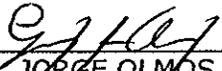
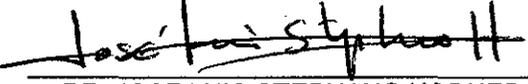
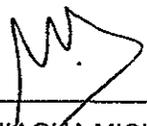


TESIS DEFENDIDA POR  
**GRETEL MENDOZA ALMANZA**  
Y APROBADA POR EL SIGUIENTE COMITÉ

  
\_\_\_\_\_  
DR. JORGE OLMOS SOTO  
*Director del Comité*

  
\_\_\_\_\_  
DRA. AMELIA PORTILLOS LOPEZ  
*Miembro del Comité*

  
\_\_\_\_\_  
DR. JOSE LUIS STEPHANO HORNEDO  
*Miembro del Comité*

  
\_\_\_\_\_  
DR. JOSE DE JESUS PANIAGUA MICHEL  
*Miembro del Comité*

  
\_\_\_\_\_  
DRA. RUFINA HERNANDEZ MARTINEZ  
*Coordinador del programa de  
posgrado en Ciencias de la  
Vida*

  
\_\_\_\_\_  
DR. DAVID HILARIO COVARRUBIAS ROSALES  
*Director de Estudios de Posgrado*

11 DE FEBRERO DEL 2011.

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y EDUCACIÓN  
SUPERIOR DE ENSENADA**



---

**PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS  
CON ORIENTACION EN BIOTECNOLOGÍA MARINA**

---

**Aislamiento y Caracterización de Toxinas Cry de *Bacillus thuringiensis* con Actividad Citócida sobre Células de Cáncer Cervicouterino *in vitro* e *in vivo*.**

**TESIS**

**Que para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para  
obtener el grado de DOCTOR EN CIENCIAS**

**PRESENTA  
GRETEL MENDOZA ALMANZA**

**Ensenada Baja California, México. Febrero del 2011.**

---

**RESUMEN** de la tesis que presenta **Gretel Mendoza Almanza**, presentada como requisito parcial para la obtención del grado de **DOCTOR EN CIENCIAS EN CIENCIAS DE LA VIDA** con orientación en **BIOTECNOLOGIA MARINA**. Ensenada, Baja California, México. 11 de Febrero del 2011.

**“Aislamiento y Caracterización de Toxinas Cry de *Bacillus thuringiensis* con actividad citócidica sobre células de Cáncer Cervicouterino *in vitro* e *in vivo*”**

Resumen aprobado por:



Dr. Jorge Olmos Soto

*Director de Tesis*

*Bacillus thuringiensis*, es una bacteria gram positiva, considerada cosmopolita. Formadora de esporas, que durante su síntesis, una mezcla de proteínas denominadas  $\delta$ -endotoxinas, conocidas también como proteínas Cry y Cyt, son depositadas como inclusiones intracelulares en un segundo compartimento ubicado en posición paraesporal. Estas inclusiones paraesporales, tienen un alto valor como proteínas insecticidas para su uso en aerosoles, y en cultivos transgénicos. Los genes *cry* son muy diversos. Su distribución en la naturaleza esta directamente relacionada con la distribución de diferentes especies de insectos. Por lo tanto, el territorio mexicano resulta atractivo para estudiar genes *cry*.

Recientemente se han encontrado algunas cepas de *B. thuringiensis* que producen proteínas de inclusión citotóxicas para cultivos celulares de mamíferos, incluyendo, líneas celulares de cáncer humano, a las que se ha agrupado en una nueva familia de endotoxinas denominado Parasporinas.

En este estudio se aislaron 28 cepas de *B. thuringiensis* de la región Ensenada-Tijuana, productoras de cristales, los cuales fueron caracterizados morfológicamente. Las proteínas Cry contenidas en los cristales fueron caracterizadas molecularmente y sometidas a un análisis de actividad tóxica tanto en larvas de insectos como en diferentes células de humano.

Se identificaron dos toxinas provenientes de las cepas 6-1 y 10-2 respectivamente con actividad citócidica importante en tumores inducidos en ratones *nude* con células HeLa originarias de células de cáncer cervicouterino con Virus del Papiloma Humano (VPH) tipo 18, que sumado al VPH 16 son los agentes causales del 70% de los casos de cancer cervicouterino en el mundo. Las toxina provenientes de 6-1 y 10-2, eliminan tumores inducidos de 0.8 a 1.4 cm a partir de una concentración de 10  $\mu\text{g/ml}$ , aparentemente por apoptosis.

**Palabras clave:** *Bacillus thuringiensis*, proteínas Cry, citotoxicidad en cultivos celulares, citotoxicidad en tumores inducidos.

**ABSTRACT** of the thesis presented by **Gretel Mendoza Almanza** as parcial requirement to obtain the **DOCTOR IN SCIENCES IN LIFE SCIENCES** degree, with orientation in **Marine Biotechnology**. Ensenada, Baja California, February 11, 2011.

**"Isolation and Characterization of Cry toxins from *Bacillus thuringiensis* with cytotoxic activity on Cervical Cancer Cells *in vitro* and *in vivo*".**

*Bacillus thuringiensis* is a gram-positive bacteria, considered cosmopolitan. Spore-forming, which during its synthesis, a mixture of proteins called  $\delta$ -endotoxins, also known as Cry and Cyt proteins are deposited as intracellular inclusions in a second compartment located in parasporal position.

These parasporal inclusions have a high value as insecticidal proteins for use in aerosols, and in transgenic crops. The cry genes are very diverse. Its distribution in nature is directly related to the distribution of different species of insects. Therefore, the Mexican territory is attractive to study genes *cry*.

Recently we have found some strains of *B. thuringiensis* that produce cytotoxic proteins for mammalian cell culture, including human cancer cell lines, which have been grouped in a new family of endotoxins called Parasporinas.

In this study, we isolated 28 strains of *B. thuringiensis* from Ensenada-Tijuana region, crystals producers. Which were characterized morphologically. The Cry proteins contained in the crystals were molecularly characterized and subjected to an analysis of toxic activity in both insect larvae and in different human cells.

We identified two toxins from strains 6-1 and 10-2 respectively with significant cytotoxic activity on induced tumors on nude mice with HeLa cells originating in cervical cancer cells with human papillomavirus (HPV) type 18, which together with HPV 16 are the causative agents of 70% of cervical cancer cases worldwide.

The toxin from 6-1 and 10-2, removed induced tumors between 0.8 to 1.4 cm of size from a concentration of 10 mg / ml, apparently by apoptosis.

**Keywords:** *Bacillus thuringiensis*, Cry protein, cytotoxicity on cell culture, cytotoxicity on induced tumors.

## DEDICATORIA

A mis dulces y adorados padres por hacer de nuestra su vida, por cuidar de nosotros, por empeñarse en ser siempre mejores en todas y cada una de las cosas que hacen, por enseñarme tantas cosas, por su confianza, apoyo y amor y por seguir aquí...en pie de lucha!!

A mi abuela, que aunque ya no esta con nosotros siempre será uno de mis pilares.

A mis entrañables hermanos Brenda e Irving por ser mis amigos, por permitirnos tener una familia unida y querida, por hacerme sentir orgullosa y por enorgullecerse de mí, por todo lo que hemos compartido y por lo que vendrá.

A mis tíos y primos por todo su apoyo y amor, por estar siempre pendientes de mí, por cuidarme y protegerme.

A mis amigos Brenda, Anahí, Lluvia, Fanny, Yamileth, Michelle y Ricardo por compartir la parte más divertida de la vida conmigo pero también por estar en las ocasiones más dramáticas. Por impulsarme a ser mejor siempre y no dejarme caer.

Los quiero y esta es mi forma de agradecerles su presencia y amor en mi vida.

---

## AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE) por el apoyo y becas otorgadas para la realización de mis estudios de Doctorado a través del Proyecto No. 202918 del CONACYT.

A mi Director de Tesis, Dr. Jorge Olmos Soto por haber dirigido este trabajo, por la confianza y los consejos.

A los Miembros de mi Comité de Tesis por el apoyo incondicional.

A la Dra. Leticia Rocha Zavaleta del Instituto de Investigaciones Biomédicas- UNAM. A la Dra. Alejandra Bravo del Instituto de Biotecnología – UNAM. Al Dr. Stephano por brindarme desinteresadamente un espacio para desarrollar este trabajo, por sus consejos y por su dedicación a la investigación que es fuente de inspiración.

A la M. en C. María Cecilia Aguilar Zacarías del Instituto de Investigaciones Biomédicas - UNAM por el entusiasmo y la entrega en este proyecto, por confiar y creer en mí y por hacer mis días en el bioterio menos aterradores.

A la Dra. Rosa María Ribas de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas por aceptar colaborar con nosotros.

---

Al Ingeniero Israel Gradilla del Centro de Ciencias de la Materia Condensada de la UNAM, a la M. en C. Miriam Poumian del Departamento de Ecología Marina – CICESE y a la M. en C. Verónica Alcántara de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas por el apoyo técnico brindado.

A mis compañeros de Laboratorio Abigail, Abelardo, Efraín, Giuly y Karla por sonreír con mis logros y alegrías y por animarme y apoyarme en los momentos difíciles en este largo camino que juntos recorrimos.

A la M. en C. Gissel Tinoco porque gracias a ella tuve mi primera experiencia en el campo laboral.

A la Dra. Carmen Paniagua por confiar en mí y darme la oportunidad de trabajar en un momento difícil para mí.

Al Dr. Miguel Angel del Rfo por su paciencia y apoyo.

A toda mis compañeros del CICESE, de la UNAM y del IPN que tuve el placer y el honor de conocer y por quienes las alegrías siempre fueron más en este venturoso camino.

*La ciencia es orgullosa por lo mucho que ha aprendido. la sabiduría es humilde porque no sabe más.*

*William Cowper (1731-1800)*

*Poeta británico.*

---

## CONTENIDO

	Página
<b>RESUMEN EN ESPAÑOL</b>	i
<b>RESUMEN EN INGLES</b>	ii
<b>DEDICATORIA</b>	iii
<b>AGRADECIMIENTOS</b>	iv
<b>CONTENIDO</b>	vi
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	x
<b>LISTA DE TABLAS</b>	xx
<b>I. INTRODUCCION</b> .....	1
<b>II. ANTECEDENTES</b> .....	4
II.I. Cáncer.....	4
II.I.I Cáncer Cervicouterino (Cacu).....	5
II.I.IA. Ciclo de Replicación del VPH.....	7
II.I.IB. Patogénesis.....	9
II.II. Cultivo Celular .....	11
II.III. p53.....	12
II.IV. Rb.....	13
II.V. <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	15
II.V.I Generalidades de <i>B. thuringiensis</i> .....	16
II.V.II. Proteínas Cry y Cyt.....	17
II.V.II.A. Síntesis de Proteínas Cry en <i>B. thuringiensis</i> .....	19
II.V.II.B. Mecanismo de acción de proteínas Cry en insectos.....	21
II.V.III. Parasporinas.....	25
<b>III. JUSTIFICACION</b> .....	30
<b>IV. OBJETIVOS</b> .....	32
<b>V. MATERIALES Y METODOS</b> .....	33
V.I. <b>Ensayos <i>in Vitro</i></b> .....	33
V.IA.I Aislamiento de cepas de <i>B. thuringiensis</i> .....	34
V.IA.II. Cultivo de cepas de <i>B. thuringiensis</i> .....	35
V.IA.III. Cosecha de <i>B. thuringiensis</i> .....	35
V.IA.IV. Identificación de Cristales por Microscopía Electrónica de Barrido.....	36
V.IA.V. Solubilización de Cristales de <i>B. thuringiensis</i> .....	36
V.IA.VI. Activación de la Protoxina Cry por acción de proteasas en los extremos C-terminal y N-terminal.....	37

## CONTENIDO (continuación)

	Página	
V.IA.VII.	Electroforesis de Proteínas en geles de poliacrilamida..	38
V.IA.VIII.	Electroforesis de Proteínas totales de cepas aisladas de <i>B. thuringiensis</i> .....	38
V.IA.IX	Extracción de ADN total.....	39
V.IA.X	Caracterización molecular por PCR de genes <i>cry</i> y <i>cyt</i> de <i>B. thuringiensis</i> .....	40
V.IA.XI.	Identificación de proteínas a través de la Espectrometría de Masas de Alta Resolución LC-MS/MS.....	42
V.IB.I.	Efecto hemolítico de toxinas de <i>B. thuringiensis</i> sobre eritrocitos humanos.....	42
V.IB.II.	Condiciones de crecimiento de las líneas celulares de eritrocitos humanos.....	43
V.IB.III.	Determinación de la relación entre el número de células metabólicamente activas y el formazán producido.....	44
V.IB.IV.	Efecto de las toxinas Cry y Cyt de <i>B. thuringiensis</i> en células cancerígenas en cultivo.....	44
V.IB.V.	Ensayo de viabilidad celular .....	45
V.II.	<b>Ensayos <i>in vivo</i></b> .....	47
V.IIA.I.	Inducción de tumores en ratones <i>nu/nu</i> .....	48
V.IIA.II.	Estudio de citotoxicidad de toxinas Cry en ratones Balb/c.....	49
V.IIA.III.	Citotoxicidad de toxinas Cry sobre tumores inducidos en modelos murinos <i>nude (nu/nu)</i> .....	50
V.IIB.I.	Actividad insecticida de toxinas Cry.....	53
<b>VI.</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>55</b>
VI.IA.I.	Aislamiento de cepas de <i>B. thuringiensis</i> .....	55
VI.AI.II.	Cultivo de cepas de <i>B. thuringiensis</i> .....	60
VI.IA.III.	Caracterización de Cristales por Microscopía Electrónica de Barrido.....	62
VI.IA.IV.	Electroforesis de proteínas totales de cepas de <i>B. thuringiensis</i> aisladas de la region Ensenada – Tijuana.....	65
VI.IA.V.	Condiciones <i>in vitro</i> de solubilización y activación para proteínas Cry de <i>B. thuringiensis</i> .....	65
VI.IA.VI.	Solubilización y confirmación de la activación de proteínas Cry en geles de poliacrilamida.....	68
VI.IA.VII.	Caracterización molecular por PCR de genes <i>cry</i> y <i>cyt</i> de <i>B. thuringiensis</i> .....	69

## CONTENIDO (continuación)

	Página
VI.IA.VIII. Identificación de proteínas a través de la Espectrometría de Masas de Alta Resolución LC-MS/MS.....	71
V.IB.I. Efecto de las toxinas de <i>B. thuringiensis</i> sobre eritrocitos humanos.....	73
VI.IB.II. Efecto anticancerígeno de toxinas Cry de <i>B. thuringiensis</i> en líneas celulares.....	75
VI.IB.IIA. Cultivo Celular.....	75
VI.IB.IIB. Determinación de la relación entre el número de células metabólicamente activas y el formazán producido .....	77
VI.IB.IIC. Efecto anticancerígeno de toxinas Cry en <i>B. thuringiensis</i> en líneas celulares HeLa, HaCat, SiHa y MCF7.....	78
VI.IB.IID. Prueba de TUNEL.....	91
VI.II. Ensayos <i>in vivo</i> .....	93
VI.IIA. Inducción de tumores en ratones <i>nu / nu</i> .....	93
VI.IIB. Citotoxicidad de toxinas Cry en ratones Balb/c.....	94
VI.IIBa. Exposición de ratones <i>Balb/c</i> a diferentes toxinas Cry...	94
VI.IIC. Citotoxicidad de toxinas Cry sobre tumores inducidos en modelos murinos <i>nude (nu/nu)</i> .....	95
VI.IICa. Exposición de ratones <i>nude</i> a toxinas Cry de la cepa 6-1.....	95
VI.IICb. Exposición de ratones <i>nude</i> a toxinas Cry de la cepa 10-2.....	99
VI.IID. Exposición de ratones <i>nude</i> a toxinas Cry y su recuperación .....	102
VI.IIDa. Exposición de ratones <i>nude</i> a toxinas Cry de la cepa 6-1.....	102
VI.IIDb. Exposición de ratones <i>nude</i> a toxinas Cry de la cepa 10-2.....	105
VI.IIB. Ensayos Bionsecticidas.....	107
<b>VII. DISCUSIONES.....</b>	<b>109</b>
VII.I. Generalidades.....	109
VII.II. Genes <i>cry</i> .....	109
VII.III. Cultivo y características de cepas de <i>B. thuringiensis</i> ...	112
VII.IV. Aislamiento y purificación de Proteínas Cry.....	114
VII.V. Solubilización y activación de Proteínas Cry.....	115
VII.VI. Actividad Insecticida de Proteínas Cry.....	116
VII.VII. Actividad citócida de las Proteínas Cry en células de cáncer <i>in vitro</i> .....	118

**CONTENIDO (continuación)**

	<b>Página</b>
VII.VIII.      Actividad citócida de las Proteínas Cry en células de cáncer <i>in vivo</i> .....	122
<b>VIII.   CONCLUSIONES</b> .....	125
<b>IX.    LITERATURA CITADA</b> .....	127
<b>    APENDICE</b>	

---

Figura	LISTA DE FIGURAS	Página
1	Diagrama que muestra el progreso de célula madre a célula de cáncer. La recurrencia de cáncer y la poca efectividad de las terapias contra el cáncer podría explicarse por las mutaciones en células totalmente indiferenciadas conocidas como células madre e incluso en células menos diferenciadas como las multipotenciales, células tejido-específicas, células progenitoras ó células maduras. Ponnusamy y Batra 2008.	5
2	Esquema de mapa genómico de VPH tipo 16. Muñoz <i>et al.</i> 2003.	6
3	Etapas del ciclo de vida de VPH durante su infección. a) Representación esquemática de piel, donde se muestra el patrón de expresión genética de HPV 16 y la migración de las células infectadas hacia la superficie celular. Después de la infección (como se representa en este caso, a través de una cortada) el genoma viral se mantiene de forma episomal con un bajo número de copias. Durante la diferenciación epitelial, el promotor p97 dirige la expresión de los genes E6 y E7 (en rojo) necesarios para entrar a la fase S. El promotor p670 se activa en las capas epiteliales superiores y la replicación de proteínas virales como E1, E2, E4, E5 se incrementa (en verde), facilitando la amplificación del genoma viral (en azul). Los cambios en el deslizamiento del ARNm permiten a E4 sobrevivir dentro de las capas epiteliales superiores donde la cápside viral se encuentra (en amarillo). b) Muestra que en las células epiteliales del estrato inferior son competentes para la fase S. La amplificación del genoma viral empieza en estas células pero cesa una vez que las células pierden su capacidad para expresar proteínas de fase S. Además el genoma viral amplificado puede ser detectado en las capas epiteliales superiores. Doorbar, 2005.	8
4	Cambios en el ciclo de vida del VPH durante el desarrollo del cáncer cervical. Durante la progresión de Neoplasia Cervical Intraepitelial de grado 1 (NCI 1) a grado 3 (NCI 3) la expresión de las diversas proteínas del HPV cambia y las células epiteliales pierden su genotipo cambiándolo por el del genoma insertado por el virus. Doorbar, 2005.	9

## LISTA DE FIGURAS (continuación)

Figura		Página
5	p53. Las señales de estrés convergen en p53, y activa varias cinasas y/o acetiltransferasas, fosforilando o acetilando a p53. Las modificaciones postraduccionales resultan en la estabilización y activación de p53 en el núcleo, donde interactúa con secuencias específicas en el ADN que son sitios de unión blanco. Esta unión desencadena diversas respuestas celulares como apoptosis, arresto del ciclo celular o reparación del ADN dañado. Cuando la cadena de p53 no es tan larga como se requiere, es ubiquitinizada por MDM2, moviéndose fuera del núcleo para ser degradada por el proteosoma 26S. p53 puede actuar fuera del núcleo uniéndose a proteínas anti-apoptóticas como la BCL2 para inducir apoptosis. Ohnishi <i>et al.</i> 2005.	13
6	Rb. El Retinoblastoma (RB) y las proteínas relacionadas a Rb, se unen a la familia de factores de transcripción E2F para inhibir su actividad. Las señales mitogénicas, estimulan la transcripción de ciclina D y permiten el ensamble de complejos enzimáticos como las cinasas dependientes de ciclina CDK4 o CDK6. Estas últimas, junto con el complejo CiclinaE - CDK2, fosforilan a Rb en diversos sitios, causando la disociación del complejo Rb-E2F, liberando la inhibición de E2F por Rb; permitiendo así la transcripción de genes mediados por E2F requeridos para la progresión a a fase S. Rb es importante en la apoptosis y en la diferenciación. Ying <i>et al.</i> 2006	15
7	<i>Bacillus thuringiensis</i> . La figura de la izquierda muestra la fase vegetativa de la bacteria, dentro de ella se observan esporas y estructuras paraesporales visto en microscopio de contraste de fases. La imagen de la derecha muestra cristales bipiramidales de <i>Bacillus thuringiensis</i> , observados con microscopio electrónico de barrido. Buckman, 2006.	17
8	Dominios típicos de proteínas Cry.	18
9	Estadios de la formación del cristal y la espora en <i>B. thuringiensis</i> . La diferenciación de <i>B. thuringiensis</i> a espora se divide en 7 estadios, a partir del tercer estadio se empieza a sintetizar el cristal proteínáceo en el compartimento denominado célula madre en posición paraesporal. En el estadio 7 se sintetizan las enzimas líticas que liberan a las esporas y a los cristales. Bechtel y Bulla, 1976.	20

---

## LISTA DE FIGURAS (continuación)

Figura		Página
10	Representación esquemática de los 4 tipos de receptores reportados para Cry1A en lepidópteros. CDR: Caderinas, APN: Glicofosfatidil-inositol anclado a aminopeptidasa-N ALP: Glicofosfatidil-inositol anclado a fosfatasa alcalina, GRC: glicoconjugados. Bravo <i>et al.</i> 2007.	22
11	Modelo de acción de las proteínas Cry. La unión univalente del monómero de toxina Cry a BT-R inicia la progresión a muerte celular por desencadenar una cascada de señales en donde el primer paso es mediar la exocitosis de receptores BT-R que están en vesículas intracelulares, hacia la membrana citoplásmica. El incremento en el despliegue de receptores BT-R en la superficie celular incrementa por lo tanto el número de monómeros de toxina que reconocen receptores, amplificando la señal original. La PKA modifica eventos bioquímicos que culminan en la muerte celular. Zhang <i>et al.</i> 2008.	24
12	Diagrama de flujo de los ensayos que se realizaron <i>in vitro</i> .	33
13	Ensayo por triplicado de citotoxicidad en microplacas de 96 pozos. Cada pozo contiene 50000 células previamente adheridas a la superficie de la placa, a cada pozo se le adicionan 100 $\mu$ l de la concentración de la toxina previamente activada, diluida en medio de cultivo celular incompleto. Las concentraciones de toxina van desde los 5 $\mu$ g hasta 0.004 $\mu$ g y la última columna se utiliza como control negativo: solo células y medio.	45
14	Diagrama de flujo del trabajo experimental realizado <i>in vivo</i> .	47
15	Imagen de ratones Balb/c atímicos con mutaciones en el gen <i>nude</i> ( <i>nu/nu</i> ). Se muestran fenotípicamente desnudos.	48
16	Imagen de un ratón inmunocompetente cepa Balb/c fenotípicamente con pelo.	50
17	Bioensayo de actividad insecticida de toxinas de <i>B. thuringiensis</i> . Crecimiento de larvas de <i>Manduca sexta</i> en cajas petri sobre dieta artificial. Del lado derecho de la figura se muestra placas de 24 pozos con dieta artificial-agar con la toxina ya embebida en él. En cada uno de ellos se colocó la larva para realizar los bioensayos.	54

## LISTA DE FIGURAS (continuación)

Figura		Página
18	Siembra de cepas de <i>B. thuringiensis</i> en medio sólido. Cepas de <i>B. thuringiensis</i> seleccionadas de la región Ensenada-Tijuana en medio de cultivo SP-agar, 96 h de incubación a 30°C.	55
19	Crecimiento colonial de diferentes cepas de <i>B. thuringiensis</i> en medio Nutrient Broth. A) <i>B. thuringiensis</i> var. <i>aizawai</i> . B) <i>B. thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> .	56
20	Cultivo de <i>B. thuringiensis</i> en medio SP líquido. En esta fotografía se muestran las diferentes coloraciones que las cepas de <i>B. thuringiensis</i> pueden tener. Figura A-E. Diferentes cepas de Bt cultivadas en medio SP durante 96 h a 30 °C.	56
21	Morfología celular de <i>B. thuringiensis</i> var. <i>aizawai</i> al microscopio óptico 100x. Medio utilizado: SP, durante 96h a 30 °C con agitación de 275 rpm. Tinción Verde de malaquita. Figura A, en luz visible y la figura B en contraste de fases. Los cristales y la fase vegetativa de la bacteria se observan en la misma tonalidad - rosa, en luz visible y verde en contraste de fases y las esporas - verdes en luz visible y amarillas en contraste de fases. CFV- Células en fase vegetativa. E- Esporas. C- Cristales	58
22	Morfología celular de <i>B. thuringiensis</i> 6-1 al microscopio óptico 100x. Medio utilizado: SP, durante 96 h a 30 °C con agitación de 275 rpm. Tinción Verde de malaquita. Figura A, en luz visible y la figura B en contraste de fases. Los cristales y la fase vegetativa de la bacteria se observan en la misma tonalidad - rosa, en luz visible y verde en contraste de fases y las esporas - verdes en luz visible y amarillas en contraste de fases. CFV- Células en fase vegetativa. E- Esporas. C- Cristales.	59
23	Gráfica de porcentaje de esporulación de <i>Bt</i> var. <i>aizawai</i> en medio Luria Bertani LB. Previa inoculación del medio, la cepa fue sometida a calentamiento durante 10 min. a 65° y 80°C. El control (s/c), consistió en la inoculación de medio con una cepa que no había sido sometida a calentamiento. Se realizaron diluciones de cada tratamiento y sembraron las diluciones $10^{-4}$ , $10^{-6}$ , $10^{-8}$ y $10^{-10}$ Las lecturas de la curva se realizaron a diferentes tiempos de incubación: 6h, 9h, 12h, 24h. La incubación fue a 37°C.	60

## LISTA DE FIGURAS (continuación)

Figura		Página
24	Gráfica de porcentaje de esporulación de <i>Bt var. aizawai</i> en otros medios. Figura a, medio utilizado: SP. Figura b, medio utilizado: Shaeffer. Previa inoculación del medio, la cepa fue sometida a calentamiento durante 10 min. a 65° y 80°C. El control (s/c), consistió en la inoculación de medio con una cepa que no había sido sometida a calentamiento. Se realizaron diluciones de cada tratamiento y sembraron las diluciones 10 <sup>-4</sup> , 10 <sup>-6</sup> , 10 <sup>-8</sup> y 10 <sup>-10</sup> . Las lecturas de la curva se realizaron a diferentes tiempos de incubación: 6h, 9h, 12h, 24h. La incubación fue a 37°C.	61
25	Imágenes observadas por MEB de las diferentes morfologías de los cristales de las cepas de <i>Bt</i> aisladas de la región Ensenada-Tijuana. Imagen a-d, Muestra diferentes morfologías de los cristales de <i>Bt</i> CC- cristal cúbico. CI- cristal irregular. CE- cristal esférico. CO- cristal ovoide. E- espora.	62
26	Imágenes observadas por MEB de las diferentes morfologías de los cristales de las cepas de <i>Bt</i> aisladas de la región Ensenada-Tijuana. Imagen e-j, Muestra diferentes morfologías de los cristales de <i>B. thuringiensis</i> , CC- cristal cúbico. CI- cristal irregular. CE- cristal esférico. CO- cristal ovoide. E- espora. C- célula vegetativa. CB- cristal bipiramidal.	63
27	Pérfil de proteínas en SDS-PAGE al 10%. Carril 1) MPM, carril 2) <i>B. thuringiensis var. aizawai</i> , carril 3) <i>B. thuringiensis var. kurstaki</i> , carril 4) Cry3A, carril 5) Cry4A, carril 6) Cry1Ab, carril 7) M1#4, carril 8) M1#8, carril 9) M2#2, carril 10) M2#7, carril 11) 6-1, carril 12) 6-4, carril 13) 10-2. Tinción con Azul de Coomassie.	65
28	Proteínas activadas de <i>B. thuringiensis</i> . Corrimiento en SDS-PAGE al 7.5% de cepas aisladas de <i>Bt</i> en la región Ensenada- Tijuana. a) carril, 1) MPM; carril 2) <i>B.thuringiensis var. aizawai</i> ; carril 3) <i>B.thuringiensis var. kurstaki</i> ; carril 4) Cry3A; carril 5) Cry4A. B. 1) MPM; carril 2) M2#7; carril 3) 1-2; carril 4) 6-1; carril 5) 6-4; carril 6) vacío; carril ;7) 7-2; carril 8) 10-2. Tinción con Azul de Coomassie.	68

## LISTA DE FIGURAS (continuación)

Figura		Página
29	Gráfica del porcentaje de presencia de genes <i>cry</i> en Ensenada-Tijuana.	70
30	Amplificación de gen <i>cry</i> 8. Los productos de la amplificación se observaron en gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio. Carril 1 y 20 Escalera de DNA. a), cepas amplificadas HD916, M2#2, 1-2. b) cepas amplificadas, 8-4.	70
31	Ensayo de actividad hemolítica de toxinas Cry. a) se muestra la línea de controles. b) se muestra el ensayo de actividad hemolítica montado en una placa de 96 pocillos, de cada toxina se probaron 3 concentraciones por duplicado (5µg/ml, 2,5µg/ml y 1.25µg/ml). A,B-1,2,3: <b>M1#7</b> ; A,B-4,5,6: <b>M1#8</b> ; A,B-7,8,9: <b>HD1</b> ; A,B-10,11,12: <b>8-4</b> . C,D-1,2,3: <b>M2#2</b> ; C,D-4,5,6: <b>M2#7</b> ; C,D-7,8,9: <b>7-3</b> ; C,D-10,11,12: <b>4-2</b> ; E-F-1,2,3: <b>19-1</b> , E,F-4,5,6: <b>9-2</b> ; E,F-7,8,9: <b>10-2</b> ; E,F-10,11,12: <b>12-2</b> ; G,H-1,2,3: <b>14-1</b> ; G,H-4,5,6: <b>18-2</b> ; G,H-7,8,9: <b>18-5</b> ; G,H-10,11,12: <b>17-3</b> .	73
32	Imágenes de las líneas celulares empleadas en los ensayos de citotoxicidad de proteínas provenientes de cepas de <i>B. thuringiensis</i> nativas de la región Ensenada-Tijuana. a) HeLa. b) SiHa. c) MCF7. d) HaCat. Imágenes por contraste de fases.	76
33	Curva tipo de líneas celulares HeLa y HaCat. a) Gráfica que relaciona el número de células HeLa viables con la absorbancia. b) Gráfica que relaciona el número de células HaCat viables con la absorbancia.	77
34	Gráfica de controles de citotoxicidad. a) muestra el comportamiento sobre células HaCat. La gráfica b) muestra el comportamiento de la mezcla utilizada para activar las toxinas sobre células HeLa.	78
35	Imágenes de un cultivo celular donde se ha realizado el ensayo colorimétrico por MTT para medir viabilidad celular. a) visto a 10x. b) visto a 40x. Las células teñidas en azul son metabólicamente activas, las no teñidas son células no viables.	79

## LISTA DE FIGURAS (continuación)

Figura		Página
36	Ensayo de citotoxicidad de proteínas Cry en cultivos celulares de HaCat. Columna A) Tiempo 0, Columna B) 12h, Columna C) 18h. Fila 1) Control (sin toxina). Fila 2) <i>Bt</i> cepa 6-1 [2µg/ml]. Fila 3) toxina de cepa de 10-2 [2µg/ml]. Fila 4) toxina de cepa M1#4 concentración de [2µg/ml]. Imágenes en microscopio invertido A) 10x contraste de fases. B) y C) 40x contraste de fases.	80
37	Ensayo de citotoxicidad de proteínas Cry en cultivos celulares de HeLa. Columna A) Tiempo 0, Columna B) 12h, Columna C) 18h. Fila 1) Control (sin toxina). Fila 2) <i>Bt</i> toxinas de la cepa 6-1 [2µg/ml]. Fila 3) toxina de la cepa de 10-2 [2µg/ml]. Fila 4) toxina de cepa M1#4 concentración de [2µg/ml]. Imágenes en microscopio invertido A) 10x contraste de fases. B) y C) 40x contraste de fases.	81
38	Ensayo de citotoxicidad de proteínas Cry en cultivos celulares de SiHa. Columna A) Tiempo 0, Columna B) 12h, Columna C) 18h. Fila 1) Control (sin toxina). Fila 2) <i>Bt</i> toxina de la cepa 6-1 [2µg/ml]. Fila 3) toxina de la cepa de 10-2 [2µg/ml]. Fila 4) toxina de la cepa M1#4 concentración de [2µg/ml]. Imágenes en microscopio invertido A) 10x contraste de fases. B) y C) 40x contraste de fases.	82
39	Ensayo de citotoxicidad de proteínas Cry en cultivos celulares de MCF7. Columna A) Tiempo 0, Columna B) 12h, Columna C) 18h. Fila 1) Control (sin toxina). Fila 2) <i>Bt</i> toxina de la cepa 6-1 [2µg/ml]. Fila 3) toxina de la cepa de 10-2 [2µg/ml]. Fila 4) toxina de la cepa M1#4 concentración de [2µg/ml]. Imágenes en microscopio invertido A) 10x contraste de fases. B) y C) 40x contraste de fases.	83
40	Toxicidad de <i>Cry</i> 6-1 sobre diversos cultivos celulares	84
41	Toxicidad de <i>Cry</i> 10-2 sobre diversos cultivos celulares	85
42	Toxicidad de <i>Cry aizawai</i> sobre diversos cultivos celulares	85
43	Toxicidad de <i>Cry</i> 1Ab sobre diversos cultivos celulares	86
44	Toxicidad de <i>Cry</i> 3A sobre diversos cultivos celulares	86

## LISTA DE FIGURAS (continuación)

Figura		Página
45	Toxicidad de <i>Cry 4A</i> sobre diversos cultivos celulares	87
46	Toxicidad de <i>Cry M1#4</i> sobre diversos cultivos celulares	87
47	Toxicidad de <i>Cry M1#7</i> sobre diversos cultivos celulares	88
48	Toxicidad de <i>Cry M2#2</i> sobre diversos cultivos celulares	88
49	Toxicidad de <i>Cry M2#7</i> sobre diversos cultivos celulares	89
50	Toxicidad de <i>Cry 1-2</i> sobre diversos cultivos celulares	89
51	Toxicidad de <i>Cry 6-4</i> sobre diversos cultivos celulares	90
52	Toxicidad de <i>Cry 8-3</i> sobre diversos cultivos celulares	90
53	Toxicidad de <i>Cry 8-4</i> sobre diversos cultivos celulares	91
54	Imágenes de células HeLa tratadas con reactivos para reacción de TUNEL. Figuras a y b, Controles positivos: Células HeLa + 5µg/ml DNAsa + <b>Deoxinucleotidil transferasa (enzima de TUNEL) + Marcador de TUNEL {kit de TUNEL}</b> . Figuras c y d, Controles negativos: Células HeLa + <b>Marcador de TUNEL</b> . Figura e, Problema: Células HeLa + 5µg/ml de toxina proveniente de la cepa 6-1 + <b>kit de TUNEL</b> . Figura f, Problema: Células HeLa + 5µg/ml de toxina proveniente de la cepa 10-2 + <b>kit de TUNEL</b> .	92
55	Seguimiento del crecimiento tumoral inducido en ratones <i>nude</i> . Imagen a) Inoculación celular. b) Observación al 4º día de crecimiento tumoral. c) Día 15 de crecimiento tumoral. d) Día 20 Inoculación de la toxina sobre el tumor.	93
56	Exposición a las diferentes toxinas <i>Cry</i> de <i>B. thuringiensis</i> en diferentes concentraciones en ratones inmunocompetentes Balb/c.	94

## LISTA DE FIGURAS (continuación)

Figura		Página
57	Control negativo para la toxina de la cepa 6-1 y 10-2. Inoculación sobre el tumor durante 5 días consecutivos de SD-IBT + Tripsina + PMSF. a) Día de inoculación de la primera dosis. b) Sexto día, sacrificio.	95
58	Imágenes de ratón <i>nude</i> inoculado con 10µg/ml de la toxina de la cepa 6-1 cada 24h durante 5 días. a) Tumor al día de la inoculación. b) Tumor al segundo día de la inoculación. c) Tumor al cuarto día de la inoculación. d) Tumor al sexto día, sacrificio.	96
59	Imágenes de ratón <i>nude</i> inoculado con 30µg/ml de la toxina de la cepa 6-1 cada 24h durante 5 días. a) Tumor al día de la inoculación. b) Tumor al segundo día de la inoculación. c) Tumor al cuarto día de la inoculación. d) Tumor al sexto día, sacrificio.	97
60	Imágenes de ratón <i>nude</i> inoculado con 50µg/ml de la toxina de la cepa 6-1 cada 24h durante 5 días. a) Tumor al día de la inoculación. b) Tumor al segundo día de la inoculación. c) Tumor al cuarto día de la inoculación. d) Tumor al sexto día, sacrificio.	98
61	Imágenes de ratón <i>nude</i> inoculado con 10 µg/ml de la toxina de la cepa 10-2 cada 24 h durante 5 días. a) Tumor al día de la inoculación. b) Tumor al segundo día de la inoculación. c) Tumor al cuarto día de la inoculación. d) Tumor al sexto día, sacrificio.	99
62	Imágenes de ratón <i>nude</i> inoculado con 30µg/ml de la toxina de la cepa 10-2 cada 24 h durante 5 días. a) Tumor al día de la inoculación. b) Tumor al segundo día de la inoculación. c) Tumor al cuarto día de la inoculación. d) Tumor al sexto día, sacrificio.	100
63	Imágenes de ratón <i>nude</i> inoculado con 50 µg/ml de la toxina de la cepa 10-2 cada 24 h durante 5 días. a) Tumor al día de la inoculación. b) Tumor al segundo día de la inoculación. c) Tumor al cuarto día de la inoculación. d) Tumor al sexto día, sacrificio.	101

## LISTA DE FIGURAS (continuación)

Figura		Página
64	Imágenes de ratón <i>nude</i> inoculado con 10 µg/ml de toxina de la cepa 6-1 cada 24 h durante 5 días. Período de recuperación hasta 8 días postinoculación de toxina sobre el tumor. a) Tumor al día de la inoculación. b) 2o. día de recuperación. c) 3er. día de recuperación. d) recuperación. e) 8o. día de recuperación, regresión del tumor, día de sacrificio.	102
65	Imágenes de ratón <i>nude</i> inoculado con 30 µg/ml de toxina de la cepa 6-1 cada 24 h durante 5 días. Período de recuperación de 23 días postinoculación de toxina sobre el tumor a) Tumor al día de la inoculación. b) 1er día de recuperación. c) 5o. día de recuperación. d) 8vo. día de recuperación. e) 12o. día de recuperación. f) 23o. día de recuperación, día de sacrificio.	103
66	Imágenes de ratón <i>nude</i> inoculado con 10 µg/ml de toxina de la cepa 10-2 cada 24 h durante 5 días. Período de recuperación hasta 8 días postinoculación de toxina sobre el	104
67	Imágenes de ratón <i>nude</i> inoculado con 10µg/ml de toxina de la cepa 10-2 cada 24h durante 5 días. Período de recuperación de 23 días postinoculación de toxina sobre el tumor. a) Tumor al día de la inoculación. b) 2o. día de recuperación. c) 5o. día de recuperación. d) 11o. día de recuperación. e) 15o. día de recuperación. f) 23o. día de recuperación, día de sacrificio.	105
68	Imágenes de ratón <i>nude</i> inoculado con 30µg/ml de toxina de la cepa 10-2 cada 24h durante 5 días. Período de recuperación de 23 días postinoculación de toxina sobre el tumor. a) Tumor al día de la inoculación. b) 2o. día de recuperación. c) 5o. día de recuperación. d) 8vo. día de recuperación. e) 17o. día de recuperación. f) 23o. día de recuperación , día de sacrificio.	106
69	Imagen comparativa de órganos de ratones <i>nude</i> expuestos a toxinas de Bt + período de recuperación. La imagen de la izquierda corresponde al bazo e hígado de ratón expuesto a la toxina de la cepa 6-1. La imagen de la derecha corresponde al bazo e hígado de ratón expuesto a la toxina de la cepa 10-2.	107

## I. INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas, el cáncer ha llamado la atención de la población mundial de manera preocupante debido al número de defunciones que esta enfermedad ha cobrado, según datos de la Organización Mundial de la Salud, durante el 2007 se le atribuyeron 7.9 millones de defunciones, equivalente al 13% de las defunciones mundiales, de las cuales aproximadamente el 72% se registraron en países en vías de desarrollo, siendo el cáncer cervicouterino una de las principales causas de muerte en mujeres, teniendo esta como principal agente etiológico al Virus del Papiloma Humano (VPH) (Muderspach *et al.* 2000). En México, el Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI) a través del Sistema de Estadísticas Vitales 2006, reportó 494,471 defunciones, de los cuales el 55.4% sucedió en hombres y el 44.6% en mujeres, siendo la tercer causa de muerte el cáncer (63,888 personas equivalente al 12%).

Sin embargo, la existencia del cáncer data desde el año 3000 a.C., según el documento médico más antiguo llamado el papiro de Edwin Smith, donde se describen 8 casos de cáncer de mama. Desde entonces existen registros de los avances en el conocimiento de esta enfermedad. Por ejemplo, en el año 400 a.C., Hipócrates acuñó las palabras carcinos y carcinoma para describir los tumores, ahí tuvo su origen la palabra cáncer para referirse a la enfermedad. En 1779, se fundó el primer Hospital de Cáncer en Reims, Francia. En 1829 el ginecólogo Joseph Claude Anthelm acuñó el término metástasis. En 1915 en la Universidad de Tokio por primera vez se logró inducir con alquitrán cáncer en la piel de conejos, esto sentó bases para muchas investigaciones que, hasta la fecha se desarrollan sobre mecanismos de evolución del cáncer. En 1976 Harold E. Varmus y J. Michael Bishop, descubren el primer oncogen celular, *src*. En 1986 Stephen H. Friend aisló el primer gen supresor de tumores, el retinoblastoma (Rb). En 1999, ocurre la primera transformación exitosa de células epiteliales y de fibroblastos humanos a cultivo de células tumorales (Mokdad *et al.* 2004).

Así pues, los avances en el conocimiento del cáncer han llevado a desarrollar este concepto involucrando varios factores. Cáncer es el crecimiento y propagación descontrolado de las células causado por la acumulación de múltiples alteraciones

---

genéticas y epigenéticas como son las mutaciones en los genes supresores de tumores, en los genes encargados de la reparación del ADN, en las proteínas reguladoras del ciclo celular, en las moléculas de adhesión celular, en los factores de crecimiento y receptores, que están involucrados en todo el curso de la transformación de una célula normal a una célula cancerígena (Mattar *et al.* 2004).

Diversos grupos de investigación dedicados al estudio del cáncer, han encontrado que las alteraciones genéticas y/o epigenéticas que dan lugar a esta enfermedad, ocurren en células madre multipotenciales, llamadas células madre del cáncer o células progenitoras del cáncer, cuya progenie da lugar a una masa celular maligna, totalmente diferenciada. Estas células progenitoras de cáncer, tienen un papel clave en la iniciación del cáncer y/o su progresión a estados metastásicos y en el cáncer recurrente, porque tienen la capacidad de adquirir un fenotipo migratorio durante la transición mesenquimal-epitelial que les confiere la capacidad de migrar a sitios distantes (Mimeault *et al.* 2007).

Se han logrado grandes avances en el tratamiento de pacientes con cáncer, los métodos de diagnóstico y pronóstico, las remociones quirúrgicas de tumores, las terapias hormonales, radioterapias y quimioterapias, solas o en combinación, son el tipo de tratamientos a los que más se recurre en pacientes diagnosticados con diversos tipos de cáncer como, leucemias, y tumores malignos sólidos, entre ellos de piel, cabeza, cuello, cerebro, hígado, riñón, próstata, mama, ovario, páncreas, y diferentes tipos de cáncer gastrointestinal, entre otros. En general los pacientes tratados por estas vías tienen una buena respuesta y logran salir de esta enfermedad, si se encuentran en la fase inicial.

Cuando existe recurrencia en esta enfermedad se asocia a alteraciones genéticas y/o epigenéticas en células madre del cáncer, que contribuyen a un crecimiento descontrolado, sobrevivencia, e invasión, así como a una resistencia intrínseca o adquirida a los tratamientos clínicos (Lowenberg *et al.* 2003).

Para estudiar la efectividad del tratamiento que se ha elegido para un paciente con cáncer, es necesario analizar periódicamente marcadores cancerígenos, como la proteína p53. La proteína p53, producto de un gen supresor de tumores, juega un papel importante en la terapia contra el cáncer ya que induce el arresto del ciclo celular, apoptosis y reparación del ADN después de terapias como la radiación y el uso de

---

agentes anticancerígenos.

Se ha observado que en la mayoría de los tumores humanos existe una mutación en el gen p53 por lo tanto es un marcador ideal el cual nos indicará por su expresión si la terapia usada está dando resultados alentadores o no. (Ohnishi *et al.* 2005).

Rb es otro importante marcador tumoral, la inactivación de la proteína Rb juega un papel muy importante en la tumorigénesis humana. Su función principal es permitir la interacción con los factores de transcripción de la familia E2F para ensamblarse a complejos represores activos y regular negativamente la expresión de los genes dependientes de E2F importante para la progresión del ciclo celular (Ying *et al.* 2006).

Las terapias desarrolladas para controlar el cáncer han evolucionado a medida que la tecnología y el conocimiento sobre la enfermedad han avanzado, ahora las terapias son más dirigidas y por lo tanto específicas hacia la célula cancerígena que se desea eliminar y muchos de los fármacos actualmente producidos a escala mundial tuvieron su origen en la búsqueda de metabolitos producidos por algún tipo de organismo, ya sea acuático o terrestre.

En el desarrollo de este trabajo nos enfocamos a la búsqueda de proteínas de origen bacteriano específicamente de *B. thuringiensis* con actividad citotóxica contra células de cáncer.

Los efectos de las toxinas de *B. thuringiensis* sobre cultivos celulares provenientes de cáncer ha resultado en un interés creciente, ya que además de sus muy conocidas propiedades insecticidas, recientemente se ha reportado que las toxinas de *B. thuringiensis* tienen actividad citocida en células de mamíferos en cultivo, y algunas de ellas específicamente sobre células de cáncer (Mizuki *et al.* 2000; Ito *et al.* 2004; Okumura *et al.* 2004; Yamagiwa *et al.* 2004; Yamashita *et al.* 2005; Uemori *et al.* 2006; Jung *et al.* 2007).

---

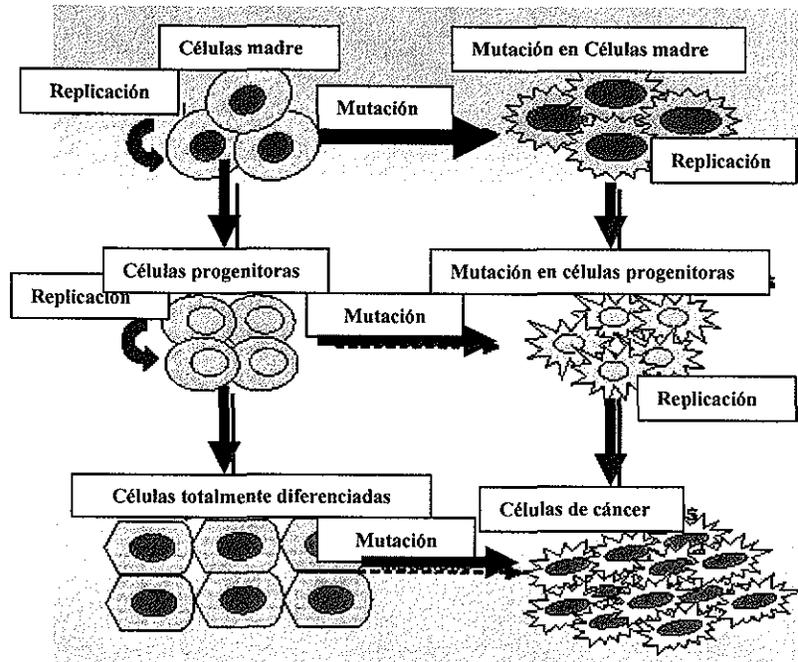
## II. ANTECEDENTES

### II.1 CANCER

Se ha propuesto recientemente la implicación de células progenitoras del cáncer tumorigénico o de leucemia, en la iniciación del cáncer y en su progresión a estadios metastásicos y en la resistencia a terapias convencionales. También llamadas células madre cancerígenas o células iniciadoras del cáncer (Dean *et al.* 2005). Se cree que las células madre cancerígenas son causa de mutaciones que ocurren en las células madre multipotenciales, células madre tejido-específicas, células progenitoras y células maduras. El programa de auto renovación y diferenciación juega un papel clave en la génesis de las células madre cancerígenas como se muestra en la figura 1. Estos conceptos explican parcialmente la recurrencia de la mayoría de los cánceres agresivos cuando son tratados con las terapias actuales. Más específicamente, la reactivación de las diversas cascadas de señalización por ejemplo, de los factores de crecimiento epidermal (EGF)/EGFR, factores de células madre (SCF)/KIT, y transporte ABC mediado para el flujo de multidrogas en células progenitoras del cáncer, pueden ser responsables, al menos en parte de la recurrencia con terapias clínicas (Mimeault *et al.* 2006).

Inclusive, los cambios en el microambiente local de células progenitoras del cáncer, pueden también influir en su comportamiento (Mimeault *et al.* 2007).

Basados en estas observaciones, es importante considerar la presencia de éstas células progenitoras de cáncer en las líneas celulares, ya que estas pequeñas subpoblaciones de células progenitoras del cáncer aisladas de tejidos malignos de pacientes pueden representar el más apropiado modelo experimental para investigaciones básicas de cáncer y pruebas de drogas *in vitro* e *in vivo*.



**Figura 1.** Diagrama que muestra el progreso de célula madre a célula de cáncer. La recurrencia de cáncer y la poca efectividad de las terapias contra el cáncer podría explicarse por las mutaciones en células totalmente indiferenciadas conocidas como células madre e incluso en células menos diferenciadas como las multipotenciales, células tejido-específicas, células progenitoras ó células maduras. Ponnusamy & Batra, 2008.

### II.I.I CANCER CERVICOUTERINO (CaCu)

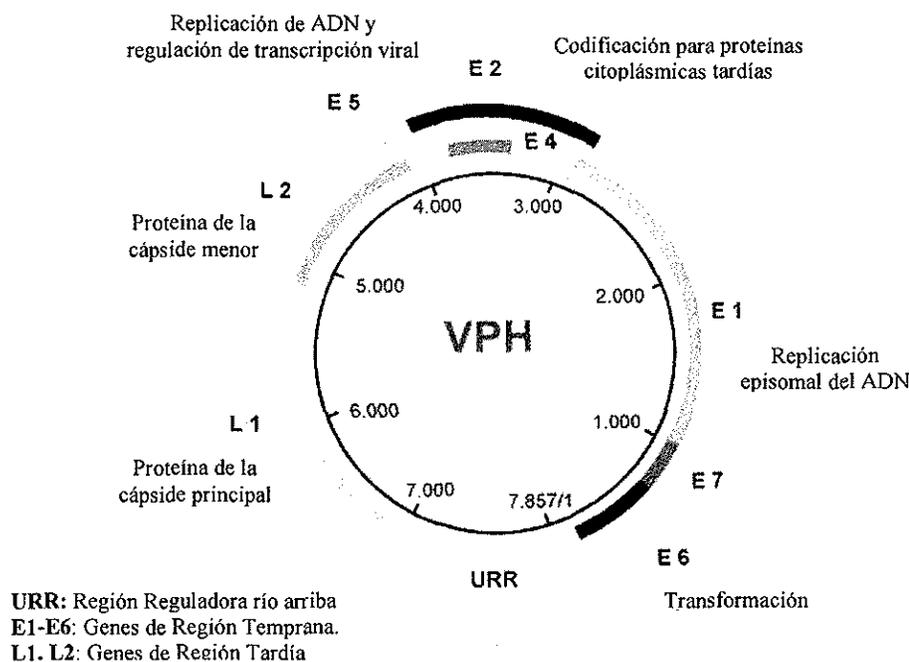
Se ha identificado al Virus del Papiloma Humano (VPH) como el principal agente causal del cáncer cervicouterino, siendo este una de las principales causas de muerte en los países en vías de desarrollo.

El VPH es un virus perteneciente a la familia papovavirus, estos virus se replican específicamente en el núcleo de células epiteliales escamosas. A diferencia de lo que ocurre en otras familias virales las proteínas de la cápside de los diversos tipos de VPH son antigénicamente similares. Por lo tanto los VPH pueden ser clasificados en genotipos y subtipos, esto se basa en las diferencias a nivel de su secuencia de ADN.

Los VPH tienen un ADN de doble cadena (Mandic *et al.* 2004), pero sólo una de las dos cadenas de ADN del VPH es transcrito (Münger *et al.* 2004). Su genoma es circular de aproximadamente 8kb. Su cápside viral mide aproximadamente 55nm.

El genoma de VPH se puede dividir en tres partes principales; la primera de ellas se encuentra a 44kb aproximadamente, conocida como región temprana (E), que codifica para proteínas no estructurales, involucradas en la replicación y regulación viral, así como en su capacidad carcinogénica. Se conocen 6 genes tempranos E1, E2, E4, E5, E6 y E7.

Posteriormente a 3kb aproximadamente se encuentra la región tardía (L) que codifica las dos proteínas de la cápside L1 y L2. A 1kb aproximadamente se encuentra la región control no codificante que contiene una variedad de elementos *cis* que regulan la replicación viral y la expresión del gen (Münger *et al.* 2004). En la figura 2 se muestra un esquema del mapa genómico de VPH tipo 16.



**Figura 2.** Esquema de mapa genómico de VPH tipo 16. Muñoz *et al.* 2003.

Los papovavirus tienen una amplia distribución entre los vertebrados y son específicos a especie (Pyeon *et al.* 2005). De los virus de papiloma que pueden infectar a los humanos, más de 80 tipos afectan células epiteliales incluyendo piel, mucosa respiratoria y tracto genital (Mandic *et al.* 2004).

Los tipos de VPH del tracto genital se clasifican por su potencial maligno en virus de bajo riesgo, entre los que se encuentran los tipos 6, 11, 40, 42, 43 y 44. Y los virus de alto riesgo, entre los que se localizan los tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 y 68 (Jacobs *et al.* 1997).

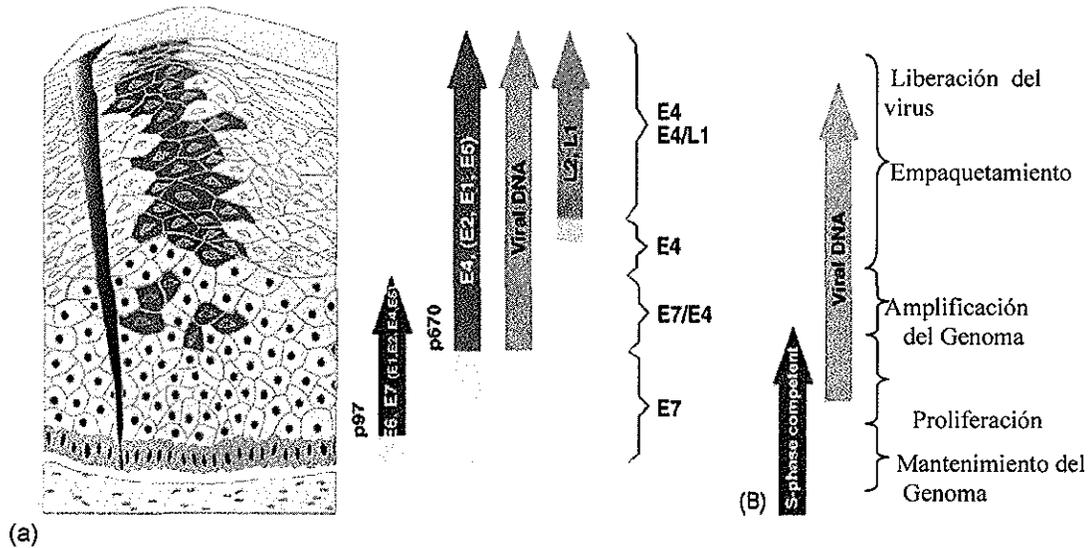
Los virus de bajo riesgo no han sido encontrados en pacientes con CaCu (Münger *et al.* 2004). Mientras que el VPH 16 y tipos relacionados (31, 33, 52 y 58) junto con el VPH 18 y tipos relacionados (45, 39, 59, 68) se han encontrado en el 91% de los tumores cervicales en Centro y Sudamérica (Rocha-Zavaleta *et al.* 2004).

### II.I.IA CICLO DE REPLICACION

El ciclo vital del VPH está relacionado íntimamente con la diferenciación epitelial. El VPH infecta inicialmente células poco diferenciadas proliferativas del segmento basal estratificado a través de lesiones, micro heridas y abrasiones del tejido. En esta etapa el genoma viral reside como un plásmido en el núcleo, con bajo número de copias que son expresadas a bajos niveles y no tienen progenie. Las células infectadas se dividen y las células hijas migran hacia el estrato espinoso del epitelio, la replicación viral se estimula produciendo viriones dentro del núcleo (Pyeon *et al.* 2005). A través del análisis de moléculas de ARN mensajero viral durante las diferentes etapas de diferenciación de las células infectadas se ha demostrado que la expresión de los genes tempranos ocurre a lo largo de todos los estratos epiteliales, sin embargo la expresión de los genes tardíos han sido observados únicamente en los queratinocitos totalmente diferenciados en el estrato córneo, donde también ocurre el ensamblaje de las cápsidas virales que dan lugar a la formación de viriones (Pyeon *et al.* 2005). Los VPH son no líticos, por lo tanto se valen de las características propias de las células que los albergan para propagar su progenie, que es liberada cuando las células terminales del estrato córneo sufren un proceso de descamación (Pyeon *et al.* 2005). En la figura 3, se muestra un esquema del

---

ciclo infeccioso del VPH en la mucosa y las proteínas se expresan en cada una de las etapas.



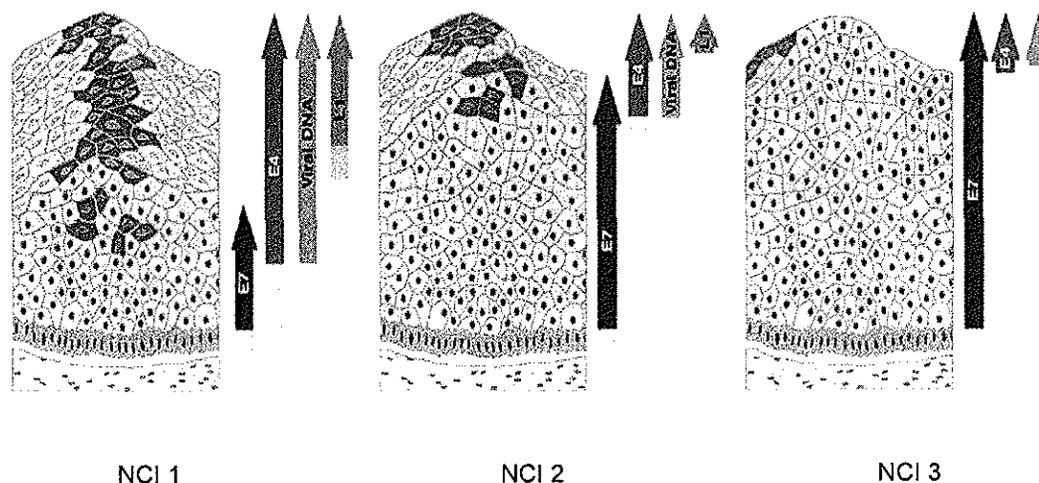
**Figura 3.** Etapas del ciclo de vida de VPH durante su infección. a) Representación esquemática de piel, donde se muestra el patrón de expresión genética de HPV 16 y la migración de las células infectadas hacia la superficie celular. Después de la infección (como se representa en este caso, a través de una cortada) el genoma viral se mantiene de forma episomal con un bajo número de copias. Durante la diferenciación epitelial, el promotor p97 dirige la expresión de los genes E6 y E7 (en rojo) necesarios para entrar a la fase S. El promotor p670 se activa en las capas epiteliales superiores y la replicación de proteínas virales como E1, E2, E4, E5 se incrementa (en verde), facilitando la amplificación del genoma viral (en azul). Los cambios en el deslizamiento del ARNm permiten a E4 sobrevivir dentro de las capas epiteliales superiores donde la cápside viral se encuentra (en amarillo). b) Muestra que en las células epiteliales del estrato inferior son competentes para la fase S. La amplificación del genoma viral empieza en estas células pero cesa una vez que las células pierden su capacidad para expresar proteínas de fase S. Además el genoma viral amplificado puede ser detectado en las capas epiteliales superiores, Doorbar, 2005.

## II.I.IB PATOGENESIS

La infección con el VPH se transmite únicamente por contacto sexual y se ha calculado que su prevalencia en nuestro país es del 70%.

Se sugiere que la neoplasia cervical intraepitelial (NCI) es un paso previo al cáncer cervical como tal, caracterizado por cambios displásicos donde además empieza la maduración del desorden. La neoplasia cervical intraepitelial se clasifica en NCI I o lesiones intraepiteliales escamosas de bajo grado (LIBG) y NCI II/III, o lesiones intraepiteliales escamosas de alto grado (LIAG). Estas lesiones precursoras pueden continuar por muchos años hasta convertirse en una enfermedad maligna invasiva (Mandic *et al.* 2004).

El genoma del VPH en este tipo de lesiones (NCI), se encuentra usualmente de forma episomal (circular no integrado), mientras que en un cáncer invasivo cervical el genoma se integra al ADN del hospedero siendo este el evento clave por el que el VPH induce carcinogénesis. En la figura 4 se muestra un esquema del patrón de expresión de proteínas de VPH a medida que la NCI avanza.



**Figura 4.** Cambios en el ciclo de vida del VPH durante el desarrollo del cáncer cervical. Durante la progresión de Neoplasia Cervical Intraepitelial de grado 1 (NCI 1) a grado 3 (NCI 3) la expresión de las diversas proteínas del HPV cambia y las células epiteliales pierden su genotipo cambiándolo por el del genoma insertado por el virus. Doorbar, 2005.

Existen diversas proteínas tanto celulares como virales que participan en el proceso de invasión e integración del genoma viral en el huésped, para finalmente producir CaCu. La proteína E4 del VPH durante la infección se asocia a filamentos intermedios de queratina de la célula huésped, de esta forma desestabiliza la red mecánica de queratina y se facilita la liberación de partículas virales (Roberts et al. 2004). E2 es un factor de transcripción viral que se une al ADN e interactúa con la secuencia ACCN<sub>6</sub>GGT en la región control no codificante del virus. En los VPH de alto riesgo E2 tiene la capacidad de actuar como activador transcripcional además de interactuar con la helicasa viral, esta interacción es necesaria para el reconocimiento eficiente del origen y la replicación del genoma viral (Roberts et al. 2004). E2 además regula a E6 y E7.

La proteína del gen E6 se une al gen supresor de tumores p53 e induce su degradación. El blanco de E7 es otro gen supresor de tumores, el producto del gen de retinoblastoma (pRB). Su unión altera el estado de fosforilación, que inactiva las funciones de p53, que a su vez es un control del ciclo celular. La inactivación de p53 y Rb por las proteínas virales E6 y E7 crean una desregulación del ciclo celular en la fase S lo que empieza a crear la atmósfera propicia para el crecimiento desmedido de células del cervix (Mandic et al. 2004, Münger et al. 2004).

La integración del genoma viral en el genoma del huésped según diversos estudios realizados, aumenta la expresión de los oncogenes E6 y E7 probablemente por la mayor estabilidad del genoma viral ya dentro del genoma del huésped, derivando en transcritos de fusión celular y viral (Klaes et al. 1999; Münger et al. 2004).

E6 tiene además otras características importantes en el proceso de carcinogénesis. Es una proteína de aproximadamente 150 aminoácidos (aa) que contiene 2 dominios con 2 motivos CXXC cada uno relacionado con el carboxilo terminal de E7. E6 puede activar la transcripción de hTERT (subunidad catalítica de telomerasa humana) y elimina un mecanismo de defensa celular encargado de depurar el ambiente de células muertas, de morfología anómala y/o senescentes desencadenada por la expresión de E7 a través de la inactivación de p53. Este proceso es esencial para el ciclo de vida de VPH de alto riesgo (Jacobs et al. 1997).

---

Al igual que E6, E7 cuenta con otras propiedades que la hacen indispensable en el proceso de carcinogénesis. E7 es una proteína de bajo peso molecular de aproximadamente 100 aa a la que no se le conoce actividad enzimática intrínseca, sin embargo, E7 posee la habilidad para asociarse con Rb, importante para generar y/o mantener un ambiente que conduzca a la replicación viral. E7 también puede actuar sobre los inhibidores dependientes de ciclina, incluyendo a p21 y p27, éstas proteínas son reguladoras críticas del arresto del ciclo celular durante la diferenciación de los queratinocitos, su inhibición por E7 contribuye al mantenimiento de un ambiente celular para una replicación competente de las células epiteliales diferenciadas del huésped. E7 actúa como un mutágeno mitótico incrementando el número de errores en la mitosis durante cada división celular, así provee la plasticidad genómica necesaria para la adquisición de mutaciones celulares adicionales que contribuyen a la progresión maligna. La mayoría de las células tumorales humanas tienen una actividad aberrante de la telomerasa importante para la carcinogénesis (Jacobs *et al.* 1997).

Las proteínas E6 y E7 contribuyen a la inmortalidad de células epiteliales humanas a través de la inducción de la actividad de la telomerasa. E6 induce la expresión de hTERT a nivel transcripcional (Jacobs *et al.* 1997).

La transfección celular de oncogenes provenientes de VPH de alto riesgo 16 o 18 transforman las líneas celulares establecidas e inmortalizan las células primarias de queratinocitos. La coexpresión de genes E6 y E7 de VPH de alto riesgo inducen la inmortalización de los queratinocitos. E6 presenta la misma actividad estimulante de la telomerasa además de inactivar p53 incrementando la mutagénesis y la inestabilidad genómica. Su constante expresión es requerida para la proliferación de las líneas de carcinoma cervical incluyendo a HeLa y SiHa (Riley *et al.* 2003).

## II.II CULTIVO CELULAR

Los cultivos celulares provenientes de tejido somático normal, expresan un limitado potencial proliferativo llamado senescencia, los mecanismos responsables de este hecho son desconocidos aún, se propone que el acortamiento de los telómeros

---

resultante de la represión de la telomerasa en cultivos celulares, así como la respuesta al estrés y daño a ADN son los principales factores limitantes (Garbe *et al.* 2007).

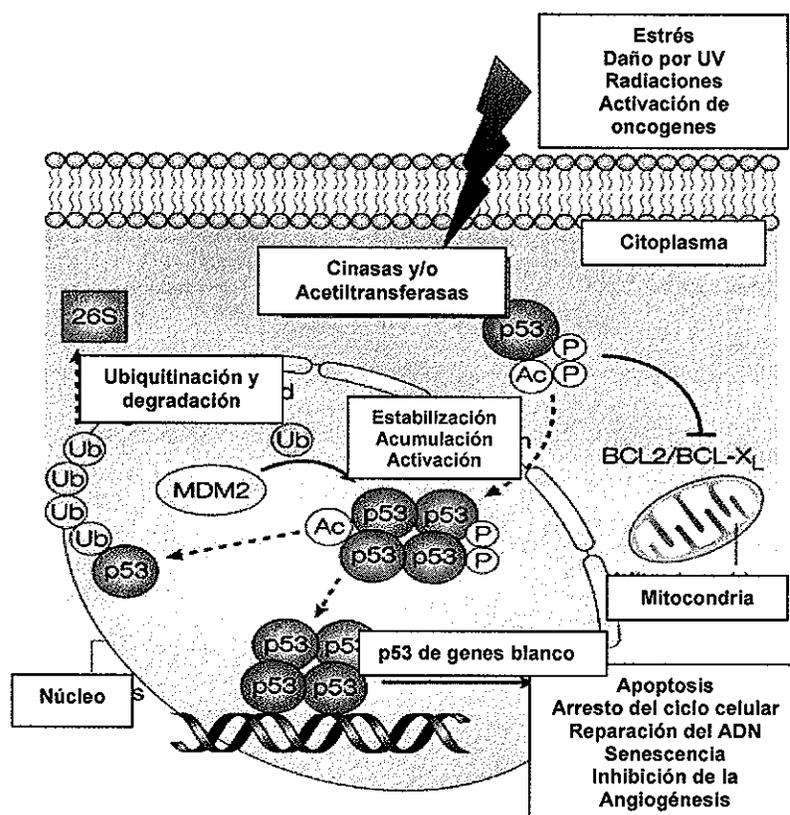
La inmortalidad de los cultivos celulares es inducida después de haber pasado dos barreras llamadas M1 y M2 (Wright *et al.* 1989). La primera barrera que debe pasar, M1, es la activación de los puntos de control de ciclo celular p53 y Rb cuyas señales provocan el acortamiento de los telómeros causando el arresto en el ciclo celular. La extensión de la vida de los cultivos celulares, se obtiene por la exposición a oncogenes virales que inactivan a Rb y p53. Después llegarán a la barrera M2, donde pasarán por un punto crítico ya que el acortamiento de los telómeros produce inestabilidad genómica y muerte celular. Se ha observado que cuando superan este punto crítico existe una rara mutación en la actividad de la telomerasa que adquiere durante este período (Wright *et al.* 1995).

### II.III p53

La proteína p53 previene la degeneración de una célula normal. El ancestro de la proteína tumor supresora p53 de mamíferos, es homóloga en *drosophila* y nemátodos (Derry *et al.* 2001). Las células que tienen mutado p53 y las que lo tienen suprimido avanzan a células cancerígenas debido a que se pierde la estabilidad genética y las mutaciones se acumulan, las células progresan a cáncer en una alta frecuencia (Garbe *et al.* 2000). p53 además, regula la transcripción de genes blanco por unión a secuencias específicas en el ADN (Ohnishi *et al.* 2005).

p53 induce el arresto en la fase G1 del ciclo celular a través de la inhibición de la actividad de la ciclina/CDK. El daño al ADN induce apoptosis por diversas vías reguladas por p53, como Bax (proteína X asociada a Bcl), Fas/APO-1. Como se muestra en la figura 5, el arresto del ciclo celular o apoptosis se lleva a cabo según las modificaciones que tengan las moléculas de p53 como; fosforilaciones, acetilaciones o poli ADP-ribosilaciones (Ohnishi *et al.* 2005).

---



**Figura 5.** p53. Las señales de estrés convergen en p53, y activa varias cinasas y/o acetiltransferasas, fosforilando o acetilando a p53. Las modificaciones postraduccionales resultan en la estabilización y activación de p53 en el núcleo, donde interactúa con secuencias específicas en el ADN que son sitios de unión blanco. Esta unión desencadena diversas respuestas celulares como apoptosis, arresto del ciclo celular o reparación del ADN dañado. Cuando la cadena de p53 no es tan larga como se requiere, es ubiquitinada por MDM2, moviéndose fuera del núcleo para ser degradada por el proteosoma 26S. p53 puede actuar fuera del núcleo uniéndose a proteínas anti-apoptóticas como la BCL2 para inducir apoptosis. Ohnishi *et al.* 2005.

#### II.IV Rb

La proteína Rb, juega un papel muy importante en muchos procesos celulares incluyendo regulación del ciclo celular, replicación del ADN, reparación del daño a ADN, apoptosis, diferenciación celular y senescencia. El gen del retinoblastoma, Rb es uno de los blancos más frecuentes para la inactivación durante el curso de la tumorigénesis humana.

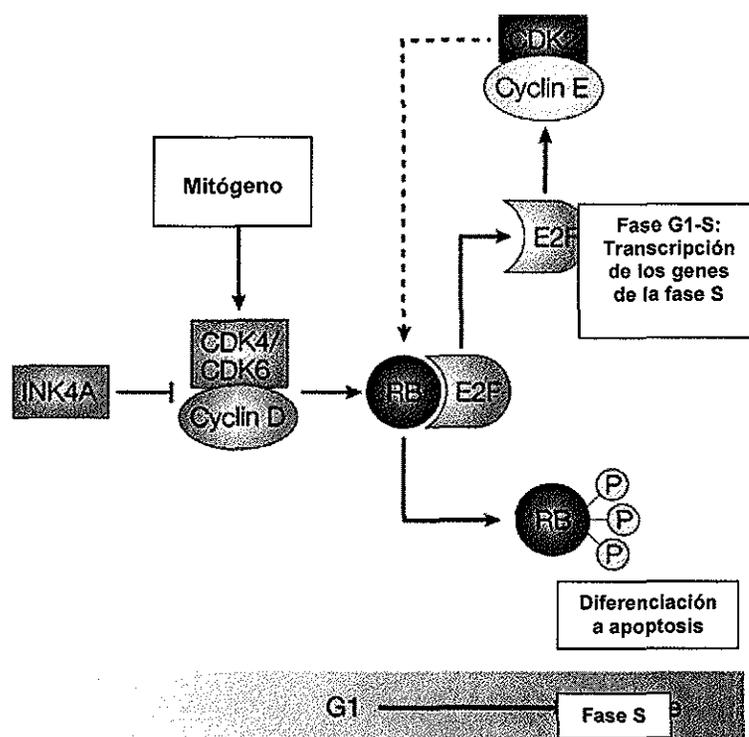
La regulación de Rb por fosforilación ha sido extensamente estudiada. La regulación de la degradación de la proteína Rb mediada por el sistema de ubiquitinación-proteosoma, se desconoce. La oncoproteína viral E7, el antígeno nuclear 3 del virus Epstein Barr (EBNA3C), el citomegalovirus humano pp71 y la oncoproteína gankirin, todas ellas contienen el motivo de unión L-X-C-X-E-Rb blanco de Rb para su degradación por rutas dependientes de ubiquitina o ubiquitina independiente de proteosoma.

La proteína Rb, contiene 3 distintos dominios de unión a proteínas: El dominio N-terminal, el dominio medio A-B y el dominio C-terminal. La función del dominio N-terminal está poco establecido, el dominio A-B llamado bolsa pequeña (RbSP) se une a las proteínas que contienen el motivo LXCXE de unión a Rb. El motivo largo (RbLP), contiene dominios A-b y C requeridos para la interacción *in vivo* con los miembros de la familia E2F y es suficiente para la función de supresión de crecimiento de Rb, como se esquematiza en la figura 6. El dominio C-terminal, llamado bolsa C (RbC), es importante para la supresión de formación de retinoblastoma (Ying *et al.* 2006).

Las oncoproteínas virales E7 de virus de papiloma humano de alto riesgo, se unen a su blanco Rb por proteosomas que median su degradación.

El citomegalovirus humano (CMV) promueve la degradación de la proteína Rb en rutas dependientes de proteosoma y ubiquitina independiente. El mecanismo molecular es desconocido. El virus Epstein-Barr se une a Rb resultando en su desestabilización. El virus de la hepatitis C, también forma un complejo con Rb y promueve su degradación (Kim *et al.* 2006).

---



**Figura 6.** Rb. El Retinoblastoma (Rb) y las proteínas relacionadas a Rb, se unen a la familia de factores de transcripción E2F para inhibir su actividad. Las señales mitogénicas, estimulan la transcripción de ciclina D y permiten el ensamble de complejos enzimáticos como las cinasas dependientes de ciclina CDK4 o CDK6. Estas últimas, junto con el complejo CiclinaE - CDK2, fosforilan a Rb en diversos sitios, causando la disociación del complejo Rb-E2F, liberando la inhibición de E2F por Rb; permitiendo así la transcripción de genes mediados por E2F requeridos para la progresión a a fase S. Rb es importante en la apoptosis y en la diferenciación. Ying et al. 2006.

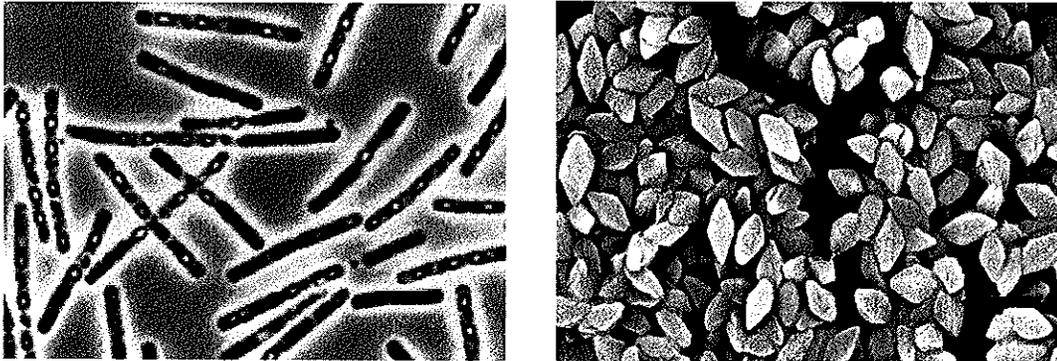
## II.V *Bacillus thuringiensis*

La búsqueda de fármacos anticancerígenos se ha realizado alrededor de todo el mundo y en todos los ecosistemas con la finalidad de encontrar un compuesto capaz de estabilizar el ciclo celular entre otras cosas. *Bacillus thuringiensis* es una bacteria que produce proteínas Cry conocidas sólo por su actividad insecticida, hasta principios de este milenio, cuando en Japón se aislaron cepas nativas de Bt productoras de proteínas

Cry sin actividad insecticida ni hemolítica, pero con actividad anticancerígena, estos hallazgos sentaron un precedente para iniciar la búsqueda de cepas nativas de Bt productoras de proteínas cristal con capacidad citotóxica en células de cáncer (Mizuki *et al.* 2000; Ito *et al.* 2004; Okumura *et al.* 2004; Yamashita *et al.* 2005).

#### II.V.I GENERALIDADES DE *Bacillus thuringiensis*

*Bacillus thuringiensis*, es una bacteria gram positiva cosmopolita pues se le ha aislado de todas partes del mundo y de muy diversos sistemas como suelo, agua, hojas de plantas, insectos muertos, telarañas, etc (Jiménez *et al.* 2007). *B. thuringiensis* al mismo tiempo que sintetiza la espora, en el compartimento de la célula madre, que se encuentra en posición parasporal, va depositando una mezcla de proteínas denominadas  $\delta$ -endotoxinas, conocidas también como proteínas Cry y Cyt. En la figura 7 se muestra la morfología celular y del cristal sintetizado por *B. thuringiensis*. Estas inclusiones paraesporales, tienen un alto valor como proteínas insecticidas para su uso en aerosoles y en cultivos transgénicos y puede incluso ser la alternativa mas promisoría a los pesticidas químicos sintéticos usados en la agricultura comercial y en la gestión forestal ya que estas proteínas son benéficas y amistosas con el ambiente y solo se tiene un caso reportado de resistencia a estas proteínas insecticidas (Cheong *et al.* 1997; de Maagd *et al.* 2001).

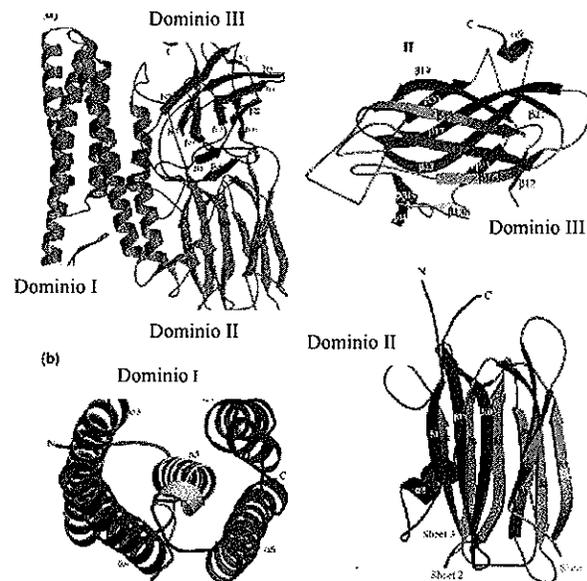


**Figura 7.** *Bacillus thuringiensis*. La figura de la izquierda muestra la fase vegetativa de la bacteria, dentro de ella se observan esporas y estructuras paraesporales visto en microscopio de contraste de fases. La imagen de la derecha muestra cristales bipiramidales de *Bacillus thuringiensis*, observados con microscopio electrónico de barrido. Buckman, 2006.

#### II.V.II PROTEINAS Cry y Cyt

Se le llama proteínas Cry a cualquier proteína paraesporal de *B. thuringiensis* que muestre un efecto tóxico hacia algún organismo. Los miembros de esta familia son generalmente proteínas globulares con tres dominios estructurales, los cuales se han determinado por cristalografía de rayos X. En la figura 8 se muestra un esquema de los 3 dominios encontrados en los cristales de *B. thuringiensis*. El dominio N-terminal (dominio I) es un paquete de 7  $\alpha$ -hélices en el cual la hélice central hidrofóbica ( $\alpha$ -hélice 5) está rodeada por las 6  $\alpha$ -hélices anfipáticas. Este dominio de hélices es responsable de la inserción de la proteína a la membrana y la formación de poros en ella. El dominio I tiene similitudes estructurales con otras toxinas que forman poros por ejemplo la colicina Ia y N, y toxinas de difteria (de Maagd *et al.* 2003).

El dominio II se constituye de 3 láminas  $\beta$  antiparalelas donde se exponen los bucles, y el dominio III es un paquete de láminas  $\beta$  (Li *et al.* 1991; Grochulski *et al.* 1995; Morse *et al.* 2001; Galitsky *et al.* 2001; Boomserm *et al.* 2005; Boomserm *et al.* 2006). Las regiones expuestas del dominio II y III están involucradas en la unión al receptor.



**Figura 8.** Dominios típicos de proteínas Cry

El dominio II de las proteínas Cry de *B. thuringiensis* se asemeja a diversas proteínas de unión a carbohidratos como la vitelina, lelectina jacalina y lectina Mpa. El dominio III muestra similitud estructural con otras proteínas de unión a carbohidratos como los dominios de unión a la celulosa de 1,4- $\beta$ -glucanasa C, galactosa oxidasa, sialidasa,  $\beta$ -glucoronidasa, los dominios de unión de la xilanasa U y la  $\beta$ -galactosidasa (de Maagd *et al.* 2003).

Una proteína Cyt es cualquier proteína paraesporal de *B. thuringiensis* que muestre actividad hemolítica hacia algún organismo (Ibarra *et al.* 2003). Estas toxinas comprenden dos familias de genes altamente relacionadas Cyt1 y Cyt2. Se les relaciona estructuralmente con la volvatoxina A2, una cardiotoxina formadora de poros producida por el hongo *Volvariella volvacea* (Lin *et al.* 2004).

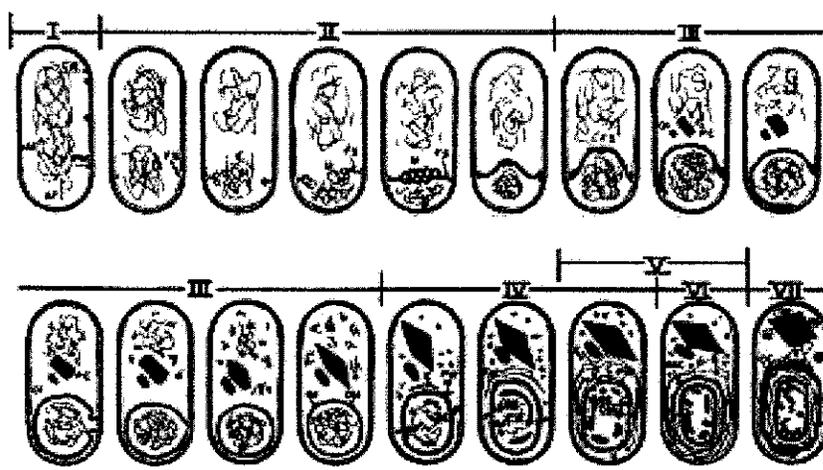
Los genes que codifican para estas toxinas de *B. thuringiensis* residen en plásmidos (Ito *et al.* 2004); su alto grado de plasticidad genética, da como resultado una amplia diversidad de cepas de *B. thuringiensis* y cristales proteicos (Broderick *et al.* 2006). A esta fecha se tienen reportados 376 genes cry clasificados de acuerdo a su similitud en la secuencia primaria en 54 grupos donde hay diferentes clases y subclases. Por serología del antígeno flagelar H se clasifica en 84 serovares (Crickmore *et al.* 1998).

Se ha encontrado que estas proteínas Cry tienen actividad tóxica contra lepidópteros (mariposas), coleópteros (escarabajos), dípteros (mosquitos), himenópteros (hormigas), ácaros y también contra otros invertebrados como nemátodos, gusanos planos y protozoarios (Jiménez *et al.* 2007a), sin embargo, no se les ha encontrado actividad tóxica contra mamíferos, aves, anfibios o reptiles (Mizuki *et al.* 2000).

#### **II.V.IIA SINTESIS DE PROTEINAS Cry EN *Bacillus thuringiensis*.**

Para que se lleve a cabo la síntesis de estas proteínas con propiedades insecticidas y de las esporas, se requiere de la sincronización de muchos genes en el tiempo y en el espacio, a través de múltiples factores sigma que se expresan a diferentes tiempos en los dos compartimentos.

En la figura 9, se esquematiza los estadios de síntesis de la espora y el cristal en *B. thuringiensis*. En el estadio I se inducen los genes que inician la esporulación. Este punto puede ser reversible si se adicionan nutrientes. Sin embargo, a partir del estadio II de esporulación, el proceso es irreversible y continúa hasta finalizar con la formación de la espora. En el estadio III, se inicia la síntesis del cristal insecticida, la cual continúa hasta el final de la esporulación. La síntesis del cristal insecticida se da a partir de dos promotores que funcionan secuencialmente (*Bt1* y *Bt 2*). El primero es activado por sigma E durante los estadios III y IV y el segundo por sigma K durante los estadios V y VI. Durante estos pasos se lleva conjuntamente la formación de la espora. Finalmente en el estadio VII se sintetizan enzimas líticas que liberan a las esporas y los cristales insecticidas (Yang *et al.* 2007) (Figura 9).



**Figura 9.** Estadios de la formación del cristal y la espora en *B. thuringiensis*. La diferenciación de *B. thuringiensis* a espora se divide en 7 estadios, a partir del tercer estadio se empieza a sintetizar el cristal proteínico en el compartimento denominado célula madre en posición paraesporal. En el estadio 7 se sintetizan las enzimas líticas que liberan a las esporas y a los cristales. Bechtel y Bulla, 1976.

Además de las  $\delta$ -endotoxinas, *B. thuringiensis* ha desarrollado una serie de factores de virulencia que le permite infectar a sus blancos con mayor eficiencia. Entre estos factores se encuentran: fosfolipasas, proteasas, quitinasas,  $\alpha$ - exotoxinas o exotoxinas termolábiles (Zhang *et al.* 1993; Budhata *et al.* 2007).

Una cepa de *B. thuringiensis* es capaz de sintetizar más de dos subclases de proteínas Cry, por ejemplo, los cuerpos de inclusión de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 comprenden 6 diferentes protoxinas: 4 Cry1 y 2 Cry2. Los péptidos que conforman la inclusión parasporal, se unen por hidrofobicidad, puentes de hidrógeno y enlaces disulfuro (Bulla *et al.* 1980). La solubilización alcalina, libera el 50% de las proteínas de inclusión parasporal, las proteínas largas como las Cry4A y Cry4B de 125 a 135 kd requieren ser reducidas con disulfidos para solubilización (Park *et al.* 2000)

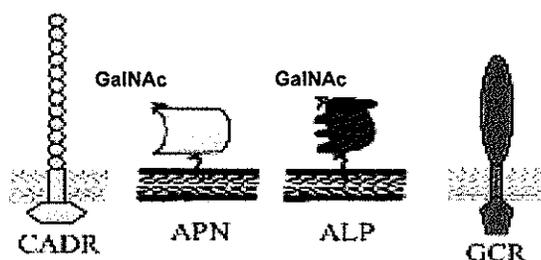
Las toxinas Cry requieren un receptor específico de membrana plasmática sobre las células. La afinidad del receptor de estas toxinas Cry puede variar con valores de constante de disociación entre  $10^{-7}$  y  $10^{-10}$  M. Por este tipo de estudios, se deduce que las células de los insectos probablemente tienen múltiples receptores para toxinas. La toxicidad de las proteínas Cry parece estar relacionada con el número de receptores más que con la afinidad por el receptor (Sarjeet *et al.* 1992).

## II.V.IIB MECANISMO DE ACCION DE LAS PROTEINAS Cry EN INSECTOS.

Una vez que el insecto ha ingerido los cristales y esporas de *B. thuringiensis*, se inicia un proceso de activación de las toxinas Cry, en el intestino del huésped, que más tarde serán reconocidas por los receptores que se encuentran en las microvellosidades que recubren las células epiteliales del intestino del insecto, causando daño. Los síntomas que se observan en el huésped son: cese de la ingesta, parálisis del intestino, vómito, diarrea, parálisis total y finalmente la muerte (Kitada *et al.* 2006; Jiménez *et al.* 2007b).

**Activación de las toxinas.** La mayor parte de las proteínas Cry se producen como protoxinas que pesan de 70 a 140 kDa. Como se mencionó anteriormente para que produzcan daño en el huésped deben ser activadas, esta acción es mediada por el pH básico y proteasas del intestino medio. Los fragmentos de las toxinas resistentes a proteinasas; que van de 30-70 kDa son derivados de la porción N- terminal de la protoxina; además se requiere un medio ambiente reductor para romper los puentes disulfuro que son abundantes en la mitad del C-terminal de las proteínas Cry (Fuentes *et al.* 2003).

**Unión al receptor.** Después de ser activadas, las proteínas Cry se unen a sitios específicos localizados en las microvellosidades de las células columnares del intestino medio de las larvas de insectos susceptibles: lepidópteros, coleópteros y dípteros. Las regiones de la toxina que participan en la interacción con el receptor se localizan en los dominios II y III (Jiménez *et al.* 2007b). En toxinas Cry1A se han descrito al menos 4 diferentes receptores en lepidópteros, como se esquematiza en la figura 10: caderinas (CADR), glicofosfatidil-inositol (GPI) anclado a aminopeptidasa-N (APN), GPI anclado a fosfatasa alcalina (ALP) y glicoconjugados de 270 kDa (Knight *et al.* 1994; Vadlamudi *et al.* 1995; Valaitis *et al.* 2001; Jurat-Fuentes *et al.* 2004).



**Figura 10.** Representación esquemática de los 4 tipos de receptores reportados para Cry1A en lepidópteros. CDR: Caderinas, APN: Glicofosfatidil-inositol anclado a aminopeptidasa-N ALP: Glicofosfatidil-inositol anclado a fosfatasa alcalina, GRC: glicoconjugados. Bravo *et al.* 2007.

Las caderinas son proteínas transmembranales con un dominio citoplásmico y un dominio extracelular con repeticiones de caderinas para el caso de los receptores tipo I de *B. thuringiensis* ( $Bt-R_1$ ) se han descrito 12 (Vadlamudi *et al.* 1995).

La acción de las toxinas Cry es un proceso dinámico donde se unen las toxinas a regiones conservadas de la caderina (Vadlamudi *et al.* 1995; Griko *et al.* 2007), esto desencadena una cascada de señalizaciones que concluyen en la muerte celular (Zhang *et al.* 2005). En la figura 11 se muestra un esquema del mecanismo de acción que se desencadena en la célula hospedera luego de la interacción de los receptores de esta con toxinas Cry. La proteína heterotrimérica G y la adenil ciclasa (AC) cuando se estimulan, incrementan dramáticamente la producción de AMPc, el cual activa a su vez a la proteína cinasa A (PKA) dando lugar a cambios en el rearrreglo del citoesqueleto y el flujo iónico. La aceleración de estos segundos mensajeros, altera la química de la célula, provocando su muerte (Zhang *et al.* 2005; 2006).

**Inserción en la membrana y formación del poro.** La correlación más estricta se da entre la toxicidad y la unión irreversible de la toxinas Cry a la membrana (Dean *et al.* 1996). Dado que las toxinas Cry son solubles en medio acuoso se ha propuesto que la toxina sufre un gran cambio conformacional que permite la exposición de regiones hidrofóbicas y su inserción a la membrana.

Las proteínas ancladas a la membrana a través de glicosil-fosfatidil-inositol (GPI) se localizan preferencialmente en balsas o tras un estímulo se movilizan hacia ellas; tal es

el caso de la aminopeptidasa N, receptor de las toxinas Cry1A, sugiriendo que las toxinas Cry ejercen su acción de formación de poro en estos microdominios de membrana. La fase irreversible de la unión de las proteínas Cry a la membrana se considera como una evidencia de que las proteínas Cry se insertan en la membrana, para luego causar la destrucción del tejido intestinal de las larvas de insectos susceptibles (Jenkins *et al.* 2000).

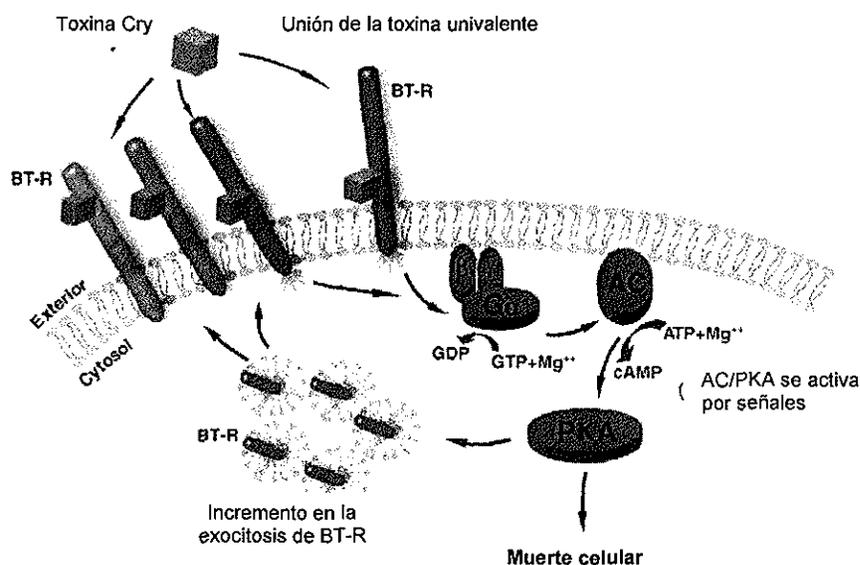
La unión de la toxina a receptores *Bt-R<sub>1</sub>* en la membrana de los insectos susceptibles promueve un rompimiento proteolítico adicional en el extremo N-terminal de la toxina (hélice  $\alpha$ -1), esto provoca la unión de otros monómeros en esta región dando lugar a una estructura oligomérica pre-poro importante en la inserción de la toxina a la membrana.

**Regulación iónica.** El lumen del intestino de insectos es eléctricamente positivo, ( $> 180$  mV) en ambos lados de la célula y la hemolinfa. La membrana de las células epiteliales del intestino medio de los insectos, transporta activamente iones  $K^+$ , creando un potencial de membrana. Este transporte y gradiente de potencial está sustentado por una bomba electrogénica ATPasa tipo IV, que activa la bomba de iones  $H^+$  dentro del lumen intestinal, el intercambio de  $K^+/H^+$  ocurre por un antiporte electroneutral. Esta bomba de protones está involucrada en la absorción de nutrientes y en la regulación del pH. El paso de los aminoácidos a través del tejido epitelial del intestino medio de larvas de insectos depende de la existencia de los potenciales eléctricos transepiteliales que son llevados a través de un mecanismo de simporte dependiente de voltaje dentro del citoplasma.

Las toxinas de *B. thuringiensis* activadas se insertan en la membrana de intestino medio, e incrementan la conductancia del  $K^+$ , acción que permite interrumpir el gradiente de pH y eléctrico de  $K^+$  (Sarjeet *et al.* 1992).

**Citolisis.** Al inactivar el sistema que mantiene el gradiente de pH, las toxinas Cry aumentan la permeabilidad de las células de las microvellosidades apicales a cationes, aniones, agua y moléculas de mayor tamaño, causando un colapso en la fuerza motriz que dirige la entrada de aminoácidos al interior celular, así como la redistribución de los cationes entre el lumen y el citoplasma. Se considera que el efecto más devastador de

este proceso es la alcalinización del citoplasma, ya que esto interfiere con el metabolismo celular normal que tiene como consecuencia final la destrucción del epitelio intestinal. Una vez que las células columnares y caliciformes se destruyen, las esporas de *B. thuringiensis* tienen acceso a la hemolinfa, medio en el que proliferan. La consecuencia final de la destrucción del intestino medio y la proliferación de bacterias en la hemolinfa es la muerte de las larvas por inanición y septicemia (Aronson *et al.* 2000; Fuentes *et al.* 2003; Jiménez, *et. al.*, 2007a).



**Figura 11.** Modelo de acción de las proteínas Cry. La unión univalente del monómero de toxina Cry a BT-R inicia la progresión a muerte celular por desencadenar una cascada de señales en donde el primer paso es mediar la exocitosis de receptores BT-R que están en vesículas intracelulares, hacia la membrana citoplásmica. El incremento en el despliegue de receptores BT-R en la superficie celular incrementa por lo tanto el número de monómeros de toxina que reconocen receptores, amplificando la señal original. La PKA modifica eventos bioquímicos que culminan en la muerte celular. Zhang *et al.* 2008.

### II.V.III PARASPORINAS

Recientemente se han encontrado algunas cepas de *B. thuringiensis* que producen proteínas de inclusión no insecticidas, no hemolíticas, citotóxicas para cultivos celulares de mamíferos incluyendo, líneas celulares de cáncer humano. Las características bioquímicas de las proteínas citotóxicas incluyen su especificidad celular y actividad citotóxica. Estas proteínas se han agrupado en una nueva familia de endotoxinas a las que se les ha llamado **PARASPORINAS** (Mizuki *et al.* 1999). Hasta esta fecha se tiene el reporte de dieciseis proteínas Cry clasificadas en esta nueva familia de parasporinas y dos proteínas en proceso de ser admitidas por el comité encargado en esta nueva clasificación. La mayoría provienen de Japón. En la Tabla I, se resume la clasificación de las parasporinas reportadas hasta el momento, la nomenclatura asignada por el Comité de Parasporinas, el lugar y país de donde se aisló la cepa que contiene la parasporina y el autor.

#### CLASIFICACION Y NOMENCLATURA DE LAS PARASPORINAS

\*(CONTINUA SIGUIENTE PAGINA)

Tabla I. Clasificación de Parasporinas.

PROTEINA	CEPA	AISLADA EN:	ACTIVIDAD INSECTICIDA	ACTIVIDAD HEMOLITICA	REFERENCIA
PS-I					
PS1Aa1 (Cry31Aa1)	A1190	Japón, Suelo	NO	NO	Mizuki <i>et al.</i> 2000
PS1Aa2 (Cry31Aa2)	M15	Canadá, Ácaros	NO	NO	Jung <i>et al.</i> 2007
PS1Aa3 (Cry31Aa3)	B0195	Japón, Suelo	NO	NO	Uemori <i>et al.</i> 2008
PS1Aa4 (Cry31Aa4)	79-25	Vietnam, Suelo	NO	NO	Yasutake <i>et al.</i> 2008
PS1Aa5 (Cry31Aa5)	92-10	Vietnam, Suelo	NO	NO	Yasutake <i>et al.</i> 2008
PS1Aa6	CP78A	Japón	NO	NO	Nagamatsu <i>et al.</i> 2010

En proceso	M019				
PS1Ab1 (Cry31Ab1)	B0195	Japón, Suelo	NO	NO	Uemori <i>et al.</i> 2008
PS1Ab2 (Cry31Ab2)	31-5	Vietnam, suelo	NO	NO	Yasutake <i>et al.</i> 2008
PS1Ac1 (Cry31Ac1)	87-29	Vietnam, suelo	NO	NO	Yasutake <i>et al.</i> 2008
PS1Ad1 En proceso	CP78 M019	Japón	NO	NO	Nagamatsu <i>et al.</i> 2010
<b>PS-2</b>					
PS2Aa1 (Cry46Aa1)	A1547	Japón, Suelo	NO	NO	Itoh <i>et al.</i> 2004
PS2Aa2 (Cry46Aa2)	A1470	Japón, Suelo	NO	NO	Ishikawa <i>et al.</i> En proceso
PS2Ab1 (Cry46Ab1)	TK-E6	Japón, Suelo	NO	NO	Hayakawa <i>et al.</i> 2007
<b>PS-3</b>					
PS3Aa1 (Cry41Aa1)	A1462	Japón, Suelo	NO	NO	Yamashita <i>et al.</i> 2005
PS3Ab1 (Cry41Ab1)	A1462	Japón, Suelo	NO	NO	Yamashita <i>et al.</i> 2005
<b>PS-4</b>					
PS4Aa1 (Cry45Aa1)	A1470	Japón, Suelo	NO	NO	Okumura <i>et al.</i> 2004
<b>PS-5</b>					
PS5Aa1 En proceso	A1100		NO	NO	Ekino & Shin. En proceso
<b>PS-6</b>					
PS6Aa1 En proceso	CP84 M019	Japón	NO	NO	Nagamatsu <i>et al.</i> 2010

La cepa *B. thuringiensis* A1190, produce proteínas con actividad citotóxica hacia células cancerígenas discrimina entre células T normales y células leucémicas, y mata específicamente a las leucémicas.

Las inclusiones parasporales de esta cepa tienen diámetro entre 0.58 a 1.66 micrómetros y a menudo son mas largas que las esporas, tiene una masa molecular de 81kDa (Mizuki *et al.* 1999).

*Bacillus thuringiensis* A1547, proveniente del serovar dakota, es otro ejemplo típico de cepas con cristales de proteínas parasporales citóxicas contra varias células humanas con una marcada divergencia en la especificidad del blanco. Mata principalmente a células cancerígenas de colon e hígado, permitiendo a la porción de células normales que se encuentran en el tejido tumoral, no ser afectadas y en líneas celulares afecta principalmente a células T de leucemia humana, MOLT-4. Su actividad citóxica esta asociada a una proteína con una masa molecular de 30kDa. (Kim *et al.* 2000).

Las proteínas de inclusión de *B. thuringiensis serovar israelensis* matan no solo células de cáncer (como HeLa y leucémicas T) sino a células T normales. (Mizuki *et al.* 2000). Se probaron algunas otras líneas celulares cancerígenas como TCS, Hc, A549 y MRC-5, las cuales fueron resistentes a la toxina. No existe una regla general para la especificidad de las células o características comunes para la sensibilidad o resistencia celular, algunas células derivadas de tumores, son más sensibles a la toxina proteica que las células normales de ese tejido.

En el tejido moderadamente diferenciado a células cancerígenas, en el cual existen eosinófilos y citoplasma abundante con núcleos atípicamente alargados, el tratamiento con la toxina proteica, causa degeneración de las células, y el núcleo y el borde celular del citoplasma de las células desaparece, en comparación con las células cancerígenas no tratadas. Algunas células presentan disminución en tamaño, picnosis, y una forma irregular del núcleo. Estas observaciones morfológicas sugieren que los efectos citóxicos de la toxina proteica parasporal, es principalmente no apoptótica (Mizuki *et al.* 2000).

Yamashita *et al.* reportaron en el 2005, una cepa productora de inclusiones parasporales, la A1462, cuya proteína activa tiene un tamaño de 64kDa. Esta toxina, tiene una fuerte actividad contra dos líneas celulares de cáncer humano, HL60 (células de leucemia mieloide) y HepG2 (células de cáncer de hígado) (Yamashita *et al.* 2005).

Kitada *et al.* en el 2006, identificaron una nueva toxina de *B. thuringiensis*, la parasporina-2 (o Cry31Aa, designada así por el comité de nomenclatura de las delta-endotoxinas de *B. thuringiensis*) altamente citotóxica contra células de cáncer de hígado humano (HepG2) y menos contra las células normales de hígado (HC). A través de diversos estudios en tejidos de hígado y de colón con cáncer parasporina-2 se observó que esta parasporina mata preferencialmente a las células de cáncer sobre las células normales (Kitada *et al.*, 2006).

La parasporina-1 es producida como una proteína de inclusión parasporal de 81-kDa (proparasporina-1) por la cepa de *B. thuringiensis* A1190. La forma activa de la parasporina-1 es un heterodímero compuesto de subunidades de 15 y 56 kDa que se observan cuando la proparasporina-1 es proteolisada. La parasporina-1 activada es altamente citotóxica en ciertas líneas celulares implicando que las líneas celulares sensibles a la toxina tienen un receptor específico para la parasporina-1 (Katayama *et al.* 2007). En la Tabla II, se nombra a la parasporina mas importante de cada una de las 4 familias en que hasta ahora se han clasificado las parasporinas, dando sus características mas importantes.

---

Tabla II. Citotoxicidad de Parasporinas

PARASPORINA	PROTOXINA kDa	TOXINA kDa	CARACTERISTICAS	CITOTOXICA PARA	DL <sub>50</sub> µg/ml
<b>PS-1:</b> PS1Aa1 Mizuki <i>et al.</i> 2000.	81	15 + 56	Proteína Cry de 3 dominios, activada por digestión del extremo N-terminal	HeLa MOLT-4 HL-60	5.8 14.6 >130
<b>PS-2:</b> PS2Aa1 Ito & Kitada, 2004	37	31	No existen los 3 dominios, activada por digestión de los extremos N- y C-terminal	Sawano UtSMC MOLT-4 HL-60 Jurkat cel-T HepG2 A549 HC HeLa TCS	0.041 9.28 0.044 0.066 0.015 0.148 0.023 >10 >10 >10 >10
<b>PS-3:</b> PS-3: PS3Aa1 Yamashita <i>et al.</i> 2005	88	64	Proteína Cry de 3 dominios, activada por digestión de los extremos N- y C-terminal	HL-60 HepG2	
<b>PS-4:</b> PS-4: PS4Aa1 Okumura & Saitoh, 2004	34	27	No existen los 3 dominios, activada por digestión del extremo C-terminal	MOLT-4 HeLa HepG2 UtSMC MRC-5 Células T normales	0.470 2.0 >2 >2 >2 >2

**Líneas celulares:**

- MOLT-4: Células T leucémicas
- JurKat: Células T leucémicas
- HL-60: Células T leucémicas
- Células T: Células T normales
- HC: Células de hepatocitos normales
- HepG2: Células de hepatocitos con cáncer
- HeLa: Células de cuello uterino con cáncer
- Sawano: Células de adenocarcinoma endometrial
- TCS: Células de cuello uterino con cáncer
- UtSMC: Células de cuello uterino normales
- A549: Células de pulmón con cáncer

### III. JUSTIFICACIÓN

El avance más notable en la lucha contra el Cáncer Cervicouterino se dió en el 2005, con la producción de dos vacunas, la primera llamada Cevaxix de Glaxo-Smith-Kline de Seattle diseñada para prevenir infecciones con VPH tipo 16 y el VPH tipo 18. Esta vacuna previene el 91.6% de las infecciones con VPH incidentes y en un 100% en infecciones persistentes. La segunda vacuna es la llamada Gardasil, de Merck en Francia, cuyo blanco son los VPH tipo 6, 11, 16 y 18; previene el 100% de precánceres y cánceres cervicales no invasivos (Mahdavi *et al.* 2005), sin embargo a pesar del gran éxito de estas vacunas, no es suficiente. Las vacunas se centran en la prevención de infecciones con el VPH de alto y bajo riesgo, pero una vez que la infección ha avanzado hasta estados neoplásicos tipo II o III, no tiene ningún valor terapéutico. Es por esto que siguen investigándose fármacos capaces de destruir células cancerígenas de cervix.

*B. thuringiensis* es una bacteria que produce inclusiones paraesporales constituidas de proteínas Cry y Cyt, también conocidas como delta endotoxinas, las cuales son conocidas ampliamente por su actividad insecticida, importantes en la producción mundial de bioinsecticidas y más recientemente de transgénicos, entre ellos el maíz, algodón, soya, canola, papa, tomate, tabaco remolacha, etc.

Estas inclusiones cristalinas tienen diferente morfología que se refleja en la naturaleza heterogénea de las delta endotoxinas que lo componen dando lugar a que una cepa de *B. thuringiensis* se explote como citotóxica para diferentes organismos. Cry y Cyt son toxinas formadoras de poros tanto en larvas de insectos como en células humanas en cultivo, la rapidez y agresividad con la que actúen dentro de estos huéspedes tendrá que ver con su especificidad y con la activación de la toxina, lo que es interesante observar para considerar una de estas toxinas como parasporina y por lo tanto como posible fármaco contra el cáncer.

La distribución de los genes *cry* de propios de *B. thuringiensis* en la naturaleza, está directamente relacionada con la distribución de diferentes especies de insectos, debido a la gran diversidad de especies encontradas en el territorio mexicano, resulta atractivo para su estudio. Otro hecho importante es que en los últimos 9 años se han caracterizado 13  $\delta$  endotoxinas con actividad selectiva hacia células de cáncer humano

en cultivos celulares, conocidas como parasporinas. Este descubrimiento aumenta el interés de rastrear cepas (y toxinas proteicas) citóxicas con especificidad por células de cáncer.

---

## IV. OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL

Aislar, caracterizar, purificar y secuenciar proteínas de *Bacillus thuringiensis* nativas de la región Ensenada - Tijuana con actividad citotóxica para líneas celulares de cáncer cervicouterino y en tumores *in vivo* en ratones inmunocomprometidos *nude*.

### OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Obtener cepas de *Bacillus thuringiensis* de la región Ensenada-Tijuana, principalmente de sitios ricos en materia orgánica y libre de tratamientos bioinsecticidas a base de *B. thuringiensis*.
  - Determinar las condiciones de cultivo óptimas para crecimiento de la bacteria y producción de cristales, partiendo de las necesidades de *B. thuringiensis* para crecer como T°, pH, nutrimentos, y tiempo.
  - Caracterizar por PCR genes tipo Cry y Cyt con oligos generales.
  - Determinar la actividad citocida de las toxinas Cry *in vitro* en cultivos celulares humanos, por viabilidad celular con el MTT.
  - Determinar la actividad citocida de las toxinas Cry sobre tumores inducidos en modelos murinos.
-

## V. MATERIALES Y MÉTODOS

### V.I ENSAYOS *IN VITRO*

#### EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD CITOTÓXICA DE LAS TOXINAS AISLADAS DE *B. thuringiensis* EN CULTIVOS CELULARES.



Figura 12. Diagrama de flujo de los ensayos que se realizaron *in vitro*.

Para estudiar la posible actividad citócida de toxinas provenientes de *Bacillus thuringiensis* en líneas celulares tumorales, se retaron las células con toxinas Cry activadas de *B. thuringiensis*. Posteriormente se comparó mediante ensayos de citotoxicidad la viabilidad de las líneas celulares incubadas en presencia y ausencia de las toxinas.

#### **V.IA.I AISLAMIENTO DE CEPAS DE *Bacillus thuringiensis***

Se utilizaron cepas de *Bacillus thuringiensis* provenientes de insecticidas agrícolas comerciales (DiPe1 DF, que contiene esporas y cristales de *B. thuringiensis* variedad kurstaki y XenTari DF, que contiene esporas y cristales de *B. thuringiensis* variedad aizawai) como controles.

Se tomaron muestras de suelo y agua de diferentes puntos geográficos de Ensenada y Tijuana, Baja California y se procesaron de la siguiente manera: Se pesó 0.1g y se solubilizó en 1ml de regulador de fosfatos pH 7.4 estéril en el caso de muestras sólidas, en el caso de muestras líquidas se tomó 1ml. Se realizaron diluciones seriadas de las cepas comerciales hasta  $10^{-10}$  en regulador de fosfatos pH 7.4, y en el caso de cepas aisladas del ambiente, la dilución óptima para recuperar colonias aisladas fue  $10^{-5}$ . Las diluciones se calentaron a 80°C durante 10min con el fin de hacer una selección de bacterias formadoras de esporas. Se sembraron 100µl en cajas con medio Nutrient Broth (NB) agar y se incubaron durante 12h a 37° C. Se observaron las diferentes morfologías coloniales.

Se aislaron colonias de morfología semejante a la descrita para *B. thuringiensis* en medio NB agar y se incubaron durante 12h a 37°C. Se eligieron por morfología colonial y celular colonias presuntivas de *B. thuringiensis*. Las colonias elegidas se resembraron en medio SP líquido y se incubaron a 30° C durante 96 h días con agitación constante a 275 rpm. Se observó su morfología celular por frotis del cultivo y tinción por la técnica de verde de malaquita cada 24 h.

Se observaron al microscopio de contraste de fases y luz visible a 100 x las cepas que presentaron la morfología característica de *Bacillus thuringiensis*, se calificaron como presuntivas.

Las colonias elegidas se cultivaron en 500 ml de medio SP líquido a 30°C por 96 h a 275 rpm para escalar la cantidad de cristales obtenidos y purificarlos.

#### **V.IA.II CULTIVO DE CEPAS DE *Bacillus thuringiensis***

Se tomó una colonia que presuntamente era *Bacillus thuringiensis* y sembró como preinoculo en 5 ml de medio SP, se incubó por 12 h a 30°C a 275 rpm.

Se inoculó 500 ml de medio SP con el cultivo crecido un día anterior incubándose por 96 horas a 30°C a 275 rpm, revisando diariamente la producción y liberación de esporas y cristales realizando un frotis delgado del cultivo y tinción con verde de malaquita.

Se observaron al microscopio bajo las mismas condiciones mencionadas anteriormente.

#### **V.IA.III COSECHA DE *Bacillus thuringiensis***

Se cosecharon las bacterias por centrifugación durante 10 min a 10000 rpm. Por cada 50 ml de cultivo se utilizaron 20 ml de 0.5M NaCl, 0.01 M EDTA pH 8.0 para lavar el botón celular por 3 veces, con centrifugaciones por 10 min a 10000 rpm, en cada lavado se eliminó el sobrenadante. Después del último de estos lavados, el botón se lavó con 20 ml del inhibidor de proteasas, PMSF 0.1M por cada 50 ml de cultivo por 3 veces. Se guardaron a 4 °C, hasta su purificación.

---

#### **V.IA.IV IDENTIFICACION DE CRISTALES POR MICROSCOPIA ELECTRONICA DE BARRIDO**

Se utilizaron suspensiones del complejo bacteria-cristal-espora de cada una de las cepas, las cuales fueron lavadas 3 veces con agua desionizada. En el primer lavado se centrifugó a 8000 rpm por 6 min y se desechó el botón, el sobrenadante se lavó con un volumen igual de agua desionizada. Se centrifugó a 8000 rpm por 10 min y se eliminó el botón, se triplicó el volúmen inicial de la suspensión de bacteria-espora-cristal con agua desionizada. Se homogeneizó la suspensión con agua desionizada y se centrifugó a 8000 rpm por 10 min. El volúmen total de la suspensión lavada se pasó a través de una Unidad Centricon para filtración con centrífuga Amicon Centricon YM 100 Millipore® concentrando la muestra por centrifugación a 3500 rpm hasta que el volúmen final fuera de 50 µl. Se colocaron 10µl de la muestra en un portaobjetos y se dejó secar al aire. Las muestras se llevaron al Centro de Nanociencias y Nanotecnología de la UNAM-Ensenada, B.C., donde fueron recubiertas en un evaporador al vacío JEOL: JEE-400 Vacuum Evaporation con una capa de oro por 5 min. Posteriormente, se observaron en un microscopio electrónico de barrido JSM-5300.

#### **V.IA.V SOLUBILIZACION DE CRISTALES DE *Bacillus thuringiensis***

Una vez que el cultivo se cosechó y se realizaron los lavados con PMSF para anular la acción de las proteasas, se centrifugó a 10000 rpm por 10min y el botón proveniente de 50 ml de cultivo se resuspendió en 1.5 ml de buffer TTN (20 mM Tris, 300 mM NaCl, tritón x-100 al 0.1%, pH 7.2), se incubó a 37°C por 30 min y las muestras se sonicaron en hielo, por períodos de 1min por 1min de descanso por un tiempo total de 6 min a 20 watts .

Posteriormente, imitando las condiciones que existen en el intestino medio de las larvas susceptibles a las proteínas Cry, se solubilizaron los cuerpos de inclusion parasporal con un pH de 10.5 ya sea con una solución 0.5 M de Carbonato de Sodio-Bicarbonato

de Sodio o con una solución 0.1 M de Hidróxido de Sodio y las condiciones reductoras se reprodujeron con  $\beta$  mercaptoetanol a una concentración final de 0.2%.

Por cada 90  $\mu$ l de cultivo sonicado se adicionaron 10  $\mu$ l de la solución de solubilización de pH 10.5, en presencia de 0.2% de  $\beta$  mercaptoetanol. Las protoxinas se recuperaron en el sobrenadante, después de centrifugar a 10000 rpm por 10 min.

Se comprobó la solubilidad de los cristales por electroforesis SDS-PAGE, utilizando un marcador de peso molecular comercial Presicion Plus Protein standard All Blue de BioRad, Número de Catálogo 161-0373.

#### **V.IA.VI ACTIVACION DE LA PROTOXINA Cry POR ACCION DE PROTEASAS EN LOS EXTREMOS C-TERMINAL Y N- TERMINAL.**

La activación de las protoxinas solubilizadas, se llevó a cabo con Tripsina con concentraciones que varían en concentración final de 5 a 50  $\mu$ g/ml, con tiempos de 30 min a 2 h 30 min, a 37 °C dependiendo de cada cepa. Después del tiempo de incubación, la reacción se paró con PMSF 1 mM en concentración final. La toxina activada se recuperó en el sobrenadante después de centrifugar a 10000 rpm por 10 min y se guardó a -20°C, hasta su uso en los ensayos de citotoxicidad.

Se comprobó la presencia de proteína Cry activada en un gel SDS-PAGE al 10%, el cual se corrió a 25 mA durante 2 h.

La cuantificación de la proteína se llevó a cabo por el método de Lowry tomando como referencia la curva estándar de albúmina sérica bovina.

Los ensayos de citotoxicidad en las líneas celulares se realizaron por triplicado con concentraciones de 5  $\mu$ g a 0.005  $\mu$ g de proteína Cry activada.

#### **V.IA.VII ELECTROFORESIS DE PROTEINAS EN GELES DE POLIACRILAMIDA.**

La electroforesis unidimensional de tipo desnaturalizante en gel de poliacrilamida-docecil sulfato de sodio, (SDS-PAGE) se realizó por el método de Laemmli publicado en 1970, usando un gel separador al 10% (p/vol) .

Las muestras se corrieron a 25 mA durante aproximadamente 40 min y después a 30 mA por aproximadamente 1.5 h. El gel se tiñó con azul brillante de Coomassie R250 al 0.4% (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.). El peso molecular de las proteínas se determinó usando como referencia el marcador de peso molecular comercial Precision Plus Protein Standard All Blue de BioRad.

#### **V.IA.VIII ELECTROFORESIS DE PROTEINAS TOTALES DE CEPAS AISLADAS DE *Bacillus thuringiensis***

Una forma de identificar y caracterizar cepas de *B. thuringiensis*, es a través de su perfil de proteínas ya que resulta característico en este grupo de bacterias. Se presenta invariablemente una banda mayoritaria alrededor de los 150 kDa, 75 kDa o 50 kDa, en algunos casos existen las 3 bandas. Para determinar el perfil de proteínas de cepas de *B. thuringiensis* aisladas de la región Ensenada-Tijuana, se creció en medio SP cada una de las cepas durante 96 horas a 30°C, se corrió una electroforesis en gel de poliacrilamida, (SDS-PAGE) para definir su perfil de proteínas. Se tomaron 20 µl del cultivo y 20 µl de mezcla lítica 1 x, se homogeneizó y se calentó a 95 °C por 5 min. Las muestras se sometieron a electroforesis cargando 30 µl en cada pozo y se corrieron a 20 mA durante 2 h. El gel se tiñó con azul brillante de Coomassie R250 al 0.4% (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.). El peso molecular de las proteínas se determinó usando como referencia el marcador de peso molecular comercial Precision Plus Protein Standard All Blue de BioRad .

## V.IA.IX EXTRACCION DE ADN TOTAL

A partir de un cultivo de 24h de *Bacillus thuringiensis* en medio LB se obtuvo un botón celular, al que se le añadieron 100µl de solución STE (Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM, Sacarosa 50mM y NaCl 0.1M + 10µg/ml de lisozima), se homogeneizó. Se incubó por 30 min y se le añadieron 300 µl de una solución Tris- HCl-EDTA + SDS-Proteinasa K 50µg/ml se mezcló y homogeneizó. Después de una incubación de 60 min a 50 °C se le añadieron 200 µl de fenol equilibrado o saturado con Tris pH 8.0, se mezcló por inversión y posteriormente se centrifugó a 13000 rpm por 5 min, la fase acuosa e intermedia se separaron, la fase orgánica se desechó.

A la fase acuosa e intermedia se les agregaron 200 µl de fenol/cloroformo y se mezcló por inversión. Se centrifugó a 13000 rpm por 5 min. Se separó la fase acuosa y la orgánica se desechó, el último lavado se realizó adicionando 200 µl de cloroformo puro. A la fase acuosa se le agregó 1 µl de ARNsa y se incubó por 30 min a 37°C. Se adicionó 1 volúmen de acetato de sodio 3 M y 2 volúmenes de etanol absoluto frío (-20°C) , se dejó toda la noche a -20 °C .

El ADN se obtuvo por centrifugación a 13000 rpm durante 10 min, se eliminó el etanol, se añadieron 300 µl de etanol frío al 70% se centrifugó a 13000 rpm por 5 min para eliminar el etanol y por último se dejó evaporar el resto de etanol para posteriormente resuspender en 50 µl de agua estéril tipo I. El ADN se guardó -20 °C.

La integridad del ADN se comprobó en un gel de agarosa al 0.8% empleando un marcador de peso molecular de 1 kb O´Gene Ruler 1 kb ADN ladder ready to use de Fermentas , Número de Catálogo SM1163.

### **V.IA.X CARACTERIZACION MOLECULAR POR PCR DE LOS GENES *cry* Y *cyt* DE *Bacillus thuringiensis*.**

La identificación de genes *cry* y *cyt* de las cepas de *Bacillus thuringiensis* aisladas de Baja California se realizó a partir de ADN total y oligos generales previamente reportados por Bravo *et al.* 1998; 2003; Ceron *et al.* 1995) (Tabla III) para: *cry*1, *cry*2, *cry*3, *cry*4, Nem (oligo general para *cry*5, *cry*12, *cry*14, *cry*21), *cry*8, *cry*9, *cry*10, *cry*11, *cry*25, *cry*29 y *cyt* y oligos específicos para *cry*1.

Las condiciones generales de amplificación de los genes *cry* y *cyt* son: Un ciclo de 2 min a 95°C. 30 ciclos de 1 min a 95°C, 1min a la temperatura de alineamiento indicada para cada oligonucleótido en la Tabla 3; 1 min a 72°C. Y un paso más de 5min a 72°C. Los productos de PCR se sometieron a electroforesis en geles de agarosa al 0.8% a 100 V durante 1.5 h. Se cargaron 10 µl de muestra + 3 µl de colorante, se utilizó un marcador de peso molecular de 1kb O'Gene Ruler 1kb ADN ladder ready to use de Fermentas , Número de Catálogo SM1163. El gel se tiñó con Bromuro de Etidio durante 5 min y las bandas se visualizaron en un transiluminador de luz UV.

**Tabla III.** Oligonucleótidos Cry generales y específicos. En esta tabla se muestra el par de oligos que reconoce la secuencia complementaria del gen Cry presente en la cepa, la temperatura de alineamiento utilizada en la reacción de PCR y el tamaño esperado del producto.

Gen	Oligonucleótidos	Temperatura de alineamiento	Tamaño del producto esperado
Gral Cry2	(d) GAGTTTAATCGACAAGTAGATAATTT (r) GGAAAAGAGAAATATAAAAATGGCCAG	50°C	526pb
Gral Cry3	(d) TTAACCGTTTTTCGCAGAGA (r) TCCGCACTTCTATGTGTCCAAG	48°C	703pb
Gral Cry4	Esp cry 4A (d) TCAAAGATCATTTCAAAATTACATG Esp cry 4B (d) CGTTTTCAAGACCTAATAATATAATACC (r) CGGCTTGATCTATGTCATAATCTGT	50°C	459pb 321pb
Gral Nem	(d) TTACGTAAATTGGTCAATCAAGCAAA (r) AAGACCAAATTCATACCAGGGTT	50°C	474pb
Gral Cry8	(d) ATGAGTCCAAATAATCTAAATG (r) TTTGATTAATGAGTTCTTCCACTCG	49°C	376pb
Gral Cry9	Esp cry 9A (d) GTTGATACCCGAGGCACA Esp cry 9B (d) TCATTGGTATAAGAGTTGGTGATAGAC Esp cry 9C (d) CTGGTCCGTTCAATCC Cry 9 (r) CCGCTTCCAATAACATCTTTT	51°C	571pb 402pb 306pb
Gral Cry10	(d) TCAATGCTCCATCCAATG (r) CTTGTATAGGCCTTCCTCCG	51°C	348
Gral Cry11	(d) CGCTTACAGGATGGATAGG (r) GCTGAAACGGCAGCAATATAATA	50°C	305pb
Gral Cry25	(d) GGCTTCTAGATCAGGAGATGG (r) CATCATAATCAGAGCGCAGG	53°C	560pb
Gral Cry29	(d) TCAGCTCCAATAACTGGTG (r) GCATGTCATCCCCTGTCTA	50°C	451pb
Gral Cyt	(d) CCTCAATCAACAGCAAGGGTTATT (r) TGCAAACAGGACATTGTATGTGTAATT	52°C	477pb

## V.IA.XI IDENTIFICACION DE PROTEINAS A TRAVES DE LA ESPECTROMETRIA DE MASAS DE ALTA RESOLUCION LC-MS/MS

Las muestras fueron enviadas a la Unidad de Proteómica del IBT-UNAM, donde fueron analizadas.

Previamente las muestras son reducidas con diotiotreitol (DTT), alquilado con iodoacetamida y digeridas con tripsina Promega part no. 9PIV5113. Los péptidos resultantes se desalan usando C18 ZipTips (Millipore), y después son analizadas por LC-MS/MS. La cromatografía fue presentada usando el Accela HPLC de ThermoFisher. A una tasa de flujo de 300nL/min. Corrió a través de una columna PicoFrit Proteopep2 C18 de 75mm ID x 50nm por 90 min. Se utilizó como solvente A: agua + ácido acético al 0.1%, y como solvente B Acetonitrilo + ácido acético al 0.1%.

El análisis de datos se hizo utilizando el Sequest from Discoverer 1.0 contra una base de datos no redundante.

## V.IB.I EFECTO HEMOLITICO DE TOXINAS DE *Bacillus thuringiensis* SOBRE ERITROCITOS HUMANOS

Se extrajeron 10 ml de sangre en un tubo heparinizado. Se centrifugó el tubo con la sangre sin coagular a 2500 rpm x 10 min a 10°C. Se removió la fracción del suero con una pipeta. Se realizaron tres lavados con un amortiguador de lavado [PBS al 50% (v/v) y glucosa al 2.25% (w/v)]. Se centrifugó en cada lavado a 2500 rpm x 10 min a 10°C. El paquete de eritrocitos se recuperó y se resuspendió hasta una concentración del 0.1% (v/v) con un regulador de suspensión, que consiste en PBS al 50% (v/v) glucosa al 2.25% (w/v) y gelatina al 0.05% (w/v).

Se realizó por triplicado el ensayo en placas de 96 pocillos de fondo U. Se mezclaron 100 µl de la suspensión de eritrocitos al 1% con 100 µl de la suspensión de la toxina activada en concentraciones de 5 µg/ml, 2.5 µg/ml y 1.25 µg/ml.

Al control negativo no se le inoculó nada sólo fue la suspensión de eritrocitos al 1%. El control positivo para hemólisis se construyó mezclando 100 µl de la suspensión de eritrocitos al 1% con 100 µl de Triton X al 1%.

Se observaron los cambios en la suspensión de eritrocitos cada hora hasta cumplir las 24 h y se cuantificaron los glóbulos rojos presentes en cada pocillo en un contador automático de células sanguíneas.

En base a los controles positivo y negativo se determinó si había actividad hemolítica de cada toxina sobre los eritrocitos.

#### **V.IB.II CONDICIONES DE CRECIMIENTO DE LINEAS CELULARES DE HUMANO.**

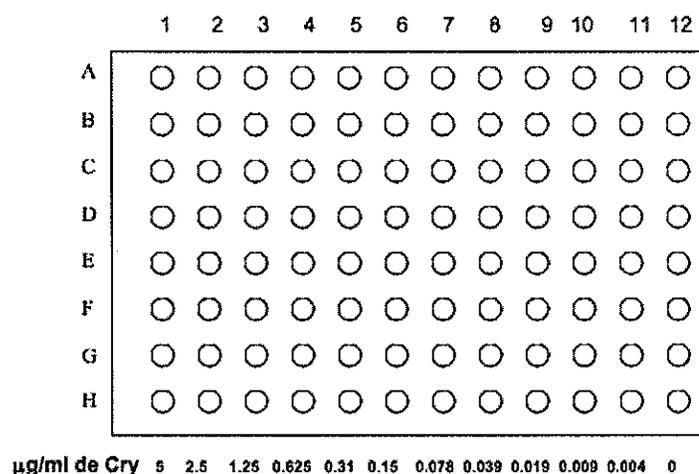
Cada línea celular se cultivó en frascos de 75 cm<sup>2</sup> en el medio más conveniente según la línea celular, RPMI para HeLa, DMEM para SiHa, HaCat, y MCF-7. Además se suplementaron con 10% de suero bovino fetal de Invitrogen, No. de Catálogo 26140-087 y con Antibiótico/Antimicótico de Invitrogen, No. de Catálogo 15240 al 1%. Los cultivos se incubaron a 37°C con atmósfera humidificada conteniendo un 5% de CO<sub>2</sub>. Las células se mantuvieron en crecimiento exponencial mediante la realización de subcultivos dos veces por semana retirando el medio de cultivo suplementado y realizando 3 lavados con 5 ml PBS 1x pH 7. Posteriormente las células se disociaron con 500 µl de Tripsina de Invitrogen 0.25% 1x, No. de Catálogo 15050-057 más 1500 µl de Verseno pH 7.0, con una incubación de 5 min a 37°C. Posteriormente las células se concentraron por centrifugación a 2500 rpm por 5 min. Se retiró el sobrenadante, las células se resuspendieron en 1 ml de medio y se sembraron en frascos de 75 cm<sup>2</sup> con 10 ml de medio suplementado.

### **V.IB.III DETERMINACION DE LA RELACION ENTRE EL NUMERO DE CELULAS METABOLICAMENTE ACTIVAS Y FORMAZAN PRODUCIDO.**

El definir el número de células metabólicamente activas adecuado por pocillo para cada línea celular es importante, ya que de esta forma se obtiene la relación entre el número de células colocado inicialmente en los pocillos y la absorbancia que se obtiene en el ensayo final con MTT, y se determina en que rango esta relación es lineal. Se realizaron siembras de células por triplicado en pocillos con número creciente de 1,000 hasta 30,000 células, eligiendo esta densidad por el número de células con las que los ensayos de citotoxicidad se llevaron cabo. Se incubaron por 5h y al termino de este tiempo se adicionó MTT, a las 2h el MTT se ha transformado en formazán a través de una reacción catabolizada por la succinato deshidrogenasa. Se tomó la lectura a 545 nm y se graficaron las absorbancias encontradas para cada tipo celular y el número de células sembradas.

### **V.IB.IV EFECTO DE TOXINAS Cry y Cyt DE *B. thuringiensis* EN CELULAS CANCERIGENAS EN CULTIVO.**

Se realizaron ensayos de citotoxicidad en líneas celulares cancerígenas. Las células de cada línea, procedentes de un cultivo en crecimiento exponencial con una confluencia del 80%, se retiraron de los frascos por disociación con una solución de Tripsina-Verseno, y se centrifugaron a 2500 rpm durante 5 min, se resuspendieron en 1 ml de medio y se contaron en una cámara de Neubauer en un microscopio invertido. Tras el recuento se añadió el volumen necesario para sembrar  $5 \times 10^4$  células en cada pozo de las placas de microcultivo de 96 pocillos, a continuación se colocó el medio necesario para alcanzar un volumen total de 100  $\mu$ l, se incubaron por 5h a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Después de transcurrido el tiempo adecuado para que las células se adhirieran a la superficie, se desechó el sobrenadante y se adicionó la toxina activada en la concentración determinada para cada pocillo como se muestra en la Figura 13.



**Figura 13.** Ensayo por triplicado de citotoxicidad en microplacas de 96 pozos. Cada pozo contiene 50000 células previamente adheridas a la superficie de la placa, a cada pozo se le adicionan 100  $\mu\text{l}$  de la concentración de la toxina previamente activada, diluida en medio de cultivo celular incompleto. Las concentraciones de toxina van desde los 5  $\mu\text{g}$  hasta 0.004  $\mu\text{g}$  y la última columna se utiliza como control negativo: solo células y medio.

El ensayo de citotoxicidad duró 24 h, con incubación a 37 °C y en atmósfera humidificada conteniendo un 5% de  $\text{CO}_2$ . Después de 24 h de incubación las células se observaron bajo el microscopio de contraste de fases para estimar la citotoxicidad de manera cualitativa, y se sometieron a ensayos colorimétricos con MTT para medir viabilidad celular. Los ensayos se realizaron por triplicado.

#### V.IB.V ENSAYO DE VIABILIDAD CELULAR.

La actividad inhibidora del crecimiento tumoral se estudió mediante un microensayo colorimétrico de citotoxicidad basado en el empleo del Bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazoilo (MTT). Las células vivas y metabólicamente activas son capaces de reducir el MTT, de color amarillo en solución a formazán, compuesto insoluble que precipita en forma de cristales de color azul oscuro (Kalous *et al.* 2004).

Esta reacción está catalizada por la succinato deshidrogenasa mitocondrial (Mueller *et al.* 2004), y la cantidad de producto formado puede ser fácilmente cuantificada utilizando un lector de placas de ELISA. Esto permite estimar el número de células vivas y activas que existe en un cultivo realizado en presencia de un metabolito cuyo efecto se quiere estudiar.

Una vez transcurrido el tiempo de incubación se añadió una solución de 50 µl de MTT (1 mg/ml en PBS) y 50 µl de medio incompleto a cada uno de los pocillos con células. Se incubaron bajo las mismas condiciones antes mencionadas durante 2 horas permitiendo a las células vivas metabolizar el MTT a formazán.

A continuación el sobrenadante se desechó, y los cristales de formazán precipitados, se disolvieron con 100µl de isopropanol por cada pocillo. Las placas se agitaron mecánicamente durante unos minutos para facilitar la disolución del formazán y obtener una coloración homogénea, y la lectura se llevó a cabo en un lector de placas de ELISA a una longitud de onda de 545 nm.

Con la absorbancia obtenida en cada pocillo con diferentes concentraciones de la toxina se obtendrá el % de viabilidad de cada muestra de células respecto al control negativo:

$$\left[ (M_P - M_B) / M_{CN} \right] \times 100$$

Donde  $M_P$  es la absorbancia problema, encontrada para una concentración de toxina dada,  $M_B$  es la absorbancia del blanco, que es medio incompleto + MTT y  $M_{CN}$  es la absorbancia del control negativo, es decir células incubadas en ausencia de toxina.

## V.II ENSAYOS *IN VIVO*

### EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD CITOTÓXICA DE LAS TOXINAS DE *Bacillus thuringiensis* (*B. thuringiensis*) SOBRE TUMORES INDUCIDOS EN RATONES *nu/nu* Y DE LA ACTIVIDAD INSECTICIDA.

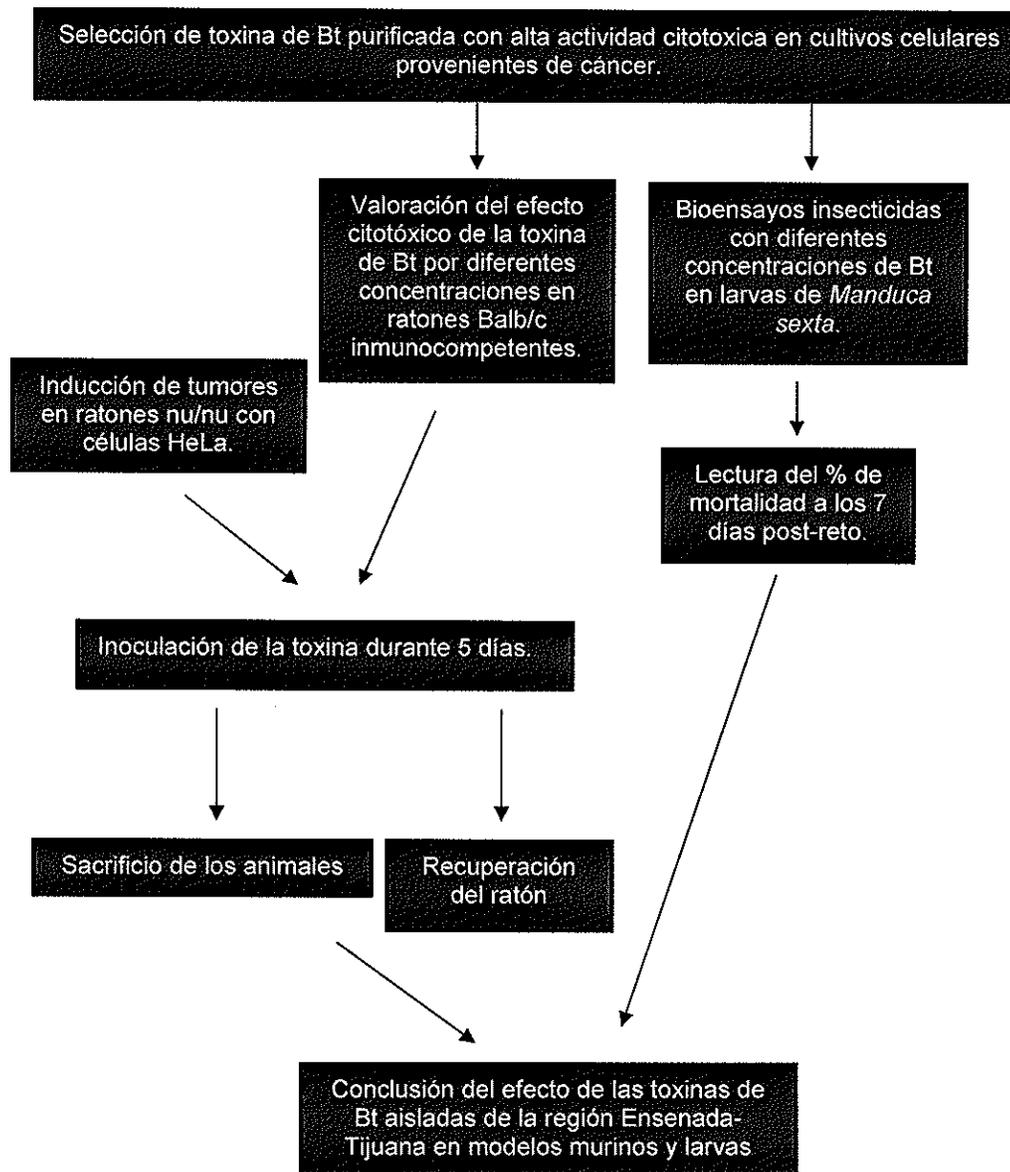
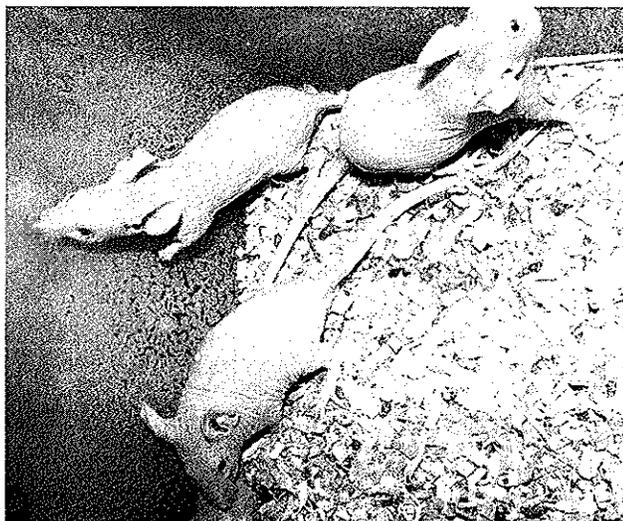


Figura 14. Diagrama de flujo del trabajo experimental realizado *in vivo*.

En base a los estudios de las toxinas realizados *in vitro*, se eligieron las 2 mejores toxinas para realizar los estudios *in vivo*, estas fueron las toxinas pertenecientes a las cepas 6-1 y 10-2 para estudios en modelos murinos en Balb/c y nu/nu. Y 6-1, 10-2, 6-3, 6-4 y 13-4 para bioensayos en *Manduca sexta*.

#### V.IIA.I INDUCCION DE TUMORES EN RATONES nu/nu

Se utilizaron 44 ratones nude hembra de 6 semanas de edad proporcionados por el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubiran". En la figura 15, se muestra una imagen de un ratón *nude* (*nu/nu*).



**Figura 15.** Imágen de ratones Balb/c atímicos con mutaciones en el gen *nude* (*nu/nu*). Se muestran fenotípicamente desnudos.

Posteriormente se trasladaron al bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas UNAM donde se mantuvieron hasta finalizar el experimento bajo temperaturas controladas de 25 °C +/- 2 °C, humedad relativa de 55%, ciclos de luz-oscuridad de 12 por 12 h, agua y alimentación (fórmula para roedores 2018S Harlan) estéril a libre demanda.

Los tumores en ratones *nude* se indujeron inoculándolos con células HeLa cultivadas como se describe previamente. Cuando se alcanzó una confluencia del 90% en frascos de cultivo celular, se despegaron las células y se realizó el conteo. Se ajustó el número de células a  $1 \times 10^6$  por cada 100  $\mu$ l de medio RPMI.

Se inocularon 100  $\mu$ l de la suspensión celular ajustada a  $1 \times 10^6$  células HeLa a cada ratón para inducir el tumor de forma subcutánea en el flanco posterior del ratón con una jeringa de insulina y aguja del No. 27.

Se observó el comportamiento del ratón y se realizaron mediciones del tumor cada 4 días hasta que se alcanzó el tamaño deseado del tumor, entre 0.4 y 0.6 cm de diámetro. Posteriormente se inició el experimento de citotoxicidad de toxinas Cry sobre tumores inducidos.

#### **V.IIA.II ESTUDIO DE CITOTOXICIDAD DE TOXINAS Cry EN RATONES Balb/c**

Se utilizaron 20 ratones Balb/c de 6 semanas de edad proporcionados por el Instituto de Biotecnología UNAM. Posteriormente se trasladaron al bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas UNAM donde se mantuvieron de la misma manera mencionada anteriormente. En la figura 16 se muestra la imagen de un ratón Balb/c.

Se formaron 5 grupos de 4 ratones cada uno. 4 grupos fueron inoculados con una toxina diferente y el quinto grupo fue utilizado como control, se le inoculó sólo medio.

La inoculación de la toxina fue cada 24 h por 7 días de forma subcutánea en el lomo o flanco posterior del ratón con una jeringa de insulina y aguja No. 27. En la tabla IV se define la forma que se realizaron las inoculaciones.

---



**Figura 16.** Imagen de un ratón inmunocompetente cepa Balb/c fenotípicamente con pelo.

**Tabla IV.** Diseño experimental para estudiar la citotoxicidad de toxinas Cry en ratones Balb/c.

Ratón No.	Toxina de 6-1µg/100µl	Toxina de 6-4µg/100µl	Toxina de 10-2µg/100µl	Toxina de M2#2µg/100µl	Control medioRPMI
1	1	1	1	1	100µl
2	10	10	10	10	100µl
3	50	50	50	50	100µl
4	100	100	100	100	100µl

### V.IIA.III CITOTOXICIDAD DE TOXINAS Cry SOBRE TUMORES INDUCIDOS EN MODELOS MURINOS *nude (nu/nu)*.

Una vez que los tumores alcanzaron el tamaño esperado de 0.4 a 0.6 cm, lo cual se presentó alrededor de la tercer semana se trataron con las toxinas Cry previamente estudiadas en cultivos celulares.

Se formaron 5 grandes grupos. El primero para experimentar con diferentes concentraciones de la toxina 6-1 y comparar diferentes parámetros de 24 h después de que la última dosis fue administrada. En el segundo grupo de ratones se administraron diferentes concentraciones de la toxina 10-2 y se compararon diferentes parámetros 24 h después de que la última dosis fue administrada. El tercero y cuarto grupo se formaron en base a la concentración de la toxina 6-1 ó 10-2, respectivamente que causó el efecto deseado sobre el tumor (eliminación). Se observó el proceso de recuperación del ratón después de que el tumor fue destruido por la toxina. El objetivo de este último experimento fue conocer si la concentración utilizada erradicaba por completo el tumor o presentaba regresión. El quinto grupo se utilizó como grupo control, consistió en ratones con tumor inducido a los que se les inoculó una mezcla de los reactivos utilizados para la activación de la toxina (SD-IBT, Tripsina, PMSF). El diseño experimental se describe en la tabla V.

La toxina fue previamente activada con tripsina, cuantificada e inoculada como se describió previamente.

**Tabla V.** Diseño experimental para estudiar el efecto de toxinas Cry sobre tumores inducidos en ratones *nude*.

<b>GRUPO 1</b>	<b>TOXINA 6-1</b>
<b>Subgrupo 1</b>	
Ratón 1 al 4	10µg/100µl
<b>Subgrupo 2</b>	
Ratón 1 al 4	30µg/100µl
<b>Subgrupo 3</b>	
Ratón 1 al 4	50µg/100µl
<b>GRUPO 2</b>	<b>TOXINA 10-2</b>
<b>Subgrupo 1</b>	
Ratón 1 al 4	10µg/100µl
<b>Subgrupo 2</b>	
Ratón 1 al 4	30µg/100µl
<b>Subgrupo 3</b>	
Ratón 1 al 4	50µg/100µl
<b>GRUPO 3</b>	<b>TOXINA 6-1</b>
<b>Subgrupo 1</b>	
Ratón 1 al 4	10µg/100µl
<b>Subgrupo 2</b>	
Ratón 1 al 4	30µg/100µl
<b>GRUPO 4</b>	<b>TOXINA 10-2</b>
<b>Subgrupo 1</b>	
Ratón 1 al 4	10µg/100µl
<b>Subgrupo 2</b>	
Ratón 1 al 4	30µg/100µl
<b>GRUPO 5</b>	<b>CONTROL</b>
Ratón 1 al 4	100µl (SD-IBT+Tripsina+PMSF)

### V.IIB.I ACTIVIDAD INSECTICIDA DE TOXINAS Cry

Se utilizaron suspensiones de espora cristal de las cepas de *B. thuringiensis* de 96 h de cultivo. Se realizó la cuantificación de proteínas por el método de Lowry.

En placas de 24 pozos se vertió la dieta artificial – agar que consumen las larvas de *Manduca sexta* y se dejó solidificando. Se utilizó una placa por ensayo.

Cada ensayo consistió en probar una concentración de la toxina problema. La concentración a probar se ajustó a un volumen de 950 µl con agua estéril que se depositó en cada pozo de la placa en condiciones de esterilidad y se dejó secando. En la tabla VI se muestran las concentraciones que se probaron de cada una de las toxinas.

Se probó la actividad insecticida de las toxinas Cry de las cepas 6-1, 6-3, 6-4, 10-2 y 13-4 en larvas de *Manduca sexta* criadas en el insectario del laboratorio de Microbiología Molecular del Instituto de Biotecnología – UNAM bajo las siguientes condiciones: Períodos de luz de 12 h x 12 h de oscuridad, Temperatura de 26 °C, humedad relativa del 60%, alimentación artificial. Crecimiento en cajas petri.

Una vez que cumplieron 6 días de desarrollo se transfirieron a placas de 24 pozos que contenían la misma dieta artificial en agar y la concentración de la toxina Cry problema embebida en cada uno. Para no dañar el cuerpo de la larva se tomaron de la cola con pinzas y se depositó una larva por pozo. En la figura 17 se observa el crecimiento larvario de *Manduca sexta* sobre la dieta artificial en cajas Petri y una placa de 24 pozos con dieta artificial donde son depositadas para los bioensayos con las toxinas Cry.

Se sellaron las placas con plástico y se dejaron en el insectario por siete días. Se tomó lectura de las placas, de las larvas que evidentemente se observaron muertas y las vivas. Se calculó la  $DL_{50}$  de 6-1 y 10-2 por el método estadístico probit.

**Tabla VI.** Concentración de las diferentes toxinas de *B. thuringiensis* probadas en larvas de *Manduca sexta*.

Toxina	Concentración ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )
6-1	0.01
6-1	0.05
6-1	0.1
6-1	0.5
6-1	2
6-3	2
6-4	1
6-4	2
10-2	1
10-2	2
13-4	1
13-4	2
Control	-



**Figura 17.** Bioensayo de actividad insecticida de toxinas de *B. thuringiensis*. Crecimiento de larvas de *Manduca sexta* en cajas petri sobre dieta artificial. Del lado derecho de la figura se muestra placas de 24 pozos con dieta artificial-agar con la toxina ya embebida en él. En cada uno de ellos se colocó la larva para realizar los bioensayos.

## VI. RESULTADOS

### VI.IA.I AISLAMIENTO DE CEPAS DE *B. thuringiensis*.

Se aislaron 74 colonias que presuntamente era cepas de *B. thuringiensis*. Cada una de ellas se resembró en medio SP-agar durante 96 h a 30 °C. Después de verificar morfología celular y producción de cristales por tinción VM en microscopio y el perfil de proteínas de cada una en geles de poliacrilamida desnaturizante al 10%, se descartaron 39 cepas por no producir cristales y/o presentar el mismo perfil de proteínas que otra cepa ya elegida.

Finalmente con las 28 cepas restantes, que se muestran en la figura 18, se estandarizaron protocolos de cultivo, purificación y activación de cristales.



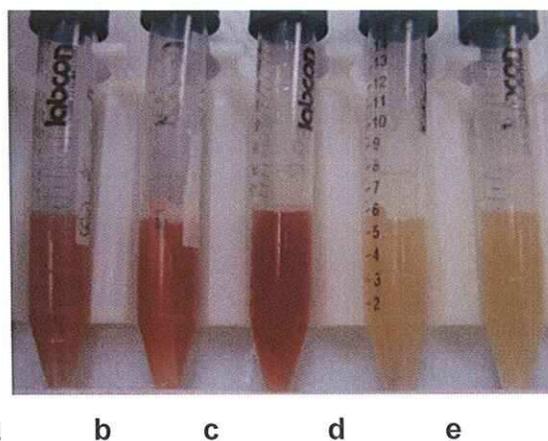
**Figura 18.** Siembra de cepas de *B. thuringiensis* en medio sólido. Cepas de *B. thuringiensis* seleccionadas de la región Ensenada-Tijuana en medio de cultivo SP-agar, 96 h de incubación a 30°C.

MORFOLOGIA COLONIAL. Son colonias de 0.5 a 1.5 cm de diámetro, blanquecinas con apariencia de cera, de forma circular, elevada, de borde ondulado, de apariencia semiseca, no brillante. La figura 19, muestra colonias típicas de *B. thuringiensis* crecidas en medio Nutrient Broth Agar, por 12 h a 37 °C.



**Figura 19.** Crecimiento colonial de diferentes cepas de *B. thuringiensis* en medio Nutrient Broth. A) *B. thuringiensis* var. *aizawai*. B) *B. thuringiensis* var. *kurstaki*.

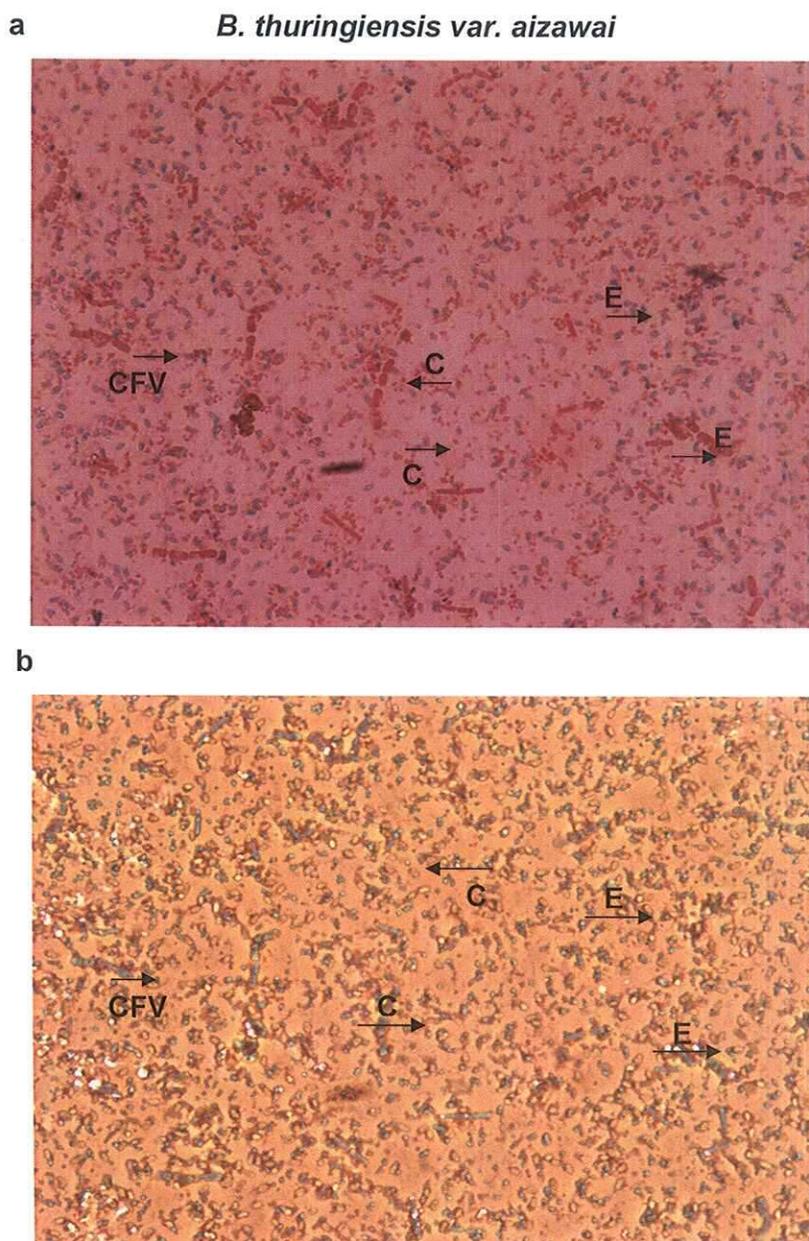
En medio SP líquido se pudo observar la diferente coloración entre las cepas de *B. thuringiensis*, que va desde un tono amarillo paja hasta tonos rojo ladrillo. En la figura 20, se observan cultivos de *B. thuringiensis* en medio SP líquido.



**Figura 20.** Cultivo de *B. thuringiensis* en medio SP líquido. En esta fotografía se muestran las diferentes coloraciones que las cepas de *B.thuringiensis* pueden tener. Figura A-E. Diferentes cepas de Bt cultivadas en medio SP durante 96 h a 30 °C.

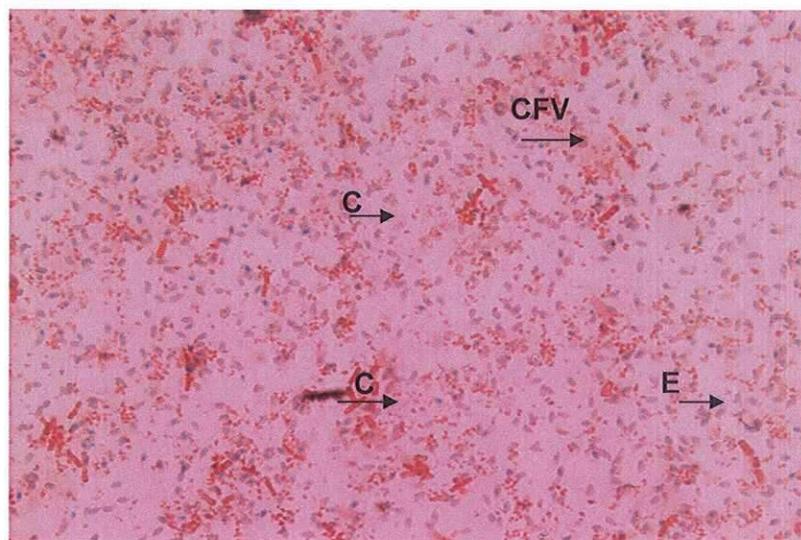
**MORFOLOGIA CELULAR.** Son bacilos gram positivos, esporulados, de 1 a 1.5  $\mu\text{m}$  de ancho por 3 a 5  $\mu\text{m}$  de largo. Cuando son teñidos por la técnica de verde de malaquita, podemos observar además una estructura en posición paraesporal, del mismo tamaño o inclusive algunas veces mayor a la espora, estos son los cristales cuyos péptidos que lo forman al activarse presentan propiedades insecticidas y anticancerígenas.

Las incubaciones de 96h tienen como objetivo la producción masiva de esporas y cristales, pero además, el que la mayoría de las células lleguen a lisarse para facilitar la purificación de los cristales. Cuando se observa al microscopio óptico el cultivo cosechado teñido con la técnica de Verde de Malaquita, se distinguen las esporas y cristales liberados. En la figura 21 y 22, se puede observar la morfología celular de *B. thuringiensis* teñida con verde de malaquita vista al microscopio óptico con luz visible y en contraste de fases.

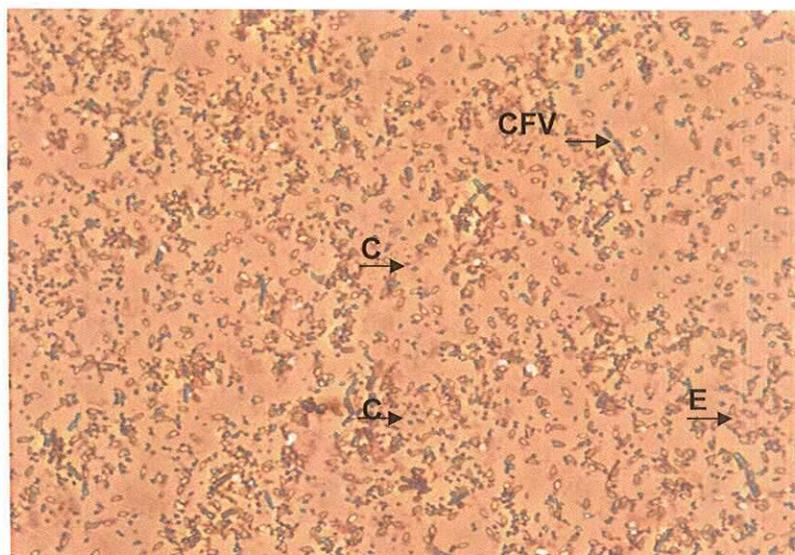


**Figura 21.** Morfología celular de *B. thuringiensis var. aizawai* al microscopio óptico 100x. Medio utilizado: SP, durante 96h a 30 °C con agitación de 275 rpm. Tinción Verde de malaquita. Figura A, en luz visible y la figura B en contraste de fases. Los cristales y la fase vegetativa de la bacteria se observan en la misma tonalidad - rosa, en luz visible y verde en contraste de fases y las esporas - verdes en luz visible y amarillas en contraste de fases. CFV- Células en fase vegetativa. E- Esporas. C- Cristales.

a *Bacillus thuringiensis* 6-1



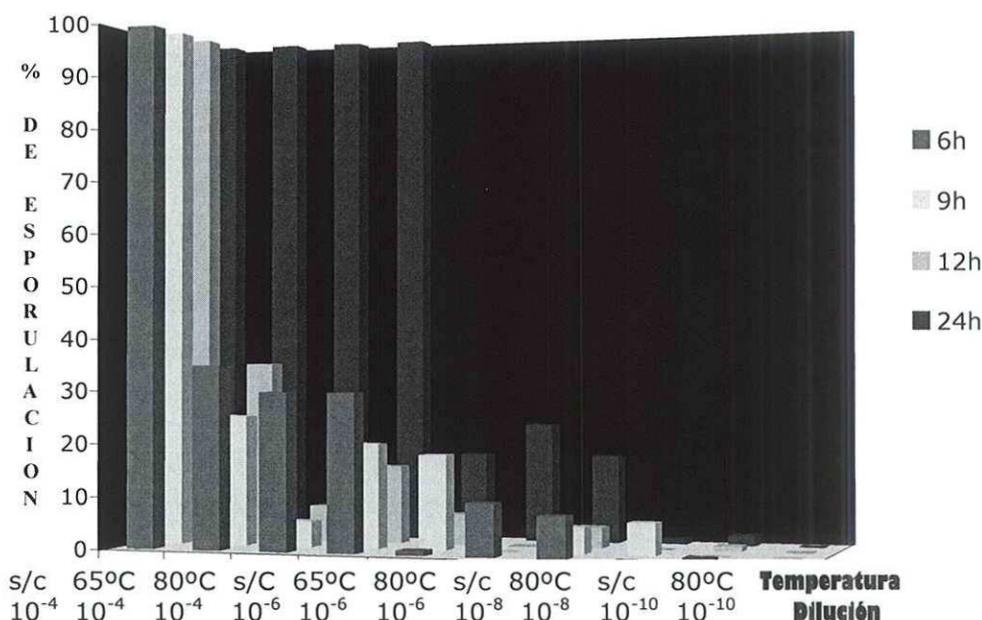
b



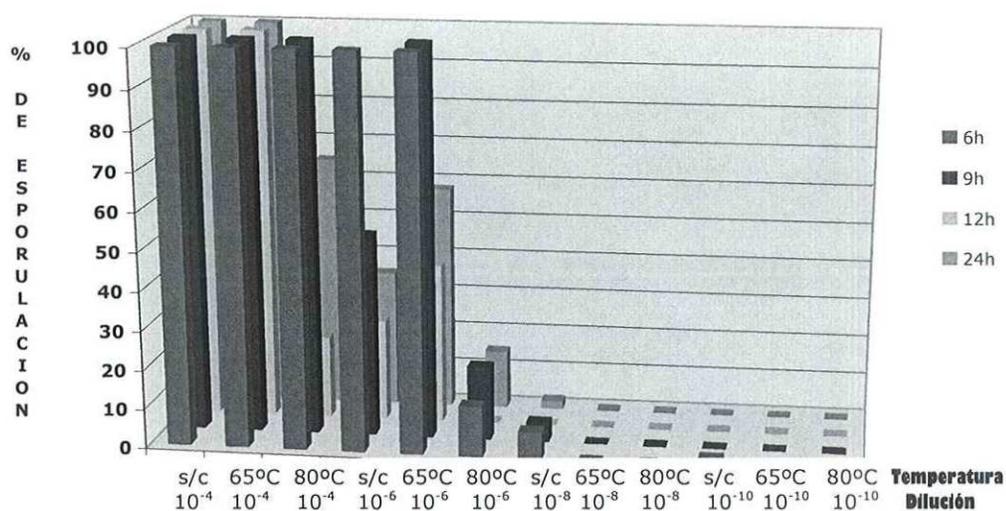
**Figura 22.** Morfología celular de *B. thuringiensis* 6-1 al microscopio óptico 100x. Medio utilizado: SP, durante 96 h a 30 °C con agitación de 275 rpm. Tinción Verde de malaquita. Figura A, en luz visible y la figura B en contraste de fases. Los cristales y la fase vegetativa de la bacteria se observan en la misma tonalidad - rosa, en luz visible y verde en contraste de fases y las esporas - verdes en luz visible y amarillas en contraste de fases. CFV- Células en fase vegetativa. E- Esporas. C- Cristales.

### VI.AI.II CULTIVO DE CEPAS DE *Bacillus thuringiensis*.

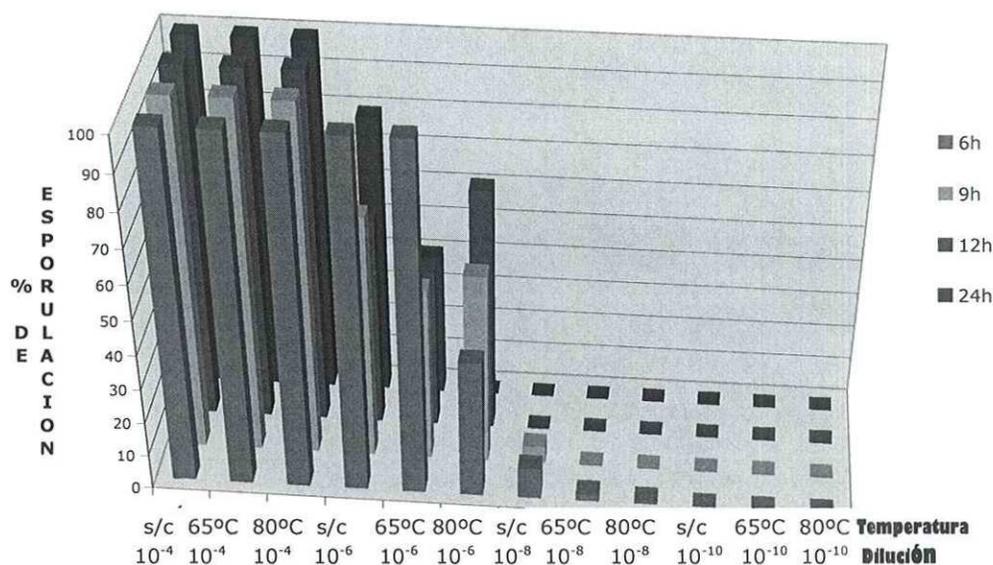
Después de sembrar y cultivar *Bacillus thuringiensis* en diferentes medios como Schaffer, LB y SP durante 4 días a 30°C con una agitación de 275 rpm, se determinó que el mejor medio para el cultivo de *Bacillus thuringiensis* y la obtención de sus cristales es SP, seguido por LB y el menos adecuado para la obtención de cristales fue Schaffer, aunque es todo lo contrario en la esporulación, ya que Schaffer es el mejor medio para esporular Bt. La esporulación se comparó cuantitativamente, pero la producción de cristales se hizo de manera cualitativa. En la figura 23 y 24, se observan gráficas que muestran el comportamiento de *B. thuringiensis* var. *aizawai* durante una curva de crecimiento en diferentes medios.



**Figura 23.** Gráfica de porcentaje de esporulación de *Bt* var. *aizawai* en medio Luria Bertani LB. Previa inoculación del medio, la cepa fue sometida a calentamiento durante 10 min. a 65° y 80°C. El control (s/c), consistió en la inoculación de medio con una cepa que no había sido sometida a calentamiento. Se realizaron diluciones de cada tratamiento y sembraron las diluciones 10<sup>-4</sup>, 10<sup>-6</sup>, 10<sup>-8</sup> y 10<sup>-10</sup>. Las lecturas de la curva se realizaron a diferentes tiempos de incubación: 6h, 9h, 12h, 24h. La incubación fue a 37°C.



a

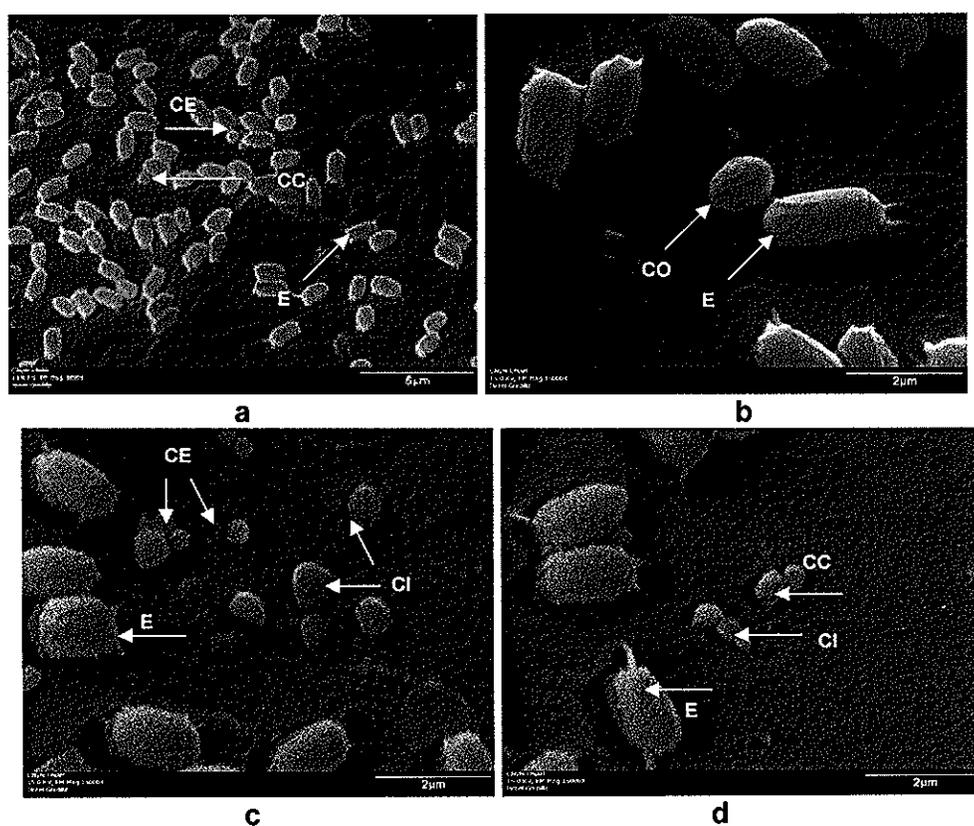


b

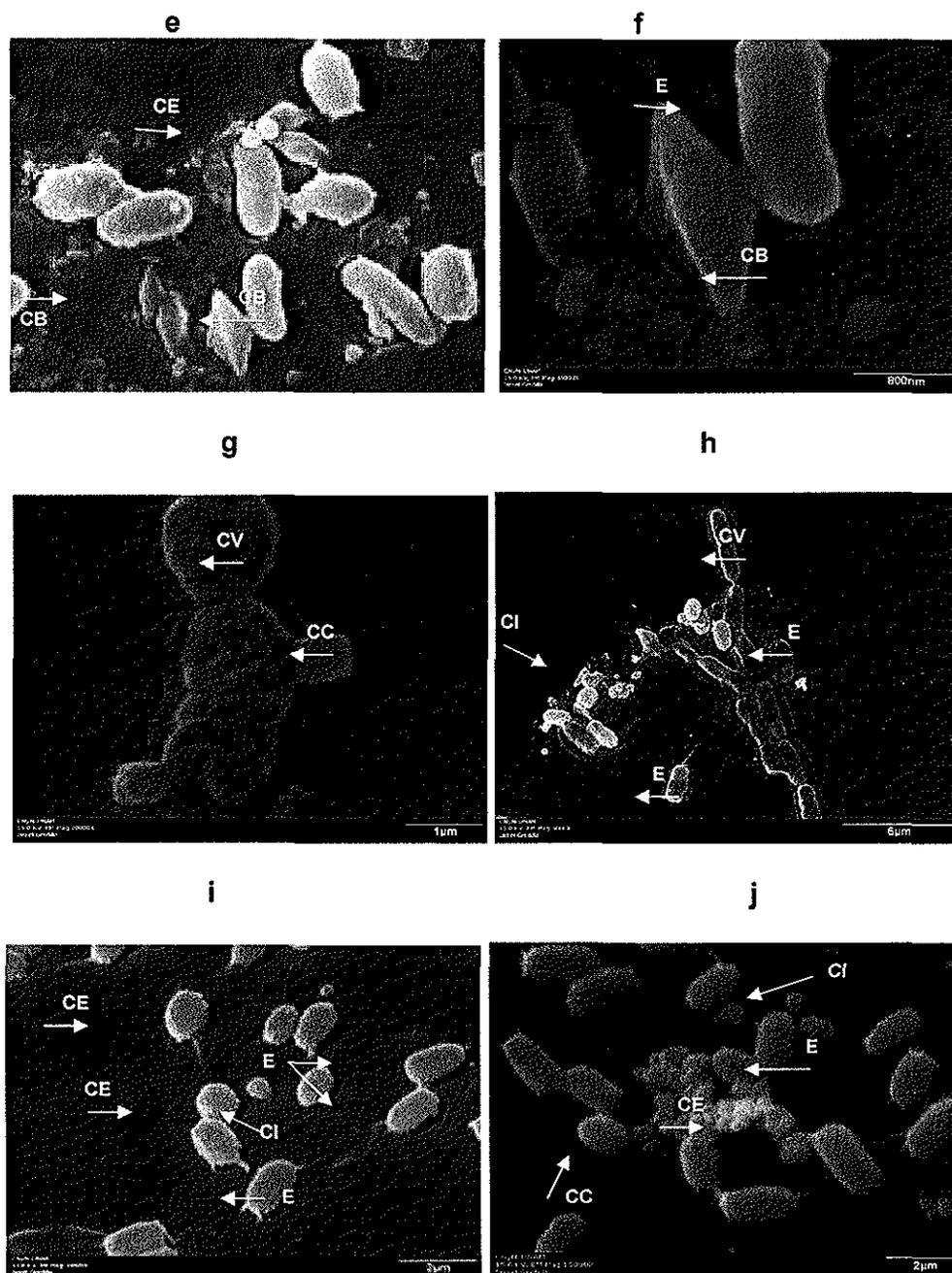
**Figura 24.** Gráfica de porcentaje de esporulación de *Bt var. aizawai* en otros medios. Figura a, medio utilizado: SP. Figura b, medio utilizado: Shaeffer. Previa inoculación del medio, la cepa fue sometida a calentamiento durante 10 min. a 65° y 80°C. El control (s/c), consistió en la inoculación de medio con una cepa que no había sido sometida a calentamiento. Se realizaron diluciones de cada tratamiento y sembraron las diluciones 10<sup>-4</sup>, 10<sup>-6</sup>, 10<sup>-8</sup> y 10<sup>-10</sup>. Las lecturas de la curva se realizaron a diferentes tiempos de incubación: 6h, 9h, 12h, 24h. La incubación fue a 37°C.

### VI.IA.III CARACTERIZACION DE CRISTALES POR MICROSCOPIA ELECTRONICA DE BARRIDO.

Se realizaron frotis muy delgados de la muestra en un portaobjetos previa limpieza con el objetivo de conservar solo cristales-esporas y desechar residuos de medio y sales. Las muestras se secaron al aire y se recubrieron con oro. Se observaron en MEB a diferentes aumentos. En la figura 25 y 26 se muestran imágenes que se lograron observar por MEB y capturar de las diferentes morfologías de los cristales encontrados en las cepas de Bt aisladas en la región Ensenada-Tijuana. En la tabla VII se enlistan las cepas aisladas y la morfología de sus cristales.



**Figura 25.** Imágenes observadas por MEB de las diferentes morfologías de los cristales de las cepas de Bt aisladas de la región Ensenada-Tijuana. Imagen a-d, Muestra diferentes morfologías de los cristales de *B. thuringiensis*, CC-cristal cúbico. CI-cristal irregular. CE- cristal esférico. CO-cristal ovoide. E- espora.



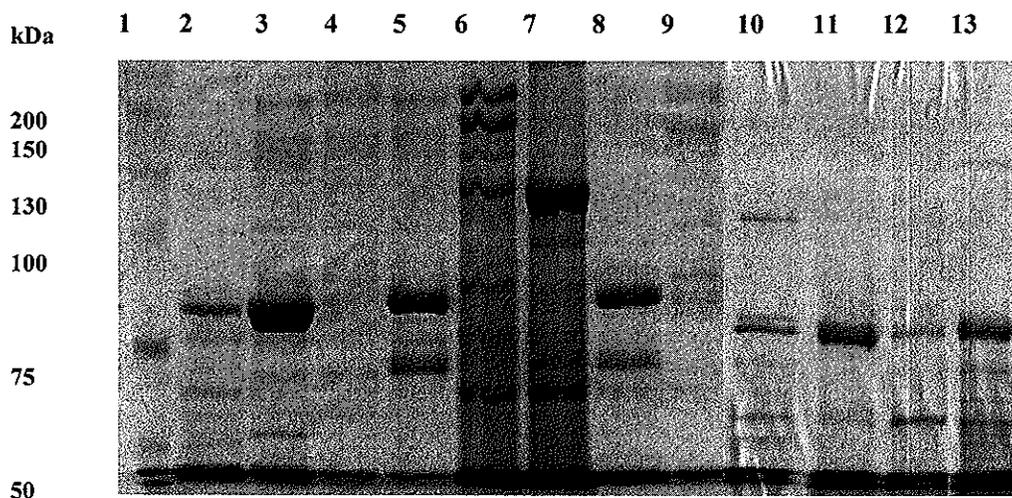
**Figura 26.** Imágenes observadas por MEB de las diferentes morfologías de los cristales de las cepas de Bt aisladas de la región Ensenada-Tijuana. Imagen e-j, Muestra diferentes morfologías de los cristales de *B. thuringiensis*, CC-cristal cúbico. CI-cristal irregular. CE- cristal esférico. CO-cristal ovoide. E- espora. C- célula vegetativa. CB-cristal bipiramidal.

**Tabla VII.** Cepas de *B. thuringiensis* aisladas de la región Ensenada-Tijuana y la morfología de sus cristales .

CEPA	MORFOLOGIA DEL CRISTAL
Bt var. aizawai	Bipiramidal, Cúbico
Bt var kurstaki	Bipiramidal, Cúbico
M1#7	Bipiramidal, Cúbico
M1#8	Bipiramidal, Ovoide
M2#2	Cúbico, Esférico
M2#7	Cúbico, Ovoide
1-2	Bipiramidal, Cúbico, Esférico
2-2	Cúbico, Irregular
4-2	Cúbico, Ovoides
4-5	Cúbico Irregular
5-4	Cúbico, Irregular
6-1	Bipiramidal, Cúbico, Esférico
6-3	Esférico
6-4	Cúbico, Esférico, Ovoide
7-2	Bipiramidal, Cúbico
7-3	Esférico, Ovoide
8-3	Cúbico
8-4	Bipiramidal, Esférico, Irregular
9-2	Cuadrado plano, Esférico, Irregular
10-2	Cúbico, Irregular, Ovoide
11-4	Cúbico
12-2	Bipiramidal, Cúbico, Irregular
12-6	Bipiramidal, Cuadrado plano, Esférico,
13-4	Cúbico
14-1	Cuadrado plano, Irregular
17-3	Bipiramidal, Irregular
18-2	Cúbico
18-5	Cuadrado, Bipiramidal
19-1	Cúbico, Irregular

#### VI.IA.IV ELECTROFORESIS DE PROTEINAS TOTALES DE CEPAS DE *B. thuringiensis* AISLADAS DE LA REGION ENSENADA-TIJUANA.

El perfil de proteínas de cada una de las cepas de *B. thuringiensis* aisladas fue una herramienta indispensable para seleccionar las cepas de Bt productoras de cristales con un perfil de proteínas único que además evidencia la presencia de proteínas Cry. En la figura 27 se muestra el perfil de proteínas de 12 cepas de *B. thuringiensis*, de las cuales 7 son aisladas de la región Ensenada-Tijuana.



**Figura 27.** Perfil de proteínas en SDS-PAGE al 10%. Carril 1) MPM, carril 2) *B. thuringiensis* var. *aizawai*, carril 3) *B. thuringiensis* var. *kurstaki*, carril 4) Cry3A, carril 5) Cry4A, carril 6) Cry1Ab, carril 7) M1#4, carril 8) M1#8, carril 9) M2#2, carril 10) M2#7, carril 11) 6-1, carril 12) 6-4, carril 13) 10-2. Tinción con Azul de Coomassie.

#### VI.IA.V CONDICIONES *IN VITRO* DE SOLUBILIZACION Y ACTIVACION PARA PROTEINAS Cry DE *B. thuringiensis*

Cada una de las cepas de *B. thuringiensis*, se sometió a diferentes tratamientos para solubilizar las proteínas que componen la inclusión parasporal, posteriormente cada una recibió un tratamiento diferente para activar las protoxinas que contenían esas inclusiones parasporales. En la tabla VIII, se resume el protocolo utilizado para cada una de las cepas (\*\*ver apéndice para preparación de los reactivos utilizados).

**Tabla VIII.** Condiciones de solubilización y activación *in vitro* de las distintas cepas de Bt aisladas y peso en kDa encontrado en cada proceso.

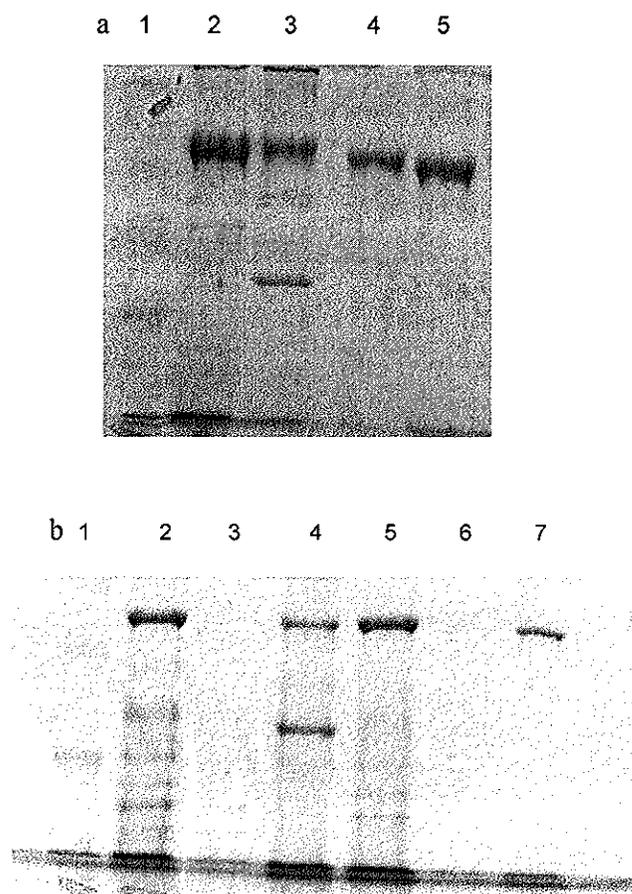
CEPA	PERFIL DE PROTEINAS (kDa)	CONDICIONES DE SOLUBILIZACION	PERFIL DE SOLUBILIZACION (kDa)	CONDICIONES DE ACTIVACION	PERFIL DE ACTIVACION (kDa)
A	160,130, 125, 100, 65, 55	1	150, 130, 88	3 (2h 30min)	65
K	200,160, 130,88,65, 48	1	160, 130, 88	3 (2h 30min)	65,54
HD1	180, 130, 120, 100, 88, 65, 56	1	<b>180, 130, 120, 100, 70, 65, 52</b>	3 (2h)	65
HD916	130, 110, 88, 65	1	<b>150, 125, 110, 75, 65, 50</b>	3 (2h)	70
Cry1b	130,88,60	1	130, 80, 60	3 (1h)	65
Cry1c	200,130	2	130, 100	3 (1h)	65
Cry3A	160,150,130	1	140	3 (2h)	47
Cry4A	160,140, 90, 50	2	160, 140	3 (1h)	
Cyt1A	100	2		5 (30min)	
M1#4	200, 130, 88,75,65,50	2	88	5(30min)	62
M1#7	200,160,1408 8, 75	1	160, 130, 88 <b>200, 150, 120, 90, 70</b>	3 (2h)	67
M1#8	160,140,88	1	130, 88	3 (2h 30min)	48
M2#2	180, 150, 120, 100,88, 65	1	<b>180, 150, 120, 100, 65</b>	3 (2h 30min)	48,37, 29
M2#7	88, 70, 65	1	88	3 (1h 30min)	49,38, 29
1-2	200,130, 100, 88,75,65	1	<b>88, 75, 65</b>	3 (2h)	40
2-2	200,88,75, 48,40	1	88	3 (2h)	37
4-2	200,88, 75, 68, 65, 62, 50	2	88	4 (1h)	67
4-5	200, 88, 75, 68, 65, 62, 50, 45	2	120, 88, 65	4 (1h)	56
5-4	150, 120, 75, 65, 55, 48	2	<b>75, 62</b>	4 (1h)	45
6-1	250, 130, 88, 75, 65, 48, 47, 46	1	<b>88</b>	3 (1h)	54

<b>6-3</b>	88, 75, 65, 55, 48, 46	2	<b>88,62</b>	4 (1h)	40
<b>CEPA</b>	<b>PERFIL DE PROTEINAS (kDa)</b>	<b>CONDICIONES DE SOLUBILIZACION</b>	<b>PERFIL DE SOLUBILIZACION (kDa)</b>	<b>CONDICIONES DE ACTIVACION</b>	<b>PERFIL DE ACTIVACION (kDa)</b>
<b>6-4</b>	200, 88, 75, 70, 44	1	<b>80</b>	5 (30min)	50, <b>37</b>
<b>7-2</b>	200, 88, 70, 44	1	<b>75, 62</b>	4 (30min)	65
<b>7-3</b>	210, 40	2	88,65,50	5 (30min)	40
<b>8-3</b>	130, 88, 75, 65, 50	2	130	5 (30min)	62
<b>8-4</b>	200, 130, 120, 100, 88, 70, 65, 50	1	<b>88, 75, 70, 65</b>	3 (1h 30min)	65
<b>9-2</b>		1	75, 65	5 (30min)	40
<b>10-2</b>	150, 88, 70, 67, 55, 50, 44	1	<b>88,</b>	3 (1h)	<b>55</b>
<b>11-4</b>	200, 88, 70, 67, 66, 55, 50, 44	2	88	5 (30min)	50
<b>12-2</b>	200, 88, 70, 67, 66, 44	2	58	3 (1h)	65
<b>12-6</b>	200, 88, 75	1	100, <b>53, 51,</b> <b>37, 23</b>	5 (30min)	70
<b>13-4</b>	80	1	<b>53, 51, 37, 23</b>	3	65
<b>14-1</b>	200, 55, 47, 40	2		5 (30min)	40
<b>17-3</b>	88	2	88,65	3 (1h)	55
<b>18-2</b>	130, 88, 70	1	130	5 (30min)	65
<b>18-5</b>	100, 75, 50	1	<b>140, 100, 70,</b> <b>53, 51, 37, 23</b> <b>105, 75, 53</b>	5 (1h)	62
<b>19-1</b>	88, 75, 50	1	<b>75, 53</b>	5 (30min)	43

1. NaHCO<sub>3</sub> 50mM + β Mercaptetanol al 0.2% (v/v) . Incubación a 37°C por 2h.
2. NaOH 100mM. Incubación a 4°C por 1h.
3. 50µg/ml de Tripsina. Incubación 37°C.
4. 10µg/ml de Tripsina. Incubación 37°C.
5. 5µg/ml de Tripsina. Incubación 37°C.

### VI.IA.VI SOLUBILIZACION Y CONFIRMACION DE LA ACTIVACION DE PROTEINAS Cry EN GELES DE POLIACRILAMIDA SDS-PAGE.

Las proteínas Cry activadas muestran una única banda o dos en el corrimiento en gel SDS-PAGE. En la figura 28 se muestran las proteínas activadas con Tripsina.



**Figura 28.** Proteínas activadas de *B. thuringiensis*. Corrimiento en SDS-PAGE al 7.5% de cepas aisladas de *Bt* en la región Ensenada- Tijuana. a) carril, 1) MPM; carril 2) *B.thuringiensis* var. *aizawai*; carril 3) *B.thuringiensis* var. *kurstaki*; carril 4) Cry3A; carril 5) Cry4A. B. 1) MPM; carril 2) M2#7; carril 3) 1-2; carril 4) 6-1; carril 5) 6-4; carril 6) vacío; carril ;7) 7-2; carril 8) 10-2. Tinción con Azul de Coomassie.

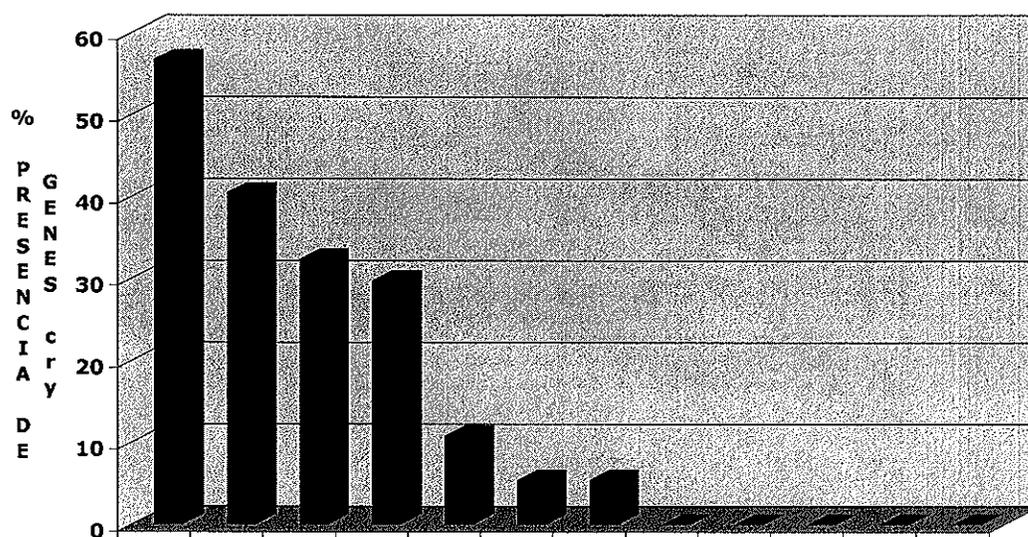
### VI.IA.VII CARACTERIZACION MOLECULAR POR PCR DE GENES *cry* Y *cyt* DE *B. thuringiensis*

Hasta el momento la técnica de PCR es la herramienta molecular mas eficaz para identificar los genes *Cry* presentes en cada una de las cepas.

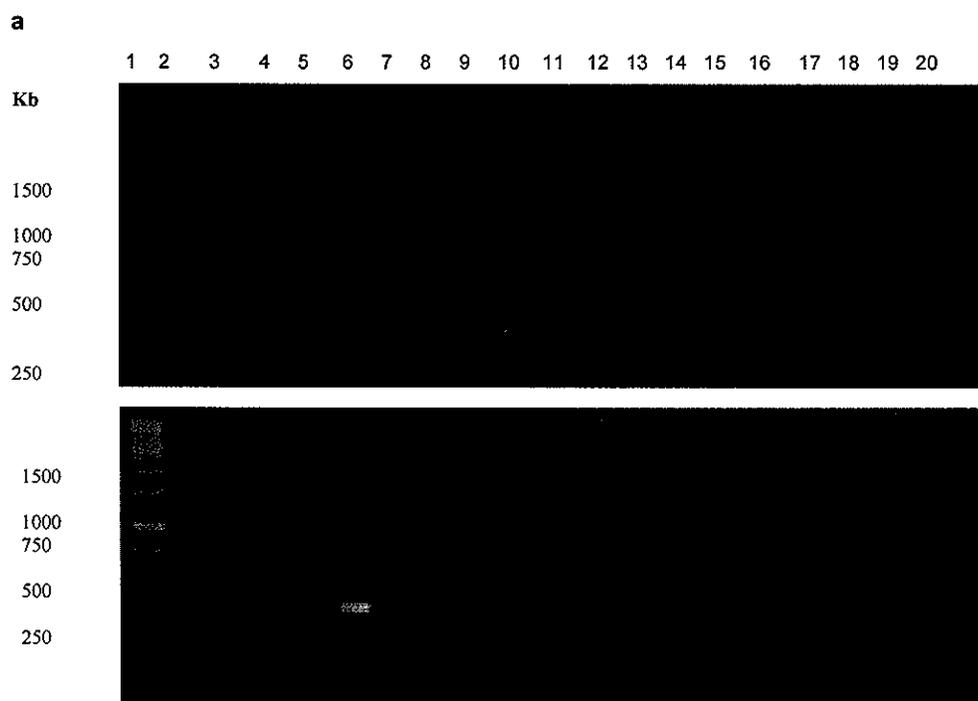
Bajo las condiciones generales mencionadas en Materiales y Métodos, la tabla IX muestra la temperatura de alineamiento específica para cada oligonucleótido utilizado, el tamaño de la banda amplificada y las cepas que amplificaron con cada oligonucleótido. En la figura 29 y 30 se muestra graficamente el porcentaje de presencia de cada gen *cry* analizado por PCR.

**Tabla IX.** Caracterización por PCR de los genes *cry* y *cyt*, presentes en cada una de las cepas aisladas de la región Ensenada –Tijuana.

Gen	Cepas que amplificaron	% que representa
Gral Cry1	HD1, Cry 1Ab, Cry 1Ac, aizawai, kurstaki, M1#7, M1#8, M2#2, 1-2, 6-11, 7-2, 8-4, 12-2, 17-3, 18-5	40.5%
Gral Cry2	HD1, HD916, kurstaki, M1#4, M1#7, M2#2, M2#7, 2-2, 4-2, 4-5, 5-4, 6-1, 7-2, 8-3, 9-2, 11-4, 12-2, 17-3, 18-2, 18-5, 19-1	56.7%
Gral Cry3	Cry3A, 9-2, 12-6, 14-1	10.8%
Gral Cry4	HD916, Cry4A,	5.4%
Gral Nem	NINGUNA	0
Gral Cry8	HD916, M2#2, 1-2, 8-4,	5.4%
Gral Cry9	NINGUNA	0
Gral Cry10	NINGUNA	0
Gral Cry11	HD916, 1-2, 7-3, 8-4, 9-2, 12-6, 14-1,	29.7%
Gral Cry25	NINGUNA	0
Gral Cry29	NINGUNA	0
Gral Cyt	HD1, Cyt1A, M1#4, M2#7, 4-2, 5-4, 7-3, 8-4, 12-2, 14-1, 17-3, 19-1	32.43%
No amplificó	6-3, 6-4, 10-2, 13-4	5.4%



**Figura 29.** Gráfica del porcentaje de presencia de genes *cry* en Ensenada-Tijuana.



**Figura 30.** Amplificación de gen *cry 8*. Los productos de la amplificación se observaron en gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio. Carril 1 y 20 Escalera de DNA. a), cepas amplificadas HD916, M2#2, 1-2. b) cepas amplificadas, 8-4.

## VI.A.VIII IDENTIFICACION DE PROTEINAS A TRAVES DE LA ESPECTROMETRIA DE MASAS DE ALTA RESOLUCION LC-MS/MS

Las proteínas 6-1 y 10-2 analizadas por LC-MS/MS fueron secuenciadas parcialmente, sin embargo los resultados obtenidos por este análisis son certeros, eficientes y suficientes para poder concluir acerca de la proteína que esta presente en la muestra.

A continuación se presentan los datos reportados del análisis de los péptidos presentes en las muestras 6-1 y 10-2.

Para la proteína Cry solubilizada de 6-1 con peso de 150 kDa, se logro secuenciar el 20% de la proteína y al someterlo al banco de datos arrojó un 99% de igualdad con Cry1Ac. Los aminoácidos marcados en rojo son las secuencias que lograron obtenerse en la secuenciación parcial por LC-MS/MS

gi|67089175 Cry1Ac [Bacillus thuringiensis]  
similitud=99% cobertura=20%

1	NECIP	YNCLS	NPEVE	VLGGE	RIETG	YTPID	ISLSL	TQFLI	SEFVP	GAGFV
51	LGLVD	IIWGI	FGPSQ	WDAFL	VQIEQ	LINQR	IEEFA	RNQAI	SRLEG	LSNLY
101	QIYAE	SFREW	EADPT	NPALR	EEMRI	QFNDM	NSALT	TAIPL	LAVQN	YQVPL
151	LSVYV	QAANL	HLSVL	RDVSV	FGQRW	GFDAF	TINSR	YNDLT	RLIGN	YTDYA
201	VRWYN	TGLER	VWGPD	SRDWV	RYNQF	RRELT	LTVLD	IVALF	PNYDS	RRYPI
251	RTVSQ	LTREI	YTNPV	LENFD	GSFRG	SAQGI	ERSIR	SPHLM	DILNS	ITIIY
301	DAHRG	YYYWS	GHQIM	ASPVG	FSGPE	FTFPL	YGTMG	NAAPQ	QRIVA	QLGQG
351	VYRTL	SSTFY	RRPFN	IGINN	QQLSV	LDGTE	FAYGT	SSNLP	SAVYR	KSGTV
401	DSLDE	IPPQN	NNVPP	RQGFS	HRLSH	VSMFR	SGSSS	SVSII	RAPMF	SWIHR
451	SAEFN	NIIAS	DSITQ	IPAVK	GNFLF	NGSVI	SGPGF	TGGDL	VRLNS	SGNNI
501	QNRGY	IEVPI	HFPST	STRYR	VRVRY	ASVTP	IHLNV	NWGNS	SIFSN	TVPAT
551	ATSLD	NLQSS	DFGYF	ESANA	FTSSL	GNIVG	VRNFS	GTAGV	IIDRF	EFIPV
601	TATLE	AEYNL	ERAQK	AVNAL	FTSTN	QLGLK	TNVDI	YHIDQ	VSNLV	TYLSD
651	EFCLD	EKREL	SEKVK	HAKRL	SDERN	LLQDS	NFKDI	NRQPE	RGWGG	STGIT
701	IQGGD	DVFKE	NYVTL	SGTFD	ECYPT	YLYQK	IDESK	LKAFT	RYQLR	GYIED
751	SQDLE	IYLIR	YNAKH	ETVNV	PGTGS	LWPLS	AQSPI	GKCGE	PNRCA	PHLEW
801	NPDLI	CSCRD	GEKCA	HSHSH	FSLDI	DVGCT	DLNED	LGVVW	IFKIK	TQDGH
851	ARLGN	LEFLE	EKPLV	GEALA	RVKRA	EKKWR	DKREK	LEWET	NIVYK	EAKES
901	VDALF	VNSQY	DQLQA	DTNIA	MIHAA	DKRVH	SIREA	YLPFL	SVIPG	VNAAI
951	FEELE	GRIFT	AFSLY	DARNV	IKNGD	FNNGL	SCWNV	KGHVD	VEEQN	NQRSV
1001	LVVPE	WEAEV	SQEVK	VCPGR	GYILR	VTAYK	EGYGE	GCVTI	HEIEN	NTDEL
1051	KFSNC	VEEEI	YPNNT	VTEND	YTVNQ	EEYGG	AYTSR	NRGYN	EAPSV	PADYA
1101	SVYEE	KSYTD	GRREN	PCEFN	RGYRD	YTPLP	VGYYT	KELEY	FPETD	KVWIE
1151	IGETE	GTFIV	DSVE							

La proteína activada de la cepa 6-1, concuerda con los resultados observados para la proteína solubilizada. Por lo tanto se concluye que la proteína Cry presente en la cepa 6-1 es Cry1Ac

**gi|5916230 Cry 1Ac de Bacillus thuringiensis**  
**similitud=99% cobertura=43%**

```

1      MAIET GYTPI DISLS LTQFL LSEFV PGAGF VLGLV DIIWG IFGPS QWDAF
51     LVQIE QLINQ RIEEF ARNQA ISRLE GLSNL YQIYA ESFRE WEADP TNPAL
101    REEMR IQFND MNSAL TTAIP LFAVQ NYQVP LLSVY VQAAN LHLSV LRDVS
151    VFGQR WGFDA ATINS RYNDL TRLIG NYTDY AVRWY NTGLE RVWGP DSRDW
201    VRYNQ FRREL TLTVL DIVAL FPNYD SRRYP IRTVS QLTRE IYTNP VLENF
251    DGSFR GSAQG IERSI RSPHL MDILN SITTY TDAHR GYYYW SGHQI MASPV
301    GFSGP EFTFP LYGTM GNAAP QQRIV AQLGQ GVYRT LSSTL YRRPF NIGIN
351    NQQLS VLDGT EFAYG TSSNL PSAVY RKSGT VDSL D EIPPQ NNNVP PRQGF
401    SHRLS HVSMF RSGSS NSSVS IIRAP MFSWI HRSAE FNNII ASDSI TQIPA
451    VKGNF LFNGS VISGP GFTGG DLVRL NSSGN NIQNR GYIEV PIHFP STSTR
501    YRVRV RYASV TPIHL NVNWG NSSIF SNTVP ATATS LDNLQ SDDFG YFESA
551    NAFTS SLGNI VGVRN FSGTA GVIID RFEFI PVTAT LE

```

La proteína activada de la cepa 10-2, arrojo resultados diferentes, al parecer se trata de una proteína de superficie bacteriana (S-layer). Estos resultados deberan ser confirmados con la secuenciación completa de la toxina

**gi|52144434**  
**similitud=99% S-layer protein, Bacillus thuringiensis**

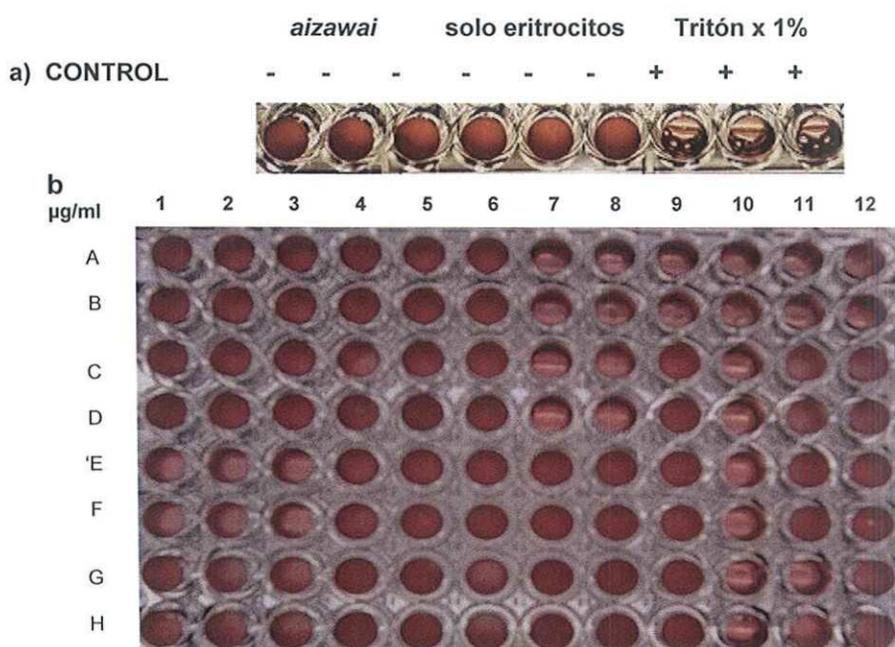
```

1      MAKTN SYKKV IAGTM TAAMV AGVVS PVAAB GKSFP DVPAG HWAEG SINYL
51     VDKGA ITGKP DGTYG PTETI DRSSA AVIFT KILNL PVDDN AQPST KDAKN
101    TWAAK YIAAV EKAGI VKGDG KENFY PEGKI DRASF ASMLV SAYNL KDKVN
151    GELVT TFEDL LDHWG EEKAN ILINL GISVG TGGKW EPNKT VTRAE AAQFI
201    ALTDK KYGKK DNEQA YVTDV KVSEP TKLTL TGTGL DKLSA DDVTL EGDKA
251    VAIEA SADGT SATVT LGGKV APNKN LTVKV KNQSF VTKFV YEVKK LAVEK
301    LTFDD DRAGQ AIAFK LNDEK GNADV EYLNL ANHDV KFVAN NLDGS PANIF
351    EGGEA TSTTG KLGVG LSHGD YKVEV QVTKR GGLTV SNTGI ITVKN LDTPA
401    SAIKN TVFAV DADKN GVVYV NKLTG KDFKL NSQTL VVGEK AQIHN VVATI
451    AGEDK VVDPN SISIK SSNHG IISVV NNYIT AEAAG EATLT IKVGD VTKDV
501    KFKVT TDSRK LVSVK ANPDK LQVVQ NKTLV VTFVT TDQYG DPFGA NPAAI
551    KEVLP KTGTV AEGGL DVVTT DSGSI GTKTI GVTGN DVGEG TVHFQ NANGE
601    TLGSL YVNVV EGNVA FKNFE LVSKV GQYGG SPDTK LDLNV SNTVA YQLSK
651    YTSDR VYSDP ENLEG YVVES KNPVAV AEAKE VGNKV VVKGL KPGKV DIHLT
701    KNGAT AGKAT VEIVQ EKIAI KSVNF KPVQT ENFVE KKINI GTVLE LEKSN
751    LDDIV KGINL TKETQ HKVVRV VKSGD DQGKL YLDTN GNAHF DLFQD ELGYV
801    TVSQT SDSAL PNFKT DLYDT LTTKY TDKGT LVFKV LGEKD VLTSE IGSQA
851    VHVNV LNNPN L

```

### V.IB.I EFECTO DE LAS TOXINAS *B. thuringiensis* SOBRE ERITROCITOS HUMANOS

La actividad de las toxinas Cry sobre los eritrocitos, se evaluó en placas ELISA de forma cualitativa cada hora durante 12 h y de forma cuantitativa en el sobrenadante de la reacción a las 12 h en un contador automatizado. Se utilizaron diversos controles de la reacción. El primer control negativo, consiste en una cepa control no hemolítica (*aizawai*). El segundo control negativo fue sólo la suspensión de eritrocitos y el tercer control es positivo a hemólisis construido con una suspensión de eritrocitos sometida a tratamiento lítico con tritón x al 1%. En la figura 31, se muestran los resultados observados para los controles positivos y negativos, además la actividad hemolítica de las toxinas cry sobre eritrocitos humanos a las 12 h. En la tabla X se pueden observar los resultados cualitativos y cuantitativos.



**Figura 31.** Ensayo de actividad hemolítica de toxinas Cry. a) se muestra la línea de controles. b) se muestra el ensayo de actividad hemolítica montado en una placa de 96 pocillos, de cada toxina se probaron 3 concentraciones por duplicado (5µg/ml, 2,5µg/ml y 1.25µg/ml). A,B-1,2,3: **M1#7**; A,B-4,5,6: **M1#8**; A,B-7,8,9: **HD1**; A,B-10,11,12: **8-4**. C,D-1,2,3: **M2#2**; C,D-4,5,6: **M2#7**; C,D-7,8,9: **7-3**; C,D-10,11,12: **4-2**; E-F-1,2,3: **19-1**, E-F-4,5,6: **9-2**; E,F-7,8,9: **10-2**; E,F-10,11,12: **12-2**; G,H-1,2,3: **14-1**; G,H-4,5,6: **18-2**; G,H-7,8,9: **18-5**; G,H-10,11,12: **17-3**.

**Tabla X.** Actividad hemolítica de toxinas de *B. thuringiensis* aisladas de Ensenada-Tijuana

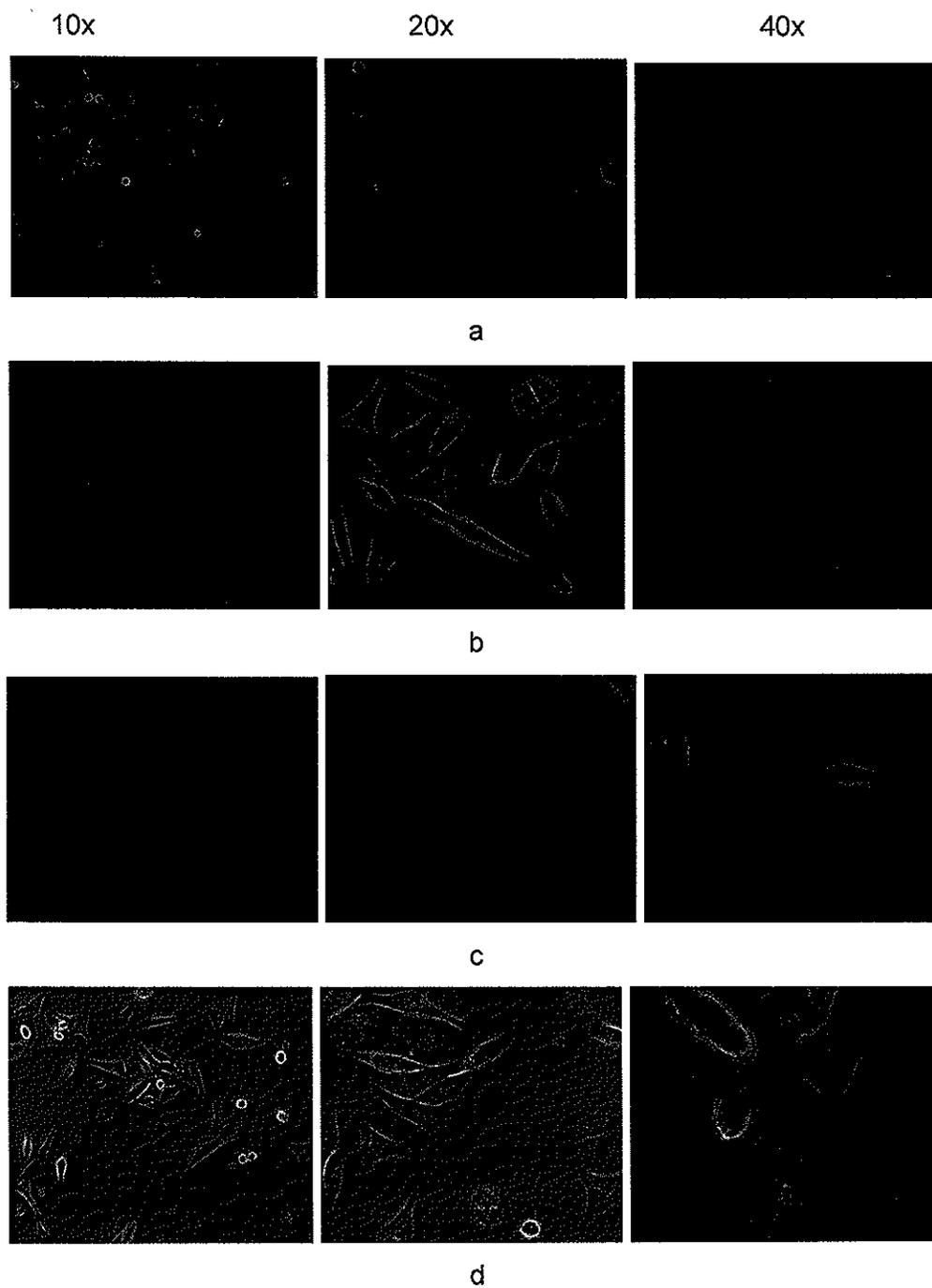
<b>Cepa</b>	<b>Análisis cualitativo 5 , 2.5 , 1.25 (µg/ml)</b>	<b>Análisis cuantitativo. Millones de eritrocitos/µl (contador automatizado) 5 , 2.5 , 1.25 (µg/ml)</b>
<b>Control negativo</b>	- - -	<b>0.07 0.07 0.07</b>
<b>Control positivo</b>	<b>+ + +</b>	<b>0.0 0.0 0.0</b>
<b>Bt var. aizawai</b>	- - -	0.05 0.05 0.05
<b>Bt var kurstaki</b>	- - -	0.05 0.05 0.05
<b>Bt var HD1</b>	<b>+ + +</b>	0.02 0.02 0.02
<b>Bt var HD916</b>	- - -	0.05 0.05 0.05
<b>Cry1Ab</b>	- - -	0.05 0.05 0.05
<b>Cry1Ac</b>	- - -	0.05 0.05 0.05
<b>Cry3A</b>	- - -	0.05 0.05 0.05
<b>Cry4A</b>	- - -	0.05 0.05 0.05
<b>Cyt1A</b>	<b>+ + +</b>	0.02 0.02 0.02
<b>M1#4</b>	<b>+ - -</b>	0.02 0.05 0.05
<b>M1#7</b>	- - -	0.05 0.05 0.05
<b>M1#8</b>	- - -	0.05 0.05 0.05
<b>M2#2</b>	- - -	0.05 0.05 0.05
<b>M2#7</b>	<b>+ - -</b>	0.02 0.05 0.05
<b>1-2</b>	- - -	0.05 0.05 0.05
<b>2-2</b>	- - -	0.05 0.05 0.05
<b>4-2</b>	<b>+ - -</b>	0.02 0.05 0.05
<b>4-5</b>	- - -	0.05 0.05 0.05
<b>5-4</b>	<b>+ - -</b>	0.02 0.05 0.05
<b>6-1</b>	- - -	0.05 0.05 0.05
<b>6-3</b>	- - -	0.05 0.05 0.05
<b>6-4</b>	- - -	0.05 0.05 0.05
<b>7-2</b>	- - -	0.05 0.05 0.05
<b>9-2</b>	- - -	0.05 0.05 0.05
<b>10-2</b>	- - -	0.05 0.05 0.05

CEPA	ACTIVIDAD HEMOLITICA 5 , 2.5 , 1.25 (µg/ml)	No. DE ERITROCITOS Millones /µl (contador automatizado) 5 , 2.5 , 1.25 (µg/ml)
12-2	+ - -	0.02 0.05 0.05
12-6	- - -	0.05 0.05 0.05
13-4	- - -	0.05 0.05 0.05
14-1	+ + -	0.02 0.02 0.05
17-3	+ + -	0.02 0.02 0.05
18-2	- - -	0.05 0.05 0.05
18-5	- - -	0.05 0.05 0.05
19-1	+ + +	0.02 0.02 0.02

## VI.IB.II EFECTO ANTICANCERIGENO DE TOXINAS Cry DE *Bacillus thuringiensis* EN LINEAS CELULARES

### VI.IB.IIA CULTIVO CELULAR

El cultivo de células cancerígenas de humano permitió realizar los ensayos pertinentes con las toxinas, en la figura 32 se muestran imágenes de las líneas celulares empleadas en los ensayos de citotoxicidad de las proteínas aisladas de Bt nativas de la región Ensenada-Tijuana. HeLa y SiHa se utilizaron como modelos de células de cáncer cervicouterino inducido por VPH tipo 18 y VPH tipo 16 respectivamente. La línea celular MCF7 se utilizó como modelo de células de glándula mamaria con cáncer y la línea celular HaCat se utilizó como control negativo, ya que esta línea celular no proviene de células con cáncer. Todas estas líneas exceptuando HaCat fueron crecidas en medio DMEM bajo las condiciones ya especificadas en materiales y métodos. Para HaCat se empleó medio RPMI.

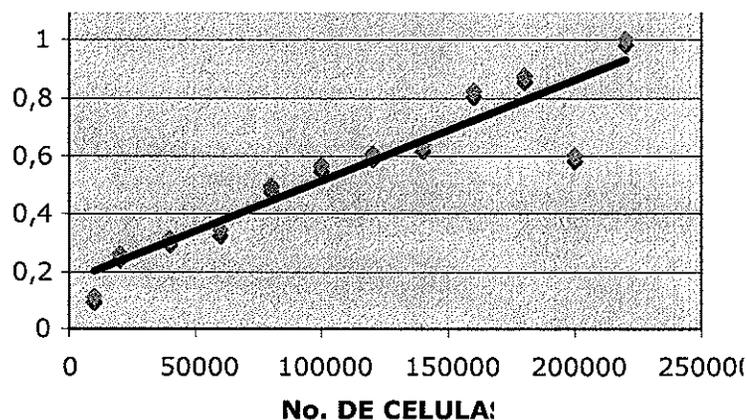


**Figura 32.** Imágenes de las líneas celulares empleadas en los ensayos de citotoxicidad de proteínas provenientes de cepas de *B. thuringiensis* nativas de la región Ensenada-Tijuana. a) HeLa. b) SiHa. c) MCF7. d) HaCat. Imágenes por contraste de fases.

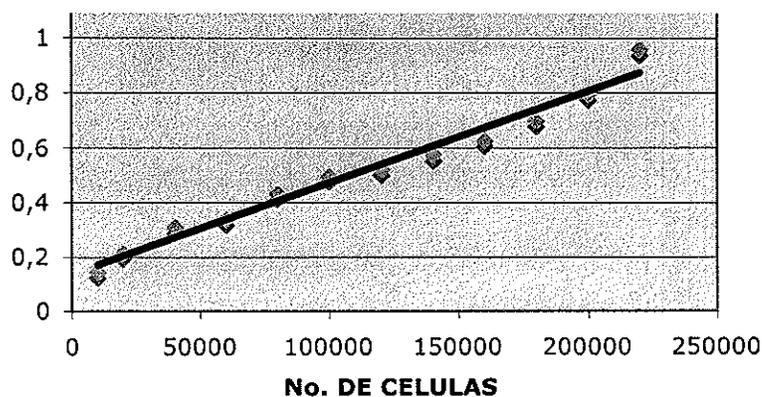
### VI.B.IIB DETERMINACION DE LA RELACION ENTRE EL NUMERO DE CELULAS METABOLICAMENTE ACTIVAS Y FORMAZAN PRODUCIDO.

Es necesario realizar una curva patrón de la línea celular y observar su comportamiento con MTT, con la finalidad de ajustar el número de células que será utilizado en los experimentos de citotoxicidad para cada línea celular, de tal manera que la respuesta entre el número de células y la viabilidad celular medida por MTT sea lineal. En la figura 33, se demuestra que la relación que se establece entre el número de células viables y la absorbancia medida es lineal, por lo tanto el estudio de viabilidad celular se pudo realizar de manera confiable dentro de este rango de número de células estudiado.

a



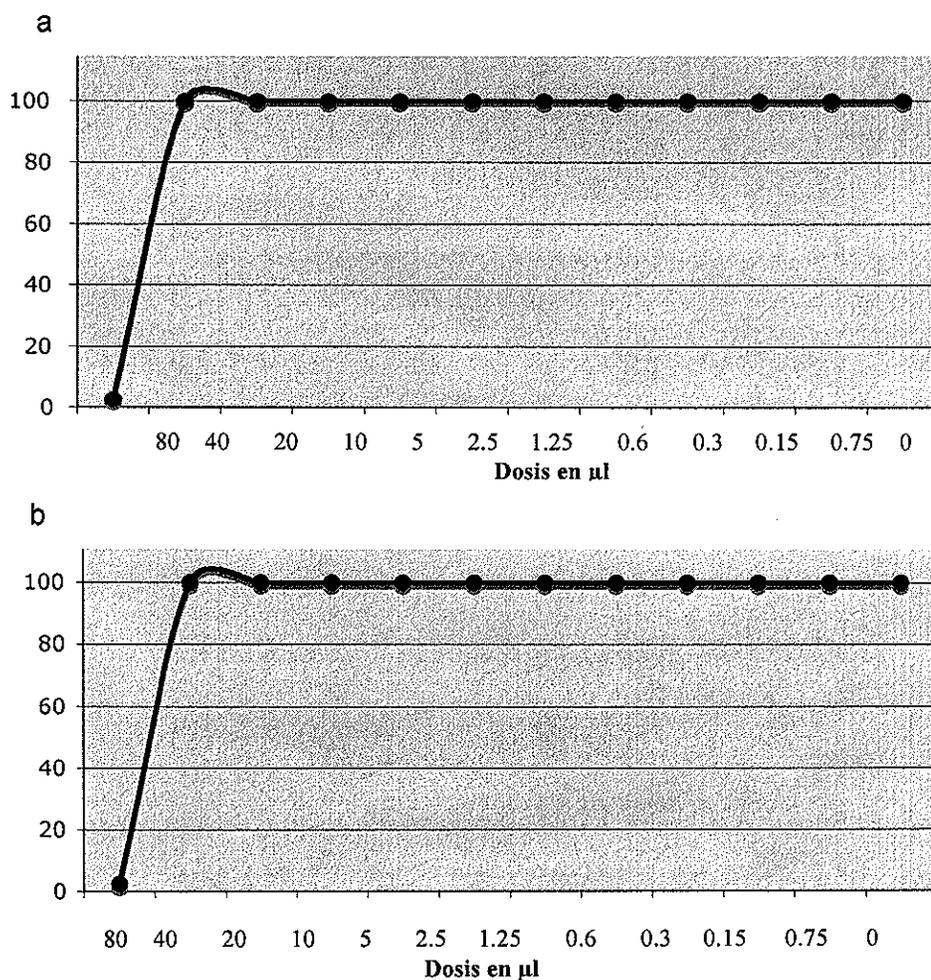
b



**Figura 33.** Curva tipo de líneas celulares HeLa y HaCat. a) Gráfica que relaciona el número de células HeLa viables con la absorbancia. b) Gráfica que relaciona el número de células HaCat viables con la absorbancia.

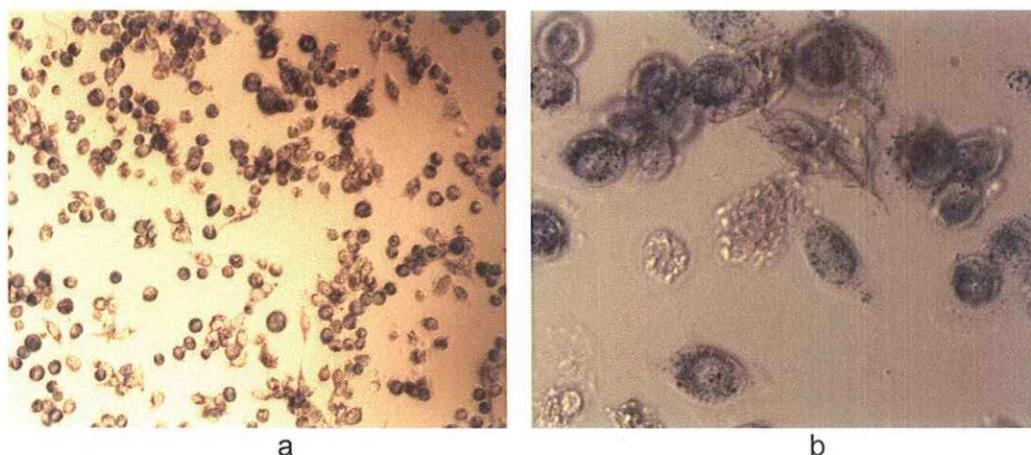
### VI.IB.IIC EFECTO ANTICANCERIGENO DE TOXINAS Cry DE *B. thuringiensis* EN LINEAS CELULARES HeLa, HaCat, SiHa y MCF7

Los primeros experimentos se realizaron para descartar la posibilidad de que la mezcla de la que proviene la toxina activada (NaOH, SD-IBT, Tripsina, PMSF) tuviera por sí sola algún efecto citotóxico en los cultivos celulares se utilizaron los mismos tiempos de incubación que se usaron para las toxinas. En la figura 34 se muestra las gráficas de HeLa y HaCat de cada uno de estos controles. En este experimento se utilizaron concentraciones de NaOH, SD-IBT, Tripsina, PMSF muy por encima de las empleadas para activar toxinas Cry.



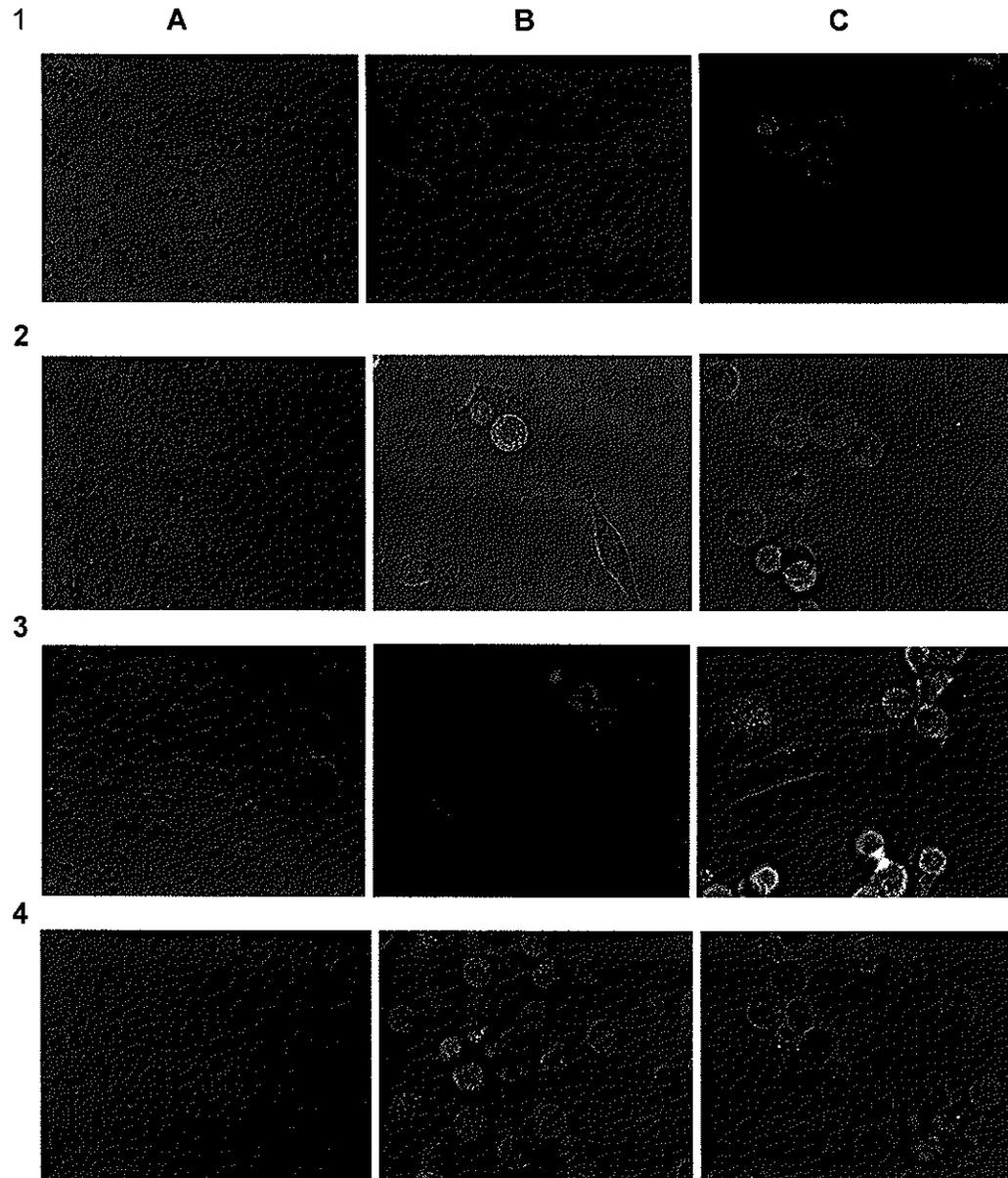
**Figura 34** .Gráfica de controles de citotoxicidad. a) muestra el comportamiento sobre células HaCat. La gráfica b) muestra el comportamiento de la mezcla utilizada para activar las toxinas sobre células HeLa.

Las células vivas y metabólicamente activas son capaces de reducir el MTT, de color amarillo en solución, a formazán, compuesto insoluble que precipita en forma de cristales de color azul oscuro. El producto formado puede ser fácilmente cuantificado utilizando un lector de placas de ELISA. En la figura 35 se presenta un cultivo celular expuesto al MTT por 4 h, las células teñidas en azul son las células metabólicamente activas, capaces de captar el MTT y metabolizarlo a formazan a través de la succinato deshidrogenasa mitocondrial. Las células no teñidas son células muertas o metabólicamente inactivas.

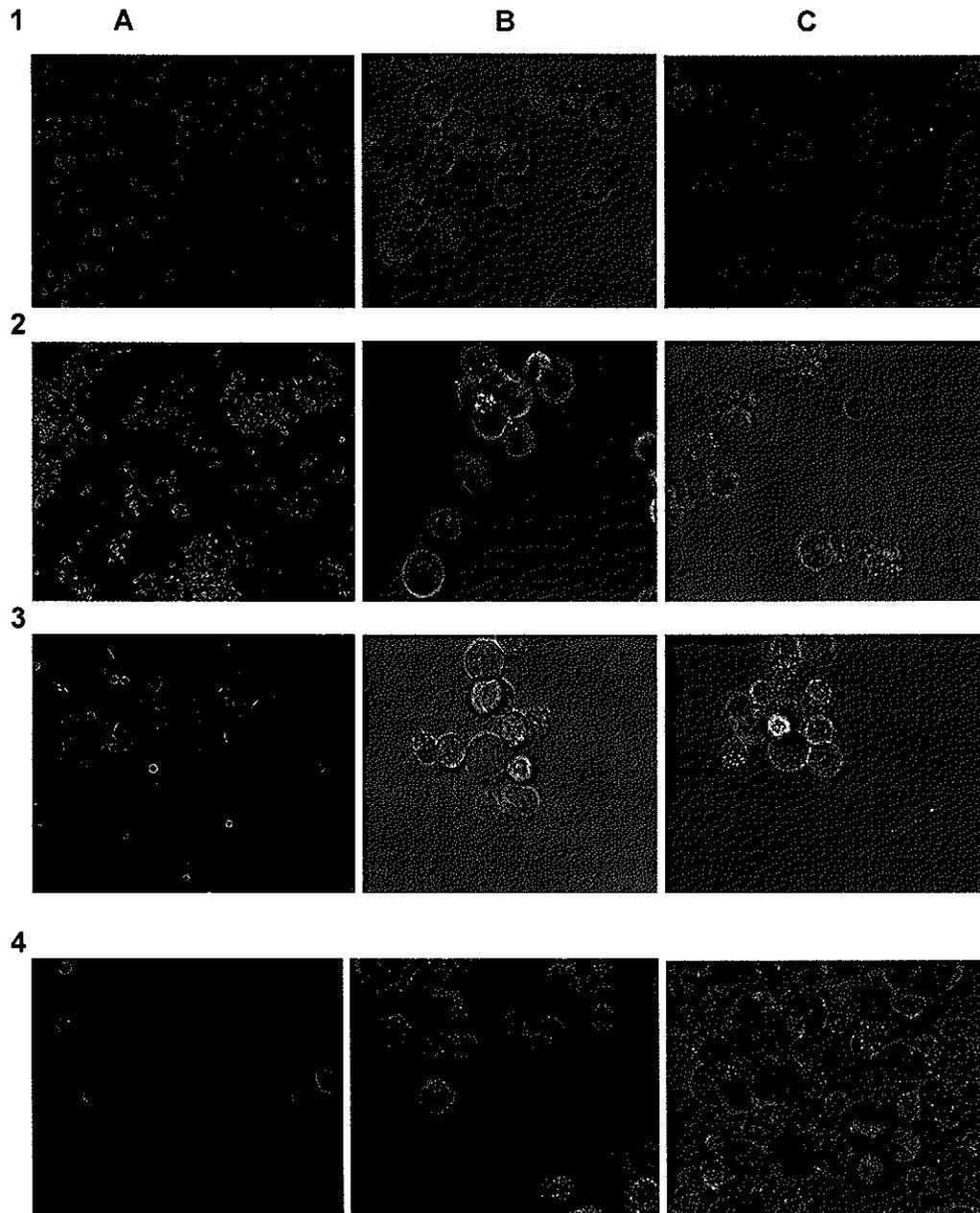


**Figura 35.** Imágenes de un cultivo celular donde se ha realizado el ensayo colorimétrico por MTT para medir viabilidad celular. a) visto a 10x. b) visto a 40x. Las células teñidas en azul son metabólicamente activas, las no teñidas son células no viables.

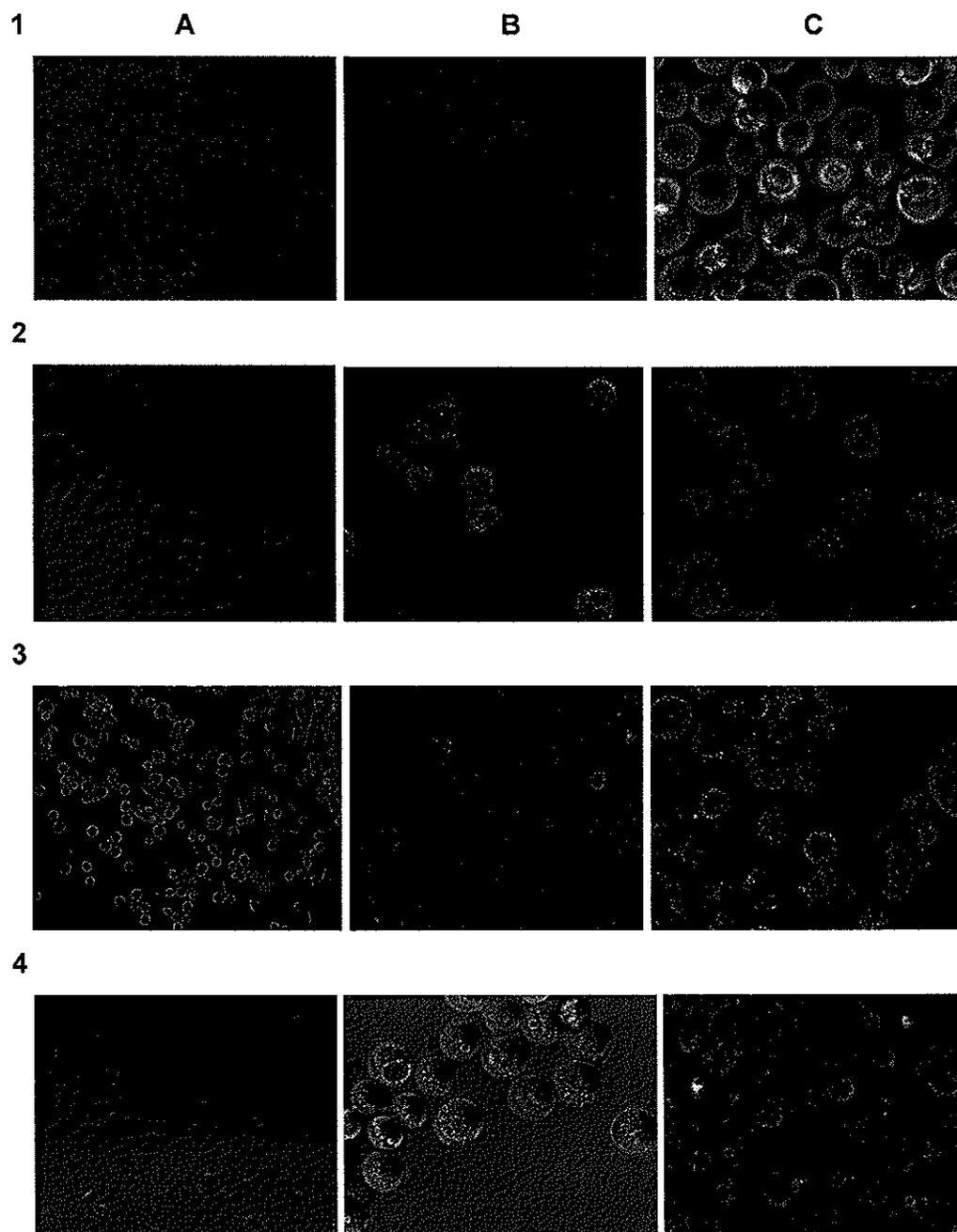
En las figuras 36-39 se observa el efecto citopático que causan las toxinas Cry sobre los diferentes cultivos celulares estudiados a diferentes tiempos. A las 24 h postinoculación se efectuó el ensayo de viabilidad celular, figuras 40-53 donde se gráfico el efecto dosis-viabilidad celular.



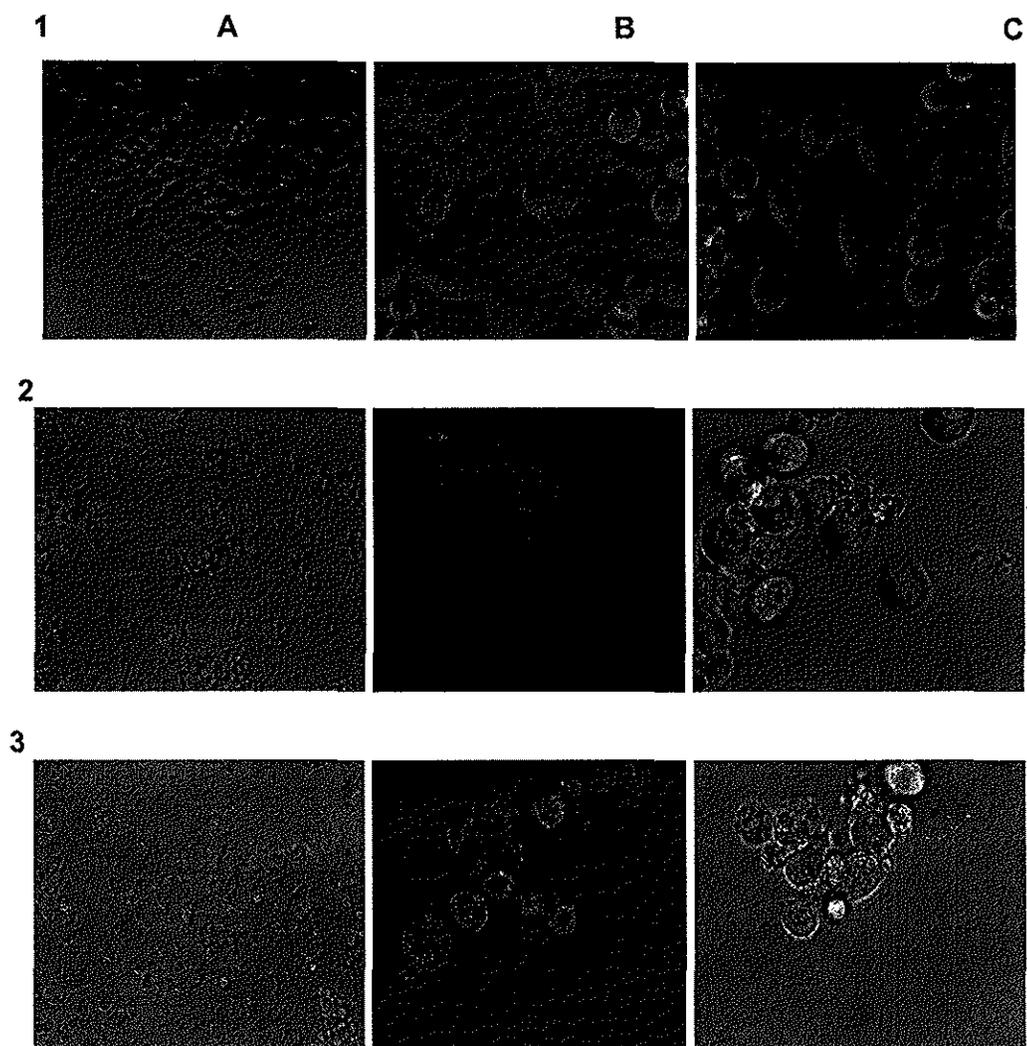
**Figura 36.** Ensayo de citotoxicidad de proteínas Cry en cultivos celulares de HaCat. Columna A) Tiempo 0, Columna B) 12h, Columna C) 18h. Fila 1) Control (sin toxina). Fila 2) *Bt* cepa 6-1 [ $2\mu\text{g/ml}$ ]. Fila 3) toxina de cepa de 10-2 [ $2\mu\text{g/ml}$ ]. Fila 4) toxina de cepa M1#4 concentración de [ $2\mu\text{g/ml}$ ]. Imágenes en microscopio invertido A) 10x contraste de fases. B) y C) 40x contraste de fases.



**Figura 37.** Ensayo de citotoxicidad de proteínas Cry en cultivos celulares de HeLa. Columna A) Tiempo 0, Columna B) 12h, Columna C) 18h. Fila 1) Control (sin toxina). Fila 2) *Bt* toxinas de la cepa 6-1 [2μg/ml]. Fila 3) toxina de la cepa de 10-2 [2μg/ml]. Fila 4) toxina de cepa M1#4 concentración de [2μg/ml]. Imágenes en microscopio invertido A) 10x contraste de fases. B) y C) 40x contraste de fases.

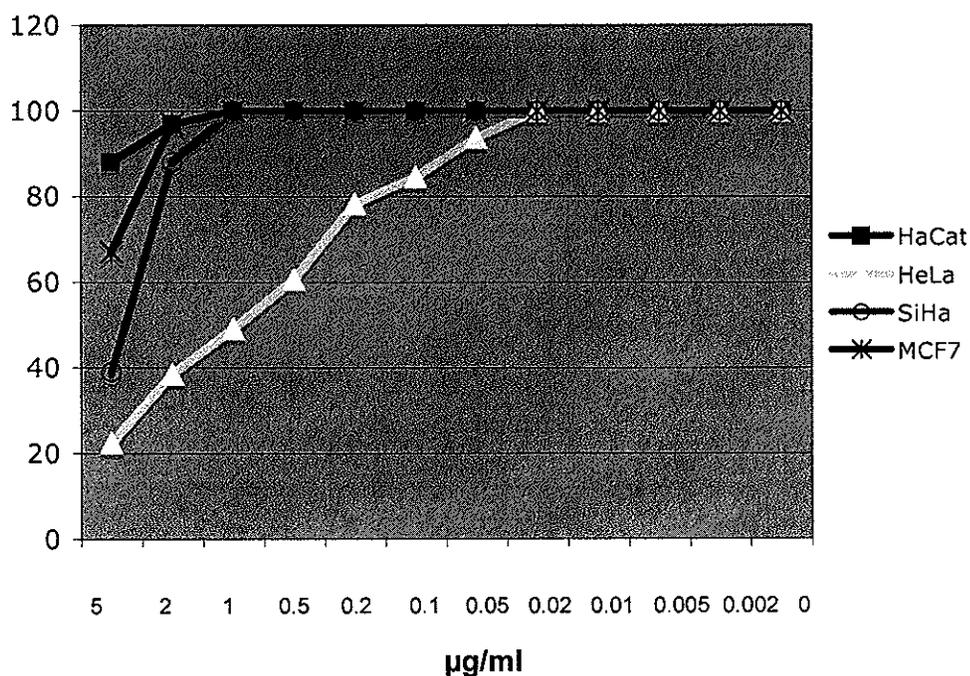


**Figura 38.** Ensayo de citotoxicidad de proteínas Cry en cultivos celulares de SiHa. Columna A) Tiempo 0, Columna B) 12h, Columna C) 18h. Fila 1) Control (sin toxina). Fila 2) *Bt* toxina de la cepa 6-1 [2μg/ml]. Fila 3) toxina de la cepa de 10-2 [2μg/ml]. Fila 4) toxina de la cepa M1#4 concentración de [2μg/ml]. Imágenes en microscopio invertido A) 10x contraste de fases. B) y C) 40x contraste de fases.



**Figura 39.** Ensayo de citotoxicidad de proteínas Cry en cultivos celulares de MCF7. Columna A) Tiempo 0, Columna B) 12h, Columna C) 18h. Fila 1) Control (sin toxina). Fila 2) *Bt* toxina de la cepa 6-1 [ $2\mu\text{g/ml}$ ]. Fila 3) toxina de la cepa de 10-2 [ $2\mu\text{g/ml}$ ]. Fila 4) toxina de la cepa M1#4 concentración de [ $2\mu\text{g/ml}$ ]. Imágenes en microscopio invertido A) 10x contraste de fases. B) y C) 40x contraste de fases.

Para poder conocer el efecto citotóxico en cultivos celulares de las toxinas de *B. thuringiensis*, se realizó el ensayo de citotoxicidad a diferentes concentraciones de la proteína Cry en células ya anteriormente sembradas a una densidad de  $1 \times 10^5$ . Después de 24h de incubación, se realizó el ensayo colorimétrico para medir la viabilidad celular por MTT. En las figuras 40-53 se muestran gráficos del comportamiento de las diferentes líneas celulares con la toxina problema. Se utilizaron cuatro líneas celulares, tres provenientes de células humanas cancerígenas y una de células no cancerígenas. En el eje de las X se encuentra la concentración de toxina evaluada sobre el cultivo celular, en el eje de las Y el porcentaje de células metabólicamente activas calculado con base en el blanco (cultivo celular sin exposición a la toxina) que corresponde al último punto de la gráfica)



**Figura 40.** Toxicidad de *Cry 6-1* sobre diversos cultivos celulares.

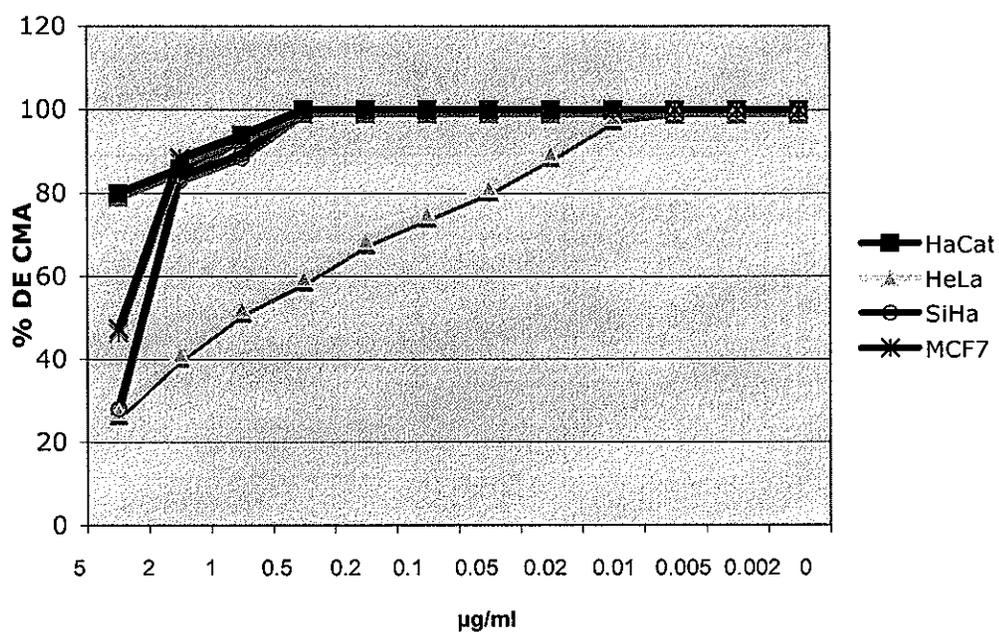


Figura 41. Toxicidad de *Cry 10-2* sobre diversos cultivos celulares.

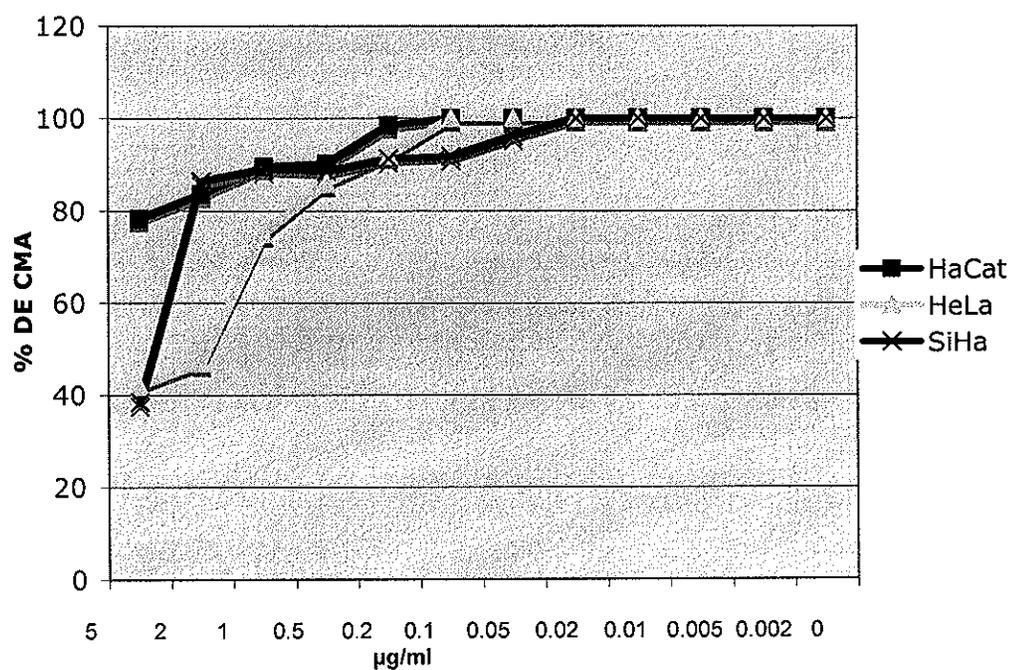


Figura 42. Toxicidad de *Cry aizawai* sobre diversos cultivos celulares.

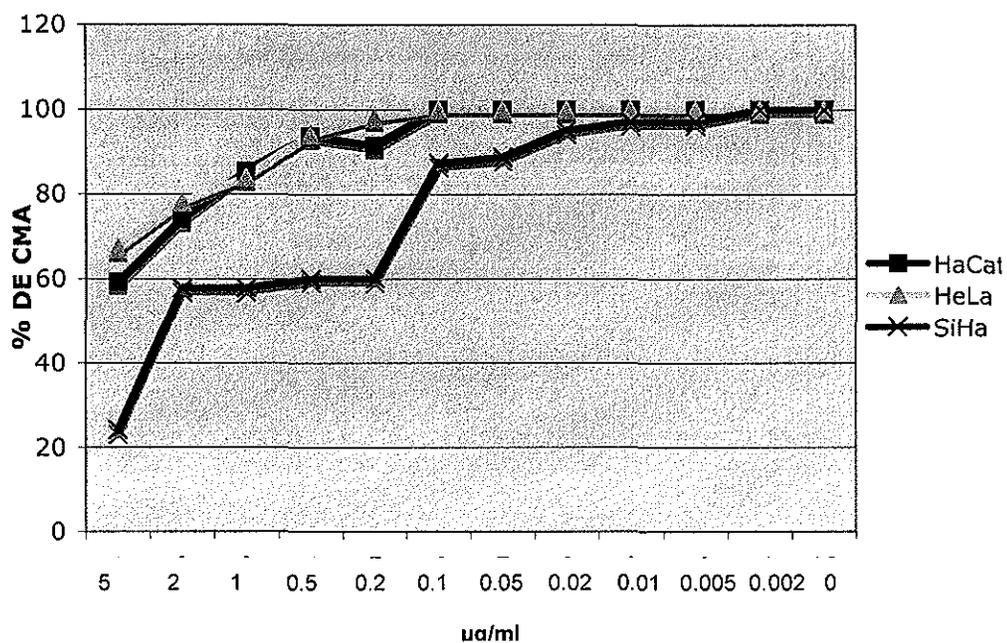


Figura 43. Toxicidad de *Cry 1Ab* sobre diversos cultivos celulares.

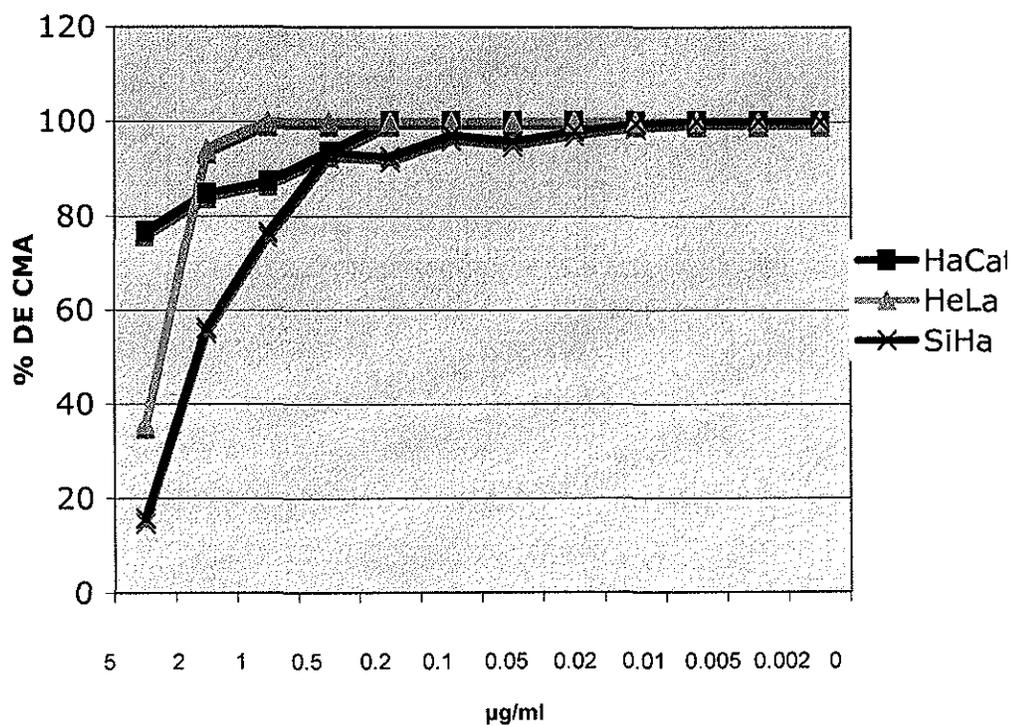


Figura 44. Toxicidad de *Cry 3A* sobre diversos cultivos celulares.

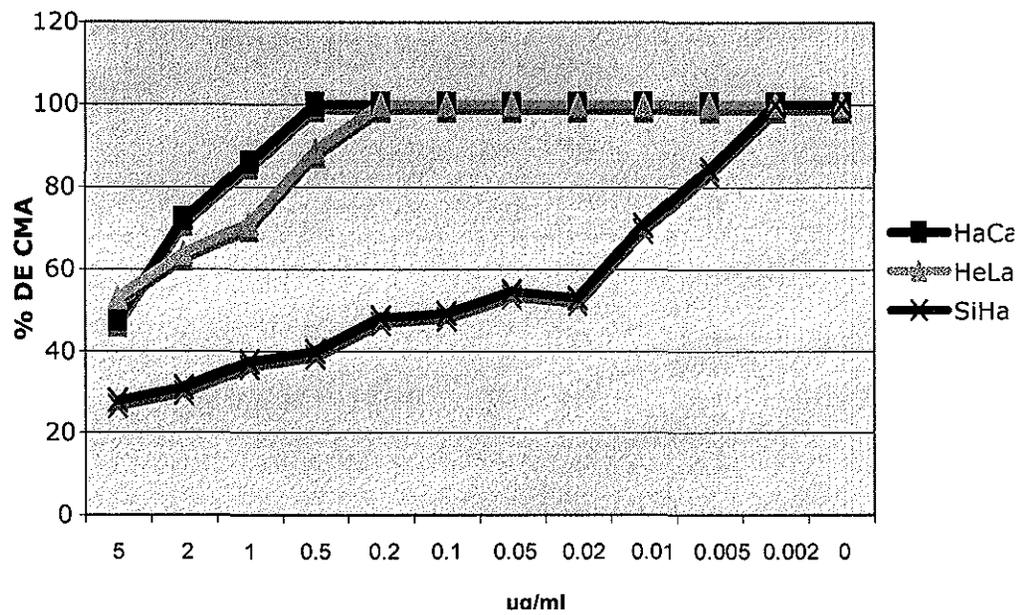


Figura 45. Toxicidad de *Cry 4A* sobre diversos cultivos celulares.

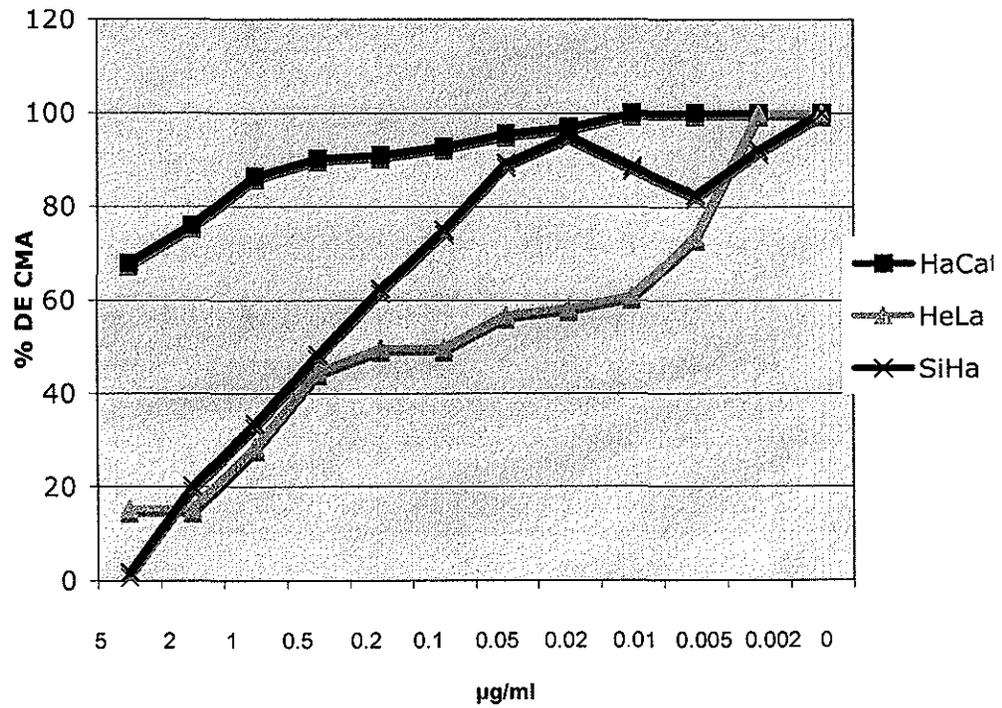


Figura 46. Toxicidad de *Cry M1#4* sobre diversos cultivos celulares.

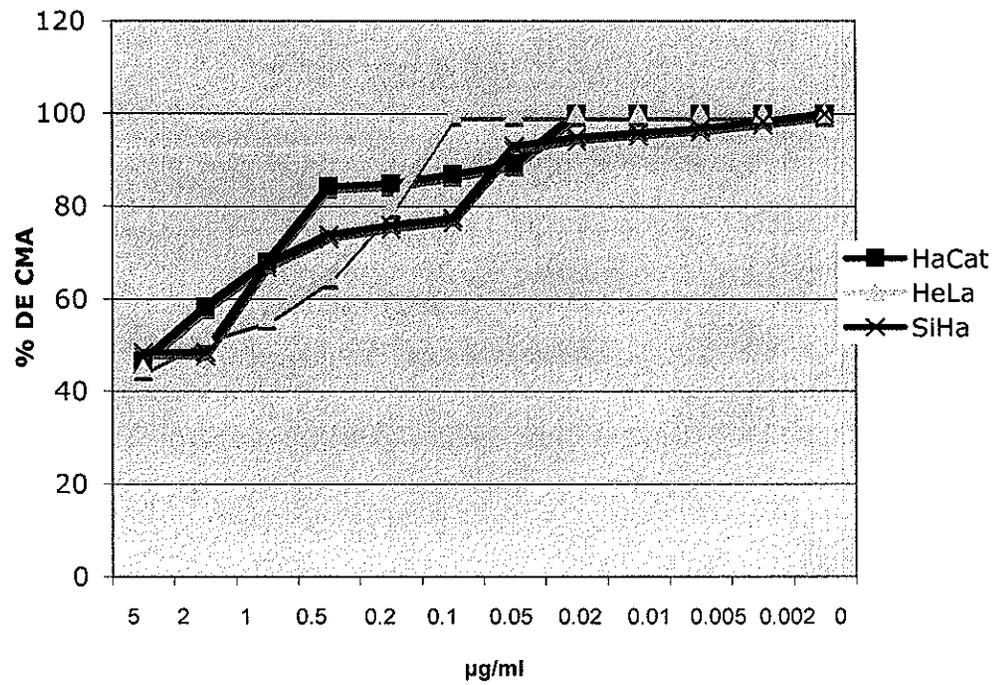


Figura 47. Toxicidad de *Cry M1#7* sobre diversos cultivos celulares.

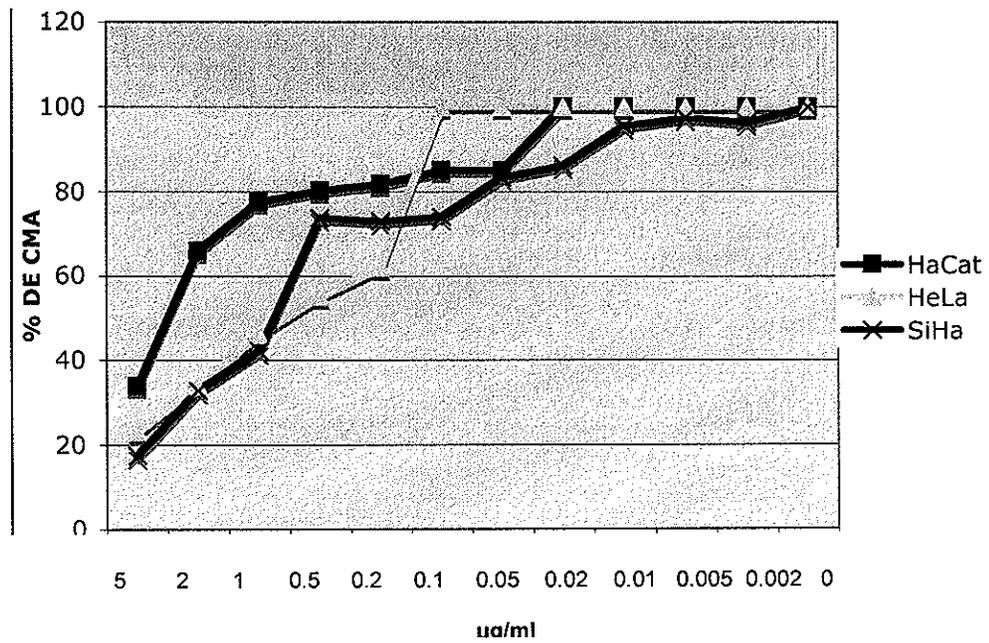


Figura 48. Toxicidad de *Cry M2#2* sobre diversos cultivos celulares.

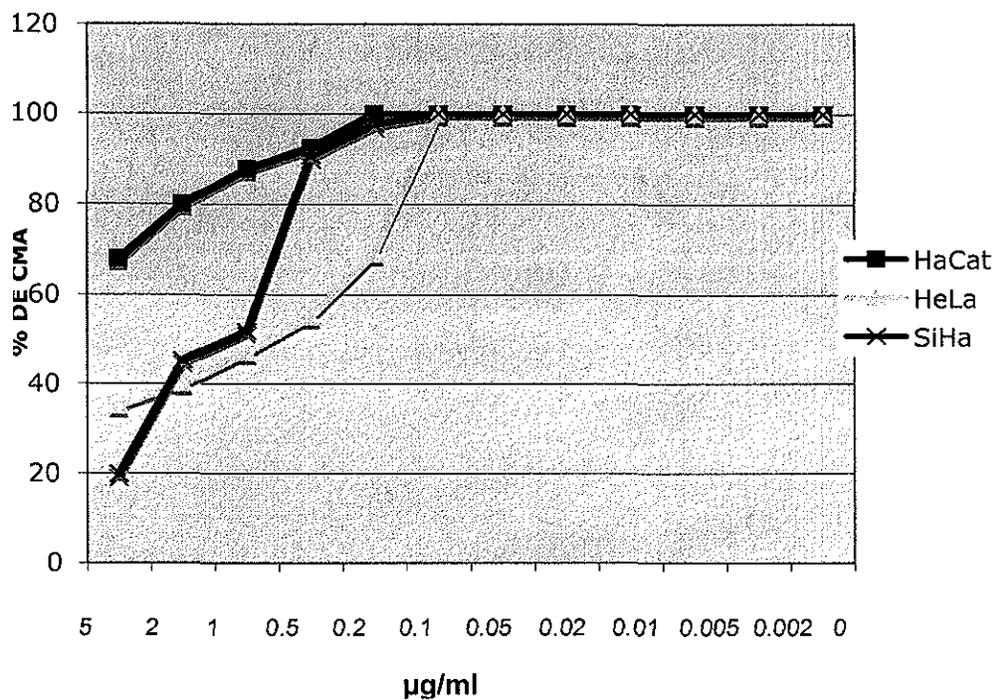


Figura 49. Toxicidad de *Cry M2#7* sobre diversos cultivos celulares.

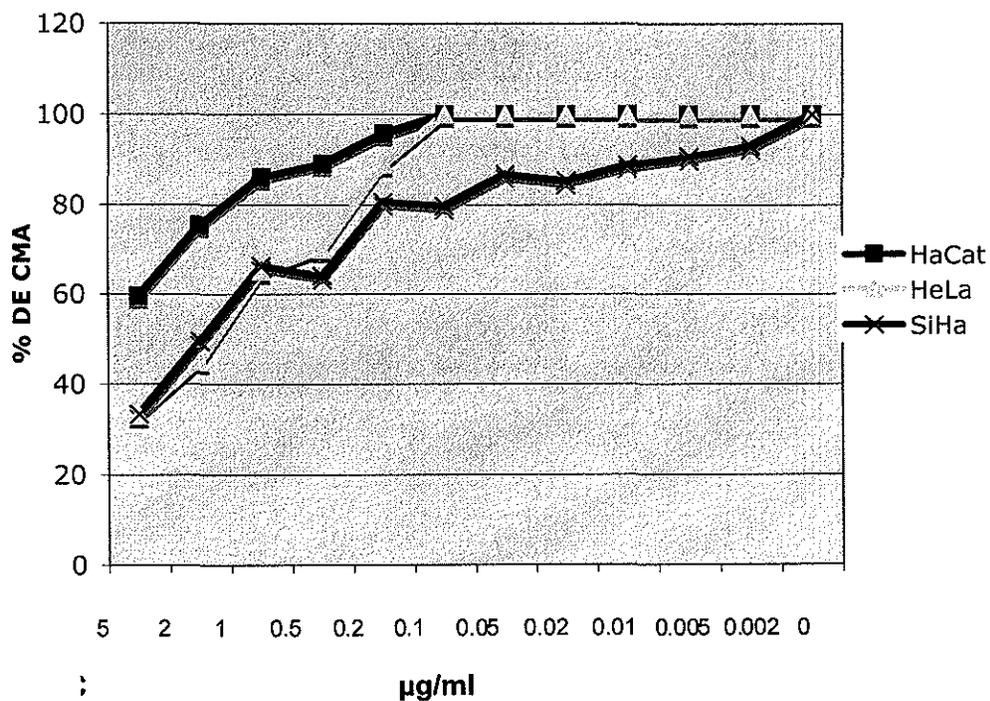


Figura 50. Toxicidad de *Cry 1-2* sobre diversos cultivos celulares.

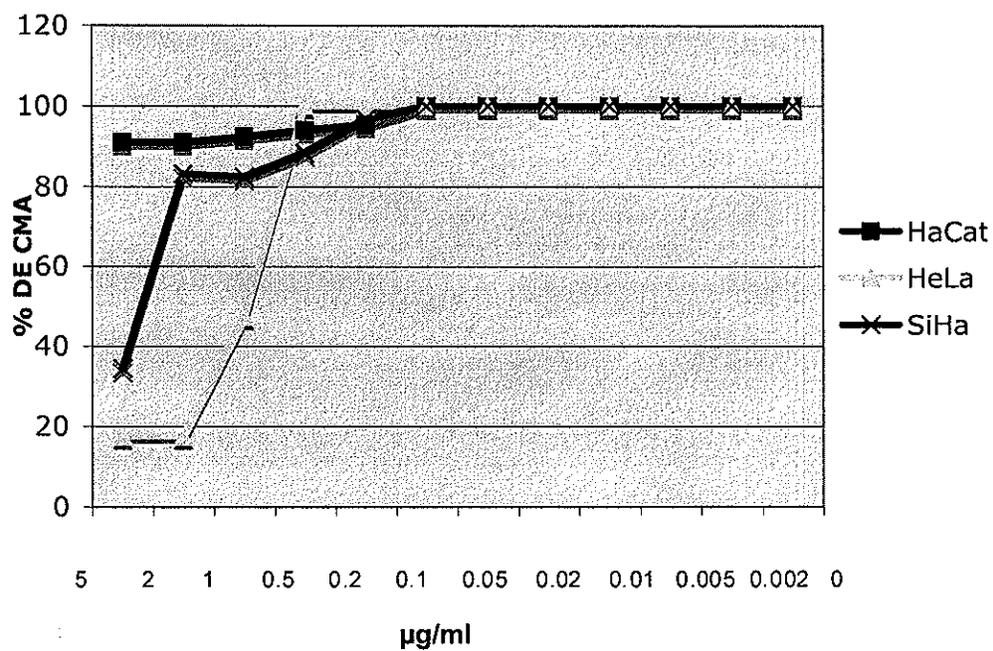


Figura 51. Toxicidad de *Cry 6-4* sobre diversos cultivos celulares.

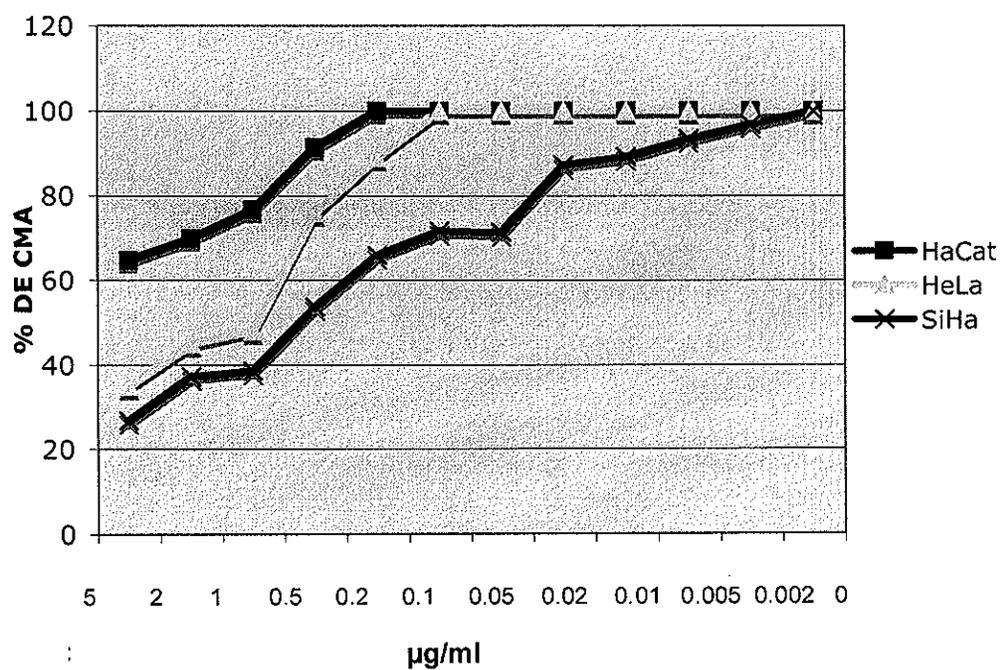


Figura 52. Toxicidad de *Cry 8-3* sobre diversos cultivos celulares.

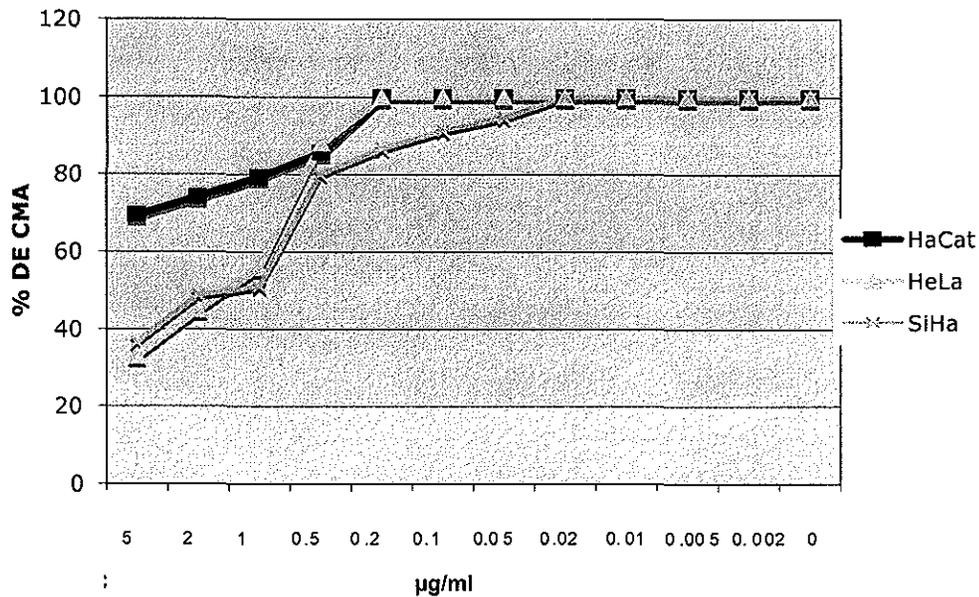
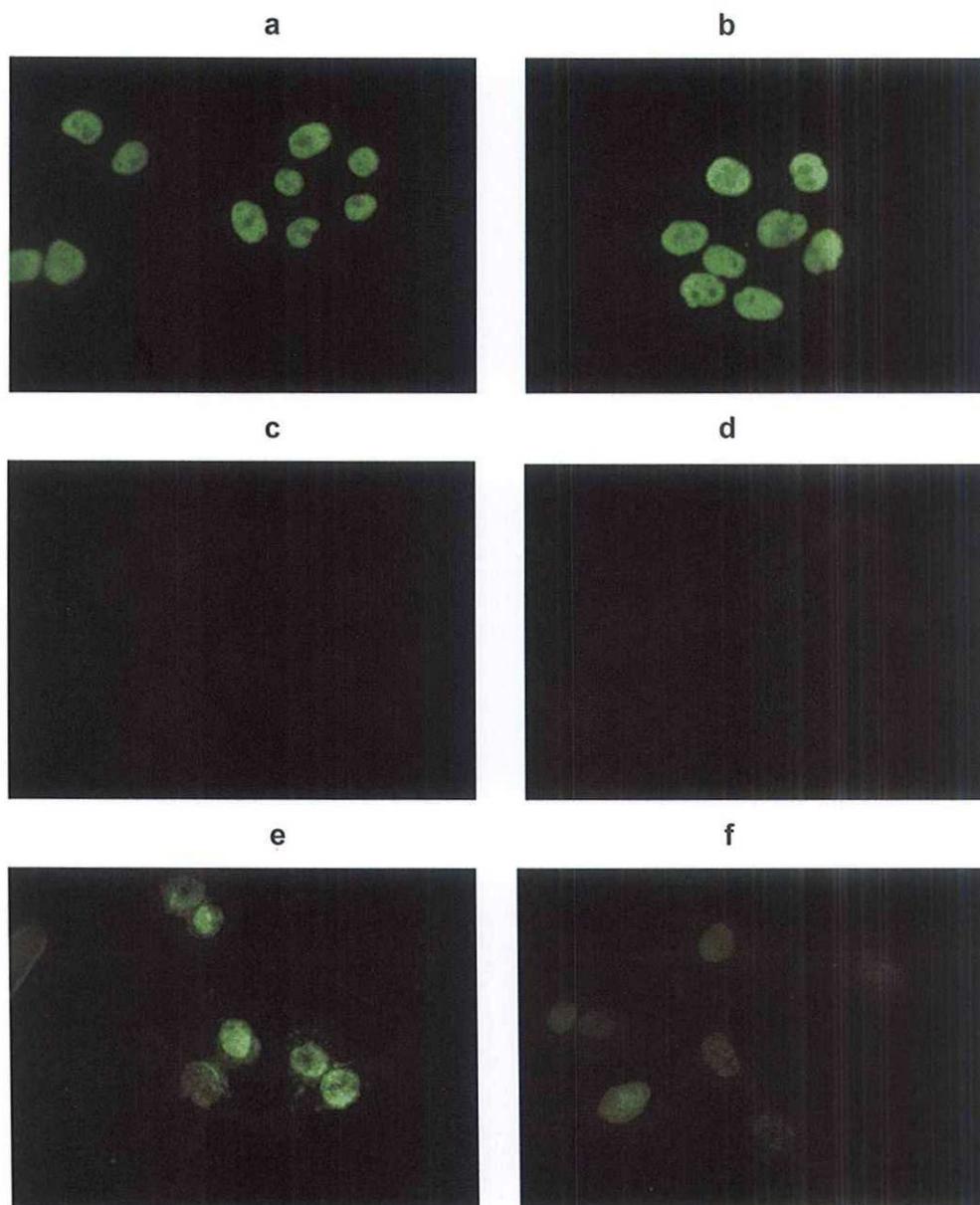


Figura 53. Toxicidad de *Cry 8-4* sobre diversos cultivos celulares.

#### VI.IB.IID PRUEBA DE TUNEL

La prueba de TUNEL es utilizada para detectar muerte celular por apoptosis. La mezcla de reacción de TUNEL consiste en la enzima Deoxinucleotidil transferasa, proveniente de timo de ternera recombinante en *E.coli* y su marcador. En la figura 54, se muestran imágenes de células HeLa en cultivo expuestas a diferentes condiciones para observar si se induce la muerte celular apoptótica o no. Las figuras a y b son controles positivos, donde se ha empleado DNAsa para inducir el rompimiento de las cadenas de ADN, la fluorescencia generada es muy intensa. Las figuras c y d, son los controles negativos, en los que no se ha inducido de ninguna manera el rompimiento del ADN por lo que, como se puede observar no presenta fluorescencia. Las células de las imágenes e y f han sido inoculadas con las toxinas 6-1 y 10-2, en ambas se observa fluorescencia, lo que está indicando activación de la cadena de caspasas y muerte por apoptosis.

## PRUEBA DE TUNEL EN CELULAS HeLa

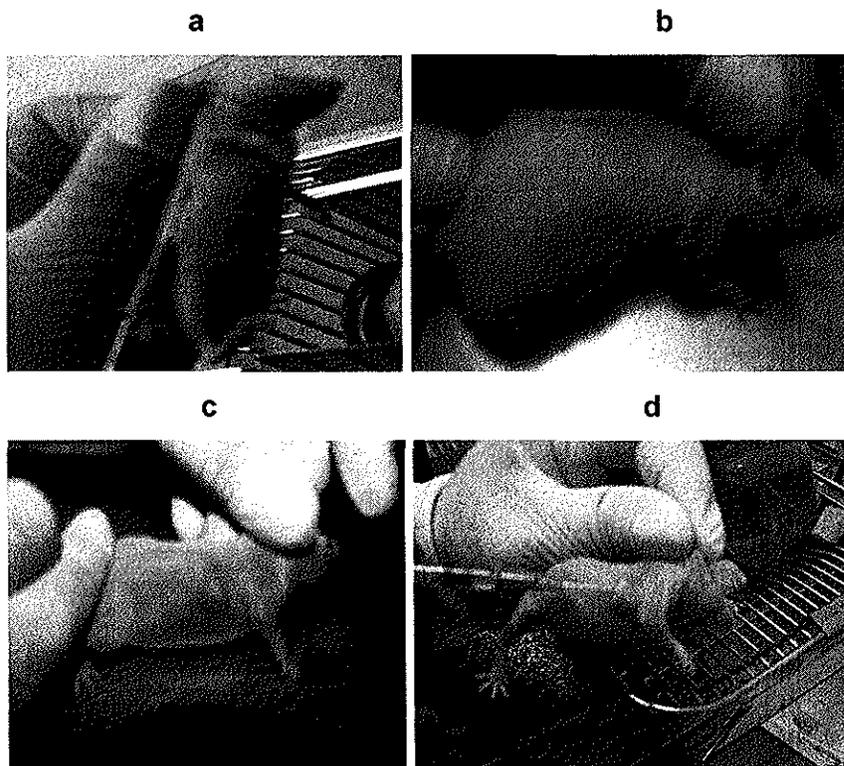


**Figura 54.** Imágenes de células HeLa tratadas con reactivos para reacción de TUNEL. Figuras a y b, Controles positivos: Células HeLa + 5 $\mu$ g/ml DNAsa + **Deoxinucleotidil transferasa (enzima de TUNEL) + Marcador de TUNEL {kit de TUNEL}**. Figuras c y d, Controles negativos: Células HeLa + **Marcador de TUNEL**. Figura e, Problema: Células HeLa + 5 $\mu$ g/ml de toxina proveniente de la cepa 6-1 + **kit de TUNEL**. Figura f, Problema: Células HeLa + 5 $\mu$ g/ml de toxina proveniente de la cepa 10-2 + **kit de TUNEL**.

## VI. II ENSAYOS IN VIVO

### VI.IIA INDUCCION DE TUMORES EN RATONES *nu / nu*

Se inocularon  $1 \times 10^6$  células HeLa en ratones inmunosuprimidos, se revisaron cada 4º día para evaluar el crecimiento del tumor, en promedio alrededor de la 3 semana los tumores tenían el tamaño adecuado de proximadamente 0.8 a 1.2 cm para iniciar con la inoculación de la toxina. En la figura 55 se observa el seguimiento del crecimiento tumoral, desde la inoculación en un costado del dorso del ratón, el momento en que alcanza el tamaño deseado el tumor y el inicio de la etapa experimental de las toxinas Cry en tumores *in vivo*.



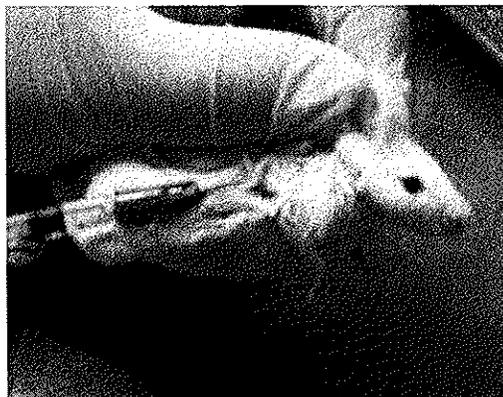
**Figura 55.** Seguimiento del crecimiento tumoral inducido en ratones *nude*. Imagen a) Inoculación celular. b) Observación al 4º día de crecimiento tumoral. c) Día 15 de crecimiento tumoral. d) Día 20 Inoculación de la toxina sobre el tumor.

## VI.IIB CITOTOXICIDAD DE TOXINAS Cry EN RATONES Balb/c.

### VI.IIBa EXPOSICION DE RATONES *Balb/c* A DIFERENTES TOXINAS Cry.

Los ratones Balb/c fueron el grupo control por presentar un sistema inmnlógico competente. En ellos no se indujeron tumores por lo que el objetivo de este grupo de estudio fue, analizar el efecto de la toxina Cry activada en ratones sanos. Se inocularon, como se muestra en la figura 56, siguiendo el mismo protocolo que se siguió en ratones *nude*, 5 dosis de la toxina Cry cada 24 h y se observaron los posibles cambios en el ratón.

En los grupos de ratones inoculados con 1, 10, 50 y 100 µg/100 µl de las toxinas Cry de las cepas 6-1, 6-4 y 10-2, no se observó ningún cambió en el ratón, incluso el bazo e hígado de estos grupos tenían apariencia y tamaño similar al grupo control, al que sólo se le inoculó medio RPMI. Sin embargo en el grupo inoculado con la toxina M2#2, se observaron algunos síntomas de daño como: piloerección, encorvamiento, ojos semicerrados. El hígado y bazo presentaban un tamaño mayor con respecto al control.



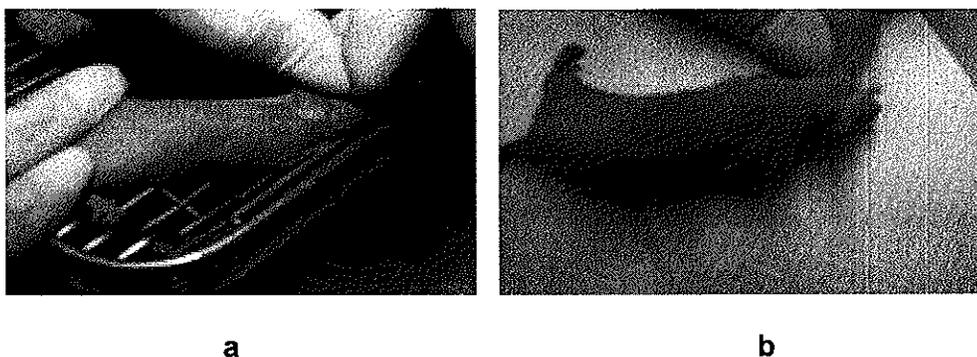
**Figura 56.** Exposición a las diferentes toxinas Cry de *B. thuringiensis* en diferentes concentraciones en ratones inmunocompetentes Balb/c.

## VI.IIC CITOTOXICIDAD DE TOXINAS Cry SOBRE TUMORES INDUCIDOS EN MODELOS MURINOS *nude* (*nu/nu*).

### VI.IICa EXPOSICION DE RATONES *nude* A TOXINAS Cry DE LA CEPA 6-1

#### 1. CONTROL CINCO DOSIS CONSECUTIVAS CON 100 $\mu$ l SD-IBT + Tripsina + PMSF

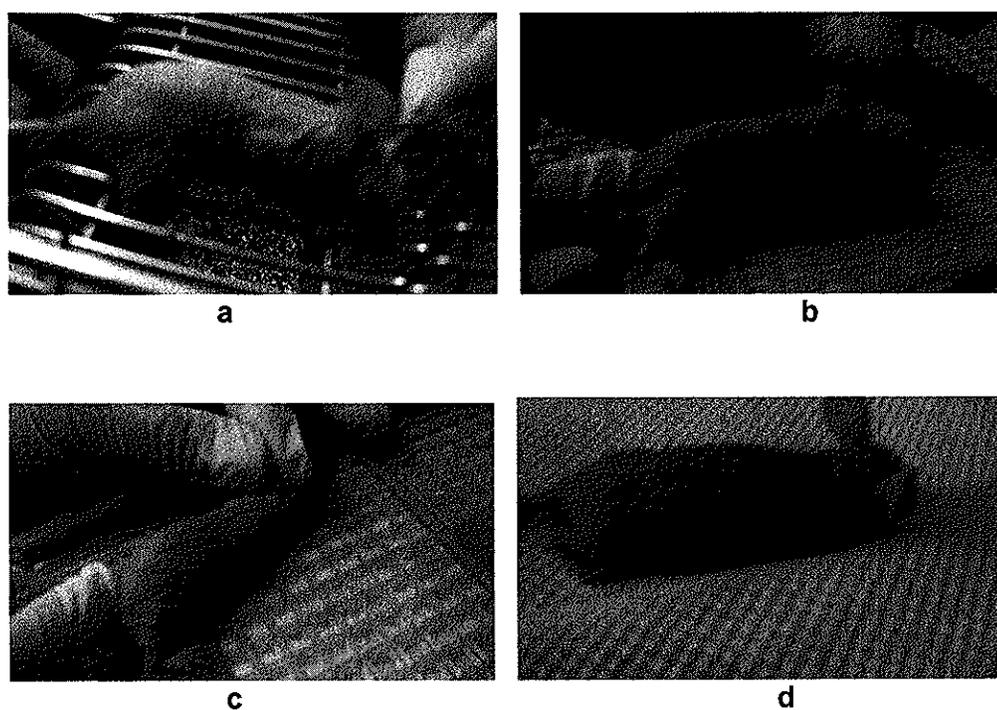
Se estableció un grupo control de ratones *nude* válidos para las toxinas Cry de 6-1 y 10-2, el cual consistió en inducir tumores e inocular la mezcla de componentes químicos utilizados para la activación de cristales, con el objetivo de demostrar que ninguno de estos componentes tiene efecto tóxico sobre el tumor inducido. Se inoculó una dosis de la solución control mucho mas alta que la inoculada con la toxina. Se comprobó que no tienen efecto sobre las células cancerosas la solución de SD-IBT+Tripsina+PMSF.



**Figura 57.** Control negativo para la toxina de la cepa 6-1 y 10-2. Inoculación sobre el tumor durante 5 días consecutivos de SD-IBT + Tripsina + PMSF. a) Día de inoculación de la primera dosis. b) Sexto día, sacrificio.

## 2. CINCO DOSIS CONSECUTIVAS CON 10 $\mu$ g/ml DE LA TOXINA PROVENIENTE DE LA CEPA 6-1.

La toxina Cry proveniente de la cepa 6-1 logró afectar el tumor inducido en ratones, sin embargo no se logró erradicar el tumor a esta concentración en ninguno de los casos. En la figura 58, se muestra la secuencia de fotos, donde el ratón presenta el tumor de tamaño adecuado para iniciar el tratamiento con la toxina de la cepa 6-1, las siguientes fotos son postinoculación en diferentes días del tratamiento.

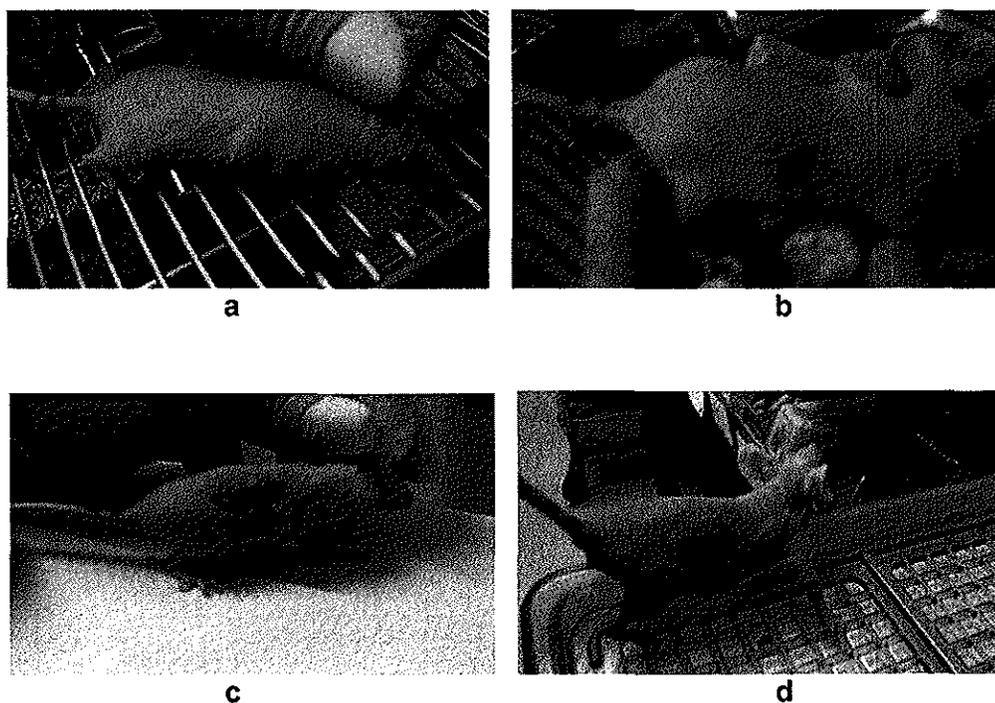


**Figura 58.** Imágenes de ratón *nude* inoculado con 10 $\mu$ g/ml de la toxina de la cepa 6-1 cada 24h durante 5 días. a) Tumor al día de la inoculación. b) Tumor al segundo día de la inoculación. c) Tumor al cuarto día de la inoculación. d) Tumor al sexto día, sacrificio.

### 3. CINCO DOSIS CONSECUTIVAS CON 30 $\mu$ g/ml DE LA TOXINA PROVENIENTE DE LA CEPA 6-1

La dosis de 30  $\mu$ g/ml de la toxina Cry de la cepa 6-1 resultó eficiente para erradicar por completo el tumor en el 100% de los casos.

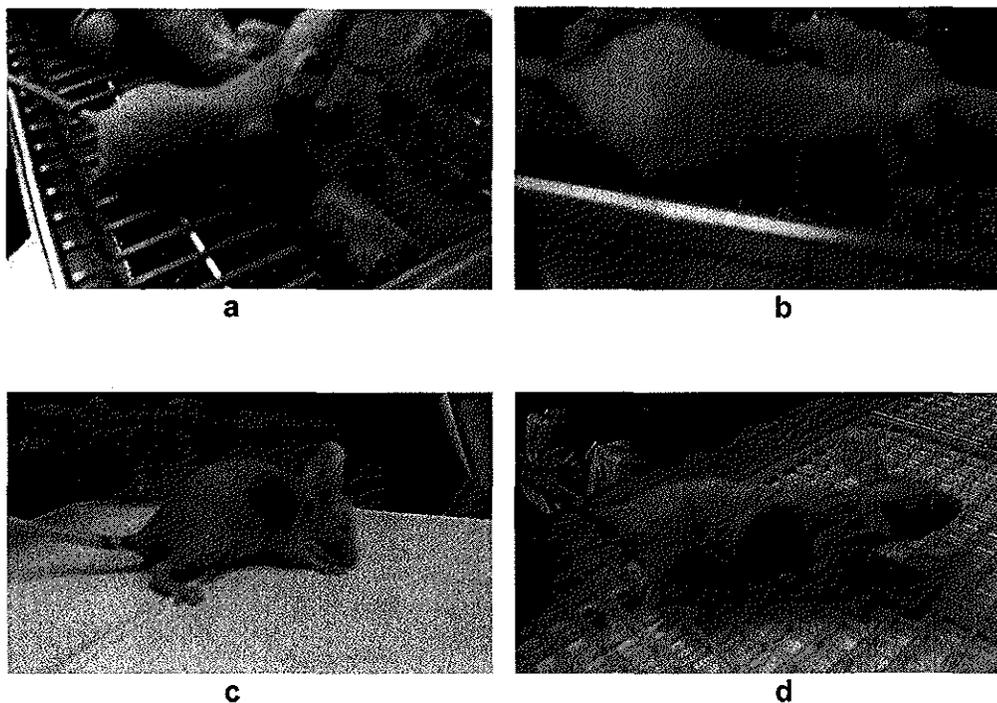
En la figura 59 se pueden observar imágenes del daño que causa sobre el tumor la toxina inoculada.



**Figura 59.** Imágenes de ratón *nude* inoculado con 30 $\mu$ g/ml de la toxina de la cepa 6-1 cada 24h durante 5 días. a) Tumor al día de la inoculación. b) Tumor al segundo día de la inoculación. c) Tumor al cuarto día de la inoculación. d) Tumor al sexto día, sacrificio.

#### 4. CINCO DOSIS CONSECUTIVAS CON 50 $\mu$ g/ml DE LA TOXINA PROVENIENTE DE LA CEPA 6-1.

La dosis de 50  $\mu$ g / ml de la toxina 6-1 sobre el tumor inducido en ratones *nude* resultó eficiente desde la 2<sup>a</sup>. dosis, hacia la 4<sup>a</sup>. dosis el ratón presentaba síntomas de diarrea, piel reseca, descamación, pérdida de peso evidente. La dosis de 50  $\mu$ g / ml es tóxica para el ratón. En la figura 60, se muestra la secuencia de fotos de el día en que inició la inoculación de la toxina sobre el tumor y 24 h después de la última inoculación .

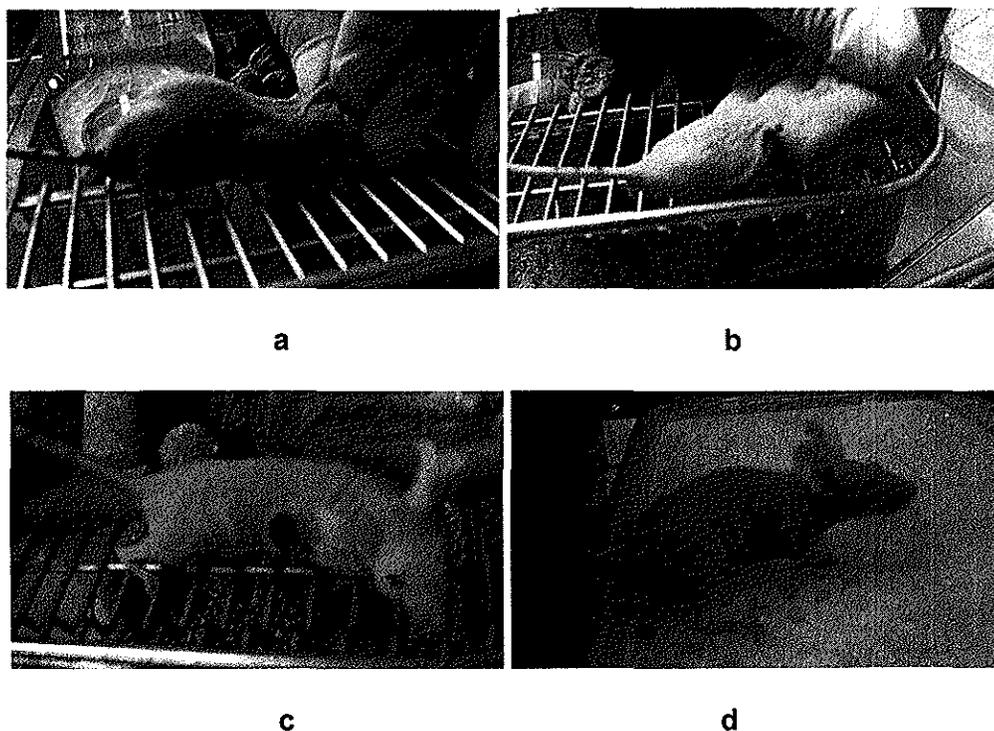


**Figura 60.** Imágenes de ratón *nude* inoculado con 50 $\mu$ g/ml de la toxina de la cepa 6-1 cada 24h durante 5 días. a) Tumor al día de la inoculación. b) Tumor al segundo día de la inoculación. c) Tumor al cuarto día de la inoculación. d) Tumor al sexto día, sacrificio.

## VI.IICb EXPOSICION DE RATONES *nude* A TOXINAS Cry DE LA CEPA 10-2.

### 1. CINCO DOSIS CONSECUTIVAS CON 10 $\mu$ g/ml DE LA TOXINA PROVENIENTE DE LA CEPA 10-2.

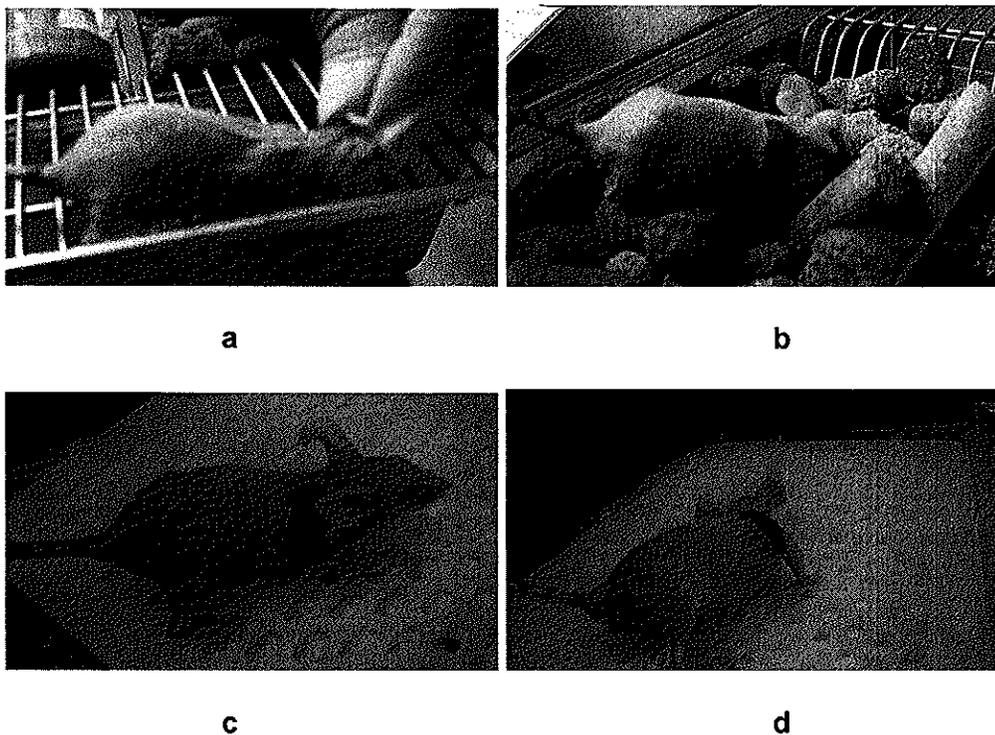
La dosis de 10  $\mu$ g / ml de la toxina 10-2 sobre el tumor, no fue en todos los casos suficiente para eliminarlo, a pesar del daño que ocasionó sobre el área inoculada y sus alrededores, las células cancerígenas no fueron eliminadas en el 100% de los casos y el tumor se expandió. En la figura 61, se observa que si hubo un efecto de la toxina contra el tumor, sin embargo, en este caso la dosis administrada no logró eliminar el tumor.



**Figura 61.** Imágenes de ratón *nude* inoculado con 10  $\mu$ g/ml de la toxina de la cepa 10-2 cada 24 h durante 5 días. a) Tumor al día de la inoculación. b) Tumor al segundo día de la inoculación. c) Tumor al cuarto día de la inoculación. d) Tumor al sexto día, sacrificio.

## 2. CINCO DOSIS CONSECUTIVAS CON 30 $\mu$ g/ml DE LA TOXINA PROVENIENTE DE LA CEPA 10-2.

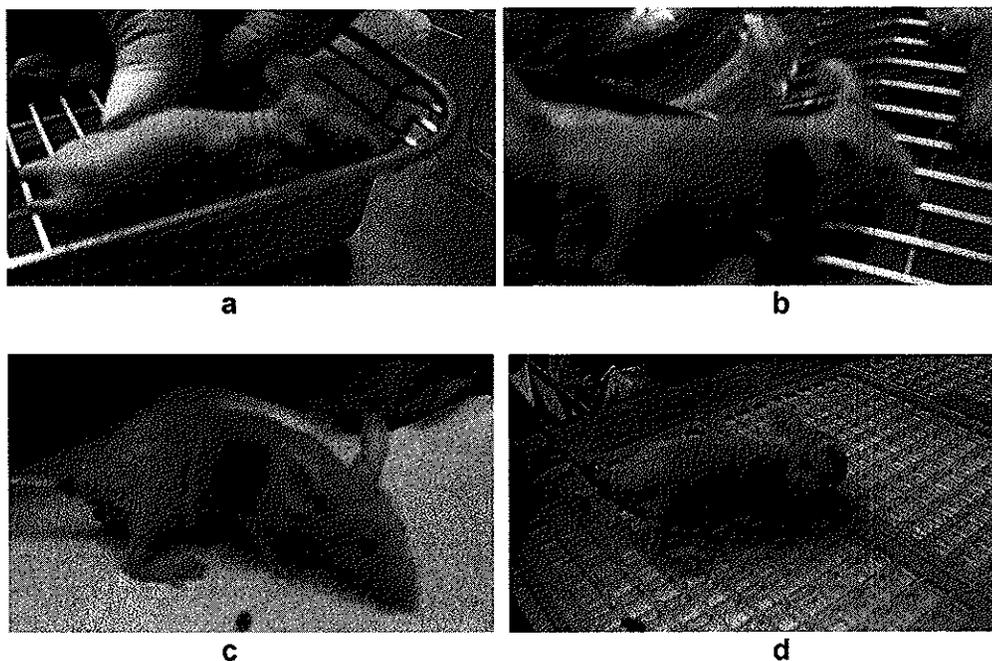
La dosis de 30  $\mu$ g / ml de la toxina 10-2 sobre el tumor inducido en ratones *nude*, se extinguió en todos los casos. En la figura 62, se observa la secuencia de fotos de el día en que inició la inoculación de la toxina sobre el tumor y 24 h después de la última inoculación .



**Figura 62.** Imágenes de ratón *nude* inoculado con 30 $\mu$ g/ml de la toxina de la cepa 10-2 cada 24 h durante 5 días. a) Tumor al día de la inoculación. b) Tumor al segundo día de la inoculación. c) Tumor al cuarto día de la inoculación. d) Tumor al sexto día, sacrificio.

### 3. CINCO DOSIS CONSECUTIVAS CON 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ DE LA TOXINA PROVENIENTE DE LA CEPA 10-2.

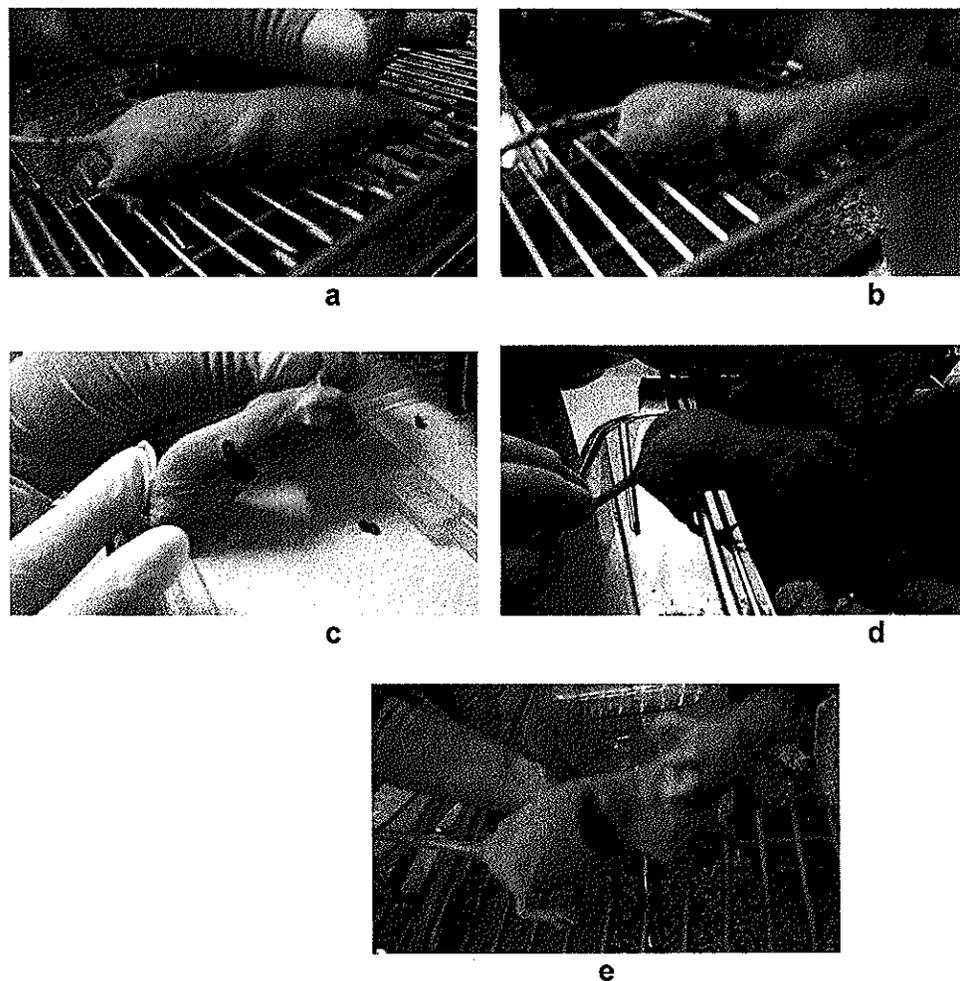
La dosis de 50  $\mu\text{g} / \text{ml}$  de la toxina 10-2 sobre el tumor inducido en ratones *nude* resultó eficiente desde la 2<sup>a</sup>. dosis, hacia la 4<sup>a</sup>. dosis el ratón presentaba síntomas de diarrea, piel reseca, descamación, pérdida de peso evidente. La dosis de 50  $\mu\text{g} / \text{ml}$  es tóxica para el ratón. En la figura 63, se muestra la secuencia de fotos de el día en que inició la inoculación de la toxina sobre el tumor y 24 h después de la última inoculación .



**Figura 63.** Imágenes de ratón *nude* inoculado con 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de la toxina de la cepa 10-2 cada 24 h durante 5 días. a) Tumor al día de la inoculación. b) Tumor al segundo día de la inoculación. c) Tumor al cuarto día de la inoculación. d) Tumor al sexto día, sacrificio.

**VI.IIDa. EXPOSICION DE RATONES *nude* A TOXINAS Cry DE LA CEPA 6-1.****1. CINCO DOSIS CONSECUTIVAS CON 10 $\mu$ g/ml DE LA TOXINA PROVENIENTE DE LA CEPA 6-1 Y SU POSTERIOR RECUPERACION - REGRESION.**

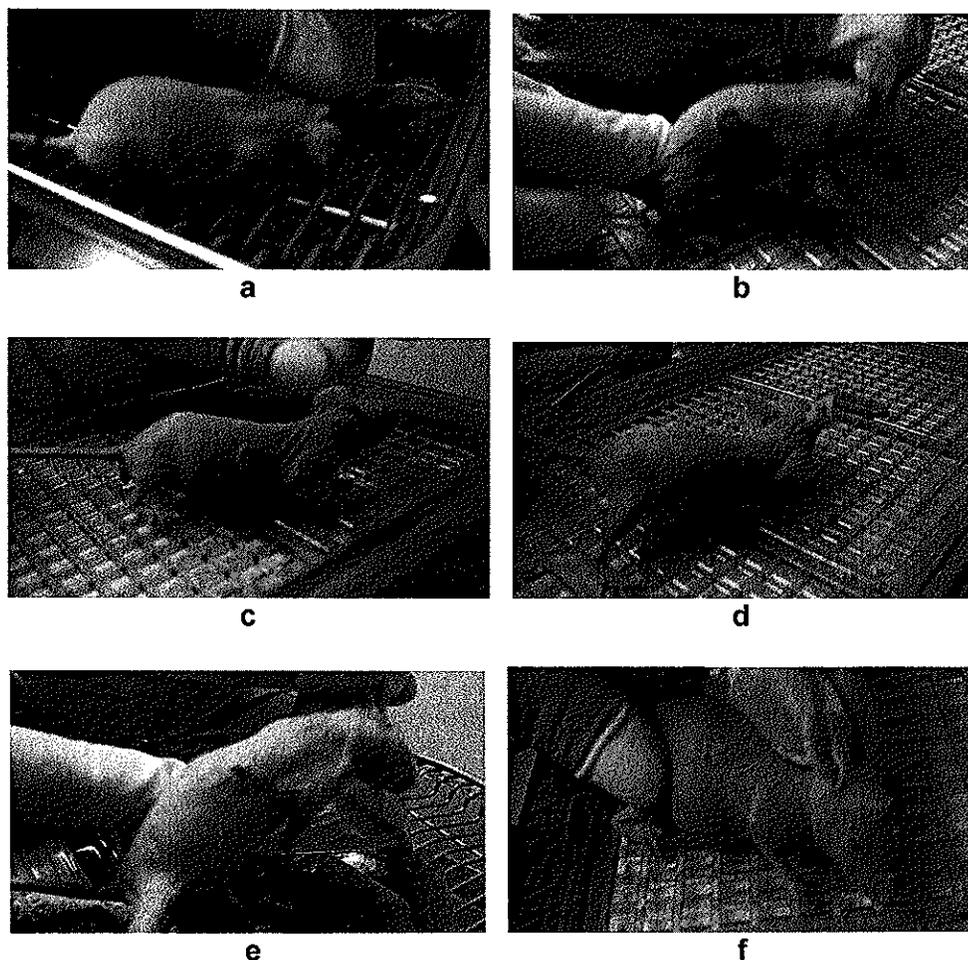
En la figura 64, se muestra la etapa de recuperación del ratón inoculado con células tumorales y tratado con 10  $\mu$ g /ml de la toxina 6-1. En este grupo de ratones el 100% de los individuos tuvo regresión del tumor al final de la etapa de recuperación.



**Figura 64.** Imágenes de ratón *nude* inoculado con 10  $\mu$ g/ml de toxina de la cepa 6-1 cada 24 h durante 5 días. Período de recuperación hasta 8 días postinoculación de toxina sobre el tumor. a) Tumor al día de la inoculación. b) 2o. día de recuperación. c) 3er. día de recuperación. d) 5o. día de recuperación. e) 8o. día de recuperación, regresión del tumor, día de sacrificio.

## 2. CINCO DOSIS CONSECUTIVAS CON 30 $\mu$ g/ml DE LA TOXINA PROVENIENTE DE LA CEPA 6-1 Y SU POSTERIOR RECUPERACION.

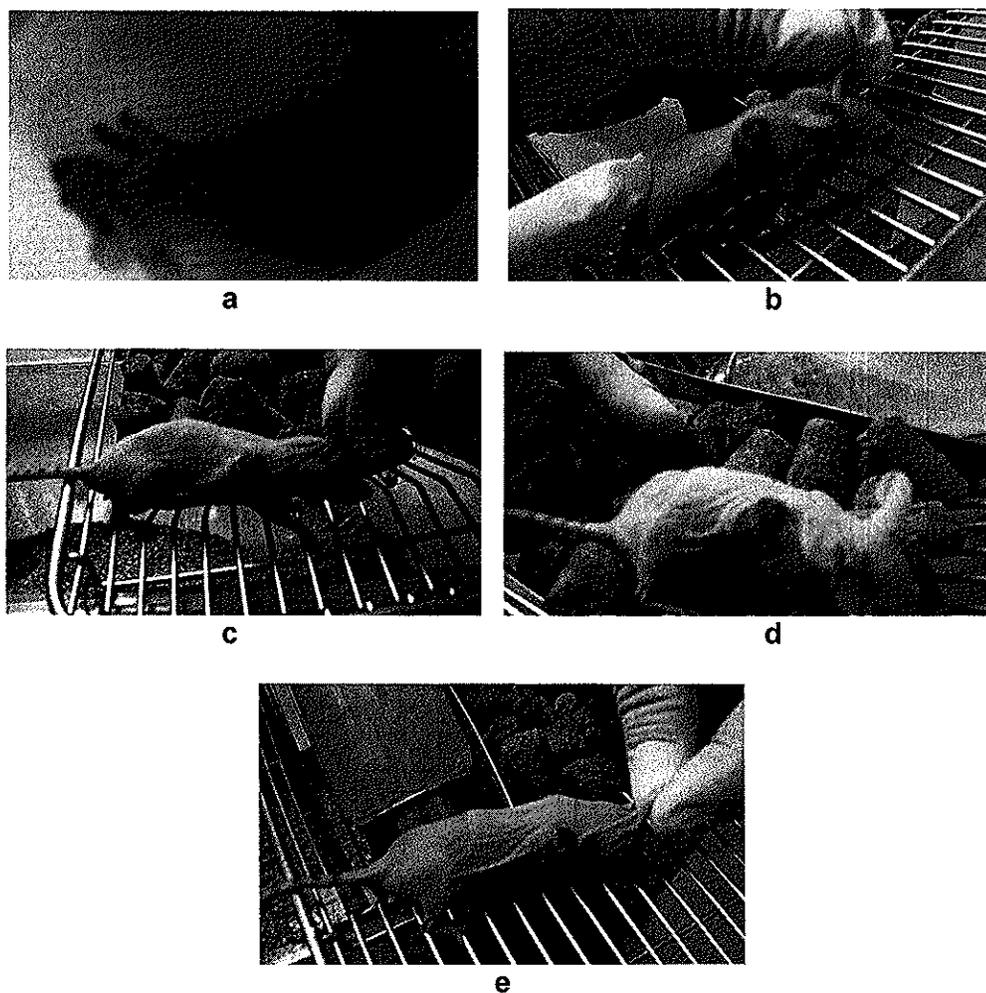
En la figura 65, se muestra la etapa de recuperación del ratón inoculado con células tumorales y tratado con 30  $\mu$ g /ml de la toxina 6-1. En este grupo de ratones en el 100% de los individuos se observó recuperación del ratón y eliminación del tumor al final de la etapa de recuperación.



**Figura 65.** Imágenes de ratón *nude* inoculado con 30  $\mu$ g/ml de toxina de la cepa 6-1 cada 24 h durante 5 días. Período de recuperación de 23 días postinoculación de toxina sobre el tumor a) Tumor al día de la inoculación. b) 1er día de recuperación. c) 5o. día de recuperación. d) 8vo. día de recuperación. e) 12o. día de recuperación. f) 23o. día de recuperación, día de sacrificio.

**VI.IIDb. EXPOSICION DE RATONES *nude* A TOXINAS Cry DE LA CEPA 10-2.****1. CINCO DOSIS CONSECUTIVAS CON 10 µg/ml DE LA TOXINA Y SU POSTERIOR RECUPERACION - REGRESION.**

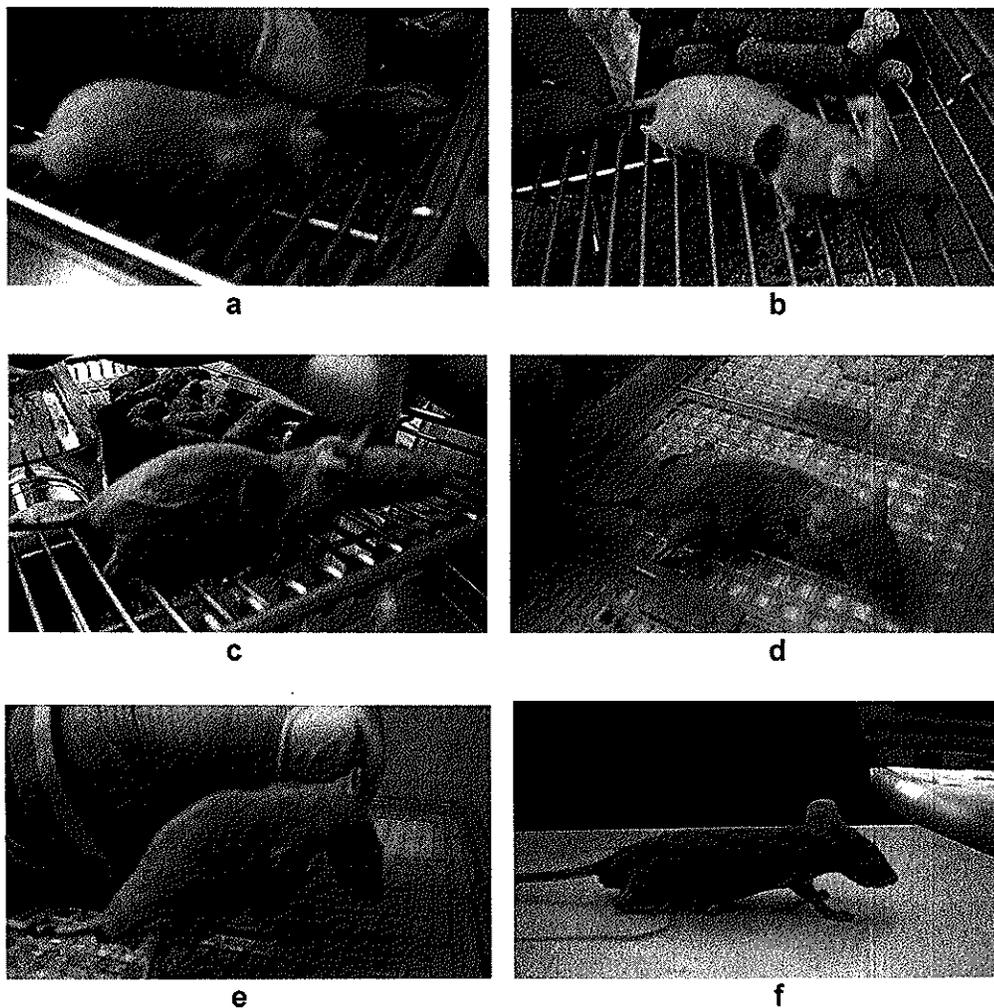
En la figura 66, se muestra la etapa de recuperación del ratón inoculado con células tumorales y tratado con 10 µg /ml de la toxina 10-2. En este grupo de ratones el 50% de los individuos tuvo regresión del tumor y el 50% logró eliminar el tumor con la dosis administrada al final de la etapa de recuperación.



**Figura 66.** Imágenes de ratón *nude* inoculado con 10 µg/ml de toxina de la cepa 10-2 cada 24 h durante 5 días. Período de recuperación hasta 8 días postinoculación de toxina sobre el tumor a) Tumor al día de la inoculación. b) 20. día de recuperación. c) 3er. día de recuperación. d) 50. día de recuperación. e) 80. día de recuperación, regresión del tumor, día de sacrificio.

## 2. CINCO DOSIS CONSECUTIVAS CON 10 $\mu$ g/ml DE LA TOXINA PROVENIENTE DE LA CEPA 10-2 Y SU POSTERIOR RECUPERACION.

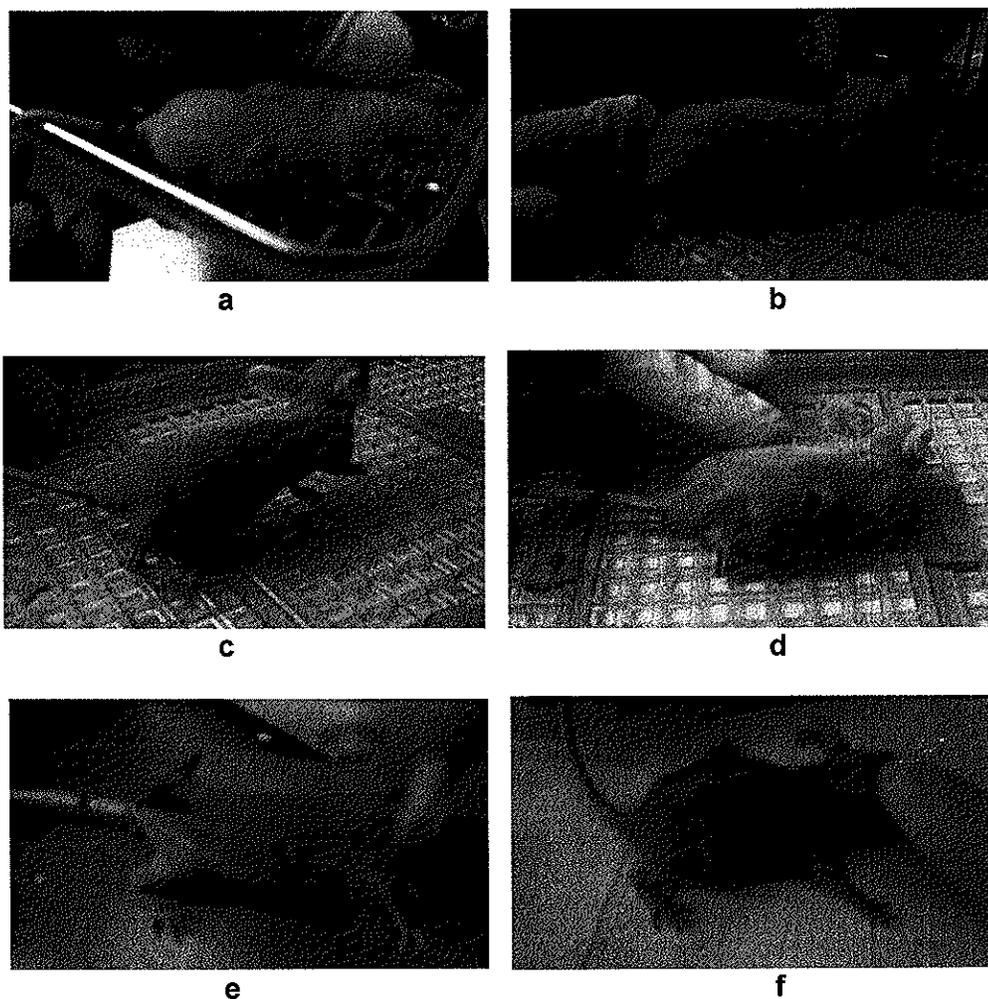
En la figura 67, se muestra la etapa de recuperación del ratón inoculado con células tumorales y tratado con 10  $\mu$ g /ml de la toxina 10-2. En este grupo de ratones el 50% de los individuos tuvo regresión del tumor y el 50% logró eliminar el tumor con la dosis administrada al final de la etapa de recuperación.



**Figura 67.** Imágenes de ratón *nude* inoculado con 10 $\mu$ g/ml de toxina de la cepa 10-2 cada 24h durante 5 días. Período de recuperación de 23 días postinoculación de toxina sobre el tumor. a) Tumor al día de la inoculación. b) 2o. día de recuperación. c) 5o. día de recuperación. d) 11o. día de recuperación. e) 15o. día de recuperación. f) 23o. día de recuperación, día de sacrificio.

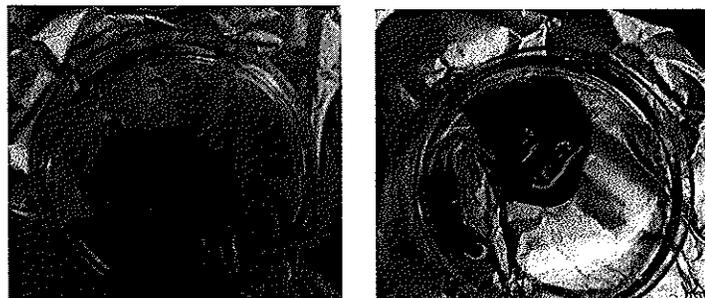
### 3. CINCO DOSIS CONSECUTIVAS CON 30 $\mu$ g/ml DE LA TOXINA PROVENIENTE DE LA CEPA 10-2 Y SU POSTERIOR RECUPERACION.

En la figura 68, se muestra la etapa de recuperación del ratón inoculado con células tumorales y tratado con 30  $\mu$ g/ml de la toxina 10-2. En este grupo de ratones en el 100% de los individuos se observó recuperación del ratón y eliminación del tumor al final de la etapa de recuperación.



**Figura 68.** Imágenes de ratón *nude* inoculado con 30 $\mu$ g/ml de toxina de la cepa 10-2 cada 24h durante 5 días. Período de recuperación de 23 días postinoculación de toxina sobre el tumor. a) Tumor al día de la inoculación. b) 2o. día de recuperación. c) 5o. día de recuperación. d) 8vo. día de recuperación. e) 17o. día de recuperación. f) 23o. día de recuperación , día de sacrificio.

Después de los 23 días de recuperación, se comparó el bazo y el hígado de los dos principales grupos de estudio. En la figura 69, se muestran imágenes de los órganos extraídos de ratones con tumor, expuestos a la toxina *in situ*.



**Figura 69.** Imagen comparativa de órganos de ratones *nude* expuestos a toxinas de Bt + período de recuperación. La imagen de la izquierda corresponde al bazo e hígado de ratón expuesto a la toxina de la cepa 6-1. La imagen de la derecha corresponde al bazo e hígado de ratón expuesto a la toxina de la cepa 10-2.

#### V.IIB ENSAYOS BIOINSECTICIDAS

Cada ensayo consiste en inocular en una placa de veinticuatro pozos una concentración de la toxina, que es embebida en el alimento solidificado. Posteriormente las larvas de *M. sexta* son depositadas en cada uno de los pozos. Después de 7 días se toma la lectura de cada placa, y se cuantifica el número de larvas vivas por concentración. Este ensayo se realiza por triplicado. En la tabla XII se observan los resultados obtenidos para cada una de las toxinas en las diferentes concentraciones estudiadas. La toxina Cry de la cepa 6-1 fue la más tóxica para las larvas, esto se relaciona con el tipo de toxina Cry encontrada por el análisis molecular, se ha descrito que las larvas de *M. sexta* son más susceptibles a la toxina Cry1.

Tabla XI. Resultados obtenidos para el Ensayo Insecticida

<b>TOXINA</b>	<b><math>\mu\text{g}/\text{cm}^2</math></b>	<b>Larvas vivas</b>	<b>Larvas muertas</b>
6-1	0.01	15	9
6-1	0.05	13	11
6-1	0.1	10	14
6-1	0.5	6	18
6-1	2	0	24
6-1	1	0	24
6-3	2	21	3
6-4	1	24	0
6-4	2	0	24
10-2	1	22	2
10-2	2	23	1
13-4	1	22	2
13-4	2	23	1
Control	----	24	0

## VII. DISCUSIONES

### VII.I.GENERALIDADES.

Durante muchos años se ha tratado de encontrar la cura definitiva contra el cáncer, sin embargo, a medida que se avanza en el conocimiento de la enfermedad, surgen nuevos problemas y dudas por resolver. Se han buscado en todos los ecosistemas moléculas que funcionen como anticancerígenos, en algunas ocasiones se han potencializado las funciones de algunos compuestos importantes a través de la biotecnología o de la química pura, sin embargo esto no ha sido suficiente.

Nuestro grupo de investigación es pionero en México, en la búsqueda de proteínas cristal (Cry) de *Bacillus thuringiensis* nativas de territorio mexicano, con actividad citócidica contra líneas celulares de cáncer y células tumorales *in vivo*.

México resulta atractivo para la búsqueda de compuestos activos naturales debido a que se encuentra ubicado en la zona de confluencia y transición de dos zonas biogeográficas de las 6 existentes en el planeta, la Neártica al norte del continente y la Neotropical en Centro y Sudamérica. Se le considera entre los 18 países megadiversos, el segundo país en el mundo en ecosistemas y el 4o. en total de especies. Según la CONABIO (Consejo Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad), en México existen 8 tipos de ecosistemas; Templados, Tropicales, Subterráneos, Terrestres modificados, Acuáticos modificados, Dulceacuícolas, Costeros y Marinos. Es poseedor de entre 300,000 y 425,000 especies de insectos, lo que lo sitúa entre los primeros 9 países del mundo y lo relaciona directamente con la diversidad de genes *cry* en el país, ya que los insectos además de ser el blanco de estas proteínas son vectores y a través de ellos así como de las aves que se alimentan de estos insectos o de mamíferos que comen en suelos infectados por Bt, se esparcen y diversifican los genes *cry*.

### VII.II. GENES *cry*

Los genes *cry* en general se encuentran en plásmidos de *Bacillus thuringiensis*, una bacteria anaerobia facultativa, móvil, Gram positiva, formadora de esporas y de inclusiones paraesporales que empiezan la síntesis de proteínas Cry durante los estadios de esporulación III y IV (Somerville, 1978; Bulla, et al. 1980; Aronson, et al.

1986; Pramatha, R.B., 1993; Promdonkoy, et al. 2000; Ito, et al. 2004; Bravo, et al. 2004). Estas proteína Cry han sido nombradas de diversas maneras, basándose en varias de sus características.

En un primer sistema se intentó organizar la nomenclatura genética basándose en la actividad insecticida de las proteínas cristal por la clasificación primaria de sus genes correspondientes (Crickmore, et al. 1998). Así los genes que codificaban para *cryI* eran proteínas tóxicas para lepidópteros. Los genes codificantes para *cryII* eran proteínas tóxicas tanto para lepidópteros y dípteros. Los genes *cryIII* según este sistema codificaban para proteínas tóxicas contra coleópteros y los genes *cryIV* sólo para dípteros. Poco tiempo después se modificó este sistema por sus inconsistencias ya que descubrieron que existía alta homología entre genes que codificaban para toxinas con un espectro insecticida totalmente diferente. Por ejemplo la proteína designada como CryIB se había reportado como tóxica para lepidópteros y coleópteros, mientras que CryIC reportó toxicidad para dípteros y lepidópteros.

En 1998, Crickmore propuso un nuevo sistema de nomenclatura para las proteínas Cry y Cyt basado únicamente en la similitud de la secuencia primaria de estos genes. Se observó que las toxinas con la secuencia primaria similar afectan generalmente al mismo orden de insectos pero si su estructura secundaria y terciaria es diferente entonces se altera su blanco y su eficiencia insecticida dentro del mismo orden (Crickmore, 1998).

Crickmore además definió a una proteína Cry, como una proteína proveniente de una inclusión parasporal formada en *Bacillus thuringiensis* con actividad tóxica en algún organismo. Y a una proteína Cyt como aquella proteína proveniente de una inclusión parasporal formada en *Bacillus thuringiensis* con actividad hemolítica (Crickmore, 1998).

Bravo y colaboradores en 1998 aislaron 496 cepas de Bt de diversas zonas de México exceptuando a la península de Baja California. Se caracterizaron los genes *cry* que contenían por medio de PCR y oligos generales y específicos. Los resultados reportados fueron: **49%** de las cepas con genes *cry 1*, **38%** de las muestras *cry 2*, el **22%** presentó genes *cry3*, el **8%** lo daban genes *cry 11* y *cyt*, las cepas con genes *cry 7*, *cry 8* y *cry 9* fueron muy pocas, y el **14%** de las cepas no amplificó ningún producto de PCR. En este mismo trabajo de Bravo et al. hacen una concordancia de resultados. El análisis es que los genes *cry 11* y *cyt* específicos para dípteros (mosquitos y otros) fueron aislados

mayoritariamente en regiones tropicales, esto se correlaciona con la abundancia mayoritaria de dípteros en estas regiones.

En la zona tropical se aíslan frecuentemente cepas con genes *cry* potencialmente nuevos y esto concuerda con la relación directa que hay entre diversidad de genes *cry* y diversidad de insectos.

Los resultados reportados en este trabajo de genes *cry* encontrados en 28 cepas aisladas de la región Ensenada-Tijuana de la República Mexicana fueron los siguientes: **40.5%** de genes *cry 1*, **56.7%** para genes *cry 2*, **10.8%**, de genes *cry 3* presentes en las muestras, *cry 4* y *cry 8* estuvo presente en un **5.4%** de las muestras, *cry 11* en el **29.7%** de las muestras, el gen *cyt* estuvo presente en el **32.43%** de las muestras, para genes **de Nem, cry 9, cry 10, cry 25 y cry 29** no hubo ninguna cepa que amplificara.

Correlacionando los resultados reportados de los genes presentes en cada cepa aislada de la región Ensenada-Tijuana, con la morfología de cristales observada por MEB y el perfil de las bandas que se observó en geles de poliacrilamida desnaturalizante, estos resultados son confiables y siguen el patrón de lo que los científicos dedicados al estudio de proteínas Cry como insecticidas afirman. Que existe una correlación entre la morfología del cristal, la composición de proteínas cristal y la selectividad al insecto (Ceron, et al. 1995; Bravo, et al. 2007).

Esta afirmación tiene soporte en los trabajos realizados con la clonación y caracterización de los genes que codifican para proteínas Cry. Se ha observado que su secuencia es muy poco conservada en general, pero si se compara la secuencia de toxinas activas contra la misma especie de insectos se observan secuencias más conservadas. (Crickmore, 1998)

En la caracterización molecular de genes *cry* en las cepas aisladas tuvimos cepas que no amplificaron con ninguno de los oligos probados, a pesar de tener caracterizada la morfología de los cristales de esta cepa y su perfil de proteínas. Esto indica que en la práctica no siempre se cumple esta triada de morfología del cristal, peso molecular, gen *cry*, en la que han encasillado a las proteínas Cry y podemos estar enfrentándonos al hallazgo de nuevos genes en esta región.

### VII.III. CULTIVO Y CARACTERISTICAS DE CEPAS DE *Bacillus thuringiensis*.

*Bacillus thuringiensis* se puede aislar de casi cualquier microsistema, en el caso de las cepas aisladas de la región Ensenada-Tijuana en su mayoría fueron aisladas de suelo no tratado con bioinsecticidas a base de cristales y esporas de Bt.

Se utilizaron dos cepas control: *Bt var. aizawai* y *Bt var. kurstaki*, para conocer el proceso de cultivo, cosecha, solubilización y activación de cristales.

A lo largo de este período de trabajo, se han mejorado las condiciones para obtener las toxinas de *Bacillus thuringiensis*. Se analizaron diferentes medios de cultivo para el crecimiento de *Bacillus thuringiensis* y la formación de cristales. Por la experiencia del grupo de la Dra. Bravo Investigadora del IBT-UNAM en el manejo de cepas de Bt por recomendación suya se eligió cultivar la cepa y obtener cristales después de 4 días de incubación a una temperatura de 30°C en medio SP. Este medio es capaz de mantener el cultivo bacteriano durante todo este tiempo y producir la mayor cantidad de cristales que cualquier otro medio probado previamente, lo que esta relacionado con su composición altamente nutritiva y la adición de sales minerales.

En resultados más específicos, la morfología colonial en todas las cepas aisladas coincidió con lo ya descrito por otros autores (Realpe, et al. 2002; Ozgur, et al. 2005) colonias blanquecinas con apariencia cerosa, de entre 0.5 a 1.5 cm, de forma circular, borde ondulado, de apariencia semiseca no brillante, sin embargo en medio líquido algunas de estas cepas aisladas presentan colores diferentes que van desde marrón hasta amarillentos. Se ha reportado que la mayoría de las especies del género *Bacillus* no son pigmentadas sin embargo algunas cepas de este género sintetizan diferentes clases de pigmentos: rojos (Uffen y Canale, 1972), rosa, amarillo, naranja, café, negro y fluorescente de color amarillo verdoso (Grimont y Grimont, 1984; Harwood, 1989); dependiendo de la subespecie y el medio en el cual se cultiva.

Se ha reportado que el pigmento producido por *Bacillus* es melanina identificado por su espectro en el infrarrojo y no es el único género bacteriano reportado que produce este compuesto, *Mycobacterium*, *Vibrio*, *Rhizobium*, *Pseudomonas*, *Micrococcus*, *Gluconobacter*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, se ha reportado que también la producen (Aronson y Wermus, 1965).

La cromogénesis de las colonias bacterianas es una de las características más notables de los cultivos. En algunas especies el pigmento producido es retenido dentro de las células y su masa celular se colorea, en otras especies por el contrario el pigmento es expulsado al medio de cultivo. Estos pigmentos no son producidos en todos los medios de cultivo ni bajo todas las condiciones ambientales (Grimont y Grimont, 1984; Harwood, 1989). Nosotros lo pudimos constatar en el laboratorio, al crecer en diferentes medios e incluso bajo diferentes condiciones a las cepas aisladas de *Bt*. Mientras que en medios sólidos no se observó coloración en las colonias en ninguno de los diferentes medios empleados, cuando las cepas se crecieron en medio líquido rico en sales (SP exclusivamente) algunas de ellas fueron capaces de sintetizar pigmentos que le dieron tonalidades diferentes a las típicamente reportadas para *Bt* y a lo ya observado en el laboratorio en los experimentos realizados.

Los factores que influyen en la pigmentación son variados y no se encuentran bien estudiados. Sin embargo como ya se mencionó el medio de cultivo es una condición esencial para la producción de pigmentos bacterianos; la presencia o ausencia de fuentes de carbono o nitrógeno orgánicas/inorgánicas (Torres y Bonilla, 1999; Toro et al. 2001) la presencia de otros componentes, como sales y aminoácidos entre otros pueden inhibir o estimular su síntesis (Kerr, 2000)

Las funciones específicas de la mayoría de los pigmentos en los cultivos bacterianos no están determinadas. En general son metabolitos secundarios sin función biológica definida en el crecimiento celular a los cuales se les han atribuido diversas funciones, como ser amortiguadores redox, generar o neutralizar radicales libres tóxicos del oxígeno (Kerr 2000).

Algunos científicos explican su presencia como un mecanismo de defensa desarrollado por las bacterias susceptibles al daño oxidativo causado por los rayos ultravioleta .

En el caso particular de *Bt*, se ha observado que las esporas y cristales de esta bacteria son inactivados por la radiación solar por lo que su uso como bioinsecticida es limitado. En un trabajo realizado en 1993 por Hoty et al. reportaron que una cepa mutante de H14 (conocida por su alta actividad contra mosquitos y mariposas, no productora de melanina), produce melanina que le confiere una coloración café oscura a la cepa, y resulta ser mucho más potente que la original durante mayor tiempo.

En el 2002, Deepak et al. protegieron exitosamente la actividad mosquitocida de *Bt var.*

---

*kurstaki* de irradiaciones UV con melanina de *Streptomyces lividans* (Deepak et al. 2002).

#### VII.IV. AISLAMIENTO Y PURIFICACION DE PROTEINAS Cry.

Al finalizar el período de cultivo de 4 días en agitación, las mayoría de las bacterias se han lisado, liberando esporas y cristales al medio en una concentración deseable. La tinción con verde de malaquita es una técnica diferencial muy simple y noble, las esporas no son teñidas con cualquier técnica de tinción y la técnica de tinción con Verde de Malaquita nos permite teñir esporas, de esta manera es posible observar los diferentes componentes celulares liberados de interés inclusive a 100x. Al utilizar el microscopio de contraste de fases (Ozgur, et al. 2005) con la tinción Verde de Malaquita se obtiene como resultado mayor diferenciación entre una espora y un cristal.

Una vez que en un frotis de cultivo de Bt se observa arriba del 80% de esporas aún que no se observen cristales en un microscopio óptico es seguro que estarán presentes, no necesariamente en la misma cantidad porque varía de una cepa a otra la producción de estos cristales (Prieto, et al. 1997). Sin embargo este momento es el ideal para cosechar el cultivo y obtener los cristales con las endotoxinas.

El método más empleado para la purificación de cristales es la Centrifugación con Gradiente de Densidad de Sacarosa o Bromuro de Sodio principalmente (Thomas et al. 1983; Armstrong, et al. 1985; Ibarra, et al. 1986; Katayama, et al. 2007) Se requiere de ultracentrifugación. Este método se basa en el desplazamiento de los cristales, esporas y restos bacterianos a través de la columna con gradiente hasta encontrar la posición en la cual la densidad del componente subcelular es igual a la de su entorno. Es bastante eficiente la Centrifugación con Gradiente de Densidad en la separación de cristales los cuales se recuperan en la capa mas externa de la columna, las esporas quedan atrapadas en la capa intermedia que se forma y las células vegetativas en el fondo de la columna. Sin embargo presenta como principales desventajas que la cantidad de muestra que se introduce en las columnas es muy pequeña, el tiempo invertido desde la preparación de la columna hasta la limpieza de los cristales es largo (16 a 24 h aproximadamente), se requiere equipamiento para ultracentrifugación y el costo es elevado en comparación con otras técnicas.

En el laboratorio se analizó una forma relativamente sencilla, eficiente y barata de obtener proteínas Cry, esta no implica la purificación del cristal como paso primordial, es una purificación al mismo tiempo que las proteínas se solubilizan y activan.

En el momento en el que el cultivo se cosecha existe una mezcla de todos los componentes que libera la bacteria al lisarse, entre ellos los cristales, esporas, pero también otros como las proteasas. Por ello es paso primordial inactivar estas proteasas con NaCl-EDTA y PMSF.

La solubilización y activación de las proteínas Cry se hace imitando el mecanismo de acción de los insectos.

La actividad insecticida de *Bacillus thuringiensis* se le confiere a la presencia de proteínas Cry, agregadas en inclusiones parasporales, cada subespecie de Bt pueden sintetizar más de una inclusión paraesporal que puede contener diferentes proteínas cristalinas también llamadas delta endotoxinas. Término referido a las toxinas asociadas con la membrana externa de las bacterias Gram positivas, compuestas de un centro de lipopolisacáridos, lípidos A y antígenos somáticos (O), sin embargo este término conceptual no es utilizado en este documento .

Dependiendo de la composición de proteínas cristalinas, el cristal puede tomar varias formas: bipiramidal, cuboidal, rombo o cuadrado plano, amorfo o irregular (Barbara, et al. 1978; Aronson, et al. 1986; Pramatha, et al. 1993; de Maagd, et al. 2001) .

#### **VII.V. SOLUBILIZACION Y ACTIVACION DE PROTEINAS Cry.**

Las proteínas que forman el cristal se unen por enlaces disulfuro, enlaces covalentes, puentes de hidrógeno (Ibarra, et al. 1985; Aronson, et al. 1986). Dentro de una misma subespecie de Bt puede inclusive haber dos o más tipos de cristales. *In vivo* las larvas susceptibles a estas toxinas solubilizan los cristales en el intestino medio donde existe un pH arriba de 10 y condiciones reductoras que rompen los enlaces disulfuro (Jenkins, et al.2000; de Maagd, et al. 2001; Bravo, et al. 2007)

*In vitro* se ajusta el pH de la solución de cristales a pH alcalinos con Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> pH 10.5 y se adiciona a la mezcla β mercaptoetanol como agente reductor el cual tiene como función romper los enlaces disulfuro los cuales son abundantes en el extremo C-terminal de la protoxina.

Después de un tiempo de incubación *in vitro* de 2h a 37°C se ha perdido la estructura del cristal y sus componentes ahora son péptidos solubles, protoxinas susceptibles a proteasas las cuales *in vivo* se encuentra de forma abundante en los jugos intestinales de las larvas susceptibles a las toxinas Cry insecticidas. Estas proteasas cortarán en diferentes puntos de la protoxina hasta encontrar una secuencia resistente a su ataque. Esta forma resistente al ataque de las proteasas es la toxina activada que buscará receptores en la membrana de las células de borde en cepillo del epitelio intestinal a través de su dominio I se unirá a ellos, formará oligómeros con otras toxinas en las mismas condiciones y por el dominio II y III formarán poros en la membrana de las células de intestino de las larvas susceptibles provocando su muerte (Dean, et al. 1996; Boonserm, et al. 2005; Broderick, et al. 2006; Bravo, et al. 2007)

*In vitro* se emplean diversas proteasas como la Tripsina, Quimiotripsina y Proteinasa K principalmente. La Tripsina es una endopeptidasa con alta especificidad por los enlaces peptídicos del extremo C-terminal de los aminoácidos lisina y arginina en la que un residuo de Aspartato localizado en la región catalítica de la enzima es el que tiene la función de atraer residuos de lisina y arginina (ambos cargados positivamente). Trabaja de manera óptima a una temperatura de 37°C y un pH de 8-8.5.

La Proteinasa K es también una endopeptidasa que a diferencia de la Tripsina tiene mayor rango de acción, rompe enlaces peptídicos siguiendo al grupo carboxilo de los aminoácidos hidrofóbicos alifáticos (Glicina, Alanina, Valina, Leucina, Isoleucina y Metionina) y aromáticos (Fenilalanina, Tirosina y Triptófano).

En el laboratorio debido a las características de cada proteasa se decidió el uso de la Tripsina para todas las toxinas, por considerarla más específica y menos agresiva con la proteína. Una vez más se imitaron las condiciones del intestino de las larvas susceptibles y ya que los péptidos han sido solubilizados, se bajó el pH a 8.5 para efficientizar el trabajo de la Tripsina y se incubó a 37°C en un rango de 1-2.5h dependiendo de cada toxina.

#### **VII.VI. ACTIVIDAD INSECTICIDA DE PROTEINAS Cry.**

Los bioensayos de toxicidad en larvas de insectos se realizan utilizando un protocolo estándar aceptado internacionalmente para un insecto de prueba específico (Dulmage et al. 1981). Esta estandarización permite la comparación de diferentes formulaciones

dentro del laboratorio. Cabe aclarar un punto muy importante: Para los ensayos bioinsecticidas no se solubiliza ni activa a la toxina *in vitro*, lo importante en este tipo de ensayos es observar la especificidad de la toxina por la larva, la capacidad de solubilización activación y reconocimiento de receptores en el huésped de forma natural. Generalmente la actividad insecticida de una proteína Cry se expresa en dosis letal o concentración letal que mata al 50% de la población ( $DL_{50}$  o  $CL_{50}$ ), según el método de bioensayo empleado.

Como un primer acercamiento a la naturaleza de la proteína Cry, se prueban dosis altas ( $2\mu\text{g}/\text{cm}^2$  y  $1\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ). Si en estas concentraciones se observa 100% de mortalidad de la larva, se considera insecticida y se realiza entonces una curva de mortalidad con diferentes dosis de la toxina para conocer su  $DL_{50}$  o  $CL_{50}$ . En base a lo reportado para *Manduca sexta* (organismo de referencia en pruebas insecticidas para lepidópteros) la  $DL_{50}$  por Cry1Ab reportada es de  $1\text{ng}/\text{cm}^2$ , con estos resultados se analiza y evalúa si la toxina en estudio es fuerte candidata para desarrollar bioinsecticidas con ella o cualquier otro estudio.

Uno de los objetivos en este trabajo fue conocer si las toxinas de las cepas aisladas tenían actividad insecticida o no y aunque no de todas pudimos saber (hasta este momento) si son insecticidas y la potencia que tienen, se probaron las cepas que resultaron más interesantes desde el enfoque que tuvo el estudio de las proteínas Cry en este trabajo. De las 28 cepas aisladas fueron escogidas 5 de ellas para realizar el ensayo de bioactividad insecticida bajo 2 criterios primordiales. El primero fue la selección de cepas que no presentaron actividad hemolítica a eritrocitos humanos. El segundo fue la selección de cepas que no presentaron genes *cyt* según los resultados de PCR. Las cepas elegidas bajo estos dos criterios primordiales de selección fueron: 6-1, 6-3, 6-4, 10-2, 13-4. Además se tomaron en cuenta otros criterios como: selección de las cepas con buena actividad citócida selectiva contra HeLa y SiHa y baja actividad citócida en HaCat como el caso de las cepas 6-1, 6-4 y 10-2, o bien selección de cepas por no haber sido caracterizadas molecularmente con oligos utilizados para la PCR como el caso de 6-3, 6-4, 10-2 y 13-4.

Dos de ellas resultaron insecticidas; 6-1, 6-4. Mientras que las restantes 6-3, 10-2 y 13-4 no presentaron actividad insecticida.

La principal determinante de la actividad que ejercen las proteínas Cry sobre un organismo es la presencia de receptores reconocibles para la toxina en la membrana externa de la célula (Du, et al. 1999; Fuentes, et al. 2003; Griko, et al. 2007)

Hasta hace poco se creía que los receptores para las proteínas Cry sólo estaban presentes en larvas de insectos. En el año 1999, la Organización Mundial de la Salud publicó el libro "*Bacillus thuringiensis*" donde recopilan trabajos publicados hasta ese momento sobre los efectos que Bt produce en diferentes organismos incluyendo al hombre y no se observan efectos importantes sobre ninguno de los organismos estudiados. Un aspecto importante que cabe destacar es que los estudios que se han hecho en mamíferos para medir el efecto citócidico de cepas de Bt se realizan probando bacterias completas o sus esporas (World Health Organization, 1999). Nunca se ha expuesto la forma solubilizada o activada de la proteína Cry en este tipo de experimentos. Sin embargo, existen estudios previos de cepas de Bt que contienen proteínas Cyt, las cuales han sido expuestas tanto a eritrocitos de diferentes mamíferos como ratones, conejos, borregos e incluso humanos (Thomas, et al. 1983; Armstrong, et al. 1985). A líneas celulares de mamíferos (Hiromi, et al. 2005; Thomas, et al. 1983) . Y a modelos *in vivo*, principalmente ratones por vía sistémica y subcutánea (Armstrong, et al. 1985) . Se concluyó que las toxinas Cyt tienen actividad citócidica sobre todas estas células, inclusive en ratones expuestos vía sistémica a las proteínas Cyt

Se ha reportado que cuando una larva de mosquito susceptible es expuesta a proteínas cristalinas insecticidas de *Bt var. israeliensis* se tiene una CL<sub>50</sub> de aproximadamente 10 ng/ml de agua. Un cultivo entero de *Bt var. israeliensis* da una CL<sub>50</sub> de aproximadamente 10<sup>3</sup> células/ml para larvas de mosquito susceptibles, mientras que 10<sup>9</sup> células/ml de cultivo no afectan a ningún mamífero de laboratorio expuesto a estas proteínas por varias rutas como la oral, intramuscular, intraperitoneal, incluso la sistémica.

#### **VII.VII. ACTIVIDAD CITOCIDA DE LAS PROTEINAS Cry EN CELULAS DE CANCER *IN VITRO*.**

A principios del año 2000 dos grupos de investigación de Japón dedicados al estudio de Bt como insecticida desde hace varias décadas, publicaron el descubrimiento de las primeras proteínas de Bt encontradas que dañan células de cáncer humano (Mizuki, et

al. 2000; Kim, et al. 2000).

A partir de ese momento diversos grupos de investigación en todo el mundo, incluyendo el nuestro nos hemos dado a la tarea de buscar este tipo de proteínas. Este grupo japonés de investigación junto con otros que han encontrado nuevas proteínas Cry con actividad selectiva en células de cáncer han sentado las bases para una nueva clasificación de las proteínas cristal.

Partiendo de los principios de nomenclatura y el concepto básico de una proteína Cry y una proteína Cyt, nace una nueva clasificación a principios del milenio con el mismo principio de nomenclatura de Crickmore. Agrupa principalmente a proteínas cristal que muestran actividad citotóxica en células humanas, específicamente en células de cáncer. Estas proteínas como condición para clasificarse dentro de este grupo, no deben ser insecticidas ni hemolíticas. Se nombran Parasporinas .

En el 2006 se crea el Comité de Clasificación y Nomenclatura de las Parasporinas donde se busca la clasificación de nuevas proteínas con características similares basándose en la similitud de aminoácidos de la estructura primaria de las proteínas.

De las 13 parasporinas reconocidas hasta el momento, en sólo tres de ellas se han reportado resultados de  $DL_{50}$  para líneas celulares de cáncer cervicouterino. Las 3 parasporinas provienen de Japón (Mizuki, et al. 2000; Ito, et al. 2004; Okumura, et al. 2004).

Mizuki y colaboradores en el 2000 encontraron una cepa de Bt con proteínas Cry no insecticidas y no hemolíticas con propiedades anticancerígenas para células de cáncer cervicouterino, más tarde esta proteína Cry se convierte en la primera proteína parasporal nombrada Parasporina PS1Aa1. En la parasporina PS1Aa1, se reportó una  $DL_{50}$  para células HeLa de  $5.8\mu\text{g/ml}$ , sin reportar el uso de células control.

A partir de la publicación de Mizuki y colaboradores otros grupos de investigación reportaron nuevas Parasporinas, Ito y colaboradores en el 2004 reportaron la actividad de la PS2Aa1, que es de todas las Parasporinas reportadas la que en mayor número de células cancerígenas se ha probado, en el caso de líneas provenientes de cáncer cervicouterino se utilizaron tres, HeLa con una  $DL_{50} >10\mu\text{g/ml}$ , TCS con  $DL_{50} >10\mu\text{g/ml}$  y Sawano con una  $DL_{50}$  de  $0.041\mu\text{g/ml}$ . Se utilizó en este caso una línea celular control la UtSMC con  $DL_{50}$  de  $9.28\mu\text{g/ml}$ .

En ese mismo año Okumura y colaboradores reportan la PS4Aa1, que arroja valores de DL<sub>50</sub> para HeLa de 2µg/ml y para la línea celular control UtSMC, mayores a 2µg/ml.

Las parasporinas han resultado ser mas eficientes para las células leucémicas, sus DL<sub>50</sub> son del orden de ng/ml. Sin embargo es interesante la búsqueda de toxinas que ataquen células de cáncer cervicouterino por ser una de las principales causas de muerte por cáncer en mujeres, no solo del país sino de todo el mundo.

De las 28 cepas aisladas en la región Ensenada-Tijuana, se han probado las toxinas de 13 de ellas en diversas líneas celulares: HeLa, SiHa, MCF7 y HaCat (Figura 27).

Dos toxinas de las trece cepas probadas nombradas a lo largo del trabajo como 6-1 y 10-2 tuvieron resultados importantes en líneas celulares.

Ambas mostraron una DL<sub>50</sub> muy aproximada tanto en HaCat, que fue mayor a los 5µg/ml como en HeLa 1.1µg/ml para 6-1 y 1µg/ml para 10-2 (Figura 27. A y B respectivamente).

Estan formadas por una protoxina mayoritaria de aproximadamente 130 y 150 kDa respectivamente. El proceso de activación se llevo a cabo con Tripsina a una concentración final de 50µg/ml por 1h de incubación a 37°C (Figura 22, Tabla 8).

La protoxina de 130 kDa en el caso de 6-1 es proteolisada a un fragmento resistente a Tripsina de 54kDa(Figura 23, Tabla 8). De acuerdo a la caracterizacion molecular por PCR, esta cepa tiene el gen Cry1 que en correlación a lo reportado en la literatura para el tamaño de la proteína completa y tripsinizada de Cry1 (Tabla 9) corresponde a la proteína expresada en esta cepa, además de que se confirma con la actividad que presenta en *Manduca sexta* (Tabla 12).

Por otro lado la protoxina de 150 kda de 10-2 es proteolisada a un fragmento resistente a Tripisina de 55kDa (Figura 22, Tabla 8), que a diferencia de 6-1 no pudo ser amplificada por ninguno de los oligos generales y especificos probados para genes Cry. Y no mostró actividad contra *M. sexta* (Tabla IX y XII).

La secuenciación parcial por LC-MS/MS arrojó resultados confirmatorios para las proteínas Cry de la cepa 6-1 acerca de la identidad de la toxina, se trata de Cry1Ac. Que resulta interesante desde el punto de comparación de las proteínas Cry de aizawai y los resultados obtenidos para citotoxicidad en células de mamíferos. *Bt aizawai* reporta toxinas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ad, pero no Cry1Ac esta toxina hace la diferencia en el grado de toxicidad en células tumorales.

La toxina secuenciada en la cepa 10-2 se trata aparentemente de una proteína de superficie conocidas como S-layer, las cuales según reportó Peña et al, 2006, también tienen actividad insecticida. Sin embargo se necesitan pruebas confirmatorias sobre la identidad de esta toxina.

En ensayos hemolíticos sobre eritrocitos humanos, ni 6-1 ni 10-2 tuvieron actividad (Tabla 10), sin embargo como ya se mencionó anteriormente, 6-1 resultó mortal para larvas de *Manduca sexta* a dosis bajas de hasta  $0.01 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ . Y 10-2 en resultados preeliminares se trata de una proteína S-layer. Esto implica desde el punto de vista del Comité de Clasificación y Nomenclatura de Parasporina que no pueden ser clasificadas como Parasporina, sin embargo los resultados obtenidos son muy interesantes, tanto en cultivos celulares, como en tumores inducidos en ratones *nude*.

Las toxinas aisladas de esta región probadas en cultivos celulares, causan alteraciones morfológicas en la membrana y el citoesqueleto. Las células se vuelven redondas y se ensanchan. Se ha reportado que estas características corresponden a un incremento en la permeabilidad de la membrana plasmática (Mizuki, et al. 2000). En el caso de nuestras toxinas se empiezan a observar estos efectos dependiendo de la potencia de la toxina en la línea celular desde las 3h o hasta las 12 o 18h, en las células SiHa donde la potencia de las toxinas no es tan alta como lo es en las células HeLa, donde su potencia se empieza a ver desde las 2h y en la mayoría de células HeLa a las 24h se presenta lisis total a concentraciones altas (Figura 31-34). En las parasporinas mejor estudiadas se ha observado que actúan como citolisinas que permeabilizan la membrana plasmática de su célula blanco y llevan a la muerte celular (Mizuki, et al. 2000). Las toxinas que son reconocidas por receptores en la membrana de células de humano en cultivo, al igual que las toxinas reconocidas por larvas de insectos, tienen diferente espectro de citotoxicidad, algunas son activas sobre cualquier célula humana y otras son muy específicas hacia membranas de células con cáncer.

En las gráficas donde se muestra la actividad de las toxinas en las diferentes líneas celulares y en el estudio de daño celular a diferentes tiempos, se puede observar que M1#4 es la mas agresiva incluso en HaCat (Figura 35). Suponemos que esto tienen que ver con la naturaleza de la proteína. Es una proteína hemolítica con genes *cyt* los cuales se han caracterizado ya por atacar células de invertebrados y de vertebrados incluyendo eritrocitos de mamíferos. Es por esto que al elegir las toxinas que pueden ser

potencialmente usadas para terapia contra tumores malignos se cuidaron estas características principales: No ser hemolíticas y no tener genes *cyt*.

Otro aspecto muy importante de este estudio es que la actividad citócida de las toxinas se observó únicamente después de haber tratado a las proteínas solubilizadas con proteasas (resultados no mostrados). Sólo después de la activación *in vitro* por Tripsina estas proteínas son capaces de destruir diversas líneas celulares de cáncer humano.

El mecanismo de acción de las toxinas provenientes de las cepas 6-1 y 10-2 sobre HeLa no se conoce con exactitud. Sin embargo, por los ensayos realizados para la prueba de TUNEL, en la que ambas son positivas para la prueba (Figura 36); se asume que estas toxinas causan muerte celular por apoptosis activando de alguna manera no estudiada aún la cascada de caspasas y fragmentando el DNA a una dosis probada de 5µg/ml analizadas a las 24h.

#### VII.VIII ACTIVIDAD CITOCIDA DE LAS PROTEINAS Cry EN CELULAS DE CANCER *IN VIVO*.

En los experimentos *in vivo* el objetivo fue inducir tumores con células cancerígenas preferentemente de los cultivos en los que la actividad citócida de las toxinas haya sido importante. Así pues se decidió la inducción de tumores con células HeLa (Figura 37).

En las ciencias de la vida, los ratones son los animales más utilizados como modelos experimentales, por su facilidad de manejo y reproducción, pero además por las mutaciones que fácilmente se pueden dirigir o presentar espontáneamente en estos animales. Una de estas mutaciones espontáneas simples es la denominada *nude* (*nu*), en un alelo mutante homocigoto recesivo que pertenece al grupo *linkage* VII del cromosoma 11. Esta mutación aparece por primera vez en el año de 1966 y más tarde en 1968 se descubre que el ratón *nude* homocigoto además de presentar su fenotipo desnudo o sin pelo (característica que le dió el nombre a la mutación), carece de un timo funcional que permanece rudimentario y produce un número reducido de células T maduras, por lo cual no rechazan los tejidos alo y xenotransplantados.

El hecho de que un animal pueda aceptar transplantes de tumores humanos ha sido uno de los descubrimientos más importantes y ha contribuido con el desarrollo de las investigaciones sobre el cáncer.

Las células cancerígenas a diferencia de las células normales, tienen una mayor capacidad de proliferación debido a su producción de factores de crecimiento, son insensibles a los inhibidores de los receptores de crecimiento, tienen un ilimitado poder de replicación, son capaces de evadir señales específicas de apoptosis y de la senescencia, producen activamente factores angiogénicos y son capaces de invadir otros tejidos y provocar metástasis.

Como antecedente a este trabajo de tratamiento de tumores *in vivo* con toxinas bacterianas, existe uno que hasta la fecha es vigente, en el que se utilizan endotoxinas de *Bacillus Calmette-Guérin (BCG)*.

En 1975 Carswell et al. publicaron un trabajo acerca de endotoxinas provenientes de BCG que producía necrosis hemorrágica en tumores. Sin embargo este bacilo ya se usaba en 1930 por urólogos en la terapia contra el cáncer de vejiga. En este trabajo publicado en 1975, se propone que la necrosis del tumor inducida por endotoxinas es mediada por TNF, y que esto puede ser responsable de la limitación de reproducción de células cancerígenas.

Es decir la endotoxina actúa indirectamente causando la liberación del TNF que es selectivamente tóxico para las células malignas.

En los resultados encontrados en ratones *nude* con tumores inducidos con células de cáncer cervicouterino HeLa y tratados con diferentes concentraciones de las toxinas 6-1 y 10-2, aplicando la toxina activada sobre el tumor, se muestra claramente la eliminación del tumor a una concentración de 30µg/ml e incluso a 10µg/ml hay una aparente eliminación del tumor, con necrosis hemorrágica (Figura 40-46).

Si se permite el tiempo de recuperación de la parte necrosada, en ambas toxinas con una dosis de 30µg/ml evoluciona a cicatriz sin regresión del tumor (Figura 48, 49, 51) estos resultados no se observan cuando se utilizan concentraciones de 10µg/ml donde aparentemente el tumor fue erradicado, sin embargo al dejar un tiempo de recuperación, en aproximadamente 8 días el tumor ha crecido nuevamente (Figura 47, 50).

La toxina 10-2 resulta menos agresiva. En esta toxina no hay efectos secundarios visibles, sin embargo en los ratones tratados con la toxina de 6-1 se observó adelgazamiento, debilidad, piel reseca, agrandamiento del bazo e hígado (Figura 52).

Estos resultados son importantes desde el punto de vista de la actividad de toxinas Cry en tumores en ensayos *in vivo*. Además implican un avance en el conocimiento de las

propiedades anticancerígenas de estas proteínas ya que hasta la fecha no hay publicaciones que muestren este tipo de resultados.

A la fecha existe una patente de parasporinas, que comprende la protoxina de la cepa Bt llamada M15 con un peso molecular dentro del rango de 130-140kDa; la toxina activada con peso molecular de 60-80kDa; la secuencia nucleotídica de ambas proteínas y la aplicación terapéutica anticancerígena de esta. Principalmente en HeLa, TCS, HL-60, Jurkat y HepG2 (Cote, et al. 2008)

## VIII. CONCLUSIONES

1. La mayoría de los fármacos utilizados en la quimioterapia contra el cáncer requieren internalización celular para actuar y repetidas aplicaciones que generan resistencia. Se debe aprovechar los mecanismos de acción de las proteínas Cry. Son capaces de actuar directamente en membrana celular en tiempos cortos y de manera específica. Esto puede ser una alternativa interesante a estas limitaciones de la quimioterapia.
2. A pesar de las creencias que se tenían hasta hace unos años acerca del tipo de células blanco de Bt, últimamente se ha observado que si los cristales son solubilizados y activados con proteasas pueden también ser capaces de atacar células humanas en cultivo.
3. Se aislaron 74 cepas presuntivas de Bt de 120 muestras tomadas de agua y suelo de la región Ensenada-Tijuana. Se descartaron algunas de ellas por no producir cristales o por presentar el mismo perfil de proteínas. Finalmente con las 28 cepas seleccionadas, se estandarizaron protocolos de cultivo, purificación y activación de cristales.
4. Se caracterizaron molecularmente empleando 13 pares de oligos generales para diversos genes *cry*. Los genes *cry* más abundantes en esta región fueron los genes *cry2*.
5. De las 28 cepas aisladas, 4 de ellas no han podido ser identificadas por los 13 primers empleados : 6-3, 6-4, 10-2, y 13-4.
6. Todas las cepas que amplificaron con el par de oligos para detectar genes *cyt*, presenta la actividad hemolítica sobre eritrocitos humanos: HD1, Cry4A, Cyt 1A dentro de las cepas control. Y 10 de las 28 cepas aisladas: M1#4, M2#7, 4-2, 5-4, 7-3, 8-4, 12-2, 14-1, 17-3, 19-1.
7. Se probó la actividad insecticida de 5 cepas, 3 de ellas: 6-1, 6-4 y 10-2 presentan actividad mortal para *Manduca sexta* a concentraciones altas de  $2\mu\text{g}/\text{cm}^2$ .
8. Las dos restantes 6-3 y 13-4 no presentan actividad insecticida contra larvas de *Manduca sexta*.

9. Se analizó *in vitro* la actividad citócida de 13 toxinas en cultivos celulares. Se concluye de esto que también en los cultivos de células de mamíferos existe selectividad para el ataque de las toxinas Cry.
  10. Se encontraron 3 toxinas de las 13 analizadas en cultivos, que de manera selectiva atacan *in vitro* células de cáncer: 6-1, 6-4 y 10-2.
  11. Más importante aún 6-1 y 10-2 fueron probadas *in vivo* en tumores inducidos en ratones y preservaron su actividad.
  12. Las toxinas de las cepas 6-1 y 10-2 se conoce que activan cascada de caspasas generando muerte celular por apoptosis *in vitro*.
  13. *In vivo* se induce además a necrosis hemorrágica del tumor.
  14. Existe una dosis en la que se elimina por completo el tumor proveniente de células HeLa, esta dosis probada fue la de 30µg/ml para ambas toxinas.
  15. A una dosis de 10µg/ml de la toxina en ambos casos hay regresión del tumor.
  16. La toxina proveniente de la cepa 6-1 resultó más agresiva, dejando daños visibles en el ratón, entre los que encontramos: adelgazamiento, debilidad, piel muy reseca, hígado y bazo con coloración intensa y más grandes en comparación a los órganos de los ratones control y de los tratados con la toxina de la cepa 10-2.
-

## IX. LITERATURA CITADA

Aronson, J., Ronson, J., Wermusg, R. 1965. Effects of m-tyrosine on growth and sporulation of *Bacillus* species. *Journal of Bacteriology*. 90: 38-46.

Aronson, A., Beckman, W., and Dunn, P. 1986. *Bacillus thuringiensis* and related insect pathogens. *Microbiol. Rev.* 1-24.

Aronson, A. 2000. Incorporation of protease K into larval insect membrane vesicles does not result in disruption of integrity or function of the pore-forming *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin. *Appl Environ Microbiol.* 66(10):4568-70.

Armstrong, J., Rohrmann, G., Beaudreau, G. 1985. Delta Endotoxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. israelensis *Journal of Bacteriology*, 161(1): 39-46.

Barbara, J., Kenneth, W. 1978. Purification of the Protein Crystal from *Bacillus thuringiensis* by Zonal Gradient Centrifugation. *Applied and Environmental Microbiology*, 36(4): 625-626,

Bechtel, D., Bulla, L. 1976. Electron Microscope Study of Sporulation and Parasporal Crystal Formation in *Bacillus thuringiensis*. *Journal of bacteriology*. 127: 1472-1481.

Boonserm, P., Davis, P., Ellar, D., Li, J. 2005. Crystal structure of the mosquito-larvicidal toxin Cry4Ba and its biological implications. *J Mol Biol.* 348(2):363-82.

Boonserm, P., Mo, M., Angsuthanasombat, C., Lescar, J. 2006. Structure of the functional form of the mosquito larvicidal Cry4Aa toxin from *Bacillus thuringiensis* at a 2.8-angstrom resolution. *J Bacteriol.* 188(9):3391-401.

Bravo, A., Gill, S., Soberón, M. 2007. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon.* 49(4): 423-435.

---

Broderick, N., Kenneth, F., Handelsman, J. 2006. Midgut bacteria required for *Bacillus thuringiensis* insecticidal activity. *PNAS*, 103(41): 5196 –15199.

Bravo, A., Sarabia, S., López, L., Ontiveros, H., Abarca, C., Ortiz, A., Ortiz, M., Lina, L., Villalobos, J., Peña, G., Noez, V., Soberón, M., Quintero, R. 1998. Characterization of cry genes in a Mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 4965- 4972.

Bravo, A., Gómez, I., Conde, J., Muñoz-Garay, C., Sánchez, J., Zhuang, M., Gill, S., Soberón, M. 2004. Oligomerization triggers differential binding of a pore-forming toxin to a different receptor leading to efficient interaction with membrane microdomains. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1667: 38-46.

Bravo, A., Gill, S., Soberón, M. 2007. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon.* 49: 423-435.

Buckman, J. 2006. Spores and crystals of *Bacillus thuringiensis* serovar morrisoni strain T08025 Microscopy. English Wikipedia.

Budatha, M., Meur, G., Dutta-Gupta, A. 2007. A novel aminopeptidase in the fat body of the moth *Achaea janata* as a receptor for *Bacillus thuringiensis* Cry toxins and its comparison with midgut aminopeptidase. *Biochemical Journal Immediate Publication.*

Bulla, L., Bechtel, D., Kramer, K., Shethna, Y., Aronson, A. 1980. Ultrastructure, physiology, and biochemistry of *Bacillus thuringiensis*. *CRC Crit. Rev. Microbiol.* 8:147-204.

Carswell, E. A., Old, L.J., Kassel, E.A. Green, S., Fiore, N., B. Williamson, B. 1975. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors (activated macrophage). *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 72(9):3666-3670.

---

Ceron, J., Ortiz, A., Quintero, R., Guereca, L., Bravo, A. 1995. Specific PCR primers direct to identify cryI and cryIII genes within a *Bacillus thuringiensis* strain collection. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:3826-3831.

Cheong, H., Sarjeet, S. 1997. Cloning and Characterization of a Cytolytic and Mosquitocidal  $\delta$ -Endotoxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *Jegathesan*. *Applied and environmental Microbiology*, 63(8): 3254-360.

Côté, J. Jung, C., Mizuki, E., Akao, T. 2008. *Bacillus thuringiensis* strain, crystal gene and crystal protein and uses thereof. Unites States Patent # 7329733. (Patent).

Crickmore, N., Zeigler, D., Feitelson, J., Schnepf, E., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Dean, D. 1998. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol.* 62, 807–813.

de Maagd, R., Bravo, A., Crickmore. 2001. How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. *N. Trends Genet.* 17, 193–199.

de Maagd, R., Weemen, M., Molthoff, J., Naimov, S. 2003. Activity of wild-type and hybrid *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins against *Agrotis ipsilon*. *Arch Microbiol.* 179(5):363-7.

Dean, D., Rajamohan, F., Lee, M., Wu, S., Chen, X., Alcántara, E. Hussain, H. 1996. Probing the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins by site-directed mutagenesis- a minireview. *Gene*, 179: 111- 117.

Dean, M., Fojo, T., Bates, S. 2005. Tumour stem cells and drug resistance. *Nat Rev Cancer*, 5:275–84.

Deepak, S., Eitan, B., Robert, M., Ze'ev, B., Sammy, B., Arie, Z. 2002. A UV Tolerant Mutant of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* Producing Melanin. *Current Microbiology.* 44: 25-30.

---

Derry, WB., Putzke, AP., Rothman, JH. 2001. *Caenorhabditis elegans* p53: role in apoptosis, meiosis, and stress resistance. *Science*. 294(5542):591-5.

Doorbar, J., Cubie, H. 2005. Molecular basis for advances in cervical screening. *Mol Diagn*. 9(3):129-42.

Du, J., Knowles, B., Li, J., Ellar, D. 1999. Biochemical characterization of *Bacillus thuringiensis* cytolytic toxins in association with a phospholipid bilayer. *Biochem J*. 338 (Pt 1):185-93.

Dulmage, H. Production of bacteria for biological control of insects. 1981. In :*Biological control of crop production*. Research. Allenhed, Oamun and Co., Totowa. 5 :129.

Fuentes, J., Gould, F., Adang, M. 2003. Dual Resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac and Cry2Aa Toxins in *Heliothis virescens* Suggests Multiple Mechanisms of Resistance. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(10): 5898-5906.

Galitsky, N., Cody, V., Wojtczak, A., Ghosh, D., Luft, JR., Pangborn, W., English, L. 2001. Structure of the insecticidal bacterial delta-endotoxin Cry3Bb1 of *Bacillus thuringiensis*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 57(Pt 8):1101-9.

Garbe, J., Holst, C., Bassett, E., Tlsty, T., Stampfer, M. 2000. Inactivation of p53 function un cultured human mammary epithelial cells turns the telomere-length dependent senescence barrier from agonescence into crisis. *Cell Cycle*, 6(15): 1927-1936.

Garbe, JC., Holst, CR., Bassett, E., Tlsty, T., Stampfer, MR. 2007. Inactivation of p53 function in cultured human mammary epithelial cells turns the telomere-length dependent senescence barrier from agonescence into crisis. *Cell Cycle*.;6(15):1927-36.

Griko, N., Rose-Young, L., Zhang, X., Carpenter, L., Candas, M., Ibrahim, M., Junker, M., Bulla, L. 2007. Univalent binding of the Cry1Ab toxin of *Bacillus thuringiensis* to a conserved structural motif in the cadherin receptor BT-R1. *Biochemistry*. 46(35):10001-7.

---

Grimont, P., Grimont, F. 1984. Endospore-forming Gram-positive rods and cocci. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 1104-1207.

Grochulski, P., Masson, L., Borisova, S., Pusztai, M., Brousseau, R., Cygler, M. 1995. *Bacillus thuringiensis* CryIA(a) insecticidal toxin: crystal structure and channel formation. *J Mol Biol*. 254(3):447-64.

Harwood, C. 1989. *Bacillus*. Plenum Press, New York.

Hayakawa, T., Kanagawa, R., Kotani, Y., Kimura, M., Yamagiwa, M., Yamane, Y., Takebe, S., Sakai, H. 2007. Parasporin 2Ab, a newly isolated cytotoxic crystal protein from *Bacillus thuringiensis*. *Current Microbiology*. 55(4):278-283.

Hoty, S. y Balaraman, K. 1993. Formation of melanin pigment by a mutant of *Bacillus thuringiensis* H-14. *J. Gen. Microbiol*. 139: 2365-2369.

Ibarra, J., Federici, B. 1986. Isolation of a relatively nontoxic 65-kilodalton protein inclusion from the parasporal body of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *J Bacteriol*. 165(2):527-533.

Ibarra, J., del Rincon, C., Orduñez, S., Noriega, D., Benintende, G., Monnerat, R., Regis, L., de Oliveira, C., Lanz, H., Rodriguez, M., Sanchez, 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(9): 5269-5274.

Ito, A., Sasaguri, Y., Kitada, S., Kusaka, Y., Kuwano, K., Masutomi, K., Ohba, M. A. 2004. *Bacillus thuringiensis* Crystal Protein with Selective Cytocidal Action to Human Cells. *The Journal of Biological Chemistry* 279 (20):21282-21286.

---

Jacobs, M., Snijders, P., Van den Brule, A., Helmerhorst, T., Meijer, C., Walboomers, J. 1997. A general primer GP5+/ GP6(+)-mediated PCR-enzyme immunoassay method for rapid detection of 14 high-risk and 6 low-risk human papillomavirus genotypes in cervical scrapings. *J Clin Microbiol.* 35(3):791-5.

Jenkins, J., Lee, M., Valaitis, A., Curtiss, A., Dean, D. 2000. Bivalent sequential binding model of a *Bacillus thuringiensis* toxin to Gypsy moth aminopeptidase N receptor. *J. Biol. Chem.*, 275:14423-14431.

Jiménez-Juárez, N., Muñoz-Garay, C., Gómez, I., Gill, S., Soberón, M., Bravo, A. 2007a. The pre-pore from *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin is necessary to induce insect death in *Manduca sexta*. *Peptides.* 29 (2):318-23.

Jimenez, N., Munoz, I., Gomez, G., Saab, J., Almazo, S., Gill, S., Soberon, M., Bravo, A. 2007b. *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab Mutants Affecting Oligomer Formation Are Non-toxic to *Manduca sexta* Larvae. *J. Biol. Chem.* 282(29): 21222 - 21229.

Jung, Y.-C., Mizuki, E., Akao, T., and Côté, J.-C. 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(1): 65-79.

Jurat-Fuentes JL, Adang MJ. 2004. Characterization of a Cry1Ac-receptor alkaline phosphatase in susceptible and resistant *Heliothis virescens* larvae. *Eur J Biochem.* 271(15):3127-35,

Kalous, O., Krejsa, J., Frgala, T., Reynolds, P. 2004. The DIMSCAN cytotoxicity assay, unlike the MTT assay, identifies synergistic combinations of anticancer agents. *AACR Meeting Abstracts*, 127-138.

Katayama, H., Kusaka, I., Yokota, H., Akao, T., Kojima, M., Nakamura, O., Mekada, E., 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. *J Biol Chem.* 282(10):7742-52.

Kerr, J. 2000. Phenazine pigments: antibiotics and virulence factors. *Infect. Dis. Rev.* 2: 184-194.

Kim, M., Yamashita, S., Akao, T., Saitoh, H., Higuchi, K., Park, Y., Mizuki, E., Ohba, M. 2000. In vitro cytotoxicity of non-cyt inclusion proteins of a *Bacillus thuringiensis* isolate against human cells, including cancer cells. *J. Appl. Microbiol.* 89, 16–23.

Kim, W., Sharpless, N. 2006. The regulation of ink4/arf in cancer and aging. *Cell,* 127:265-75,

Kitada, S., Abe, Y., Shimada, H., Kusaka, Y., Matsuo, Y., Katayama, H., Okumura, S., Akao, T., Mizuki, E., Kuge, O., Sasaguri, Y., Ohba, M., Ito. 2006. A. Cytocidal actions of parasporin-2, an anti-tumor crystal toxin from *Bacillus thuringiensis*. *J Biol Chem.* 281(36):26350-60.

Klaes, R., Woerner, SM., Ridder, R., Wentzensen, N., Duerst, M., Schneider, A., Lotz B, M. 1999. Detection of high-risk cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer by amplification of transcripts derived from integrated papillomavirus oncogenes. *Cancer Res.* 59 (24):6132-6.

Knight, PJ., Crickmore, N., Ellar, DJ. 1994. The receptor for *Bacillus thuringiensis* CryIA(c) delta-endotoxin in the brush border membrane of the lepidopteran *Manduca sexta* is aminopeptidase N. *Mol Microbiol.* 11(3):429-36.

Li, J., Carroll, J., Ellar, D. 1991. Crystal structure of insecticidal delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5 Å resolution. *Nature.* 353(6347):815-21.

Lin, Y., Xiong, G. 2004. Molecular cloning and sequence analysis of the chitinase gene from *Bacillus thuringiensis* serovar alesti. *Biotechnol Lett.* 26(8):635-9.

---

Löwenberg, B., Griffin, J., Tallman, M. 2003. Acute myeloid leukemia and acute promyelocytic leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 82-101.

Mahdavi, A., Monk, B.J. 2005. Vaccines against human papillomavirus and cervical cancer: promises and challenges. *Oncologist*. 10(7):528-38.

Mandic, A., Vujkov, T. 2004. Human papillomavirus vaccine as a new way of preventing cervical cancer: a dream or the future? *Ann Oncol*. 15(2):197-200.

Mattar, R., Nonogaki, S., Silva, C., Alves, V., Gama-Rodrigues, J. 2004. p53 and Rb tumor suppressor gene alterations in gastric cancer. *Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo*. 59(4): 172-80.

Mimeault, M., Batra, S. 2006. Concise review: recent advances on the significance of stem cells in tissue regeneration and cancer therapies. *Stem Cells*.24(11):2319-45.

Mimeault, M., Hauke, R., Mehta, P., Batra, S. 2007. Recent advances in cancer stem/progenitor cell research: therapeutic implications for overcoming resistance to the most aggressive cancers. *J.Cell.Mol.Med*, 11(5): 981-1011.

Mizuki, E., Ohba, T., Akao, S., Yamashita, H., Saitoh, Y. 1999. Unique activity associated with non-insecticidal *Bacillus thuringiensis* parasporal inclusions: *in vitro* cell-killing action on human cancer cells. *J. Appl. Microbiol*, 86:477–486.

Mizuki, E., Park, Y., Saitoh, Y., 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 (4): 625–634.

Mokdad, A., Marks, J., Stroup, D., Gerberding, J. 2004. Actual causes of death in the United States. *Jama*, 291:1238-1245.

Morse, J., Yamamoto, T. 2001. Structure of Cry2Aa suggests an unexpected receptor binding epitope. *Structure*. 9;9(5):409-17.

Muderspach, L., Wilczynski, S., Roman, L., Bade, L., Felix, J., Small, LA., Kast, WM., Fascio, G., Marty, V. and Weber J. 2000. A phase I trial of a human papillomavirus (HPV) peptide vaccine for women with high-grade cervical and vulvar intraepithelial neoplasia who are HPV 16 positive. *Clin Cancer Res*. 6(9):3406-16.

Mueller, H., Kassack, M., Wiese, M. 2004. Comparison of the Usefulness of the MTT, ATP, and Calcein Assays to Predict the Potency of Cytotoxic Agents in Various Human Cancer Cell Lines. *J Biomol Screen*; 9: 506-515.

Münger, K., Baldwin, A., Edwards, KM., Hayakawa, H., Nguyen, CL., Owens, M., Grace, M., Huh, K. 2004. Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis. *J Virol*. 78(21):11451-60.

Muñoz, N., Bosh, F., De Sanjosé, S. 2003. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Eng J Med*. 348(6):518-27.

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. *Biosci Biotechnol Biochem*. 74(3):494-8.

Ohnishi, T. 2005. The role of the p53 molecule in cancer therapies with radiation and/or hyperthermia. *J Cancer Res Ther*. 1(3):147-50.

Okumura, S., Akao, T., Higuchi, K., Saitoh, H., Mizuki, E., Ohba, M., Inouye, K. 2004. *Bacillus thuringiensis* serovar shandongensis strain 89-T-34-22 produces multiple cytotoxic proteins with similar molecular masses against human cancer cells. *Lett Appl Microbiol*. 39(1):89-92.

---

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 Expr Purif.* 47 (1): 144-151.

Özgür, A., Yenidünya, A., Harsa, E., Güne, H. 2005. Isolation and characterization of *Bacillus thuringiensis* strains from different grain habitats in Turkey. *World Journal of Microbiology and Biotechnology.* 21(3): 285-292.

Park, Y., Bideshi, D., Federici, B. 2000. Molecular Genetic Manipulation of Truncated Cry1C Protein Synthesis in *Bacillus thuringiensis* To Improve Stability. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 4449-4455.

Peña, G., Miranda-Ríos, J., de la Riva G., Pardo-López L., Soberón M. y Bravo, A. 2006. A *Bacillus thuringiensis* S-Layer Protein Involved in Toxicity against *Epilachna varivestis* (Coleoptera: Coccinellidae). *Applied and Environmental Microbiology.* 72: 353-360.

Ponnusamy, M., Surinder, K. 2008. Ovarian cancer: emerging concept on cancer stem cells. *Journal of Ovarian Research (Review).* 1:4.

Pramatha, B. 1994. Expression of parasporal crystal protein ( $\delta$ -endotoxin) gene(s) of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* in sporogenic and asporogenic Mutant strains of *Bacillus cereus*. *J.Biosci.* 19 (2): 145–153.

Prieto, D., Vazquez, R., Ayra, C., Gonzalez, J., de la Riva, G. 1997. *Bacillus thuringiensis*: from biodiversity to biotechnology. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 19: 202-219.

Promdonkoy, B., Ellar, D. 2000. Membrane pore architecture of a cytolytic toxin from *Bacillus thuringiensis*. *Biochem J*, 350, 275–282.

---

Pyeon, D., Lambert, P.F., Ahlquist, P. 2005. Production of infectious human papillomavirus independently of viral replication and epithelial cell differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 28;102(26):9311-6.

Realpe, M., Hernández, C., Agudelo, C. 2002. Especies del genero *Bacillus*: morfología macroscópica y microscópica. *Biomédica.* 22(2):106-9.

Riley, R., duensing, S., Brake, T., Münger, Lambert, F. 2003. Dissection of Human Papillomavirus E6 and E7 Function in Transgenic Mouse Models of Cervical Carcinogenesis. *Cancer Research.* 63, 4862-4871.

Roberts, S., Ashmole, G., Johnson, J. 1993. Cutaneous and mucosal HPV E4 proteins form intermediate filament-like structures in epithelial cells. *Virology.* 197: 176-187.

Rocha-Zavaleta, L., Ambrosio, J., Mora-Garcia, M., Cruz-Talonia, F., Hernandez-Montes, J., Weiss-Steider, B., Ortiz-Navarrete, V., Monroy-Garcia, A. 2004. Detection of antibodies against a human papillomavirus (HPV) type 16 peptide that differentiate high-risk from low-risk HPV-associated low-grade squamous intraepithelial lesions. *Journal of General Virology.* 85: 2643–2650.

Sarjeet, S., Gill, E., Pietrantonio, P. 1992. The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins. *Annu. Rcv. Entomol,* 37:615-36.

Somerville, H. 1978. Insect toxin in spores and protein crystals of *Bacillus thuringiensis* *Trends Biochem. Sci.* 3: 108–110.

Toro, C., Patiño, P. 2001. Formulación de un medio de cultivo para la producción de pigmento a partir de *Serratia marcescens*. *Rev. Facultad de Ing. Colombia.*23: 71-80.

Torres, A., Bonilla, G. 1999. Estudio de la relación carbono/nitrógeno y su influencia en la síntesis de prodigiosín a partir de *Serratia* spp. Trabajo dirigido de grado de Ingeniería Química. Universidad de Antioquia. Medellín. 68.

---

Uemori, A., Ohgushi, A., Maeda, M., Mizuki, E. and Ohba, M. 2006. Cloning and Characterization of parasporin-1 genes of *Bacillus thuringiensis* Strain B0195. Unpublished.

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 Res.* 28(1A):91-5.

Uffen, R., Canale, E. 1972. Synthesis of pulcherriminic acid by *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 111: 86-93.

Vadlamudi, R., K Weber, E., Ji, I., Ji, TH., Bulla, LA. Jr. 1995. Cloning and expression of a receptor for an insecticidal toxin of *Bacillus thuringiensis*. *J Biol Chem.* 270(10):5490-4.

Valaitis, A.P Jenkins, JL., Lee, MK., Dean, DH., Garner, KJ. 2001. Isolation and partial characterization of gypsy moth BTR-270, an anionic brush border membrane glycoconjugate that binds *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxins with high affinity. *Arch Insect Biochem Physiol.* 46(4):186-200.

World Health Organization. *Bacillus thuringiensis*. 1999.

Wright, W., Pereira-Smith, O., Shay, J. 1989. Reversible cellular senescence: Implications for immortalization of normal human diploid fibroblasts. *Mol Cell Biol*, 9:3088-92.

Wright, W., Shay, J. 1995. Time, telomeres and tumors: Is cellular senescence more than an anticancer mechanism. *Trends Cell Biol*, 5:293-7.

Yamagiwa, M., Sakagawa, K., Sakai, H. 2004. Functional analysis of two processed fragments of *Bacillus thuringiensis* Cry11A toxin. *Biosci Biotechnol Biochem.* 68(3):523-8.

---

Yamashita, S., Katayama, H., Saitoh, H., Akao, T., Park, Y., Mizuki, E., Ohba, M., Ito, A. 2005. Typical Three-Domain Cry Proteins of *Bacillus thuringiensis* Strain A1462 Exhibit Cytocidal Activity on Limited Human Cancer Cell. *J Biochem (Tokyo)*, 138(6):663-72.

Yang, Y., Wang, L., Gaviria, A., Yuan, Z., Berry, J. 2007. Proteolytic Stability of Insecticidal Toxins Expressed in Recombinant Bacilli. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(1): 218-225.

Yasutake, K., Uemori, A., Mizuki, E., Ohba, M. 2008. Identification of parasporin genes in Vietnamese isolates of *Bacillus thuringiensis*. *Z Naturforsch C*. 63(1-2):139-43.

Ying, H., Xiao, Z. 2006. Targeting retinoblastoma protein for degradation by proteasomes. *Cell Cycle*. 5(5):506-8.

Zhang, M., Lövgren, M., Landén, R. 1993. Characterization of an avirulent pleiotropic mutant of the insect pathogen *Bacillus thuringiensis* : reduced expression of flagellin and phospholipases. *Infect. Immunol*, 61: 4947- 4954.

Zhang, X., Candas, M., Griko, N., Rose-Young, L., Bulla, J. 2005. Cytotoxicity of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin depends on specific binding of the toxin to the cadherin receptor BT-R1 expressed in insect cells. *Cell Death Differ*. 12(11):1407-16.

Zhang, B., Liu, M., Yang, Y., Yuan, Z. 2006. Cytolytic toxin Cyt1Aa of *Bacillus thuringiensis* synergizes the mosquitocidal toxin Mtx1 of *Bacillus sphaericus*. *Biosci Biotechnol Biochem*. 70(9):2199-204.

Zhang, R., Hua, G., Andacht, T., Adang, M. 2008. A 106-kDa aminopeptidase is a putative receptor for *Bacillus thuringiensis* Cry11Ba toxin in the mosquito *Anopheles gambiae* *Biochemistry*. 47(43): 11263–11272.

---

## LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
I	Clasificación de Parasporina.	26
II	Citotoxicidad de Parasporinas.	29
III	Oligonucleótidos Cry generales y específicos.	41
IV	Diseño experimental para estudiar la citotoxicidad de citotoxinas Cry en ratones Balb/c.	50
V	Diseño experimental para estudiar el efecto de toxinas Cry sobre tumores inducidos en ratones <i>nude</i> .	52
VI	Concentración de las diferentes toxinas de <i>B. thuringiensis</i> probadas en larvas de <i>Manduca sexta</i> .	54
VII	Cepas de <i>B. thuringiensis</i> aisladas de la región Ensenada -Tijuana y Morfología de sus cristales.	64
VIII	Condiciones de solubilización y activación <i>in vitro</i> de las distintas cepas de <i>B. thuringiensis</i> aisladas.	67
IX	Caracterización por PCR de los genes <i>cry</i> y <i>cyt</i> presentes en cada una de las cepas aisladas de la región Ensenada-Tijuana.	69
X	Actividad hemolítica de toxinas de <i>B. thuringiensis</i> aisladas de Ensenada-Tijuana.	74
XI	Resultados de los bioensayos insecticidas.	108

---

## X. APENDICE

### CEPAS DE *B. thuringiensis* UTILIZADAS

1. <u><i>B. thuringiensis</i> var. <i>aizawai</i></u>	19.6-3
2. <u><i>B. thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i></u>	20.6-4
3. HD1	21.7-2
4. HD916	22.7-3
5. Cepa recombinante con Cry 1Ab	23.8-3
6. Cepa recombinante con Cry 1Ac	24.8-4
7. Cepa recombinante con Cry 3A	25.9-2
8. Cepa recombinante con Cry 4A	26.10-2
9. Cepa recombinante con Cyt 1A	27.11-4
10. M1#4	28.12-2
11. M2#2	29.12-6
12. M2#7	30.13-4
13. 1-2	31.14-1
14. 2-2	32.17-3
15. 4-2	33.18-2
16. 4-5	34.18-4
17. 5-4	35.18-5
18. 6-1	36.19-1

---

## ACTIVACION DE PROTOXINAS

### BUFFER DE SOLUBILIZACION- IBT (SD-IBT)

Solución A

Carbonato de Sodio... 0.5M

Solución B

Bicarbonato de Sodio... 0.5M

Preparar solución A y B de la siguiente forma:

1)Aforar solución A a 100ml con H<sub>2</sub>O destilada.

2)Disolver la solución B en 50ml de H<sub>2</sub>O destilada y colocar aproximadamente 4.4ml de la solución A para alcanzar un pH de 10.5

3)Aforar B a un volúmen de 100ml.

Esta solución está a 5x, usarla a 1x y agregar  $\beta$  mercaptoetanol al 0.2% (v/v).

### BUFFER DE SOLUBILIZACION DE NaOH

Preparar una solución de NaOH 1M, se utiliza a 100mM (concentración final).

Pesar 0.4g de NaOH y diluir en 100ml de H<sub>2</sub>O.

---

### PROTEINASA K

Pesar 50mg de Proteinasa K y diluir en 1ml de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 50mM estéril.

### TRIPSINA

Pesar 50mg de Tripsina y diluir en 1ml de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 50mM estéril.

### COMPOSICION DEL GEL PARA CORRIMIENTO DE PROTEINAS POR SDS-PAGE

COMPONENTE	GEL SEPARADOR	GEL CONCENTRADOR
Acrilamida 30% -BisAcrilamida 0.8%	3.3ml	0.83ml
Buffer pH 8.7	2.5ml	
Buffer pH 6.8		1.25ml
H <sub>2</sub> O destilada	4ml	2.8ml
SDS 10%	0.1ml	0.05ml
AP 10%	0.1ml	0.05ml
TEMED	0.008ml	0.01ml

---

BUFFER DE CORRIDA SDS-PAGE 1X

Glicina... 94g

Tris-Base... 15.15g

SDS... 5g

H<sub>2</sub>O... 5L

Ajustar a pH de 8.3

BUFFER pH 6.7 0.5M

Tris-Base... 12g

H<sub>2</sub>O... 200ml

Ajustar pH a 6.8

BUFFER pH 8.7 1.5M

Tris-HCl... 9g

Tris-Base... 29.4g

H<sub>2</sub>O... 200ml

Ajustar pH a 8.7

---

### COLORANTE PARA GEL

Azul de coomassie... 0.25g

Metanol (v/v) (1:1 en agua)... 90ml

Acido Acético... 10ml

### MEZCLA LITICA

Glicerol... 2g

SDS... 1g

Buffer pH 6.8... 2.5ml

Azul de bromofenol... 150 $\mu$ l

DTT 100mM... 5ml

H<sub>2</sub>O destilada... Completar a 10ml

### SDS 10%

SDS... 1g

H<sub>2</sub>O... 10ml

---

## EXTRACCION DE DNA TOTAL

STE	CONC. FINAL	CONC. EN STOCK
Tris-HCl	10mM	1M
EDTA	1mM	0.5M
Sacarosa	50mM	50mM
NaCl	0.1M	1M

### Para preparar la mezcla (Tris-HCl, EDTA, SDS 10%, Proteinasa K)

Tris-HCl	50mM	1M
EDTA	1mM	0.5M
SDS 10%	1%	10%
Proteinasa K	50µg/ml	20mg/ml

### MEDIO LURIA BERTANI (LB) 1000ml

Triptona... 10g

Extracto de levadura... 5g

NaCl... 10g

Para preparar LB agar, se adicionan 15g de agar por cada litro de medio.

### **MEDIO NUTRIENT BROTH (NB) 1000ml**

Peptona...5g

Extracto de carne... 1g

Extracto de levadura...2g

NaCl...5g

Ajustar a pH 7

Para Nutrient Broth Agar, adicionar 15g de agar por litro de medio.

### **MEDIO SP 500 ml**

Caldo nutritivo 4g

MgSO<sub>4</sub>-7H<sub>2</sub>O...0.125g

KCl...0.5g

#### **Stock 1**

MnCl<sub>2</sub>-4 H<sub>2</sub>O... 10mM

En H<sub>2</sub>O... 100ml

#### **Stock 2**

de Fe(SO<sub>4</sub>)- 7H<sub>2</sub>O...1.83 g

en 100 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>... 1N

---

### Stock 3

CaCl<sub>2</sub>-2H<sub>2</sub>O...0.5M

En H<sub>2</sub>O... 100ml

Ajustar pH a 7 con KOH, esterilizar por 15 min a 121°C, agregar 1ml del stock 1 y 2, y 0.5ml del stock 3

### PCR- MEZCLA DE REACCION POR MUESTRA

H<sub>2</sub>O... 17µl

Buffer... 2.5µl

MgCl<sub>2</sub>... 0.75µl

dNTP's... 2.5µl

Oligos... 0.5µl

Taq polimerasa... 0.25µl

DNA... 1µl