cepas.

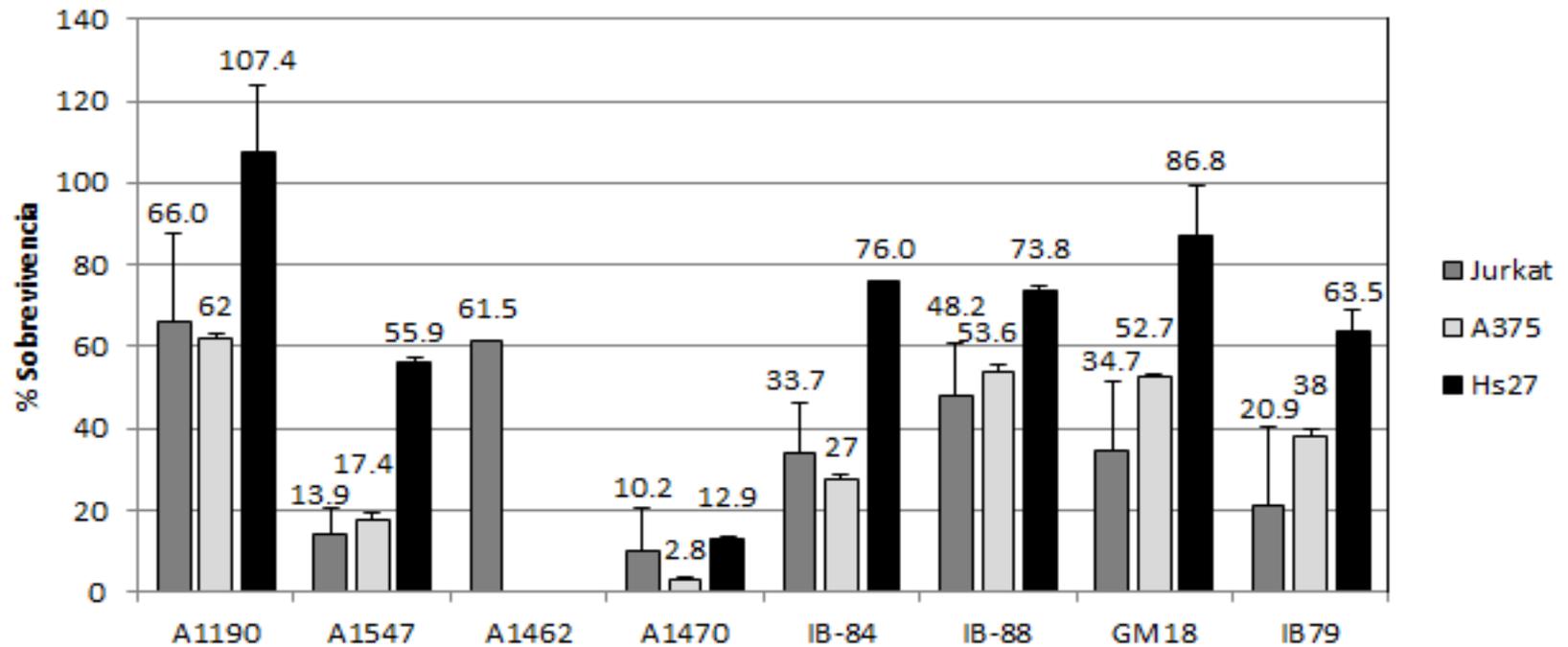
A, gel de poliacrilamida teñido con azul de coomassie; B, membrana de nitrocelulosa incubada con anti-PS4; M, marcador de peso molecular. Los controles positivos consistieron en las PS1 y PS4 activadas y purificadas, proporcionadas por Okumura (2014). La fecha indica las bandas más tenues.

## **6.5 Actividad anticancerígena de los cristales paraesporales**

La actividad biológica fue puesta a prueba mediante ensayos de citotoxicidad contra dos líneas celulares de cáncer murino, cuatro líneas de cáncer humano y una línea normal de piel, también de humano. Ya que el cultivo de las células Jurkat de leucemia y las normales no pudo ser establecido por mucho tiempo, no pudieron ser probados los cristales de las cepas CL9-1, CL9-3 y CL9-21, debido a que fueron incorporadas en etapas avanzadas del estudio. Sin embargo, para el resto de las líneas celulares si fue posible la determinación de la concentración efectiva media ( $CE_{50}$ ) de todos los cristales de las cepas seleccionadas.

### **6.5.1 Ensayos con células normales de piel**

Los primeros ensayos de citotoxicidad consistieron en la actividad anticancerígena específica de los cristales de las cepas seleccionadas. Los extractos activos de las cepas IB84, IB88, IB79 y GM198 fueron probados en ensayos de una sola dosis contra las líneas A375, Jurkat y Hs27 con el kit CellTiter Glo (Promega). Las células leucemia y melanoma maligno fueron susceptibles en mayor o menor medida ante todos los extractos, incluidos los de las cepas de referencia, mientras que las células normales de piel tuvieron un efecto mucho menor. Dada la alta concentración de proteínas paraesporales con la que fueron probadas las células normales, el efecto citotóxico (EC) es considerado como muy bajo o nulo ante todos nuestros extractos. En cuanto a las cepas de referencia, el EC de los cristales de la A1470 fue significativamente más alto, aunque puede ser considerado como poco tóxico (Fig. 28).



**Figura 28.** Ensayos de una sola Dosis en tres líneas celulares.

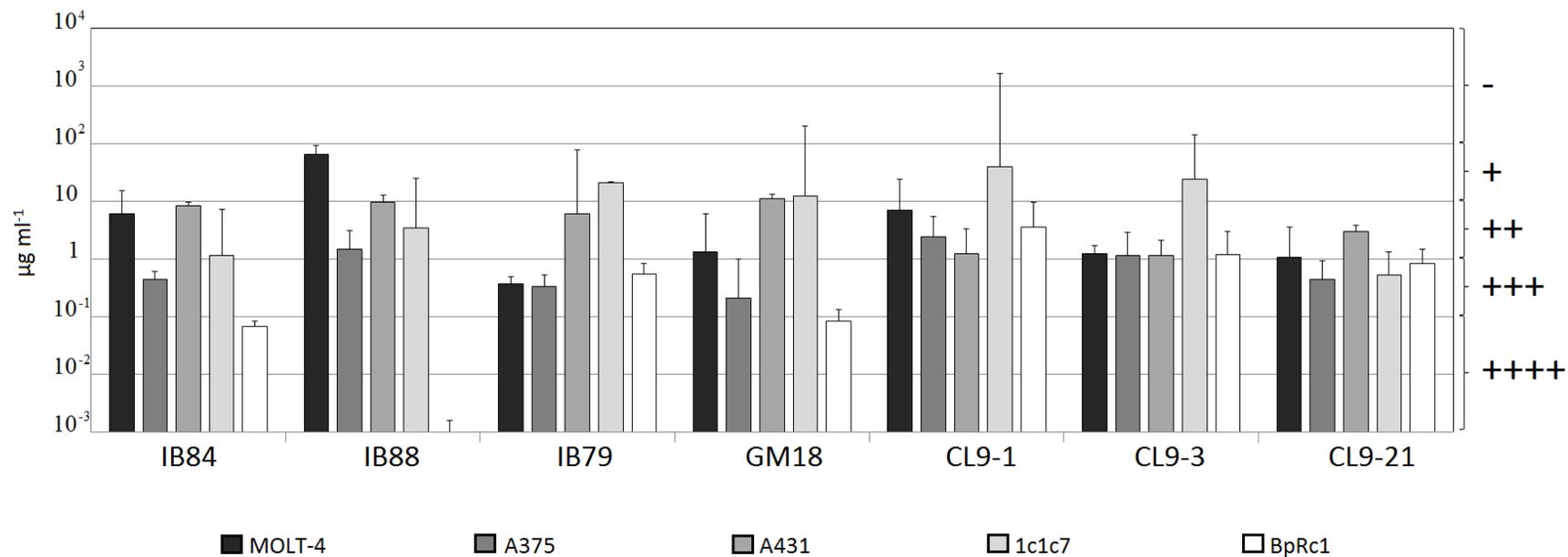
Las líneas Jurkat y A375 fueron expuestas a  $5 \mu\text{g ml}^{-1}$  y la HS27 a  $100 \mu\text{g ml}^{-1}$  de cada extracto. El porcentaje de supervivencia fue estimado en base a la luminiscencia de células sin tratamiento como el 100 %. El valor exacto de supervivencia es dado en la parte superior de las barras.

### 6.5.2 Ensayos contra las líneas de cáncer humano y murino

Los valores de  $CE_{50}$  obtenidos contra las siete líneas celulares se resumen en la tabla X y su interpretación, planteada como efecto citotóxico (EC), es esquematizada en la figura 29, en base la simbología propuesta por Mizuki y *col.* (1999).

El análisis visto del punto de vista de susceptibilidad, demostró que las células normales fueron las menos susceptibles a todos los extractos, mientras que las células cancerosas tuvieron diversos grados de susceptibilidad. La línea más susceptible fue la de hepatoma murino BpRc1, que tuvo de moderada a extrema sensibilidad; seguida de la línea A375 con sensibilidad de moderada a alta hacia los diferentes tratamientos. En otro plano, las líneas MOLT-4 y 1c1c7 tuvieron los efectos más contrastantes; ya que por una parte, tuvieron alta sensibilidad hacia los cristales de las cepas IB79 y CL9-21, pero por otra, fueron poco sensibles contra IB88 y CL9-1, respectivamente.

En cuanto a la perspectiva del EC de los cristales paraesporales, las cepas con un promedio de citotoxicidad más alta fueron la CL9-21 e IB84, con EC de moderados a extremadamente altos. Mientras que las de menor citotoxicidad media fueron las CL9-1 y CL9-3, que presentaron EC moderados o bajos. Incluso el efecto de la cepa CL9-1 contra 1c1c7, tuvo el límite confianza más alto, pudiéndose considerar como no tóxica hacia esta línea celular. La cepa IB88 por su parte, mostró el espectro más contrastante de todos. Mientras que su  $CE_{50}$  hacia la línea MOLT-4 fue de  $66.27 \mu\text{g ml}^{-1}$ , considerado como poco tóxico, contra la BpRc1 fue extremadamente tóxica con una  $CE_{50} \geq 0.001 \mu\text{g ml}^{-1}$ . Finalmente, las cepas IB79 y GM18 también mostraron un rango amplio en sus espectros de citotoxicidad, desde bajo con las líneas 1c1c7 y A431 hasta alto y extremadamente alto contra líneas como A375 y BpRc1 (Fig. 29).



**Figura 29.** Efecto citotóxico de las cepas seleccionadas ante cinco líneas de cáncer.

La altura de las barras indica la  $CE_{50}$  de los cristales, mientras que las barras de error indican los límites de confianza al 95%. El grado del efecto de citotóxico (EC) es dado por los símbolos en el lado derecho.

TABLA X

CE<sub>50</sub><sup>a</sup> de los cristales paraesporales de las cepas seleccionadas contra las siete líneas celulares

Cepas	Hs27	Jurkat	MOLT-4	A375	A431	1c1c7	BpRc1
IB84	> 100	<5	6.058 (1.09-12.72)	0.439 (0.30-0.64)	8.282 (6.88-9.69)	1.133 (0.18-11.04)	0.068 (0.055-0.083)
IB88	> 100	<5	66.279 (47.5-01.7)	1.467 (0.26-3.94)	9.664 (6.72-12.87)	3.416 (1.11-39.36)	<0.001
IB79	> 100	<5	0.367 (0.24-0.49)	0.337 (0.19-0.55)	5.991 (1.03-12.83)	20.720 (19.58-21.8)	0.548 (0.36-0.919)
GM18	> 100	<5	1.309 (8.78-0.21)	0.211 (0.15-1.46)	10.927 (8.84-13.93)	12.30 (3.46-33.82)	0.084 (0.049-0.141)
CL9-1	ND	ND	7.026 (3.65-34.4)	2.456 (0.77-6.68)	1.253 (0.13-4.19)	39.823 (7.34-277.9)	3.621 (0.622-12.49)
CL9-3	ND	ND	1.237 (0.86-1.72)	1.159 (0.22-3.49)	1.155 (0.45-2.26)	24.017 (7.69-225.1)	1.203 (0.206-3.66)
CL9-21	ND	ND	1.055 (0.007-4.7)	0.436 (0.08-1.02)	2.958 (2.06-3.95)	0.527 (0.13-1.702)	0.844 (0.362-1.65)

<sup>a</sup> Concentración efectiva media en  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ; los intervalos de confianza al 95% están dados entre paréntesis. ND: No determinado

## **6.6 Modo de acción de los cristales paraesporales**

Para tener un acercamiento al modo de acción de los cristales de nuestras cepas se hicieron ensayos múltiples en placas de 96 pozos con células MOLT-4. Los tres parámetros medidos fueron: i) viabilidad, dada por la actividad de proteasas intracelulares de células intactas; ii) necrosis, estimada por la actividad de proteasas liberadas por células con membrana plasmática dañada y iii) apoptosis, considerada por la activación de Caspasas 3 y 7. Adicionalmente, se hizo un estudio más profundo del mecanismo de acción de la PS4 producida por la cepa IB84, por medio de tres microarreglos de ADN. En donde se comparó la expresión génica de células MOLT-4 tras ser expuestas a los cristales de IB84 y a los cristales de A1470 como referencia.

### **6.6.1 Ensayo múltiple de modo de acción para todas las cepas**

El mecanismo de muerte celular producido por los cristales de nuestras cepas fue evaluado con el kit ApoTox-Glo™ Triplex Assay (Promega), que en un mismo ensayo determina la cantidad de células viables y que han perdido la integridad de membrana por medio de fluorescencia (URF), y cantidad de células que han entrado en apoptosis por luminiscencia (URL).

#### **6.6.1.1 Viabilidad**

Como se esperaba, la cantidad de células viables disminuyó con la aplicación de los cristales de todas las cepas, a excepción de la CL9-3 que superó la señal de las células sin tratamiento (Fig. 30 A). Este parámetro solo fue considerado para corroborar el efecto de los cristales, así como garantizar los valores de necrosis y apoptosis que son lo que verdaderamente nos dan un indicio del mecanismo de acción.

Curiosamente solo en este punto, las cepas CL9-1 y CL9-3 mostraron diferencias, ya que a lo largo de la caracterización de sus cristales, todos los resultados obtenidos apuntaron a que no existen diferencias significativas entre una y otra y probablemente sean dos clonas de una misma cepa. Es importante señalar, que la desviación mostrada en los cristales de la CL9-3, fue muy alta y este resultado debe ser tomado con cautela.

#### **6.6.1.2 Necrosis**

La señal de células con pérdida de integridad de la membrana plasmática tuvo diferentes intensidades en cada uno de los tratamientos. Por medio de la prueba de Tukey fue posible agrupar en tres grupos o categorías el efecto de los cristales, dependiendo del nivel de significancia con respecto al control (Fig. 30B).

Las cepas GM18 y CL9-1, pertenecientes al primer grupo (a), tuvieron una relación de células necrosadas equivalente a las encontradas sin ningún tratamiento, por lo que se considera que no dañan significativamente la integridad de membrana. En un segundo grupo, encontramos los cristales de las cepas CL9-21 e IB79, con un efecto considerable en la cantidad de células necrosadas que fue significativamente más alta que el control. Pertenecientes a estas dos categorías, se encuentran los cristales de las cepas de referencia que tuvieron un incremento moderado de células lisadas, y los cristales de la cepa CL9-3, cuyos límites de confianza no hicieron posible una diferenciación clara entre un tratamiento u otro.

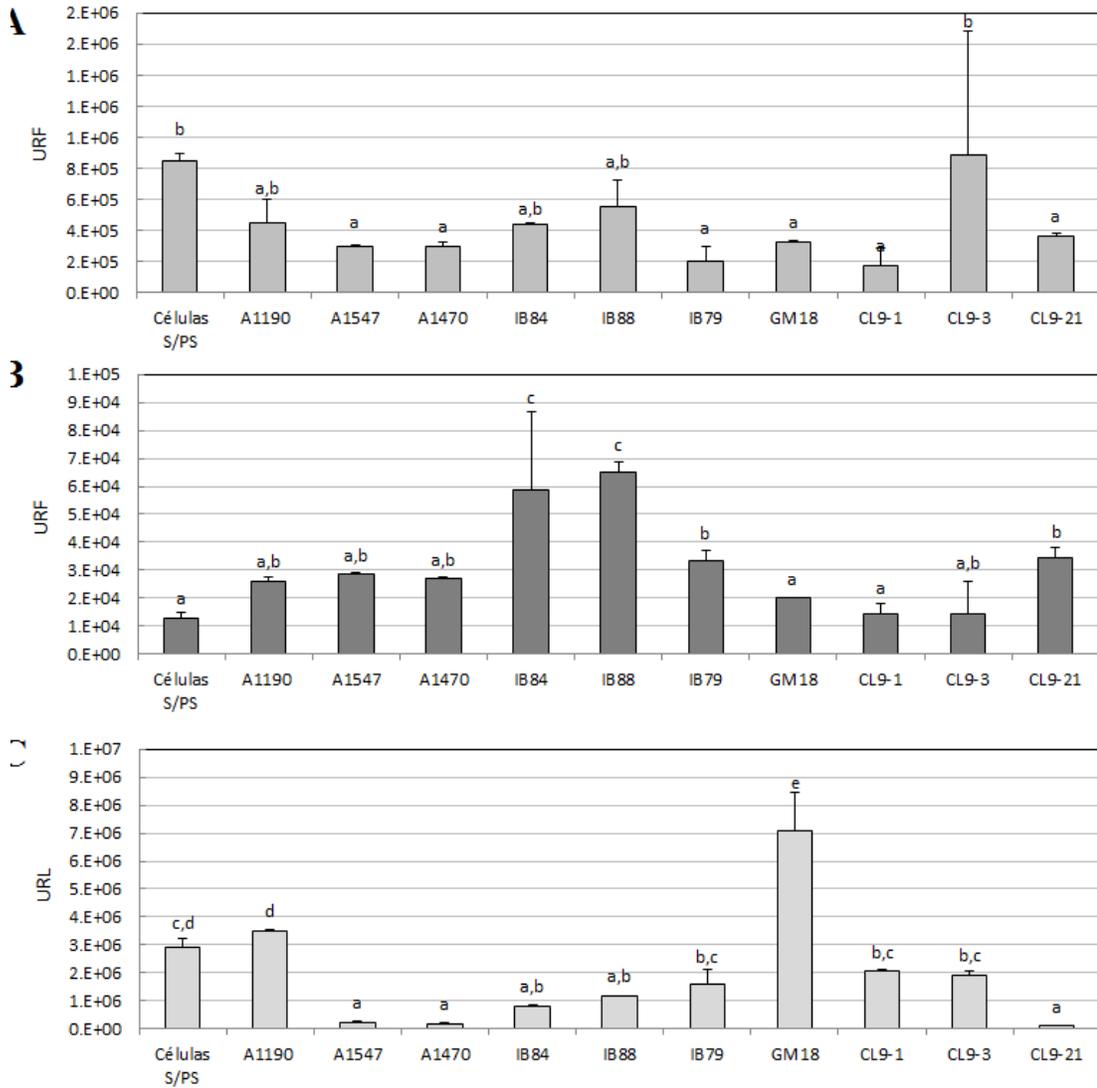
Finalmente, en el tercer nivel (c) se agruparon los cristales con el efecto más drástico en el aumento de células dañadas a nivel de membrana. En este, fueron agrupadas las cepas IB84 e IB88, que a pesar de no tener un impacto tan marcado en la disminución de viabilidad, sí impactaron significativamente la integridad de las células MOLT-4 a un nivel incluso mayor que las cepas de referencia.

### **6.6.1.3 Apoptosis**

Como último punto evaluado fue la actividad de las Caspasa 3/7, como marcador directo de la inducción de una muerte celular programada. En este caso, el efecto de los tratamientos con los cristales de todas las cepas, dio lugar a la diferenciación de cinco grupos, en donde el control de células sin tratamiento tuvo una señal más alta de lo esperada por lo que fue agrupado en dos de los grupos intermedios (Fig. 30 C). Los tratamientos que manifestaron niveles evidentes de activación de caspasas, fueron el a, d y e. En el primero (a), claramente se encontraron los cristales de las cepas A1547, A1470 y CL9-21, que no tuvieron señales considerables de las Caspasas 3/7. Mientras que en el cuarto y último (d, e) se localizaron los tratamientos con los cristales de A1190 y GM18, respectivamente; que fueron los que indujeron una mayor cantidad de células al proceso de apoptosis. Dentro de los grupos intermedios, fueron agrupados el resto de los cristales, cuyas señales fueron iguales o menores a los de las células sin tratamiento.

### **6.6.1.4 Análisis global del ensayo múltiple**

El análisis de los tres parámetros medidos nos da una caracterización consistente para el mecanismo de muerte celular inducida por la mayoría de los cristales. Claramente, el daño provocado por los cristales de las cepas IB84, IB88 y CL9-21 sobre MOLT-4, fue a nivel de membrana, provocando una muerte celular por necrosis. Igualmente para los cristales de la cepa IB79, también se presume el mismo mecanismo de acción aunque con un efecto menos marcado que en las dos cepas anteriores. Contrariamente para la cepa GM18, el mecanismo de acción propuesto para sus cristales es la apoptosis. Mientras que para las cepas CL9-1 y CL9-3, no hubo una tendencia clara en el modo de acción; aunque dada su extraordinaria similitud con la cepa A1190 de referencia, se puede presumir que también inducen una muerte celular programada. Por último, es importante recalcar que este es un primer acercamiento al modo de acción y para tener un dictamen definitivo, es necesario hacer más estudios confirmatorios, sobre todo en las cepas cuyos cristales no tuvieron señales bien definidas.



**Figura 30.** Modo de acción de los cristales paraesporales.

A, viabilidad; B, necrosis; C, apoptosis; URF, unidades relativas de fluorescencia; URL, unidades relativas de luminiscencia. Las letras minúsculas arriba de las barras (a-d), indican los grupos establecidos por un análisis de varianza seguido de una test de Tukey, con un nivel de confianza del 95%.

## **6.6.2 Modo de acción de los cristales de IB84 sobre la línea MOLT-4**

Para los cristales de la cepa IB84 que contiene la PS4, se decidió hacer un análisis más extensivo de su mecanismo de acción por medio de microarreglos, debido a que fue una de las primeras en ser seleccionadas y mostró un importante efecto citotóxico sobre varias de las líneas de cáncer evaluadas. En la primer etapa fueron hechas cinéticas por conteo directo de células para la estimación del tiempo letal medio (TL) y un monitoreo del efecto citotóxico con el kit de ApoTox-Glo™ Triplex Assay (Promega). Posteriormente, fueron realizados tres chips de microarreglos de ADN, para evaluar la expresión de las células MOLT-4 bajo el tratamiento con los cristales paraesporales de la cepa IB84. Finalmente con el análisis de todos estos los resultados, se desarrolló un modelo integral del mecanismo de acción de la PS4.

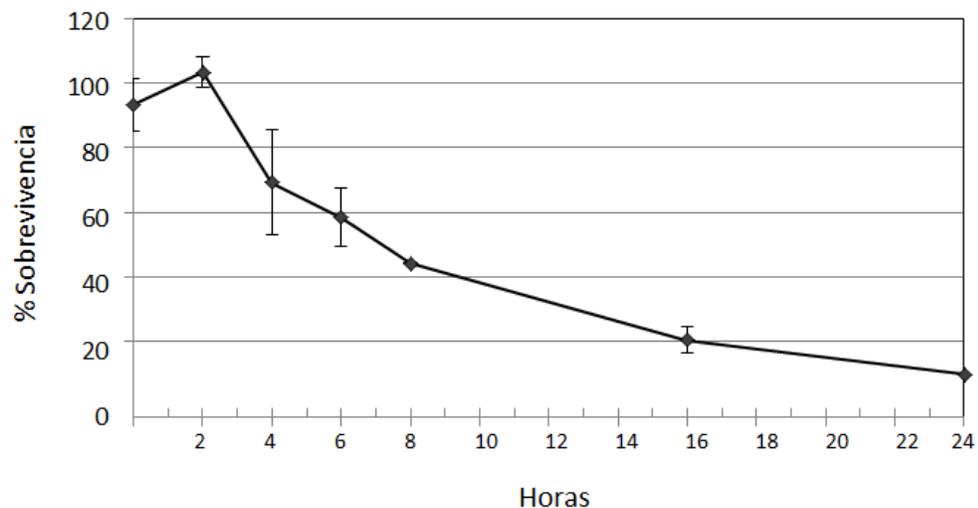
### **6.6.2.1 Cinéticas de citotoxicidad**

El TL<sub>50</sub> de los cristales de la cepa IB84 sobre la línea MOLT-4 fue alrededor de las 6 h. En la figura 31 se muestra la gráfica con los resultados de las cinéticas. Sobre este resultado se decidió que el tiempo de exposición de la PS4 para la extracción de ARN de las células MOLT-4, fuese de 4h (TL<sub>25</sub>) para los microarreglos. En este punto, aunque ya hay un 25% de células muertas, las restantes deberían expresar genes relacionados a la muerte celular o sobrevivencia.

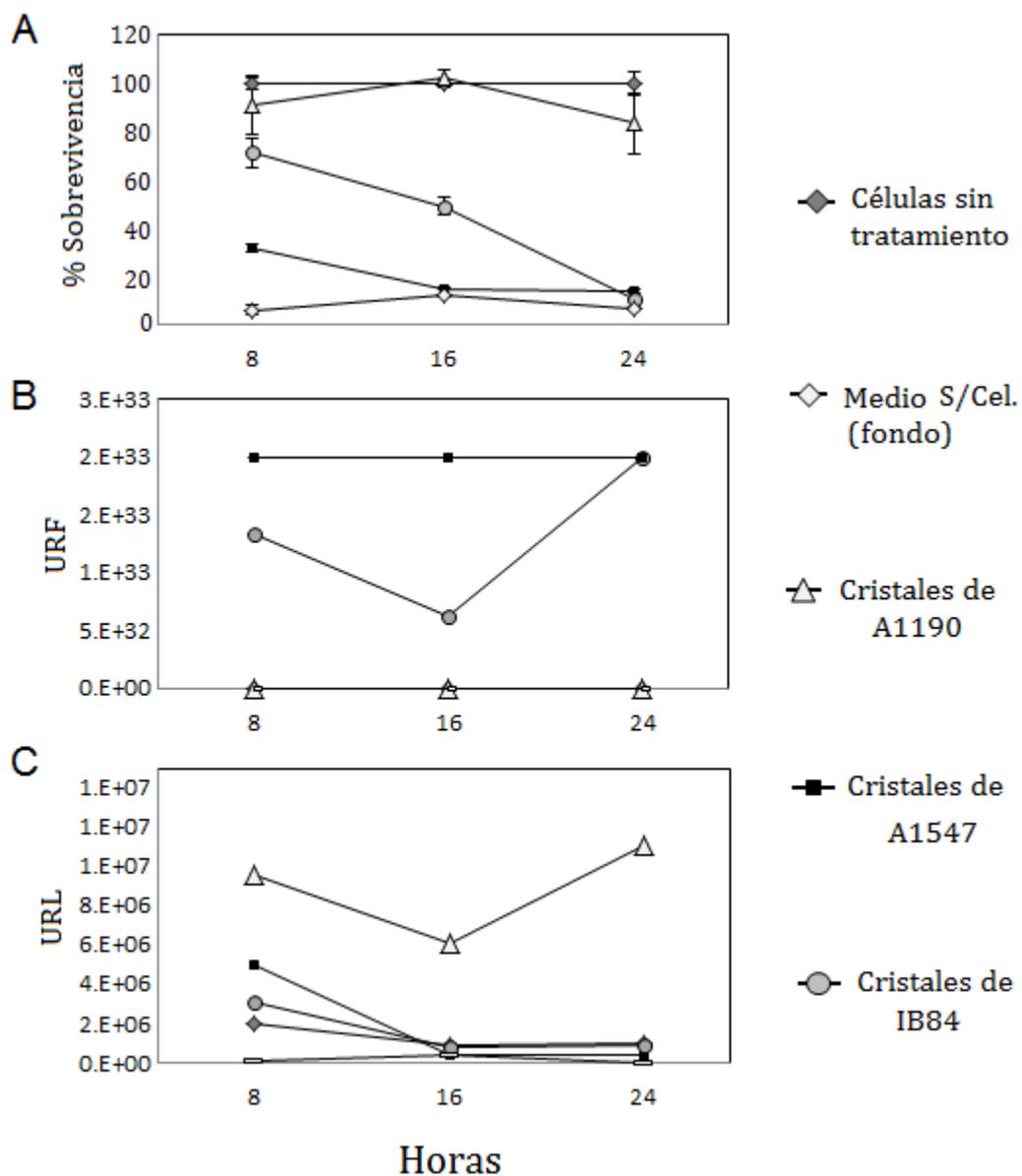
El monitoreo del modo de acción a las 8, 16 y 24 h, coincidió con el comportamiento observado para los cristales de IB84 y mostró una tendencia más clara para los extractos de las cepas de referencia. Además las células sin tratamiento, así como el medio sin células no mostraron niveles señales significativas de necrosis o apoptosis, lo cual valida estas mediciones.

Respecto a la viabilidad de las células MOLT-4 expuestas a los cristales activados de IB84 y A1547, se registró un descenso gradual alcanzando su nivel mínimo a las 24 h en donde disminuyó hasta el nivel del medio sin células (fondo). Para los cristales de la cepa A1190, la disminución de la viabilidad fue muy baja ya que la PS1Aa1 es considerada poco tóxica ante la línea MOLT-4 (Fig. 32A). No obstante, este fue el único tratamiento que tuvo una señal significativa de activación de Caspasas 3/7, lo que demostró que a pesar de su baja actividad, es posible utilizarla como control de positivo de apoptosis con MOLT-4 (Fig. 32C).

En cuanto a la determinación de necrosis, la mayor señal se obtuvo con el tratamiento de A1547 que tuvo los niveles más altos de células con daños a nivel de membrana, seguida por la IB84 que alcanzó esta señal a las 24 h. Los demás tratamientos se mantuvieron en un nivel basal de fluorescencia, indicio de un bajo número de células con pérdida de la integridad de membrana (Fig. 32 B).



**Figura 31.** Cinética de los tiempos letales para los cristales paraesporales de IB84.



**Figura 32.** Cinética del modo de acción de los cristales de la cepa IB84.

El porcentaje de sobrevivencia fue estimado en base a la señal de fluorescencia de las células no tratadas; URF, unidades relativas de fluorescencia; URL, unidades relativas de luminiscencia.

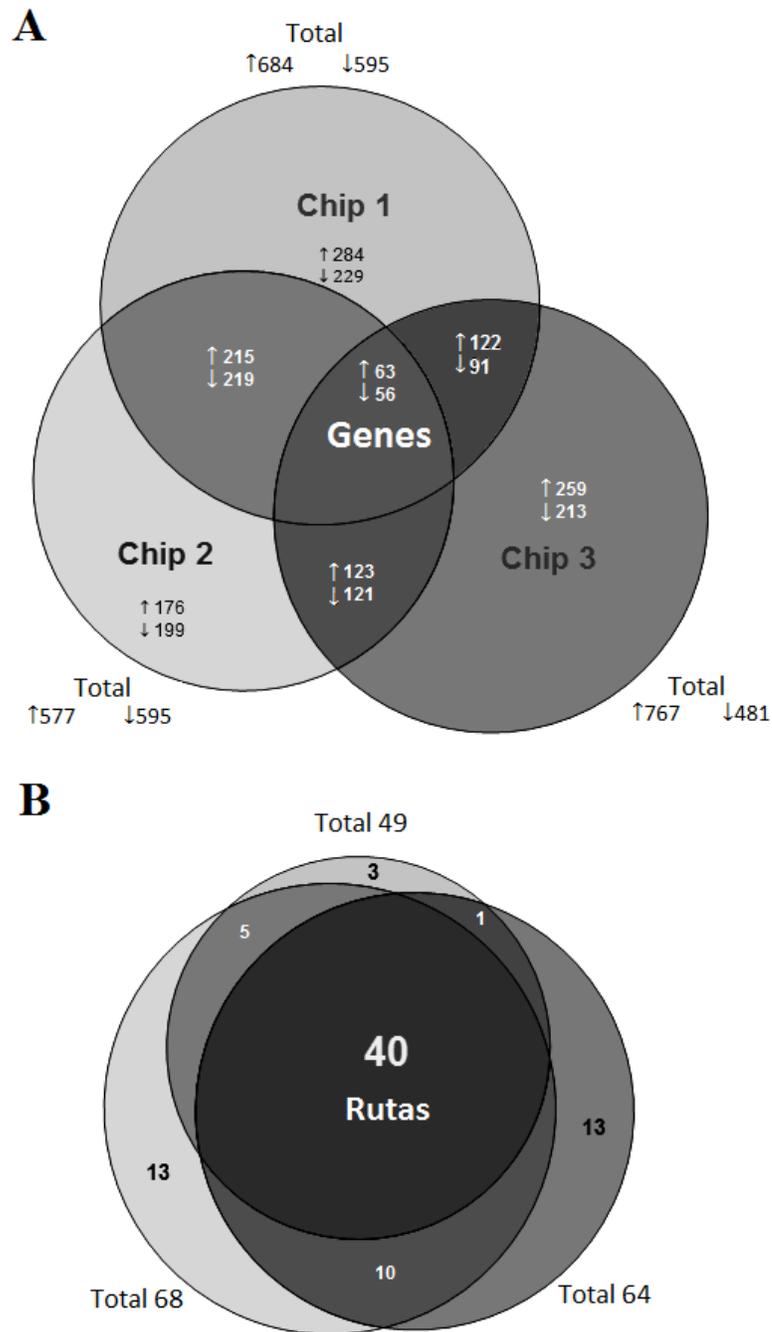
### **6.6.2.2 Microarreglos de ADN**

Para el análisis del transcriptoma de las células MOLT-4 expuestas a la PS4, se planteó la realización de tres chips de microarreglos. En el primer chip fue comparado el efecto de células tratadas con los cristales activos de la IB84 contra células MOLT-4 sin tratamiento. El segundo igualmente consistió en el efecto de los cristales de la cepa de referencia A1470 contra células sin tratar y en el tercer chip, se comparó la expresión génica de las células tratadas con los cristales de IB84 y A1470.

#### **6.6.2.2.1 Análisis comparativo de los tres chips**

Un primer análisis de los transcritos sobre expresados y reprimidos a un Zscore de  $\geq 2.0$  ( $P < 0.05$ ), reveló que alrededor del 20% de los genes regulados fueron los mismos en los tres chips de microarreglos. Sin embargo, la mayor similitud entre los tres experimentos fue observada a nivel de rutas, en donde del total de rutas encontradas, cerca del 70% fueron las mismas en los tres chips (Fig. 33). Tanto el porcentaje de transcritos como el de rutas compartidas es considerado alto, tomando en cuenta la gran cantidad de variables a las que son enfrentados los microarreglos, desde la eficiencia de la extracción y purificación de los ARNs, hasta el correcto marcaje e hibridación en los chips.

En este punto con los datos del ensayo múltiple, la alta similitud de los microarreglos y la información de la literatura, es posible deducir que el mecanismo de acción de los cristales de la cepa A1470 y los de la IB84 es el mismo, lo cual indica que de manera general, estas toxinas interactúan específicamente con receptores en la superficie de las células blanco y dañan irreparablemente la membrana plasmática, provocando la lisis celular.



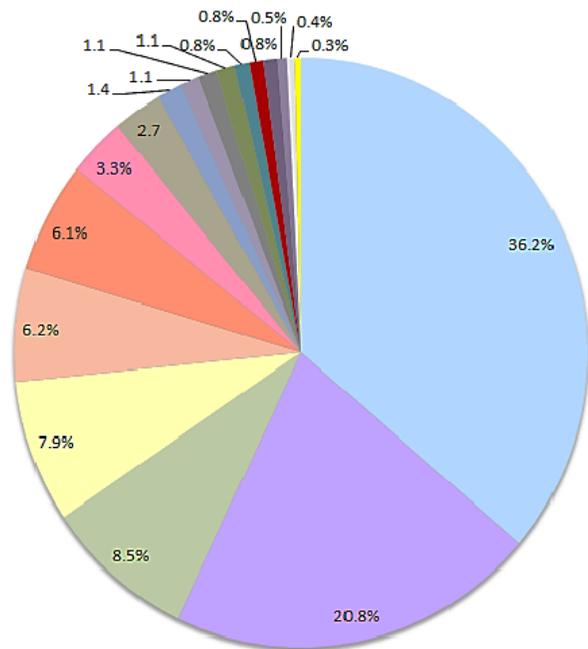
**Figura 33.** Diagramas de conjuntos para los genes y rutas encontrados en los tres chips.

A, diagrama para los transcritos con Zscore 1.5; B, diagrama para todas las rutas encontradas; ↑, transcritos con regulación positiva; ↓, transcritos con regulación negativa; chip 1, efecto de la PS4 de la cepa IB84; chip 2, efecto de las PS de A1470; chip 3, efecto de las PS de la cepa A1470 contra la IB84.

#### **6.6.2.2.2 Ontología de los genes anotados para el primer chip**

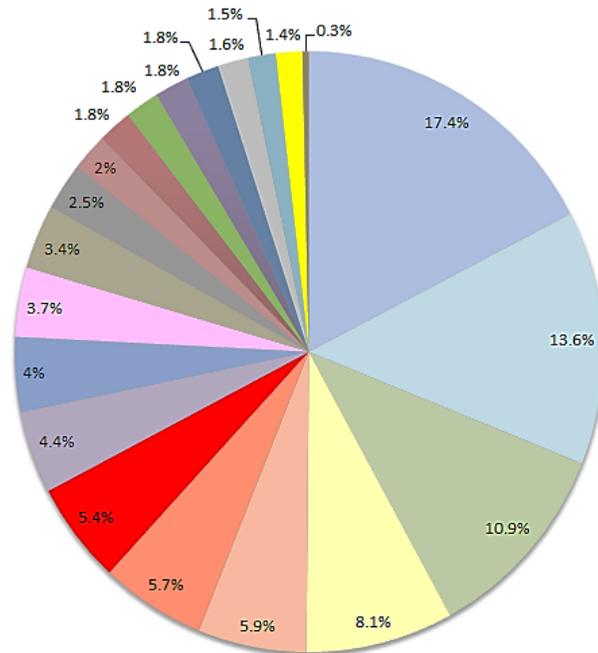
De acuerdo a la ontología de genes para componentes celulares, que nos indica la localización en la célula de sus productos, la PS4 impactó principalmente en los componentes del citoplasma y núcleo. Para la ontología de funciones moleculares, los genes mayormente activados participaron dentro de la categoría de “unión de iones metálicos de transición”, la cual estuvo comprendida predominantemente por factores de transcripción pertenecientes a la familia de dedos de zinc. En una segunda posición, un número importante de genes fueron clasificados dentro de “unión de adenil ribonucleótidos”, que incluyó a miembros proteínas trans membranales de transporte dependientes de ATP y numerosas proteínas quinasas. Mientras que en la ontología de procesos biológicos, las categorías principales fueron vías de señalización intracelular, procesos metabólicos de ARN, transporte, transporte de proteínas y procesamiento de ARN. Así mismo, con un porcentaje menor, fueron clasificadas otras categorías de gran importancia para nuestro estudio como la regulación negativa de la proliferación celular, ensamblaje y des ensamblaje de la cromatina o procesos de inflamación (Fig. 34).

Como descripción general, el análisis ontológico reveló que las células expuestas a la PS4 tienen ajustes metabólicos significativos que impactan principalmente en el procesamiento y regulación de la información génica, la cual a su vez es consecuencia de la activación de numerosas vías de señalización intracelular. Estos reajustes metabólicos y procesos biológicos implicados tienen que ser el resultado de un estrés celular importante.



## Funciones Moleculares

- Unión de iones metálicos de transición
- Unión de ribonucleótidos
- Actividad proteínasa
- Transporte transmembranal de cationes
- Actividad de canal sustrato-específico
- Actividad de canal de iones
- Actividad de coactivador de la transcripción
- Actividad transportadora transmembranal de aniones
- Unión a receptor nuclear
- Actividad de receptor scavenger
- Unión a filamentos de actina
- Actividad exonucleasa
- Actividad carbohidrato quinasa
- Actividad de proteína integral de membrana
- Proteínas activadoras de la actividad GTPasa
- Unión de colesterol
- Actividad lisofosfolipasa
- Unión de glucosa



## Procesos Biológicos

- Cascadas de señalización intracelular
- Procesos metabólicos de RNA
- Transporte de proteínas
- Procesamiento de RNA
- Proliferación negativa de proliferación celular
- Transporte intracelular de proteínas
- Traducción
- Splicing
- Regulación de traducción de señal GTPasa
- Procesos metabólicos de RNA no codificante
- Hipótesis de la señal
- Ensamblaje y desensamblaje de cromatina
- Elongación traduccional
- Ensamblaje del nucleosoma
- Ensamble de complejos DNA-proteínas
- Organización del nucleosoma
- Respuesta inflamatoria aguda
- Vías de señalización mediadas por receptores
- Procesos metabólicos de fosfoinositol
- Procesos biosintéticos de coenzimas
- Regulación de la terminación traduccional

**Figura 34.** Ontología génica del primer chip de microarreglos.

### 6.6.2.2.3 Principales rutas implicadas en la respuesta a la PS4

En total 19 rutas fueron encontradas, en su mayoría pertenecientes a la categoría de procesamiento de la información ambiental y procesamiento de la información genética. Principalmente, estas rutas están relacionadas directamente a la respuesta por estímulos en la superficie celular. De manera general, las principales rutas activadas en este punto de la exposición a la PS4, tienen que ver con una serie de cascadas intracelulares en donde la vía de señalización de Proteína Quinasa Activadas por Mitógeno (MAPK) y señalización por calcio tienen un papel central, además de varias vías que presuponen una respuesta al estrés celular, como la respuesta a hipoxia, endocitosis y proteólisis mediada por ubiquitina, que puede ser parte del sistema de respuesta a proteínas desplegadas (UPR). De igual forma, resaltaron las dos rutas metabólicas que corresponden al metabolismo de taurina y de vitamina B6, ya que se sabe que la taurina es un aminoácido no esencial que tiene actividades osmo-reguladoras y de estabilización de membrana cuya síntesis depende de la presencia de vitamina B6 (Bouckenooghe *et al.*, 2006; Huxtable, 1992). Además, recientemente se ha descrito su función protectora *in vitro* ante el incremento de  $Ca^{2+}$  intracelular en neuronas (Wu *et al.*, 2005).

Contrariamente a todas las rutas anteriormente descritas, solo las vías de señalización de receptores de células T y receptores tipo NOD, implicadas en la respuesta inmune, sufrieron regulación negativa. Interesantemente, este efecto ya ha sido descrito para la listeriolisina O (LLO), que logra mitigar la activación de linfocitos T tanto *in vitro* como *in vivo*, en un sistema calcio dependiente (Gekara *et al.*, 2010; 2008). Por otra parte, la aparición las rutas de apoptosis y p53, que a primera vista pudiera indicar una muerte celular programada, pudieran estar relacionadas con el arresto del ciclo celular, el cual se refleja en la regulación negativa de la activación de las células T y de manera más general al regulación negativa de la proliferación celular vista a nivel de ontología de procesos biológicos.

Además, es importante mencionar que el mecanismo de muerte por apoptosis es descartado por que los genes implicados prácticamente son los mismos que participan en otras vías, como la señalización como la del calcio o de proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK), cuyo valor de  $P$  es mucho menor ya que tienen un mayor número de genes regulados. Por otra parte, la vía de la p53 está alterada en las células MOLT-4 por una mutación que es lo que las hace inmortales.

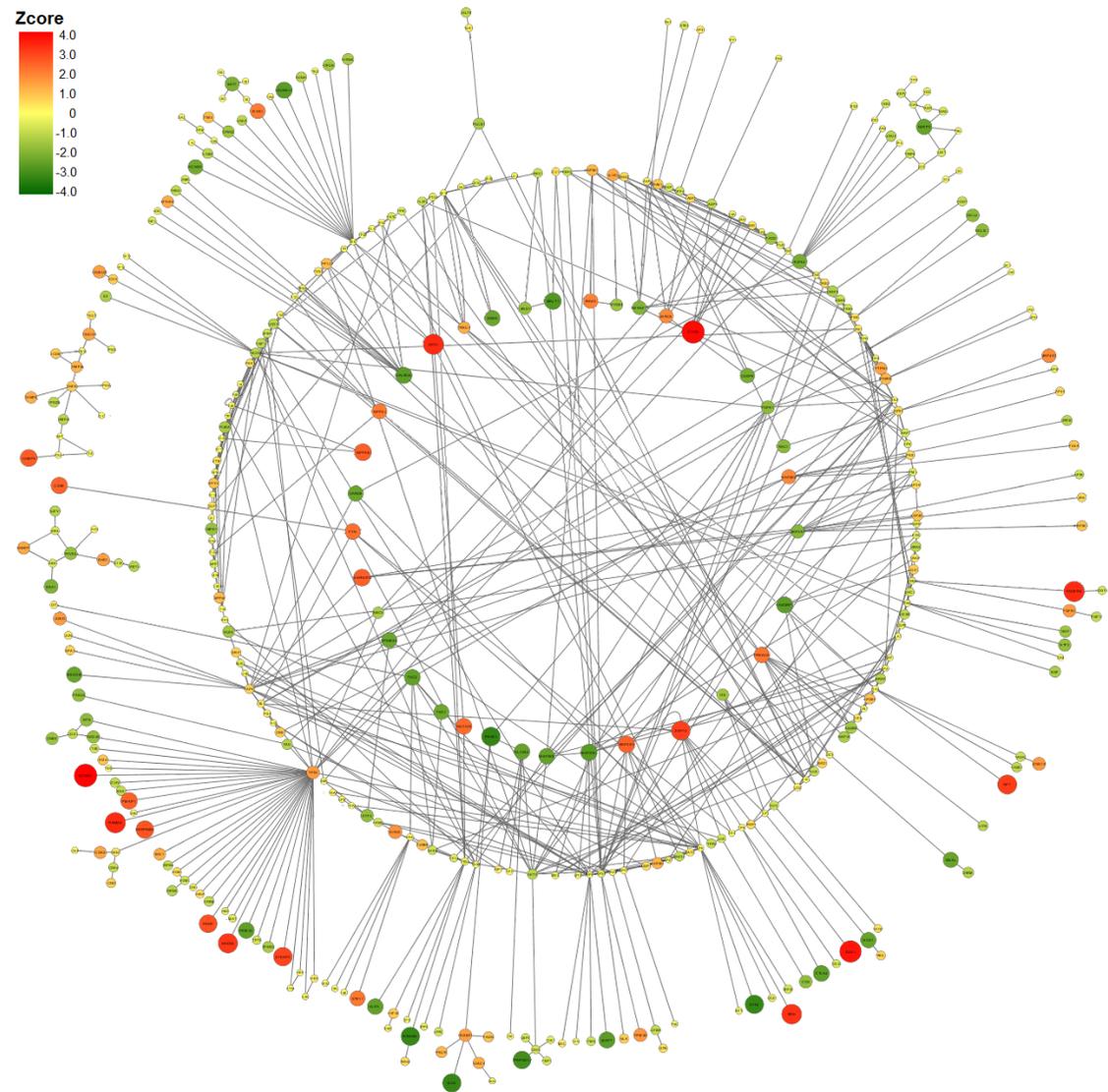
Todas estas vías ratifican el estrés al que están sometidas las células en presencia de PS4. Incluso varias de ellas han sido reportadas en la literatura como rutas maestras de respuesta a TFP (Bellier *et al.*, 2009; Bischof *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2010; Kao *et al.*, 2011). En conjunto, los procesos biológicos implicados denotan la activación de segundos mensajeros mediante los estímulos de membrana ocasionados por la PS4, que a su vez impactan en un incremento del procesamiento de la información genética para producir los ajustes necesarios para la sobrevivencia celular.

El siguiente paso, una vez establecidas las principales rutas en la respuesta celular a la PS4, fue el análisis y la selección de genes implicados en cada una de ellas. En la figura 30, se esquematizan las interacciones de varios genes anotados para las rutas principales. Derivado de este análisis, fueron seleccionados algunos genes con un efecto importante en su expresión, para su validación por qPCR (Fig. 35, Tabla XII).

TABLA XI

Rutas implicadas en el modo de acción de la PS4 de la cepa IB84

Categoría Ruta	Genes	<i>P</i>
<b>PROCESAMIENTO DE LA INFORMACIÓN AMBIENTAL</b>		
Traducción de señales		
Vía de señalización MAPK	45	0.0052
Vía de señalización por calcio	32	0.0069
Vía de señalización de insulina	29	0.00086
Vía de señalización de proteínas G heterotriméricas	28	0.043
Sistema de señalización por fosfoinositol	21	0.00013
Vía de señalización Mtor	14	0.004
Respuesta a hipoxia	9	0.036
<b>PROCESAMIENTO DE LA INFORMACIÓN GÉNICA</b>		
Transcripción		
Espliceosoma	26	0.003
Traducción		
Ribosoma	25	0.000019
Biosíntesis de Aminoacil-ARNt	11	0.013
Plegamiento, clasificación y degradación		
Proteólisis mediada por ubiquitina	22	0.085
Interacciones de SNARE en transporte vesicular	9	0.057
<b>PROCESOS CELULARES</b>		
Transporte y catabolismo		
Endocitosis	33	0.0074
Crecimiento y muerte celular		
Apoptosis	17	0.031
Vía de señalización de la p53	14	0.037
<b>SISTEMAS</b>		
Sistema inmune		
Vía de señalización de receptores de células T	19	0.055
Vía de señalización de receptores tipo NOD	12	0.083
<b>METABOLISMO</b>		
Metabolismo de aminoácidos		
Metabolismo de taurina	5	0.019
Metabolismo de vitaminas y cofactores		
Metabolismo de Vitamina B6	4	0.022



**Figura 35.** Interacciones de los genes implicados en las principales vías encontradas.

Los genes son representados por círculos y su interacción es esquematizada por líneas. El tamaño y color de los círculos indica el cambio en la expresión dado por los valores de Zscore de los microarreglos.

### 6.6.2.3 Validación por PCR cuantitativa

En base a los datos obtenidos por microarreglos, fueron seleccionados 12 genes implicados en las principales rutas, además de dos genes constitutivos, para el análisis de la expresión génica relativa por qPCR (Tabla XI). La validación consistió en el análisis de la expresión de estos genes en las células MOLT-4 expuestas a los cristales de IB84 por 4 h y adicionalmente, fueron incluidos tratamientos con los cristales de las cepas de referencia A1470 y A1190, para determinar el impacto global de las PS necróticas y apoptóticas.

En términos generales, el tratamiento con los cristales de IB84 tuvo el mismo efecto sobre la expresión de los genes por qPCR y microarreglos. Los genes de CACN, TNFR, IP3R, PDGF, IL12 y GADD sufrieron sobreexpresión con respecto al control, mientras que los de PDGFR, IL29, PI3K, PP3 y PKC se mantuvieron reprimidos (Fig. 36). Estos resultados favorecen la validación y sustenta en cierta medida la deducción del significado biológico de la actividad de la PS4 por microarreglos. No obstante, la excepción fue la expresión del factor de transcripción ATF6, que por microarreglos se encontró sobre expresado y por qPCR mostró valores de expresión negativos, respecto al control. Cabe señalar, que los resultados contradictorios en la validación suelen ser relativamente frecuentes, debido a la gran cantidad de variables en este tipo de experimentos y a los cambios constantes en los niveles de expresión génica (Jorge Ramírez, información personal).

Con respecto a los valores obtenidos con los tratamientos de las PS de referencia, también se encontraron diferencias con respecto al tratamiento de IB84 y al control. Para la cepa A1470, no hubo diferencias significativas en la expresión de los genes PDGFR, PKC y PP3, con respecto al control. Además, fue el único tratamiento en donde fue cuantificable la expresión del gen PDGF, donde se esperaba represión. Sin embargo, para el resto de los genes, la expresión positiva o negativa coincidió a la inducida por los cristales de IB84. Las diferencias entre ambos tratamientos se pueden atribuir principalmente a los tiempos letales diferentes para cada PS.

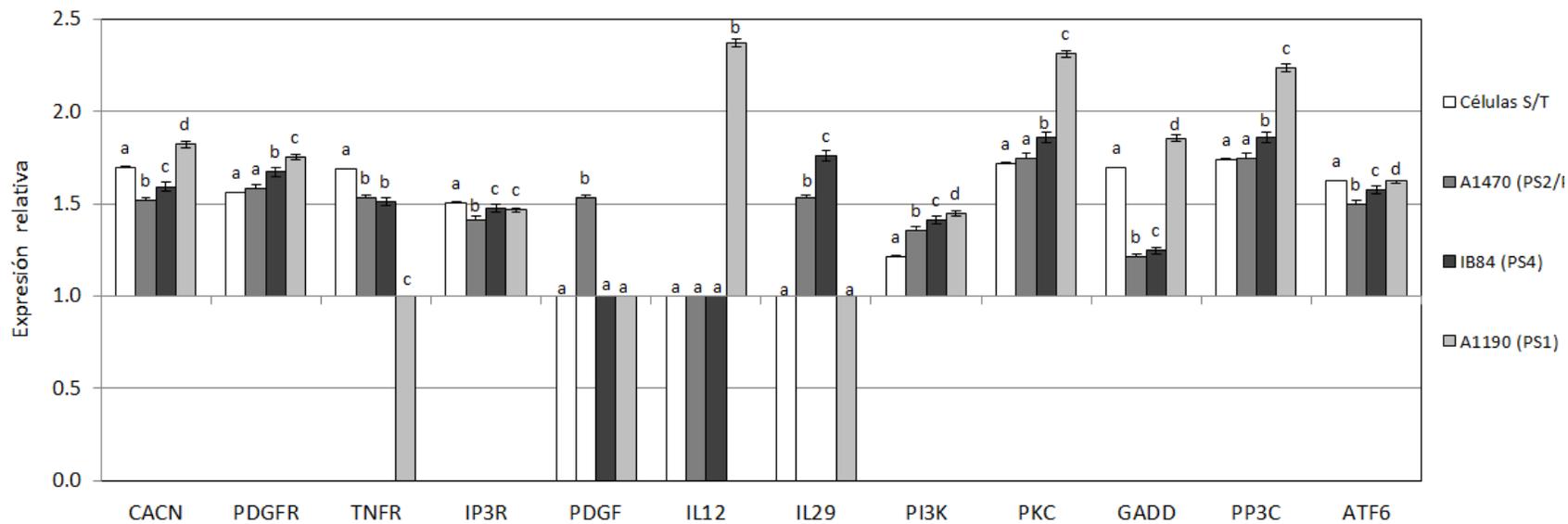
En cuanto al tratamiento con los cristales de la cepa A1190, las principales diferencias fueron monitoreadas con la expresión de los genes CACN, IL12, IL29 y GADD, que tuvieron un efecto contrario al de los tratamientos con A1470 e IB84. Estos genes, aparentemente son los mejores en la distinción del modo de acción entre PS necróticas y apoptóticas, por lo que tienen un buen potencial como marcadores genéticos. No obstante, es necesario un estudio más extensivo, para poder validar su utilidad como marcadores robustos de la respuesta celular a las PS.

TABLA XII

Genes seleccionados para validación de microarreglos

Categoría/Nombre	Descripción	Vía o proceso biológico	Expresión <sup>a</sup>	
			Chip	qPCR
<b>Receptores y Moléculas de Membrana</b>				
CACN	Canal de calcio, subunidad 1 <sup>a</sup>	MAPK, Señalización Ca <sup>2+</sup>	↓	↓
PDGFR	Receptor de PDGF	MAPK, Señalización Ca <sup>2+</sup> y endocitosis	↑	↑
TNFR	Receptor de TNF	MAPK, apoptosis, citoquinas	↓	↓
IP3R	Receptor inositol 1,4,5-trifosfato	Señalización Ca <sup>2+</sup> y fosfoinositol	↓	↓
<b>Ligandos y Citoquinas</b>				
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas	MAPK, citoquinas	↓	↓
IL12	Interleucina 12β	Citoquinas, defensa contra virus y bacterias	↓	↓
IL29	Interleucina 29	Citoquinas, defensa contra virus y bacterias	↑	↑
<b>Señalización intracelular</b>				
PI3K	Fosfoinositol 3-quinasa	Activación células T, apoptosis, señalización por fosfoinositol e insulina	↑	↑
PKC	Proteína quinasa C	MAPK, Señalización por Ca <sup>2+</sup> y fosfoinositol	↑	↑
GADD45	Arresto del crecimiento y daño de ADN	MAPK, p53	↓	↓
PP3	Fosfoproteína fosfatasa 3 (2B)	MAPK, Señalización Ca <sup>2+</sup> , activación células T y apoptosis	↑	↑
ATF6	Factor de transcripción activador 6	Respuesta a proteínas desplegadas	↑	↓
<b>Genes constitutivos</b>				
GADPH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	Metabolismo de carbohidratos	ns	ns
B2M	Beta 2 microglobulina	Presentación de antígenos	ns	ns

<sup>a</sup> Expresión con tratamiento de PS4 de IB84 con respecto al control; ↑, sobreexpresión, ↓, represión, ns: cambios no significativos en la expresión.



**Figura 36.** Expresión génica relativa de los genes seleccionados para qPCR.

Las barras bajo diferentes letras (a, b, c o d) representan los tratamientos con cambios significativos a una  $P < 0.05$ , mientras que los tratamientos con letras iguales no tuvieron cambios significativos en su expresión.

#### 6.6.2.4 Modelo del mecanismo de acción de la PS4

Dados los resultados reportados en la literatura, más la evidencia experimental de este estudio, es posible determinar que la PS4 de la cepa IB84 provoca la lisis celular por medio de daños irreversible en la célula plasmática de las células susceptibles. Más aún, no solo se encontró una estrecha relación en el mecanismo de acción de su PS homóloga, sino con otras TFP que desencadenan eventos celulares muy similares o idénticos.

Es así que formulamos un modo de acción para la PS4 (Fig. 37), el cual consiste en los siguientes puntos: 1) unión de la PS4 a la superficie de membrana, dada por la interacción de un posible receptor específico expresado solo en células susceptibles; 2) oligomerización y formación de poros en la membrana, en donde la PS4 estimula directa o indirectamente algunas moléculas o receptores de membrana; 3) desequilibrio osmótico por la entrada y salida de iones; 4) activación de varias vías de señalización celular por el estímulo de recetores de membrana más el incremento de iones, principalmente  $\text{Ca}^{2+}$  como segundo mensajero; 5) incremento y regulación de la expresión génica para la activación de vías de defensa celular, tales como endocitosis, hipoxia y generación de moléculas osmo-reguladoras como la taurina; 6) sobrevivencia o muerte por necrosis, en caso de que la dosis sobrepase las capacidades de la célula para reparar el daño.

En este modelo propuesto, existen algunos elementos fundamentales en el desencadenamiento de la respuesta celular. En primer lugar, se encuentra la participación de un receptor específico de membrana el cual aún no está identificado, pero que representa una prioridad para el análisis de la actividad de la PS4 hacia las células MOLT-4. En segundo lugar, se encuentra la participación del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, que se propone que juega un papel importante en la activación de las principales cascadas de señalización celular. Entre estas vías de señalización, se encontraron la p38 y JNK de la MAPK, como principales efectoras en de la respuesta celular, seguidas por señalización por fosfoinositol, diana de rapamicina en células de mamífero (mTOR) e insulina.

Como rutas de respuesta a estrés y sobrevivencia, pudimos asociar la endocitosis, respuesta a hipoxia y posiblemente el sistema de respuesta a proteínas desplegadas. Adicionalmente, existen bases teóricas y experimentales para suponer que la taurina, también pudiera actuar como molécula osmo-reguladora en la protección celular hacia la formación de poros.

Finalmente como sistema de detección molecular y discernimiento en el modo de acción de PS necróticas, se proponen el monitoreo de los genes CACN, IL12, IL29 y GADD a un  $TL_{25}$ . Además, de otros no validados con gran potencial como la Calmodulina, p38, JNK, factor inducible de hipoxia y cisteamina dioxigenasa, implicada en el metabolismo de la taurina.

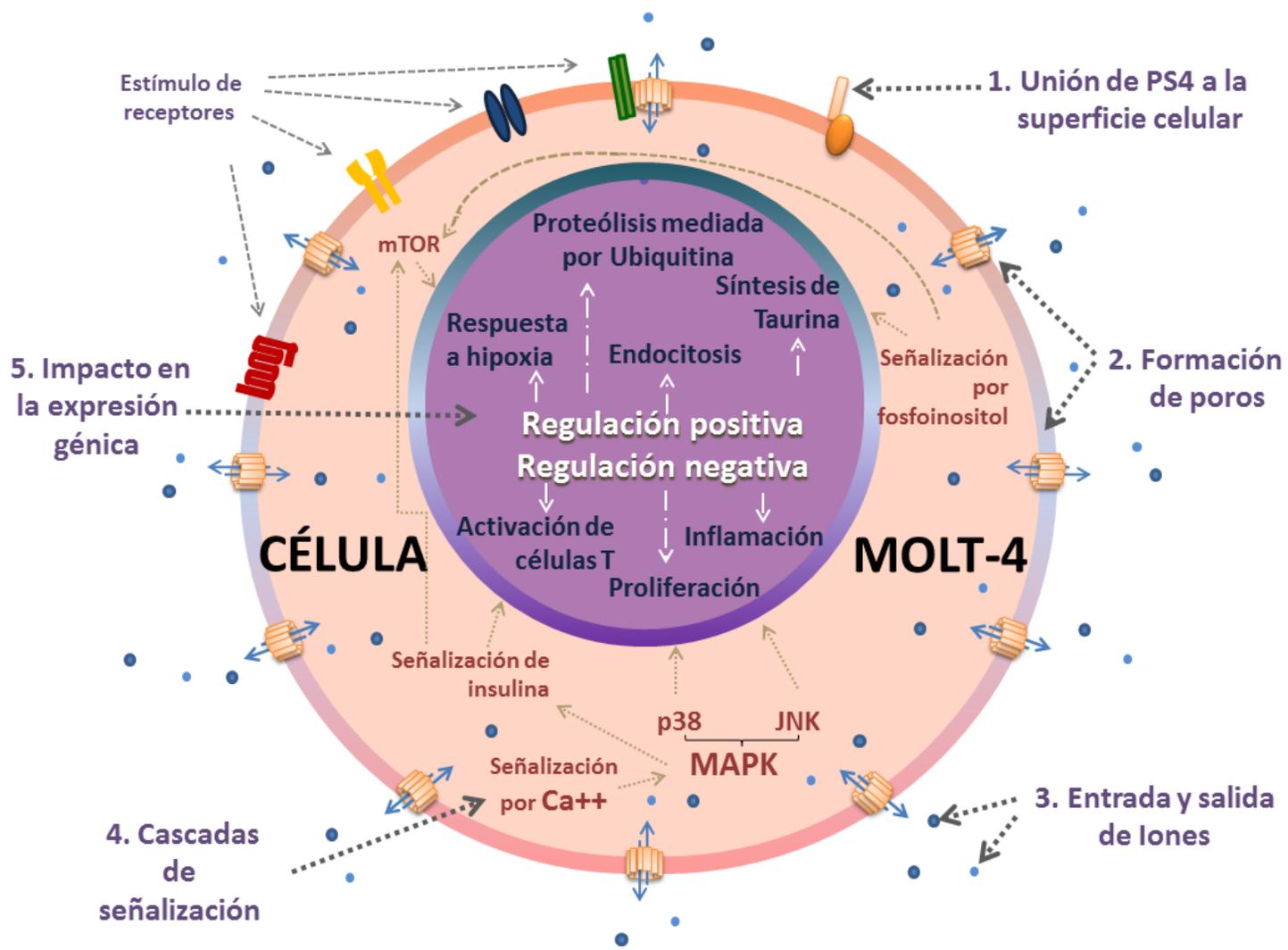


Figura 37. Modelo del modo de acción de la parasporina 4

## 7. DISCUSIÓN

### 7.1 Incidencia de PS en cepas nativas

La relación de cepas positivas para PS, de total de cepas de *B. thuringiensis* probadas en este estudio, fue ligeramente más alto a lo obtenido en otras publicaciones. Nuestro porcentaje de cepas productoras de PS fue del 6.79 % (7/103 cepas), mientras que en otros países el índice de detección se reporta desde 1.2% (1/82) en la India (Poornima *et al.*, 2010), 2.4% (42/1744) Japón (Mizuki *et al.*, 1999), 3.12% (5/160) el Caribe (González *et al.*, 2011) y hasta 6.3% (4/63) para Vietnam (Yasutake *et al.*, 2006). Es interesante que, aunque la incidencia de PS sea baja en comparación con otras proteínas Cry, su localización sea global y específicamente, exista una mayor prevalencia del grupo de las PS1 sobre los demás grupos o familias de PS (Yasutake *et al.*, 2006; Jung *et al.*, 2007; Uemori *et al.*, 2007; Poornima *et al.*, 2010). Inclusive en nuestro estudio, este fue el grupo dominante, en donde 3 de las 7 cepas dieron positivo para PS1 por PCR e inmunodetección.

Retomando la PCR como método de detección, pudimos establecer un sistema efectivo y rápido de detección múltiple, en donde la mayoría de las cepas seleccionadas (5/7) mostraron algún tipo de amplificación. Sin embargo, este tipo de técnica está limitada a la detección de PS homólogas o relacionadas a las ya reportadas y pudiera excluir a nuevos tipos de proteínas anti-cancerígenas con baja similitud a las PS de la literatura. Por esta razón, es altamente recomendable utilizar varios métodos de detección tanto moleculares como serológicos, en donde la selección definitiva de las cepas esté determinada por la actividad *in vitro* contra uno o varios tipos de células.

## 7.2 Caracterización de los cristales paraesporales

Dentro de las cepas seleccionadas para el estudio, pudimos observar la presencia de cristales paraesporales con diferentes tamaños y morfologías. De manera práctica, los diferentes tipos de cristales *B. thuringiensis* han sido asociados a una actividad biológica en particular. Y aunque esta caracterización preliminar es arbitraria, la forma de algunos de nuestros cristales coincide con los cristales de las cepas de referencia con parasporinas homólogas. Tal es el caso de la cepa de referencia A1190, cuyas inclusiones tienen una morfología idéntica a las cepas CL9-1 y CL9-3 que también sintetiza la PS1. Así mismo, los cristales de las cepas IB84 y CL9-21, que codifican para PS4, fueron extremadamente similares, y difíciles de caracterizar debido a su tamaño irregular y muy reducido. Si bien la cepa A1470, que también codifica para la PS4, sintetiza cristales irregulares, los suyos son más grandes a los de nuestras cepas y ligeramente triangulares. En este caso, es importante recordar que la cepa A1470 además produce la PS2Aa2 (Lee *et al.*, 2000; Okumura *et al.*, 2013).

Como dato interesante, solo dos de las cepas del estudio presentaron cristales bipiramidales; la IB88, que sintetiza PS2 y la de A1462 de referencia, que sintetiza las PS3Aa1 y PS3Ab1 (Yamashita *et al.*, 2005). Aunque, aparentemente no existe ninguna otra similitud entre estas dos cepas, ya que, tanto los perfiles proteicos como su espectro citotóxico mostraron patrones muy distintos. Por otra parte, los cristales de las cepas IB79 y GM18 tuvieron la mayor disparidad a los de las cepas de referencia. Ambos mostraron morfologías irregulares cóncavas poco comunes, que más que relacionarse con inclusiones de productoras de PS, morfológicamente poseen más similitud hacia aislados con nuevos tipos de proteínas Cry, cuyos cristales son descritos como globos colapsados (Noguera e Ibarra, 2010) o triangulares con actividad hacia nematodos o insectos (Itoua-Apoyolo *et al.*, 1995; Tamer y Massoud, 2009).

### 7.3 Actividad biológica

En cuanto a la actividad biológica, todas las cepas mostraron toxicidad preferencial contra las células de cáncer y baja citotoxicidad hacia células normales de piel. Específicamente, las concentraciones efectivas demuestran un espectro único para cada una de las inclusiones paraesporales. En comparación a los valores reportados para las PS de referencia, nuestras inclusiones muestran menor toxicidad global. Sin embargo, estrictamente el efecto no puede ser comparado, ya que nosotros trabajamos con extractos crudos y el literatura se hace referencia al efecto obtenido con las PS purificadas (Ohba *et al.*, 2009). Este punto quedó bien demostrado durante la estandarización de los ensayos de citotoxicidad, donde los cristales de las cepas de referencia mostraron menor citotoxicidad a la reportada al ser administrados como extractos crudos activos (sección 6.1.2.1).

Como último punto, es importante señalar que la actividad biológica de nuestras proteínas pudiera estar subestimada por la naturaleza heterogénea de los mismos cristales. Esto debido a que numerosas cepas de *B. thuringiensis* pueden sintetizar diferentes tipos de proteínas del cristal, y existe la posibilidad de más de una proteína en nuestros extractos, llegue a tener actividad anti-cancerígena.

Por esto es necesario el aislamiento o purificación de las proteínas que contengan la actividad biológica, preferentemente por expresión homóloga en *E. coli*, o heteróloga en cepas acristalíferas de *B. thuringiensis*.

## 7.4 Modo de acción

Con respecto al modo de acción, pudimos comprobar con ensayos múltiple, que la mayoría de las inclusiones inducen la lisis de las células por daños a nivel de membrana plasmática. Aunque para las cepas CL9-1 y CL9-3 este tipo de ensayo no fue concluyente, para las cepas IB84, IB88 y CL9-21, el patrón de baja activación de caspasas 3/7 y los altos niveles de células con pérdida en la integridad de membrana, coinciden con lo esperado de acuerdo al modo de acción reportado para sus PS (Abe *et al.*, 2008; Kitada *et al.*, 2006; Okumura *et al.*, 2011).

Dentro de los tratamientos con los cristales de las siete cepas, solamente la GM18 tuvo una clara activación de Caspasas 3/7 sugiriendo una muerte celular programada. El efecto de GM18 fue mucho mayor al de la A1190 de referencia, que no tuvo niveles tan altos de activación de Caspasas 3/7, debido a que tiene poca actividad contra las células MOLT-4 con las que fue montado este ensayo (Mizuki *et al.*, 2000).

Finalmente, es altamente aconsejable la implementación de protocolos adicionales para la confirmación de los modos de acción, sobre todo para los cristales de las cepas CL9-1 y CL9-3, cuyos resultados no fueron concluyentes. Dentro de las diferentes técnicas para determinar la muerte celular se pueden realizar y combinar diferentes ensayos como: monitoreo de los cambios morfológicos celulares por microscopía, que son básicos para determinar e identificar células en estado apoptótico; fragmentación del ADN por electroforesis o ensayos TUNEL; monitoreo de la integridad de membrana por cuantificación de lactato deshidrogenasa; cuantificación de la expresión génica por qPCR o microarreglos; citometría de flujo, entre muchas otras.

#### **7.4.1 Modo de acción de la PS4**

Recientemente el modo de acción de la PS4Aa1 ha sido estudiado en base a la inserción, oligomerización y afinidad hacia varios componentes de las membrana plasmáticas, así como los cambios morfológicos inducidos en las líneas susceptibles MOLT-4 y CaCo, (Okumura *et al.*, 2005; 2008; 2011). En este estudio, el mecanismo de acción de la PS4 fue evaluado desde otro enfoque, analizando la respuesta transcripcional de las células MOLT-4 por medio de microarreglos.

El análisis de los chips de microarreglos demostró una alta similitud en la expresión de global de las células MOLT-4 expuestas a la PS4 de nuestra cepa IB84 y la A1470 de referencia. Los diagramas de conjuntos obtenidos con este análisis exponen claramente la relación de los tratamientos, sobre todo a nivel de rutas, en donde se encontraron cerca del 70% de las rutas en los tres chips. La alta relación entre los tratamientos con las PS2 y PS4 necróticas son reveladoras, tomando en cuenta la gran cantidad de variables a las cuales están sujetos los experimentos por microarreglos y la naturaleza heterogénea de los extractos activos con los que fueron hechos los tratamientos. Estos resultados, más lo obtenido con el ensayo múltiple, forma una base sólida para establecer que el mismo mecanismo de acción para los cristales de ambas cepas es análogo.

#### **7.4.2 Procesos intracelulares activados por TFP**

Debido a que no existen más puntos de referencia sobre la expresión génica inducida por PS, también se hizo un análisis comparativo con otros modelos biológicos cercanos. Tal es el caso de las Cry insecticidas y nematicidas, así como de otras  $\beta$ -TFP, como la aerolisina, con la que la PS4 tiene alta relación estructural.

Sorprendentemente, el efecto encontrado en nuestros experimentos, fue muy similar a los descritos para las otras  $\beta$ -PFT, incluyendo las proteínas Cry plaguicidas. Dentro de las vías de señalización intracelular, con un papel central encontramos la vía de MAPK, la cual es ampliamente reportada como vía de respuesta y protección contra TFP's (Porta, Cancino-Rodezno, Soberón, y Bravo, 2011). Este es un hallazgo relevante, ya que la familia de vías de MAPK implica la transducción de señales para numerosos procesos de gran importancia biológica. Específicamente para las células T, las vías de MAPK inciden en su maduración desde el timo, activación y diferenciación a células CD4+ o CD8+ en el sistema inmune periférico (Rincón, Flavell, y Davis, 2000; Rincón, 2001). Más aún, las vías JNK y MAPK p38 que asociamos en nuestro estudio, se activan por estrés celular y citoquinas para la mediar la diferenciación, inflamación y muerte celular (Ip y Davis, 1998; Kyriakis y Avruch, 2001). Mientras que la vía ERK, que no figuró en nuestros resultados, normalmente es asociada a la proliferación y factores de crecimiento (Marshall, 1995).

Concretamente, para larvas de *Manduca sexta* y *Aedes aegypti*, la ruta p38 actúa en respuesta ante las Cry1Ab y Cry11Aa (Cancino-Rodezno *et al.*, 2010); en tanto que para *Caenorhabditis elegans*, la vía JNK opera de manera importante en protección contra la Cry5B (Kao *et al.*, 2011). Para líneas celulares de mamífero como HaCaT, HEK-293, A498; la MAPK p38 interviene como mecanismo de defensa contra las TFP's  $\alpha$ -toxina, citolisina, estreptolisina O (SLO) y hemolisina (Kloft *et al.*, 2009). De igual manera las líneas epiteliales A549, Detroit 562 y 293 responden ante neumolosisina,  $\alpha$ -hemolisina, SLO y antrolisina O (ALO) mediante la fosforilación de MAPK p38 (Ratner *et al.*, 2006).

Aparte de esta relación directa con la vía MAPK, varias de las demás rutas encontradas también poseen relación como activadoras o efectoras de esta. Entre ellas figuran la señalización de proteínas G, por calcio, mTOR, fosfoinositol, insulina, receptores de células T y tipo NOD, endocitosis, así como respuesta a proteínas desplegadas e hipoxia. Dentro de la literatura, existen reportes sobre las vías de señalización por insulina, el sistema de respuesta a proteínas desplegadas y la respuesta a hipoxia como auxiliares en la defensa celular de *C. elegans* contra Cry5B (Bischof *et*

*al.*, 2008; Chen *et al.*, 2010). En células normales de riñón de rata, la endocitosis dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  es un sistema que interviene en la defensa ante la LLO (Hamon *et al.*, 2007). Igualmente la regulación negativa en la activación de células T, mediante la señalización por calcio, ha sido probada *in vivo* e *in vitro* tras la administración de LLO. En este modelo, se presume que un factor de transcripción dependiente de calcio es la pieza central en el silenciamiento de la inmunidad adaptativa (Gekara *et al.*, 2010, 2008).

En este punto llama la atención que varias de las vías anteriormente mencionadas, sean activadas de manera dependiente al calcio intracelular (Idone *et al.*, 2008; Kao *et al.*, 2011; Soletti *et al.*, 2010), por lo que se presume que su participación es indispensable para el mecanismo de acción las PS. Incluso para la PS1Aa1, el incremento del calcio en las células blanco, es un factor clave en la progresión del modo de acción y posterior muerte celular por apoptosis (Katayama *et al.*, 2007).

Por otra parte, además de las rutas ya mencionadas, encontramos un impacto importante en la regulación genética, “splicing” alternativo y cambios en el empaquetamiento de ADN. En este sentido, el único trabajo relacionado ha sido probado en células HeLa contra LLO, perfringolisina y neumolisina; en donde se demostraron modificaciones epigenéticas como la fosforilación de la Ser<sup>10</sup> de la histona H3 y desacetilación de la histona H4, como una vía para la manipulación de la expresión génica en células infectadas con *Listeria monocytogenes* (Hamon *et al.*, 2007). Si bien, en nuestro estudio encontramos numerosos genes relacionados con el empaquetamiento del DNA, principalmente de histonas de la familia H2A, sería muy aventurado suponer que las histonas sufren cambios epigenéticos,

Es importante señalar que para todos los modelos mencionados, fueron utilizadas concentraciones sub letales de toxina, ya que los estudios están enfocados hacia la detección de los mecanismos que actúan en defensa para la sobrevivencia celular. Mientras que en nuestro estudio pudimos encontrar los mismos mecanismos mediante el uso de altas concentraciones de toxinas pero a tiempos relativamente cortos.

### 7.4.3 Genes implicados en el modo de acción de la PS4

Respecto al significado biológico de los genes con cambios significativos en su expresión ante la PS4, nuevamente se confirma el papel del flujo de iones de calcio, por la regulación negativa del canal de calcio (CACN) en los dos tratamientos con PS4. Este cambio pudiera explicarse como un intento de la célula para controlar la entrada de iones al citoplasma, reprimiendo la expresión de proteínas transportadoras de iones.

Mediante microarreglos también vimos una regulación negativa de la señalización por receptores de células T y aumento en la degradación de proteínas, mientras que por qPCR, la expresión negativa de la interleucina 12, una citoquina pro-inflamatoria. Estos hallazgos coinciden con el comportamiento *in vivo* e *in vitro* de un modelo murino ante la actividad de la LLO, donde se plantea que esta toxina tiene la capacidad de silenciar el sistema inmune adaptativo en el huésped. Los principales eventos observados, también por medio de microarreglos, consistieron en la sobreexpresión de moduladores negativos de activación de células T, incremento en la degradación de proteínas, modulación de la transcripción y regulación negativa de elementos que participan en la apoptosis (Gekara *et al.*, 2010).

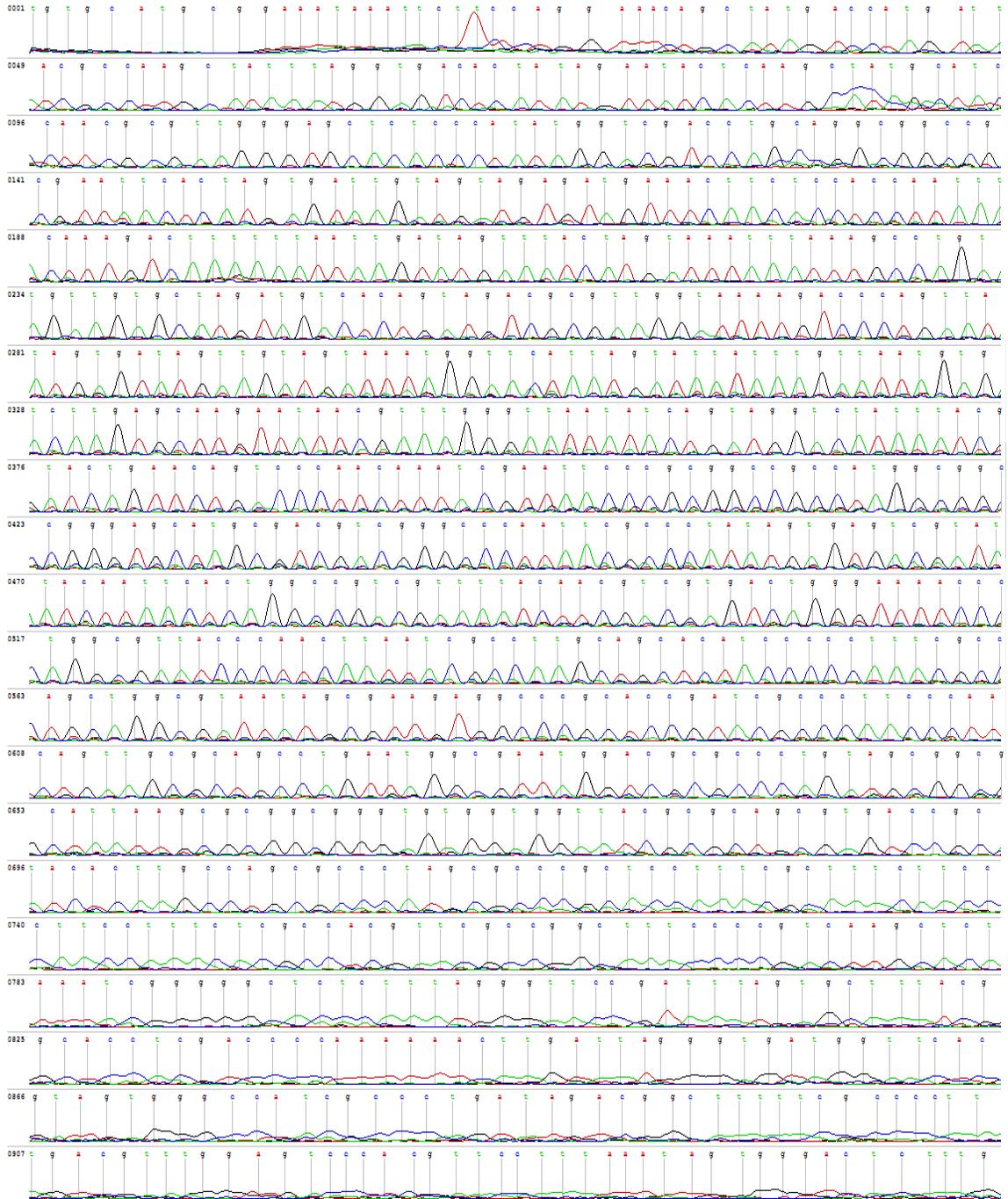
Por otra parte, también encontramos un importante aumento de la expresión de IL29 y la represión de GADD45 en presencia de la PS4. La primera es atribuida principalmente a procesos de defensa celular ante infecciones virales o bacterianas (Witte *et al.*, 2010), aunque no hay reportes de su expresión ante otras TFP. Mientras que la segunda, se confirma que hay una expresión negativa de la una muerte celular programada, ya que el GADD45, está relacionado principalmente a eventos de apoptosis o arresto del ciclo celular (Sheikh *et al.*, 2000), por lo que su sobreexpresión en el tratamiento con PS1, es justificada.

## 8. CONCLUSIONES

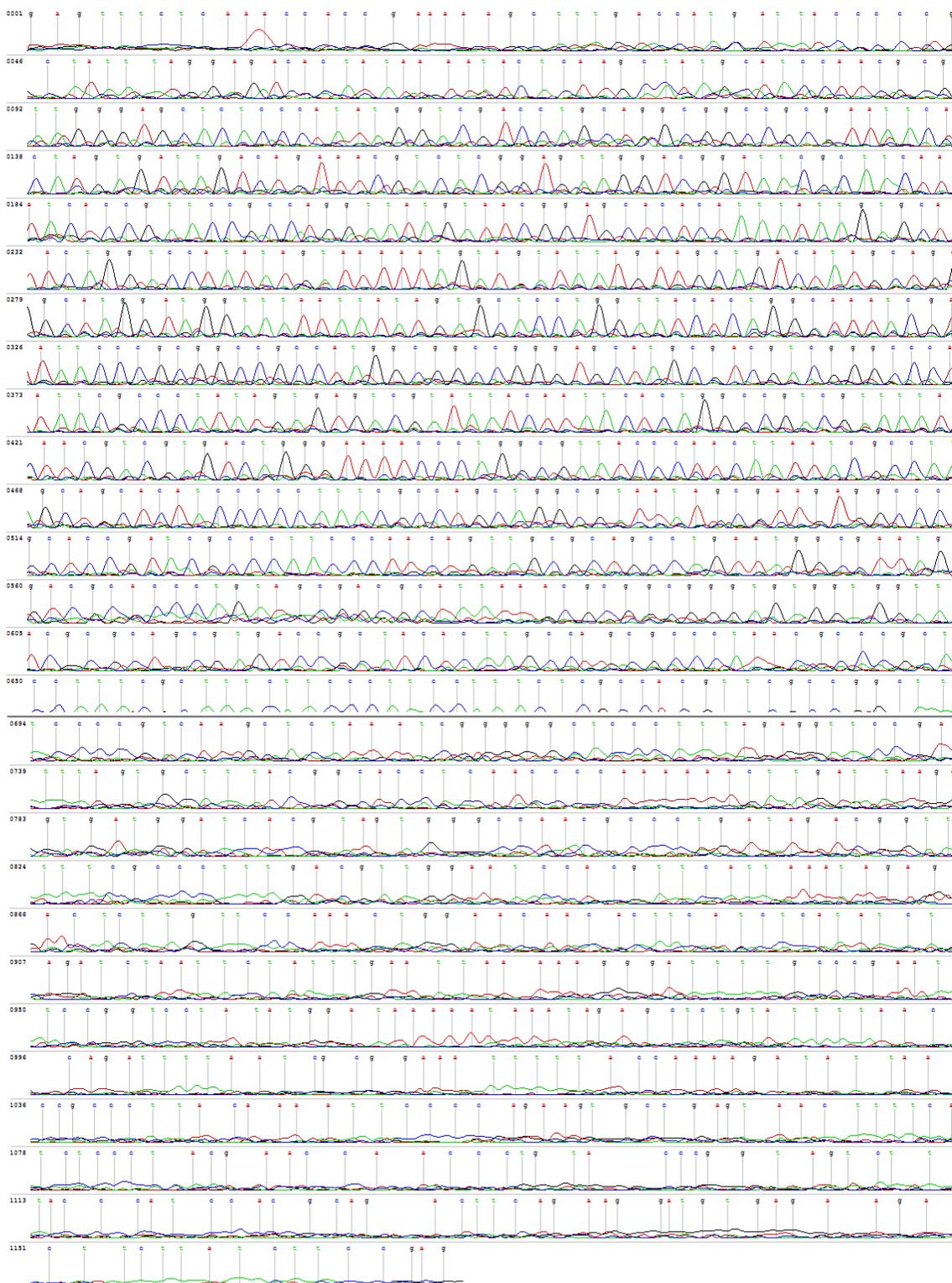
1. Siete de las 103 cepas de *Bacillus thuringiensis* sintetizan proteínas paraesporales con actividad biológica *in vitro* contra células de cáncer de diferentes orígenes.
2. Todas las cepas seleccionadas tuvieron efecto citotóxico muy bajo o nulo hacia células normales de piel.
3. Las cepas IB84, IB88, CL9-1, CL9-3 y CL9-21 codifican genes reportados de parasporinas PS1, PS2, PS3 o PS4; mientras que las cepas GM18 e IB79 no mostraron similitud hacia ninguna de las parasporinas conocidas.
4. El modo de acción de los cristales de las cepas IB84, IB88, IB79 y CL9-21 se ajusta al modelo de lisis por pérdida de la integridad de la membrana; mientras que para las cepas GM18, CL9-1 y CL9-3 el mecanismo de muerte celular propuesto es por apoptosis.
5. La actividad biológica de la PS4 de la cepa IB84 sobre células de leucemia, desencadena procesos biológicos relacionados al daño provocado por toxinas formadoras de poros tipo beta, en donde el incremento del calcio intracelular parece ser un elemento clave para la activación de rutas de respuesta a estrés celular y sobrevivencia.

# APÉNDICES

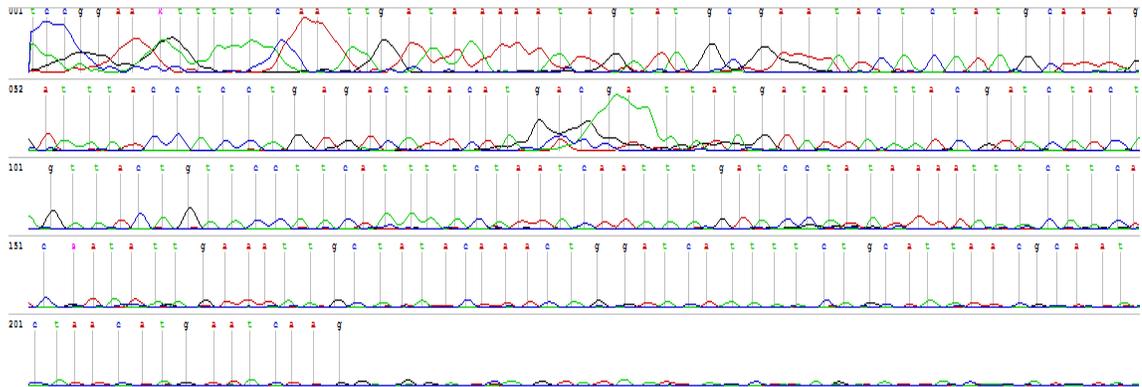
## APÉNDICE A: Electroferograma de la secuencia nucleotídica de la cepa IB84



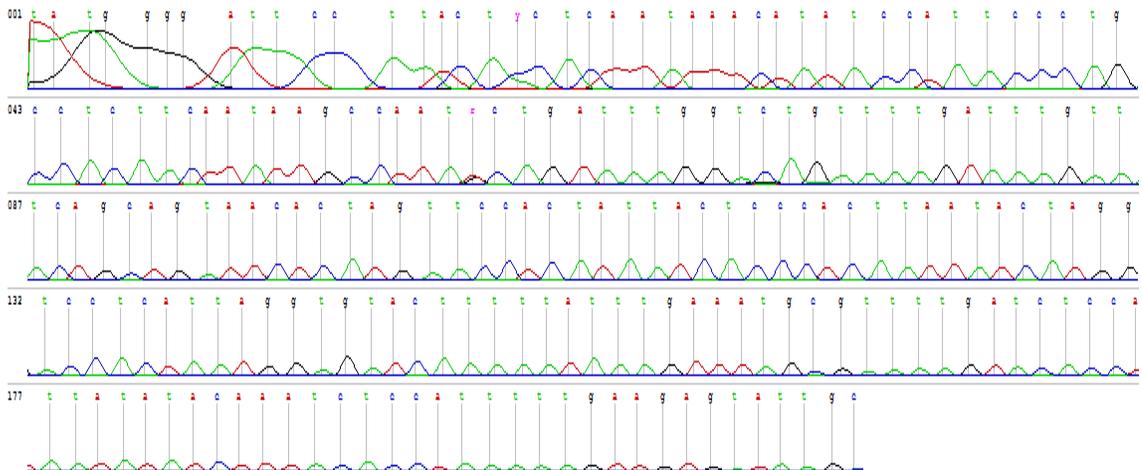
## APÉNDICE B: Electroferograma de la secuencia nucleotídica de la cepa IB88



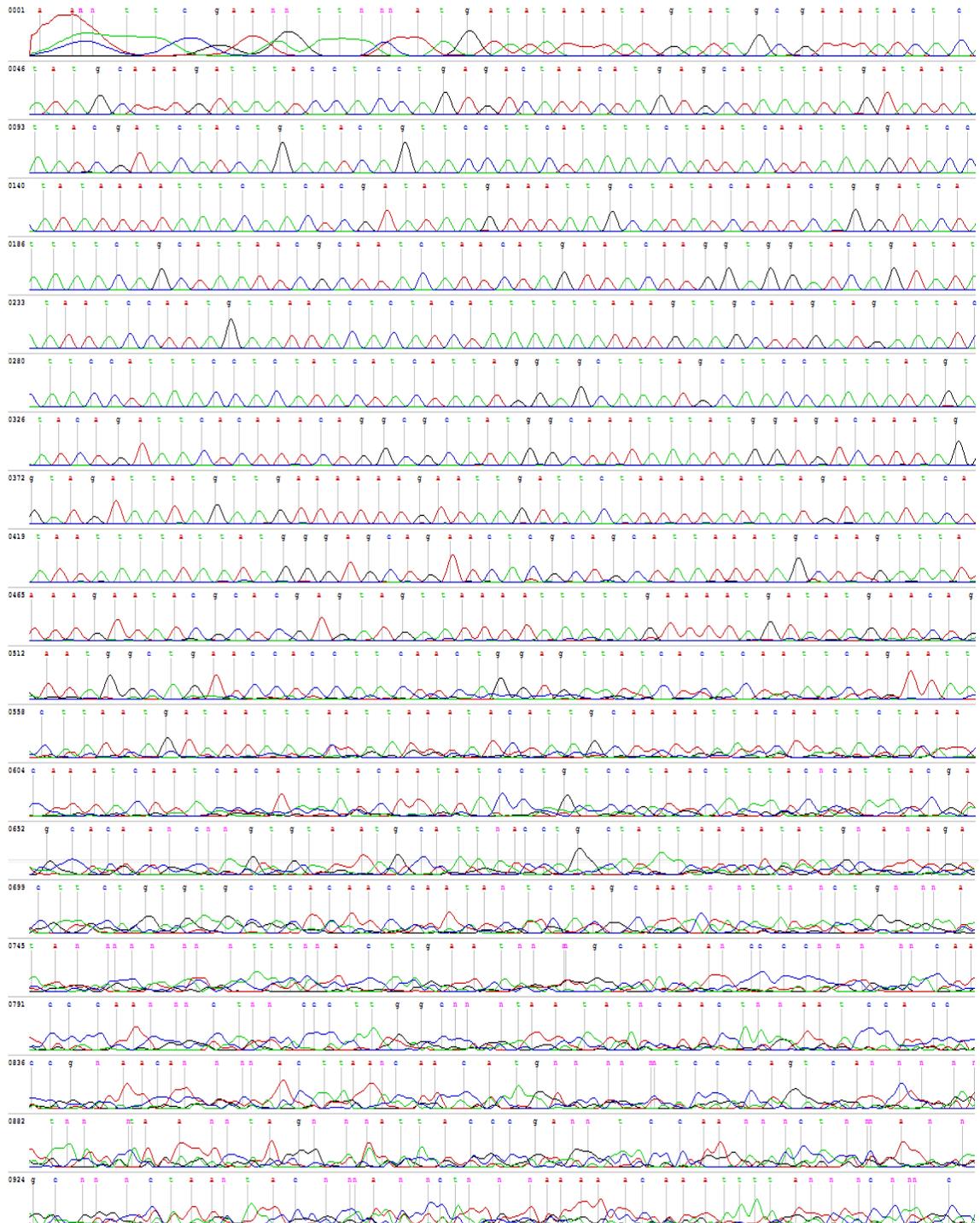
APÉNDICE C: Electroferograma de la secuencia nucleotídica de la cepa CL9-1



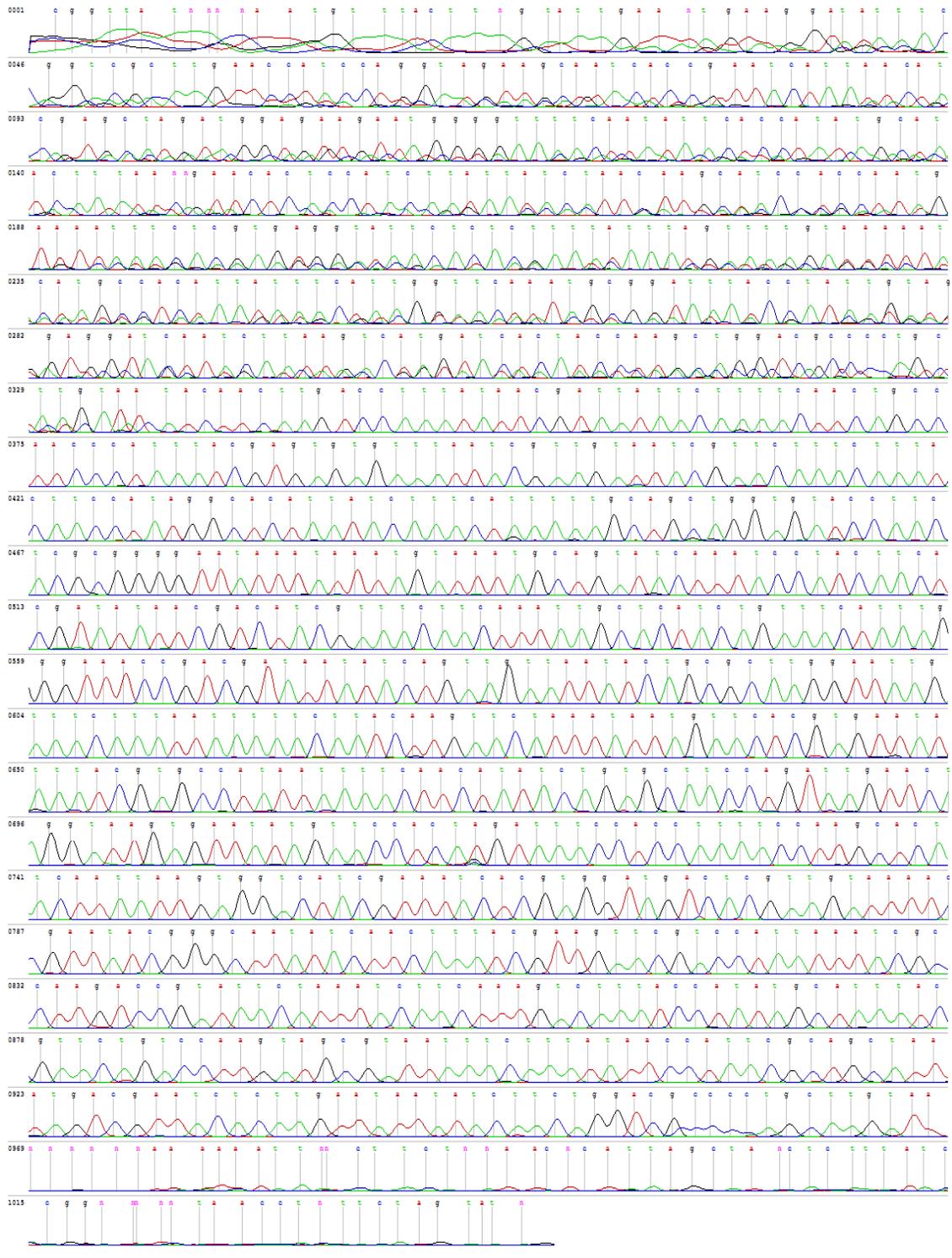
APÉNDICE D: Electroferograma de la secuencia nucleotídica de la cepa CL9-21



## APÉNDICE E: Electroferograma de la secuencia nucleotídica de la cepa CL9-3



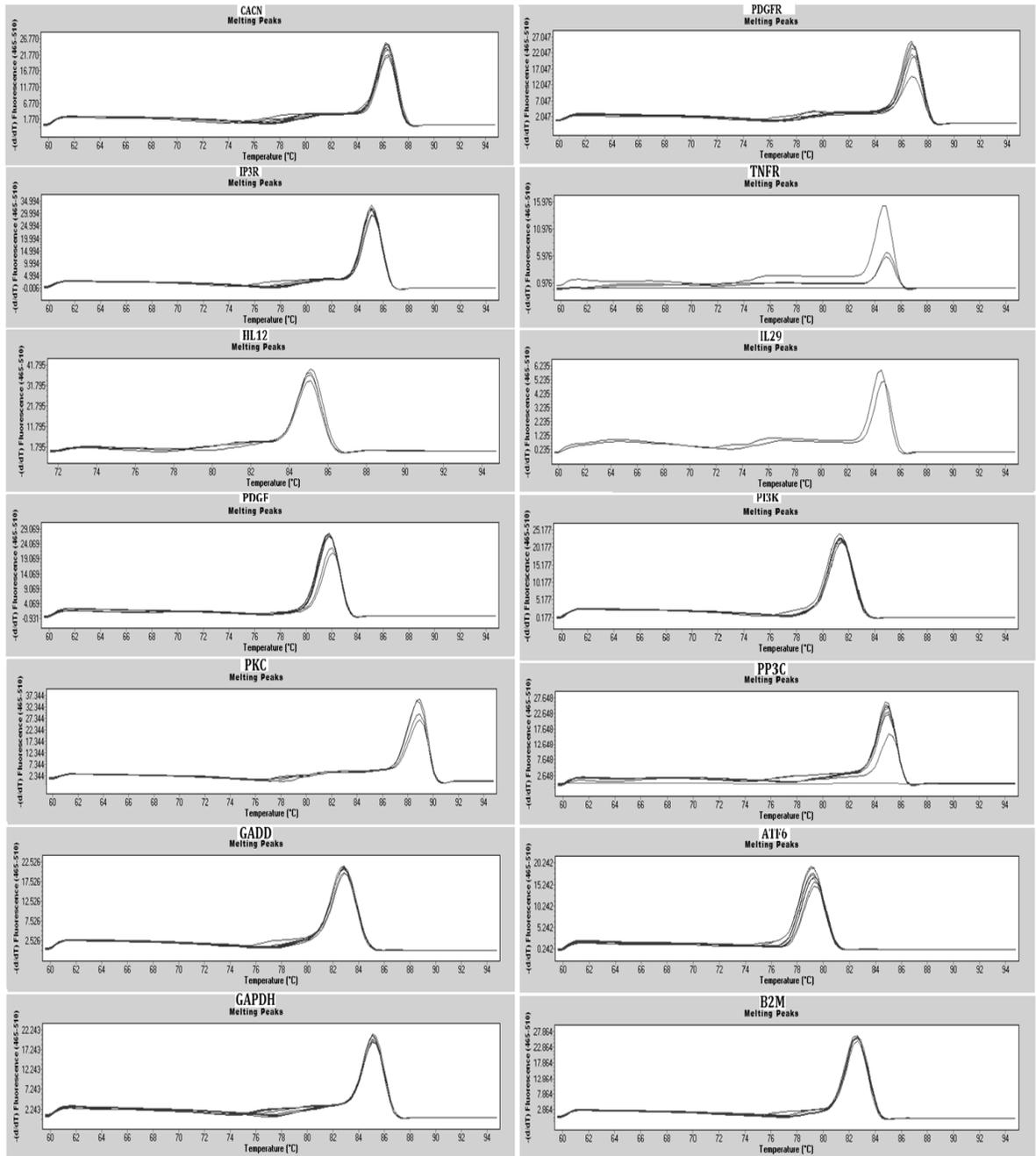
## APÉNDICE F: Electroferograma de la secuencia nucleotídica de la cepa GM18



APÉNDICE G: Características de los iniciadores diseñados para qPCR

Nombre	Secuencia (5'-3')	nt	GC (%)	T <sub>m</sub> (°C)	Producto (pb)
CACN-1	GCTGAATCTCTTTGTGCGCCG	20	55.0	56.5	125
CACN-2	AAGCTGCGGGGTCATACTC	19	59.9	57.2	
PDGFR-1	GACTAGTGCTTGGTCGGGTC	20	60.0	57.5	87
PDGFR-2	CAGGTTGGGACCGGCTTAAT	20	55.0	57.5	
TNFR-1	GATACGGACTGCAGGGAGTG	20	60.0	57.3	101
TNFR-2	TGACCCATTTCCCTTTCGGCA	20	50.0	57.1	
IP3R-1	GCAGGGAAGAAGAGGGACG	19	63.2	57.8	136
IP3R-2	ACCCCAAGGTGCTGATGAAG	20	55.0	57.5	
PDGF-1	TGCGGTCTTTGTTCTCCTCC	20	55.0	57.2	120
PDGF-2	ACTGCTTCACCGAGTGCTAC	20	55.0	57.2	
IL12-1	CATTGGACTCTCCGTCCTGC	20	60.0	57.9	88
IL12-2	GGGGAGATGCCAGAAAAACC	20	55.0	56.2	
IL29-1	TGGGGAAGCAGTTGCGATTT	20	50.0	57.6	74
IL29-2	GCCAAGCCTAGCACCAAAGT	20	55.0	58.2	
PI3K-1	GGTTTGGCCTGCTTTTGAG	20	55	57.2	81
PI3K-2	CCATTGCCTCGACTTGCCTA	20	55	57.4	
PKC-1	GAAGTTCGGCATTTCGGCTTC	20	55.0	56.8	100
PKC-2	CTTGATGGTGAGGCGAGTGT	20	55.0	57.3	
GADD-1	GCAGGAGCGTGAAGGACTTA	20	55.0	57.0	70
GADD-2	AGAAAACGAAGCATTGCCCG	20	50.0	56.5	
PP3C-1	GTTGCTCCAGCTCCTGAACA	20	55.0	57.5	184
PP3C-2	GGGAGAACAACCTTTGCTTGCC	20	55.0	56.9	
ATF6-1	GACAGGTGCCTCTTTGTCCA	20	50	57.3	71
ATF6-2	TCCCCGCTCACAAAAGTTGA	20	50	57	
GAPDH-1	GCCGCATCTTCTTTTTCGTC	20	55.0	57.5	76
GAPDH-2	CGTTGACTCCGACCTTCACC	20	60.0	57.9	
B2m-1	AGTATGCCTGCCGTGTGAAC	20	55	57.8	100
B2m-2	GCGGCATCTTCAAACCTCCA	20	55	58.1	

## APÉNDICE H: Curvas de disociación de los amplicones de qPCR



## LITERATURA CITADA

- Abe Y, Kitada S, Kuge O, Ohba M, Ito A. 2005. Oligomerization of parasporin-2, a new crystal protein from non-insecticidal *Bacillus thuringiensis*, in lipid rafts. In Coté J, Otvos I, Scwartz J, Vincent C (Eds.). 6th Pacific Rim Conference on the Biotechnology of *Bacillus thuringiensis* and its Environmental Impact 113–115.
- Abe Y, Shimada H, Kitada S. 2008. Raft-targeting and oligomerization of parasporin-2, a *Bacillus thuringiensis* crystal protein with anti-tumor activity. *Journal of Biochemistry* 143:269–275.
- Abriouel H, Franz CMAP, Omar NB, Gálvez A. 2011. Diversity and applications of *Bacillus* bacteriocins. *FEMS Microbiology Reviews* 35:201-232.
- Akao T, Mizuki E, Yamashita S, Saitoh H, Ohba M. 1999. Lectin activity of *Bacillus thuringiensis* parasporal inclusion proteins. *FEMS Microbiology Letters* 179:415–421.
- Akiba T, Abe Y, Kitada S, Kusaka Y, Ito A, Ichimatsu T, Harata K. 2004. Crystallization of parasporin-2, a *Bacillus thuringiensis* crystal protein with selective cytotoxic activity against human cells. *Acta Crystallographica* 60:2355–2357.
- Akiba T, Abe Y, Kitada S, Kusaka Y, Ito A, Ichimatsu T, Harata K. 2009. Crystal structure of the parasporin-2 *Bacillus thuringiensis* toxin that recognizes cancer cells. *Journal of Molecular Biology* 386:121–133.
- American Cancer Society and Livestrong, 2010. The global economic cost of cancer. Atlanta GA (005444).
- Bagley AL, Cannon RJC, Payne JM. 1993. *Bacillus thuringiensis* isolates for controlling acarides. US Patent 5350576 A. 1994-09-27. Mycogen Corporation.
- Bellier A, Chen CS, Kao CY, Cinar HN, Aroian RV. 2009. Hypoxia and the hypoxic response pathway protect against pore-forming toxins in *C. elegans*. *PLoS Pathogens* 5:e1000689.
- Bischof LJ, Kao CY, Los FCO, Gonzalez MR, Shen Z, Briggs SP, van der Goot FG, Aroian RV. 2008. Activation of the unfolded protein response is required for defenses against bacterial pore-forming toxin *in vivo*. *PLoS Pathogens* 4: e1000176.
- Bouckenooghe T, Remacle C, Reusens B. 2006. Is taurine a functional nutrient? *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care* 9:728–733.

- Bradford MM. 1976. 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.
- Bravo A, Sarabia S, Lopez L, Abarca C, Ortiz A, Ortiz M, Ontiveros H. 1998. Characterization of *cry* genes in a Mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. *Applied and Environmental Microbiology* 64:4965–4972.
- Campos MP, 2007. Caracterización de las proteínas del cristal de *Bacillus thuringiensis* cepas IB-2 a IB-21. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Cancino-Rodezno A, Alexander C, Villaseñor R, Pacheco S, Porta H, Pauchet Y, Bravo A. 2010. The mitogen-activated protein kinase p38 is involved in insect defense against Cry toxins from *Bacillus thuringiensis*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 40:58–63.
- Chan K, Nadarajah VD, Mohammed S, Karisnan K, Abdullah M. 2007. The effect of parasporal inclusions from Malaysian strains of *Bacillus thuringiensis* on leukemic cell lines. *The Malaysian Journal of Medical Science* 14:2.
- Chan KK, Wong RSY, Mohamed SM., Ibrahim TAT, Abdulla M, Nadarajah VD. 2012. *Bacillus thuringiensis* parasporal proteins induce cell cycle arrest and caspase-dependant apoptosis cell death in leukemic cells. *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology* 31:75–86.
- Chen CS, Bellier A, Kao CY, Yang YL, Chen HD, Los FCO, Aroian RV. 2010. WWP-1 is a novel modulator of the DAF-2 insulin-like signaling network involved in pore-forming toxin cellular defenses in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS One* 5:e9494.
- Cheng HR, Jiang N. 2006. Extremely rapid extraction of DNA from bacteria and yeasts. *Biotechnology Letters* 28:55–59.
- Chomczynski P. 1993. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *BioTechniques* 15:533–537.
- Clynes RA, Towers TL, Presta LG, Ravetch JV. 2000. Inhibitory Fc receptors modulate *in vitro* cytotoxicity against tumor targets. *Nature Medicine* 6:443–446.
- Crickmore N, Zeigler DR, Feitelson J, Schnepf E, Rie V, Lereclus D, Dean DH. 1998. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62:807–813.
- de Maagd RA, Bravo A, Crickmore N. 2001. How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. *Trends in Genetics* 17:193–199.
- de Maagd RA, Bravo A, Berry C, Crickmore N, Schnepf HE. 2003. Structure, diversity, and evolution of protein toxins from spore-forming entomopathogenic bacteria. *Annual Review of Genetics* 37:409–433.

El-Hag HAA, Safhi MA. 2011. Antimalignancy Activity of *Bacillus thuringiensis* serovar *dakota* (H15) *in vivo*. World Journal of Medical 6:6–16.

Espino-Vazquez A, Gomez-Treviño A, Galan-Wong L, Pereyra-Alferez B. 2012. Isolation of *Bacillus thuringiensis* strains with cytotoxic activity against MOLT-4, a leukemia cell line. In Microbes in Applied Research: Current Advances and Challenges, A. Mendez-Vilas (ed.), World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd. Málaga, España pp. 147–151.

Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray, F. GLOBOCAN [Internet] 2013. Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC Cancer Base No. 11 .Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2013. Disponible en el sitio de red: <http://globocan.iarc.fr> [Revisado el 30 de Marzo de 2014]

Gekara NO, Groebe L, Viegas N, Weiss S. 2008. *Listeria monocytogenes* desensitizes immune cells to subsequent Ca<sup>2+</sup> signaling via listeriolysin O induced depletion of intracellular Ca<sup>2+</sup> stores. Infection and Immunity 76:857–62.

Gekara NO, Zietara N, Geffers R, Weiss S. 2010. *Listeria monocytogenes* induces T cell receptor unresponsiveness through pore-forming toxin listeriolysin O. Journal of Infectious Diseases 202:1698–707.

Gonzalez E, Granados JC, Short JD, Ammons DR, Rampersad J. 2011. Parasporins from a Caribbean island: Evidence for a globally dispersed *Bacillus thuringiensis* strain. Current Microbiology 62:1643–1648.

Gonzalez MR, Bischofberger M, Pernot L, van der Goot FG, Frêche B. 2008. Bacterial pore-forming toxins: The whole story? Cellular and Molecular Life Sciences 65:493–507.

Hamon MA, Batsché E, Régnault B, Tham TN, Seveau S, Muchardt C, Cossart P. 2007. Histone modifications induced by a family of bacterial toxins. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 104:13467–13472.

Harvey AL. 2008. Natural products in drug discovery. Drug Discovery Today 13:894–901.

Hayakawa T, Kanagawa R, Kotani Y, Kimura M, Yamagiwa M, Yamane Y, Knagawa R. 2007. Parasporin-2Ab, a newly isolated cytotoxic crystal protein from *Bacillus thuringiensis*. Current Microbiology 55:278–83.

Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA. 2009. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. Nature Protocols 4:44–57.

Huxtable RJ. 1992. Physiological actions of Taurine. Physiological Reviews 72:101–163.

Ibarra JE, Rincón MC, Ordúz S, Noriega D, Benintende G, Monnerat R, Regis L, de Oliveira CMF, Lanz H, Rodriguez MH, Sánchez J, Peña G, Bravo A. 2003. Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains from Latin America with insecticidal activity against different mosquito species. *Applied and Environmental Microbiology* 69:5269–5274.

Ibarra MA, 2013. Detección y caracterización de parasporinas en cepas de *Bacillus thuringiensis*. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Nuevo León.

Ichikawa M, Uemori A, Ohgushi A, Yasutake K, Kagoshima K, Mizuki E, Ohba M. 2007. Phenotypic and morphometric characterization of *Bacillus thuringiensis* parasporin-1 producers : A comparison with insecticidal Cry protein producers. *Journal of the Faculty of Agriculture Kyushu University* 52:307–313.

Idone V, Tam C, Goss JW, Toomre D, Pypaert M, Andrews NW. 2008. Repair of injured plasma membrane by rapid  $Ca^{2+}$ -dependent endocytosis. *The Journal of Cell Biology* 180:905–914.

Ip YT, Davis RJ. 1998. Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase (JNK)-from inflammation to development. *Current Opinion in Cell Biology*, 10:205–219.

Ito A, Sasaguri Y, Kitada S, Kusaka Y, Kuwano K, Masutomi K, Ohba M. 2004. A *Bacillus thuringiensis* crystal protein with selective cytotoxic action to human cells. *The Journal of Biological Chemistry* 279:21282–21286.

Itoua-Apoyolo C, Drif L, Vassal JM, Debarjac H, Bossy JP, Leclant F, Frutos R. 1995. Isolation of multiple subspecies of *Bacillus thuringiensis* from a population of the European sunflower moth, *Homoeosoma nebulella*. *Applied and Environmental Microbiology* 61:4343–4347.

Jouzani GS, Seifinejad A, Saedizadeh A, Nazarian A, Yousefloo M, Soheilvand S, Akbari S. 2008. Molecular detection of nematicidal crystalliferous *Bacillus thuringiensis* strains of Iran and evaluation of their toxicity on free-living and plant-parasitic nematodes. *Canadian Journal of Microbiology* 54:812–822.

Jung YC, Mizuki E, Akao T, Côté JC. 2007. Isolation and characterization of a novel *Bacillus thuringiensis* strain expressing a novel crystal protein with cytotoxic activity against human cancer cells. *Journal of Applied Microbiology* 103:65–79.

Kanehisa M, Goto S, Sato Y, Kawashima M, Furumichi M, Tanabe M. 2014. Data, information, knowledge and principle: back to metabolism in KEGG. *Nucleic Acids Research* 42:199–205.

Kao CY, Los FCO, Huffman DL, Wachi S, Kloft N, Husmann M, Aroian RV. 2011. Global functional analyses of cellular responses to pore-forming toxins. *PLoS Pathogens* 7:e1001314.

- Katayama H, Kusaka Y, Mizuki E. 2011. Parasporin-1 receptor and use thereof. European Patent Application. 09727199.3. 2009-03-30. Fukuoka Prefectural Government.
- Katayama H, Kusaka Y, Yokota H, Akao T, Kojima M, Nakamura O, Mizuki E. 2007. Parasporin-1, a novel cytotoxic protein from *Bacillus thuringiensis*, induces Ca<sup>2+</sup> influx and a sustained elevation of the cytoplasmic Ca<sup>2+</sup> concentration in toxin-sensitive cells. *The Journal of Biological Chemistry* 282:7742–7752.
- Katayama H, Yokota H, Akao T, Nakamura O, Ohba M, Mekada E, Mizuki E. 2005. Parasporin-1, a novel cytotoxic protein to human cells from non-insecticidal parasporal inclusions of *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Biochemistry* 137:17–25.
- Kim HS, Saitoh H, Yamashita S, Akao T, Park YS, Maeda M, Ohba M. 2003. Cloning and characterization of two novel crystal protein genes from a *Bacillus thuringiensis* serovar dakota strain. *Current Microbiology* 46:33–38.
- Kim HS, Yamashita S, Akao T, Saitoh H, Higuchi K, Park YS, Ohba M. 2000. *In vitro* cytotoxicity of non-Cyt inclusion proteins of a *Bacillus thuringiensis* isolate against human cells, including cancer cells. *Journal of Applied Microbiology* 89:16–23.
- Kitada S, Abe Y, Shimada H, Kusaka Y, Matsuo Y, Katayama H, Ito A. 2006. Cytocidal actions of parasporin-2, an anti-tumor crystal toxin from *Bacillus thuringiensis*. *The Journal of Biological Chemistry* 281:26350–26360.
- Kloft N, Busch T, Neukirch C, Weis S, Boukhallouk F, Bobkiewicz W, Husmann M. 2009. Pore-forming toxins activate MAPK p38 by causing loss of cellular potassium. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 385:503–506.
- Knapp O, Maier E, Benz R, Geny B, Popoff MR. 2009. Identification of the channel-forming domain of *Clostridium perfringens* epsilon-toxin ETX. *Biochimica et Biophysica Acta Biomembranes* 1788:2584–2593.
- Kondo S, Mizuki E, Akao T, Ohba M. 2002. Antitrichomonal strains of *Bacillus thuringiensis*. *Parasitology Research* 88:1090–1092.
- Kuroda S, Begum A, Saga M, Hirao A, Mizuki E, Sakai H, Hayakawa T. 2013. Parasporin 1Ac2, a novel cytotoxic crystal protein isolated from *Bacillus thuringiensis* B0462 strain. *Current Microbiology* 66:475–80.
- Kyriakis JM, Avruch J. 2001. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiological Reviews*, 81:807–869.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680–685.

- Lee DW, Akao T, Yamashita S, Katayama H, Maeda M, Saitoh H, Ohba M. 2000. Noninsecticidal parasporal proteins of a *Bacillus thuringiensis* serovar *shandongiensis* isolate exhibit a preferential cytotoxicity against human leukemic T cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 272:218–223.
- Luna VA, King DS, Gullede J, Cannons AC, Amuso PT, Cattani J. 2007. Susceptibility of *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus pseudomycoloides* and *Bacillus thuringiensis* to 24 antimicrobials using Sensititre automated microbroth dilution and Etest agar gradient diffusion methods. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 60:555–567.
- Luo J, Sands M, Wactawski-Wende J, Song Y, Margolis KL. 2013. Sleep disturbance and incidence of thyroid cancer in postmenopausal women the Women's Health Initiative. *American Journal of Epidemiology* 177:42–49.
- Mahalakshmi A, Shenbagarathai R. 2010. *In silico* structural analysis of parasporin 2 protein sequences of non-toxic *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Biomedical Science and Engineering* 03:415–421.
- Marshall CJ. 1995. Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell*, 80:179–185.
- Meadows MP, Ellis DJ, Butt J, Jarrett P, Burges HD, Butt JOE. 1992. Distribution, frequency and diversity of *Bacillus thuringiensis* an Animal Feed Mill. *Applied and Environmental Microbiology* 58:1344-1350.
- Mizuki E, Ohba M, Akao T, Yamashita S, Saitoh H, Park YS. 1999. Unique activity associated with non-insecticidal *Bacillus thuringiensis* parasporal inclusions: *in vitro* cell-killing action on human cancer cells. *Journal of Applied Microbiology* 86:477–486.
- Mizuki E, Park YS, Saitoh H, Yamashita S, Akao T, Higuchi K, Ohba M. 2000. Parasporin, a human leukemic cell-recognizing parasporal protein of *Bacillus thuringiensis*. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 7: 625–634.
- Moreno MR, 2007. Caracterización de las proteínas del cristal de *Bacillus thuringiensis* cepas IB-62 a IB-82. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Nadarajah VD, Ting D, Chan K, Mohammed S, Kanakeswary K, Lee H, Mohamed S. 2008. Selective Cytotoxic activity against leukemic cell lines from mosquitocidal *Bacillus thuringiensis* parasporal inclusions. *Southeast Asian Journal of Tropic Medical Publication Health* 39:235–245.
- Nadarajah VD, Chai SH, Mohammed SM, Chan KK, Kanakeswary K. 2006. Malaysian mosquitocidal soil bacterium *Bacillus thuringiensis* strains with selective hemolytic and lectin activity against human and rat erythrocytes. *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health* 37:67–78.

Nagamatsu Y, Okamura S, Saitou H, Akao T, Mizuki E. 2010. Three Cry toxins in two types from *Bacillus thuringiensis* strain M019 preferentially kill human hepatocyte cancer and uterus cervix cancer cells. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 74:494–498.

Noguera PA, Ibarra JE. 2010. Detection of new cry genes of *Bacillus thuringiensis* by use of a novel PCR primer system. *Applied and Environmental Microbiology* 76:6150–6155.

Ohba M, Aizawa K. 1986. Insect toxicity of *Bacillus thuringiensis* isolated from soils of Japan. *Journal of Invertebrate Pathology* 47:12-20.

Ohba M, Mizuki E, Uemori A. 2009. Parasporin, a new anticancer protein group from *Bacillus thuringiensis*. *Anticancer Research* 29:427–433.

Okumura S, Ohba M, Mizuki E, Crickmore N, Côté JC, Nagamatsu Y, Kitada S, Sakai H, Harata K, Shin T. 2010. Parasporin nomenclature. Disponible en el sitio de red: <http://parasporin.fitc.pref.fukuoka.jp> [Revisado el 30 de Marzo de 2014]

Okumura S, Akao T, Higuchi K, Saitoh H, Mizuki E, Ohba M, Inouye K. 2004. *Bacillus thuringiensis* serovar *shandongiensis* strain 89-T-34-22 produces multiple cytotoxic proteins with similar molecular masses against human cancer cells. *Letters in Applied Microbiology* 39:89–92.

Okumura S, Ishikawa T, Saitoh H, Akao T, Mizuki E. 2013. Identification of a second cytotoxic protein produced by *Bacillus thuringiensis* A1470. *Biotechnology Letters* 35:1889–1894.

Okumura S, Saitoh H, Ishikawa T, Inouye K, Mizuki E. 2011. Mode of action of parasporin-4, a cytotoxic protein from *Bacillus thuringiensis*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1808:1476–1482.

Okumura S, Saitoh H, Ishikawa T, Mizuki E, Inouye K. 2008. Identification and characterization of a novel cytotoxic protein, parasporin-4, produced by *Bacillus thuringiensis* A1470 strain. *Biotechnology Annual Review* 14:225–252.

Okumura S, Saitoh H, Ishikawa T, Wasano N, Yamashita S, Kusumoto KI, Inouye K. 2005. Identification of a novel cytotoxic protein, Cry45Aa, from *Bacillus thuringiensis* A1470 and its selective cytotoxic activity against various mammalian cell lines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53:6313–6318.

Okumura S, Saitoh H, Wasano N, Katayama H, Higuchi K, Mizuki E, Inouye K. 2006. Efficient solubilization, activation, and purification of recombinant Cry45Aa of *Bacillus thuringiensis* expressed as inclusion bodies in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification* 47:144–151.

OMS. 2012. Latest world cancer statistics global cancer burden rises to 4.1 million new cases in 2012: Marked increase in breast cancers must be addressed. France (Press Release N° 223).

Perani M, Bishop AH, Vaid A. 1998. Prevalence of beta-exotoxin, diarrhoeal toxin and specific delta-endotoxin in natural isolates of *Bacillus thuringiensis*. FEMS Microbiology Letters 160:55–60.

Pigott CR and Ellar DJ. 2007. Role of Receptors in *Bacillus thuringiensis* Crystal Toxin Activity. Microbiology and Molecular Biology Reviews 71: 255–281.

Poornima K, Selvanayagam P, Shenbagarathai R. 2010. Identification of native *Bacillus thuringiensis* strain from South India having specific cytotoxic activity against cancer cells. Journal of Applied Microbiology 109:348–354.

Porta H, Cancino-Rodezno A, Soberón M, Bravo A. 2011. Role of MAPK p38 in the cellular responses to pore-forming toxins. Peptides, 32:601–606.

Ratner AJ, Hippe KR, Aguilar JL, Bender MH, Nelson AL, Weiser JN. 2006. Epithelial cells are sensitive detectors of bacterial pore-forming toxins. Journal of Biological Chemistry, 281:12994–12998.

Rincón M. 2001. MAP-kinase signaling pathways in T cells. Current Opinion in Immunology, 13:339–345.

Rincón M, Flavell RA, Davis RA. 2000. The JNK and p38 MAP kinase signaling pathways in T cell-mediated immune responses. Free Radical Biology y Medicine, 28:1328–1337.

Rodriguez-Padilla C, Galan-Wong L, Barjac H, Roman-Calderon E, Tamez-Guerra R, Dulmage H. 1990. *Bacillus thuringiensis* Subspecies *neoleonensis*. Journal of Invertebrate Pathology 52:280–282.

Sambrook J, Russell DW. 2006. The condensed Protocols from Molecular Cloning: a Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, New York, pp1-800.

Schnepf E, Crickmore N, Van Rie J, Lereclus D, Baum J, Feitelson J, Dean DH. 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. Microbiology and Molecular Biology Reviews 62:775–806.

Selvapandiyan A, Arora N, Rajagopal R, Jalali SK, Singh SP, Bhatnagar RK, Venkatesan T. 2001. Toxicity analysis of N- and C-terminus-deleted vegetative insecticidal protein from *Bacillus thuringiensis*. Applied and Environmental Microbiology 67:5855-5858.

Sheikh MS, Hollander MC, Fornance AJ. 2000. Role of Gadd45 in apoptosis. Biochemical Pharmacology 59:43–45.

Siegel R, Desantis C, Virgo K, Stein K, Mariotto A, Smith T, Fedewa S. 2013. Cancer treatment and survivorship statistics, 2012. American Cancer Society, 62:220–241.

Socinski MA, Bondarenko I, Karaseva NA, Makhson AM, Vynnychenko I, Okamoto I, Renschler MF. 2012. Weekly nab-paclitaxel in combination with carboplatin versus solvent-based paclitaxel plus carboplatin as first-line therapy in patients with advanced non-small-cell lung cancer: Final results of a phase III trial. *Journal of Clinical Oncology* 30:2055–2062.

Soletti RC, Alves T, Vernal J, Terenzi H, Anderluh G, Borges HL, Moura-Neto V. 2010. Inhibition of MAPK/ERK, PKC and CaMKII signaling blocks cytolysin-induced human glioma cell death. *Anticancer Research* 30:1209–15.

Stabb EV, Jacobson LM., Handelsman J. 1994. Zwittermicin A-producing strains of *Bacillus cereus* from diverse soils. *Applied and Environmental Microbiology* 60:4404–4412.

Tamer SAEM, Massoud SI. 2009. The effect of endotoxin produced by *Bacillus thuringiensis* (Bt) against *Meloidogyne incognita*. *Egyptian Journal of Natural Toxins* 6:83–93.

Thomas PD, Campbell MJ, Kejariwal A, Mi H, Karlak B, Daverman R, Narechania A. 2003. PANTHER: a library of protein families and subfamilies indexed by function. *Genome Research* 13:2129–2141.

Thorne L, Garduno F, Thompson T, Decker D, Zounes M, Wild M, Pollock TJ. 1986. Structural similarity between the lepidoptera and diptera-specific insecticidal endotoxin genes of *Bacillus thuringiensis* subsp. “*kurstaki*” and “*israelensis*”. *Journal of Bacteriology* 166:801–11.

Tsuchiya K, Kawamura I, Takahashi A, Nomura T, Kohda C, Mitsuyama M. 2005. Listeriolysin O-induced membrane permeation mediates persistent interleukin-6 production in CaCo-2 cells during *Listeria monocytogenes* infection *in vitro*. *Infection and Immunity* 73:3869–3877.

Tsuzuki K, Kimura K, Fujii N, Yokosawa N, Indoh T, Murakami T, Oguma K. 1990. Cloning and complete nucleotide sequence of the gene for the main component of hemagglutinin produced by *Clostridium botulinum* type C. *Infection and Immunity* 58:3173–3177.

Uemori A, Maeda M, Yasutake K, Ohgushi A, Kagoshima K, Mizuki E, Ohba M. 2007. Ubiquity of parasporin-1 producers in *Bacillus thuringiensis* natural populations of Japan. *Naturwissenschaften* 94:34–38.

Uemori A, Ohgushi A, Yasutake K, Maeda M, Mizuki E, Ohba M. 2008. Parasporin-1Ab, a novel *Bacillus thuringiensis* cytotoxin preferentially active on human cancer cells *in vitro*. *Anticancer Research* 28 1A:91–95.

Verma S, Miles D, Gianni L, Krop IE, Welslau M, Baselga J, Blackwell K. 2012. Trastuzumab emtansine for HER2-positive advanced breast cancer. *The New England Journal of Medicine* 367:1783–1791.

Witte K, Witte E, Sabat R, Wolk K. 2010. IL-28A, IL-28B, and IL-29: Promising cytokines with type I interferon-like properties. *Cytokine y Growth Factor Reviews* 21:237–251.

Wong LJ. 2012. *Biotecnología contra el cáncer*. Ediciones Instituto de Biotecnología. UANL pp 3-44.

Wong RSY, Mohamed SM, Nadarajah VD, Tengku IAT. 2010. Characterisation of the binding properties of *Bacillus thuringiensis* 18 toxin on leukaemic cells. *Journal of Experimental y Clinical Cancer Research* 29: 86–97.

Wu H, Jin Y, Wei J, Jin H, Sha D, Wu JY. 2005. Mode of action of taurine as a neuroprotector. *Brain Research* 1038:123–31.

Yamashita S, Akao T, Mizuki E, Saitoh H, Higuchi K, Park YS, Ohba M. 2000. Characterization of the anti-cancer-cell parasporal proteins of a *Bacillus thuringiensis*. *Canadian Journal of Microbiology* 47:913–919.

Yamashita S, Katayama H, Saitoh H, Akao T, Park YS, Mizuki E, Ito A. 2005. Typical three-domain Cry proteins of *Bacillus thuringiensis* strain A1462 exhibit cytotoxic activity on limited human cancer cells. *Journal of Biochemistry* 138:663–672.

Yasutake K, Binh ND, Kagoshima K, Uemori A, Ohgushi A, Maeda M, Ohba M. 2006. Occurrence of parasporin-producing *Bacillus thuringiensis* in Vietnam. *Canadian Journal of Microbiology* 52:365–372.

Yasutake K, Uemori A, Binh ND, Mizuki E, Ohba M. 2008. Identification of parasporin genes in Vietnamese isolates of *Bacillus thuringiensis*. *Zeitschrift Für Naturforschung* 63c:139–143

Zhong Y, Wang QJ, Li X, Yan Y, Backer JM, Chait BT, Heintz N, Yue Z. 2009. Distinct regulation of autophagic activity by Atg14L and Rubicon associated with Beclin 1-phosphatidylinositol 3-Kinase complex. *Nature Cell Biology* 11:468–476.

## RESÚMEN BIOGRÁFICO

Astrid Nalleli Espino Vázquez

Candidato para el Grado de

Doctor en Ciencias con Especialidad en Biotecnología

Tesis: “CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA DE PARASPORINAS EN CEPAS NATIVAS DE *Bacillus thuringiensis*”.

Campo de Estudio: Biotecnología aplicada en ciencias de la salud

Datos Personales: Nacida en Durango, Dgo. el 09 de Noviembre de 1984, hija de Susana Laurencia Vázquez Simental y Santos Guillermo Espino Ortíz.

Educación superior: Egresada en 2007 del Instituto de Villa Montemorelos con el grado de Licenciada en Biología, primer lugar en la generación. Egresada en 2010 del Instituto Tecnológico de Durango con el grado de Maestra en Ciencias en Ingeniería Bioquímica.

Premios y distinciones: Reconocimiento al mérito académico en 2006, otorgado por el Gobernador Constitucional del Estado de Durango. Premio Académico Biotecnología en 2010, otorgado el Instituto de Biotecnología, FCB UANL. Premio de investigación UANL 2011, otorgado por la Universidad Autónoma de Nuevo León.

Experiencia Profesional: Catedrática de la materia de Biología Molecular impartida en verano de 2013 a los grupos de Biología y Lic. en Biotecnología Genómica. Participación con instructora en ocho cursos teórico-prácticos en técnicas de biología molecular.