

Tesis defendida por
Alfredo Nuñez Rivera
y aprobada por el siguiente Comité

Dr. Jorge Olmos Soto
Director del Comité

Dr. José de Jesús Paniagua Michel

Miembro del Comité

Dr. Carlos Alberto Brizuela

Rodríguez
Miembro del Comité

Dr. Rufina Hernández Martínez

Coordinador
Programa de Posgrado en Ciencias de
la Vida

Dr. David Hilario Covarrubias

Rosales
Director
Dirección de Estudios de Posgrado

6 / Marzo / 2013.

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



Programa de Posgrado en Ciencias
Ciencias de la Vida

Aislamiento y caracterización de toxinas de bacillus sp que inhiban la proliferación y migración de líneas celulares de cáncer a través de la inactivación de la vía PI3K/AKT.

Tesis

que para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de Maestro Ciencias

Presenta:

Alfredo Nuñez Rivera

Ensenada, Baja California, México 2013

Resumen de la tesis de Alfredo Nuñez Rivera, presentada como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Ciencias de la Vida con orientación en Biotecnología Marina.

Aislamiento y caracterización de toxinas de bacillus sp que inhiban la proliferación y migración de líneas celulares de cáncer a través de la inactivación de la vía PI3K/AKT.

Resumen aprobado por:

Dr. Jorge Olmos Soto

Resumen.

El mecanismo de inhibición de la proliferación y migración celular juegan un papel central en la prevención del desarrollo de cáncer. Estos mecanismos son activados a través de la vía de señalización PI3K/AKT, la cual induce la traslocación al núcleo de β catenina, promoviendo así la expresión de genes que regulan positivamente la proliferación celular y negativamente la apoptosis. De acuerdo con esto, mutaciones que activan los componentes de esta vía se ha observado en una gran variedad de tumores. Bacillus thuringiensis se caracteriza por la síntesis de cristales con actividad de δ -endotoxinas, conocidas como toxinas Cry, las cuales recientemente se ha reportado que cuentan con actividad citotóxica en líneas celulares de cáncer humano de diversos orígenes.

En este trabajo mostramos, que en células tumorales las toxinas seleccionadas de bacillus thuringiensis regulan positivamente a la molécula de adhesión celular que cuenta con actividad supresora de tumores, que conlleva al bloqueo de la vía de señalización PI3K/AKT lo que resulta en la inhibición de la proliferación y migración celular. Aunado a esto, el bloqueo de esta vía permitió la expresión de factores de transcripción que regulan positivamente el proceso de muerte celular programada, por lo que la actividad de las toxinas Cry prometen ser un potencial blanco de terapia contra diferentes líneas celulares de cáncer humano.

Palabras clave: **β catenina, apoptosis, δ -endotoxinas, PI3K/AKT.**

Abstract of the thesis presented by Alfredo Nuñez Rivera as a partial requirement to obtain the Master or Doctor in Science degree in Science of life with orientation Marine Biotechnology.

Isolation and characterization of bacillus sp toxins that inhibit the proliferation and migration of cancer cell lines through the inactivation of the PI3K/AKT pathway.

Abstract approved by:

Dr. Jorge Olmos Soto

Abstract.

The mechanism of inhibition of cell migration and proliferation play a role in preventing the development of cancer. These mechanisms are activated through PI3K/AKT signaling pathway, which induces the translocation of β -catenin to the nucleus, thereby promoting the expression of genes that regulate cell proliferation positively and negatively apoptosis. Accordingly, mutations that activate components of this pathway has been observed in a variety of tumors. *Bacillus thuringiensis* is characterized by the synthesis of crystals with δ -endotoxin activity, called Cry toxins, which recently has been reported to have cytotoxic activity on human cancer cell lines of different origins.

This study showed that in tumor cell, toxins of *Bacillus thuringiensis* positively regulate cell adhesion molecule which has tumor suppressor activity, which leads to blocking of PI3K/AKT signaling pathways resulting in the inhibition of cell proliferation and migration. Added to this, blocking this pathway allowed the expression of transcription factors that positively regulate the process of programmed cell death, so that the activity of Cry toxins promise to be a potential target for therapy against various human cancer cell lines.

Keywords: **β catenin, apoptosis, δ -endotoxins, PI3K/AKT.**

Dedicatorias

Este trabajo como muchos mas logros en mi vida no tengo a nadie mas que dedicárselos a mi familia, principalmente a mis padres y a mi abuela, que sin su ayuda y colaboración no creo que hubiera sido posible desempeñarme de igual forma. Les agradezco las oportunidades que me han dado en la vida, la buena educación que me forgaron asi como todas las otras oportunidades que me han presentado, que yo se que ha otras muchas personas no se les presentan, por lo que les agradezco todos los sacrificios que les pudiera haber conllevado presentarme estas oportunidades.

Gracias.

Agradecimientos

En esta sección tendría que incluir y mencionar a cada una de las persona que formaron parte del proyecto o contribuyen de alguna otra forma en el. Principalmente al doctor Jorge Olmos Soto por darme la oportunidad de integrarme a su grupo de trabajo y permitirme de esta forma culminar mi proyecto de maestría. También debo agradecerle a la técnico del laboratorio Rosalia Contreras por las atenciones prestadas en el laboratorio así como su colaboracion en la gestion administrativa de material y reactivos. De igual forma también le agradezco la colaboración de mis compañeros de laboratorio Abelardo Campos Espinoza y Abigail Valdez Castillo que durante la etapa de desarrollo del proyecto mostraron una gran colaboración y compañerismo en el laboratorio.

Lista de figuras

Figura		Página
1	Vía de señalización de PI3K/Akt.	7
2	Regulación del ciclo celular en mamíferos.	12
3	Vía de Hippo en mamíferos.	15
4	Vía canónica de Wnt.	17
5	Estructura de <i>Bacillus Thuringiensis</i> .	20
6	Mecanismo de acción de las toxinas de <i>Bacillus thuringiensis</i> .	23
7	Purificación de las proteínas Cry.	33
8	Caracterización de las clonas.	35
9	Inactivación de la Akt.	37
10	Expresión de receptores de tipo caderina en células tumorales.	39
11	Expresión de APN.	41
12	Expresión de fosfatasa alcalina en diversas líneas celulares.	42
13	Inhibición de la proliferación y migración celular a través del uso de toxinas Cry.	44
14	Las toxinas Cry inducen la muerte celular programada.	47
15	Mecanismo de acción.	50

Lista de tablas

Tabla		Página
1	Genes blanco de STAT3 NF- κ B.	10

CONTENIDO

	Página
Resumen español	i
Resumen ingles	ii
Dedicatorias	iii
Agradecimientos	iv
Lista de figuras	v
Lista de tablas	vi
1. Introducción	1
2. Antecedentes	3
2.1 Evasión de la apoptosis.	3
2.2 Insensibilidad a señales anti-proliferatorias.	4
• La vía PI3K/AKT en cáncer.	5
2.3 Invasión a tejidos y Metástasis.	8
2.4 Inflamación asociada a cáncer.	9
2.5 Autosuficiencia en señales de crecimiento.	11
• CDKS en cáncer.	12
• El rol emergente de la vía Hippo en el desarrollo de cáncer en mamíferos.	14
• La vía de Wnt.	16

• Factores de transcripción involucrados	
en proliferación: Myc, Yap.	18
2.6 Receptores de adhesión celular en cáncer.	18
2.7 Bacillus thuringiensis.	19
• Cristales parasporales.	20
• Mecanismos de acción.	21
3. Justificación	24
4. Hipótesis	24
5. Objetivos	
Objetivo general.	25
Objetivos específicos.	25
6. Materiales y métodos	
6.1 Cultivo celular.	26
6.2 Análisis de viabilidad celular.	26
6.3 Detección de receptores en membrana.	26
6.4 Determinación de muerte celular programada.	27
6.5 Análisis de fragmentación del DNA.	27
6.6 Determinación del nivel de degradación del DNA.	28
6.7 Aislamiento de proteínas totales.	29
6.8 Análisis del nivel de expresión de la cinasa AKT.	29
6.9 Evaluación de la capacidad de migración celular.	30

7. Resultados	
7.1 Caracterización y purificación de las toxinas Cry.	31
7.2 En células tumorales las toxinas Cry inactiva la vía de PI3K/AKT.	36
7.3 Las toxinas Cry inactivan la vía de PI3K/AKT a través del bloqueo de un receptor de adhesión celular.	38
7.4 Las toxinas Cry no estimulan o señalizan de manera significativa a algún receptor de membrana en células no transformadas.	40
7.5 El bloqueo de la vía de PI3K/AKT por las toxinas inactivan la migración y proliferación celular.	42
7.6 En células tumorales las toxinas Cry promueven la muerte celular programada.	45
8. Discusion	48
9. Conclusiones	51
10. Perspectivas	52
Referancias bibliograficas	53
Anexos	62

1. Introducción.

Después de más de un tercio de siglo de avances, la investigación en cáncer ha generado un amplio y complejo conjunto de conocimientos, revelando que el cáncer es una enfermedad que involucra cambios dinámicos en el genoma, que ocasionan modificaciones morfológicas y funcionales, tales como centrosomas duplicados, defectos en citocinesis y expresión génica aberrantes [revisado en (Hanahan and Weinberg et al. 2000)]. Esto se ha basado en el descubrimiento de mutaciones de protooncogenes y genes supresores de tumores que resultan en ganancia y pérdida de función respectivamente, que de una u otra manera confieren algún tipo de ventaja en el crecimiento celular, lo cual permite la progresión de una célula normal en una célula cancerosa. Se ha sugerido, que los amplios genotipos observados en células tumorales son la manifestación de siete alteraciones esenciales en la fisiología celular que colectivamente dictan el crecimiento descontrolado: evasión de la apoptosis, insensibilidad a señales anti-proliferatorias, potencial replicativo ilimitado, invasión del tejido y metástasis, inflamación asociada a cáncer, angiogénesis sostenida y autosuficiencia en señales de crecimiento [revisado en (Hanahan and Weinberg 2000)].

Se ha sugerido recientemente que las proteínas Cry desempeñan una actividad citotóxica hacia líneas celulares de cáncer humano de diversos orígenes (Olmos Soto Jorge et al. 2012). Por lo que en trabajos previos en el laboratorio del doctor Jorge Olmos se logró caracterizar el perfil de las proteínas Cry de diversas cepas silvestres de *B. thuringiensis* aisladas en Baja California, de las cuales se realizaron ensayos de toxicidad con dichas toxinas en líneas celulares de cáncer humano, específicamente en cáncer de mama (MDA-231) obteniendo una dosis letal media contra estos cultivos (Mendoza Almanza Gretel 2011, Olmos Soto Jorge et al. 2012). Sin embargo, aun se desconoce el mecanismo de acción de estas toxinas en líneas celulares de cáncer humano.

Aunado a esto, siguiendo el mecanismo de acción propuesto en lepidópteros, en donde las toxinas Cry reconocen a una molécula de adhesión celular como la caderina para la formación del poro que conlleva a la lisis celular (Bravo A. et al. 2004), proponemos que estas moléculas de adhesión estarían jugando un papel fundamental también en reconocimiento de las toxinas Cry en líneas celulares de cáncer humano.

Cabe mencionar que recientemente se ha publicado que los receptores de adhesión celular actúan como un potencial supresor de tumores, de manera específica inactiva la vía de señalización PI3K/AKT (A. Bellacosa and L. Larue 2010), lo que conlleva a la inhibición de la proliferación celular. Se conoce con detalle que algunos de estos receptores inducen la fosforilación de β -catenina lo que secuestra a la β -catenina en el citoplasma, permitiendo de esta manera que el factor de transcripción Egr1 promueva la transcripción del PTEN, una fosfatasa, que inhibe la activación de la vía de PI3K/AKT (A. Bellacosa and L. Larue 2010).

Con base a todos estos antecedentes, proponemos que en líneas celulares de cáncer humano las toxinas Cry aisladas en el laboratorio reconocen al receptor de adhesión celular, lo que permite el secuestro de β -catenina en el citoplasma y conlleva a la expresión de el factor de transcripción Erg1 y a su vez de la fosfatasa PTEN con la finalidad de inactivar la vía de señalización PI3K/AKT, resultando en la inhibición de la proliferación y migración celular, así como la activación de la muerte celular programada.

2. Antecedentes.

2.1 Evasión de la apoptosis.

En condiciones homeostáticas, el número total de células en organismos multicelulares es un balance entre el efecto de generar células por mitosis y la muerte celular por apoptosis. El descontrol de este delicado balance puede permitir el desarrollo de cáncer.

Existen genes supresores de tumores, que inducen la muerte en células que presentan daño en el DNA con la finalidad de impedir su proliferación. Dos vías importantes en la supresión de tumores son la vía de p53 y la proteína retinoblastoma (Rb), las cuales actúan como puntos de control del ciclo celular, siendo estas las principales barreras que evitan el desarrollo de cáncer (Whibley et al. 2009). p53 tiene un papel clave en la preservación de la estabilidad genómica en respuesta a estrés, por lo que p53 se activa en respuesta a una gran variedad de estímulos nocivos, de los cuales podemos mencionar: daño del DNA, hipoxia, estrés metabólico y la activación de oncogenes (Whibley et al. 2009). El mecanismo mejor documentado del papel protector de p53 es su función como factor transcripcional. Uniéndose a un elemento de respuesta específico en el DNA, p53 modula la transcripción de genes que gobiernan el arresto del ciclo celular, la apoptosis, el mantenimiento de la integridad genética, la inhibición de angiogénesis y senescencia celular, mecanismos que conforman la mayor defensa contra el crecimiento de tumores. p53 también interactúa con numerosas proteínas celulares, incluyendo aquellas que controlan la muerte celular programada, y estas interacciones moleculares deben contribuir a la función inhibitoria de p53 en tumorigénesis (Whibley et al. 2009). Entre los genes que regula p53 encontramos a WAF1, CIP1, p21 y ciclina G los cuales están involucrados en el arresto del ciclo celular, en la fase G1 (Golias et al. 2004), genes apoptóticos como *BAX*, *BID*, *NOXA (PMAIP1)* y *BBC3 (PUMA)*, los cuales pertenecen a la familia de *Bcl-2*, y genes involucrados en la reparación del DNA como *GADD45* (Dyson, N.J. et al. 2008; Whibley et al. 2009). La regulación

negativa de esta molécula es mediada por la unión de las proteínas MDM2 y MDM4 a p53.

La otra vía importante en la supresión de tumores es mediada por Rb, ya que participa en la regulación del ciclo celular, y por lo tanto en el desarrollo y proliferación de células. Rb funciona como modulador transcripcional al interactuar con el factor de transcripción E2F, reprimiendo la expresión de genes necesarios para la progresión del ciclo celular, por lo que RB se considera como un regulador negativo del ciclo celular (*Morris et al. 2008; Malumbres et al. 2009*). Las proteínas Arf y FBXO31 son otros factores importantes que actúan como supresores de tumores, frenando señales de estrés generadas por la célula. En el caso de FBXO31 (F-box protein), este induce el arresto celular al degradar directamente a ciclina D1 (Santra et al. 2009). Por otro lado Arf actúa como un transactivador de p53, específicamente al reprimir la actividad de la proteína encargada de degradar a p53, MDM2 (Van Maerken et al. 2009).

2.2 Insensibilidad a señales anti-proliferativas.

En condiciones normales diferentes factores de crecimiento (EGF, HGFR, FGF, INR/IR, NGF y PDGF, entre otros), mitógenos (miembros de la familia TNF α) y lectinas, inducen el crecimiento celular. Estos actúan uniéndose a sus respectivos receptores de membrana, de los cuales la mayoría tienen actividad de cinasa de tirosina (RTKs). Estos receptores, al unirse a su ligando, son activados y generan señales que llegan al núcleo estimulando la división celular. Por tanto la regulación negativa de estas señales es esencial para prevenir la aparición de cáncer.

Las señales generadas por los receptores RTKs inducen una cascada de señalización que involucran a proteínas de la familia de la cinasa de tirosina Scr, serina/treonina- cinasas como AKT, cinasas de lípidos como PI3K, moléculas

adaptadoras como Grb2, Drk, Sem-5 y Nck entre otros, GEFs (del inglés Guanine nucleotide Exchange Factors) como SOS y Vav, GTPasa como Ras y MAP-quinasas como Raf-1, MEK y ERK1/2. Esta última cinasa de la vía de las MAP-quinasas es capaz de translocarse al núcleo y activar factores de transcripción los cuales regulan positivamente la expresión de proteínas involucradas en la regulación de proliferación celular. Todas las moléculas que participan en la inducción de la proliferación celular se consideran proto-oncogenes, en virtud de que mutaciones en estos proto-oncogenes generan moléculas constitutivamente activas (oncogenes) que resultan en un estímulo constante de proliferación (Whitfield et al. 2006).

Los oncogenes pueden ser divididos en factores de crecimiento, receptores de factores de crecimiento, transductores de señales y factores de transcripción. Entre los factores de transcripción podemos encontrar a Elk, el cual es responsable de la expresión de genes inmediatos como *c-Fos*, *NF-κB* y *c-Myc*, los cuales a su vez regulan positivamente la expresión de genes requeridos para la proliferación celular como *Ciclina-D1*, o negativamente la expresión de genes antiproliferatorios como *p21*, *p27*, *p16*, e inductores de muerte como *GAD54*, *BCL-Xs*, entre otros (Barna et al. 2008).

Recientemente se ha demostrado que la vía de PI3K/Akt, la cual regula la fosforilación de las proteínas BCL, es una de las principales vías que modulan las señales antiapoptóticas.

La vía PI3K/AKT en cáncer.

Akt es una cinasa serina/treonina (también llamada proteína cinasa B, PKB), que hoy en día se ha demostrado que es una molécula de señalización crucial dentro de las células eucariotas. Las células de mamíferos expresan tres isoformas de Akt: Akt1 (PKB α), Akt2 (PKB β) y Akt3 (PKB γ), todas codificadas por diferentes

genes (Franke et al. 2008b). Existen diferencias funcionales entre las isoformas de Akt. Estudios previos han demostrado que la isoforma Akt1 participa principalmente en el metabolismo de la glucosa, mientras que Akt2 y Akt3 se encuentran patológicamente incrementadas en cáncer (Cheng et al. 1996). Además también se han demostrado que al aumentar la actividad de Akt2 se incrementa la motilidad celular, invasión y el potencial *metastásico* (Arboleda et al. 2003).

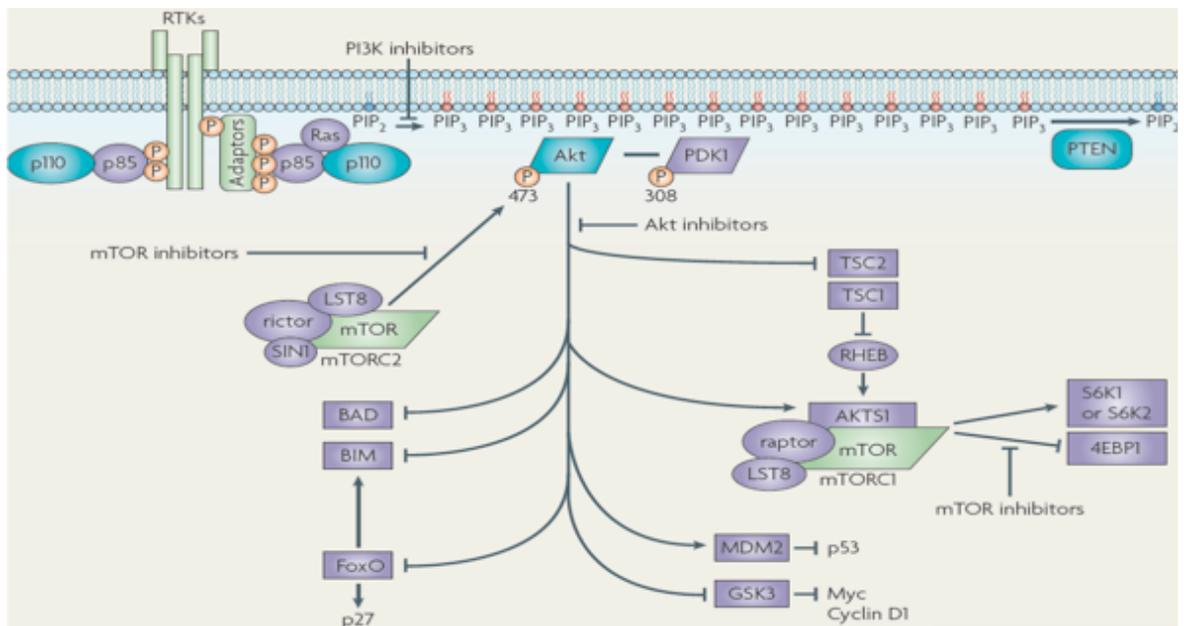
Para entender la regulación celular de Akt fue crítico el descubrimiento de que la actividad de la cinasa Akt se induce después de la activación de PI3K en respuesta a la activación de diferentes receptores para factores de crecimiento específicos, Fig.1 (Burgering and Coffey 1995). Existen otras evidencias de la importancia de esta vía en células tumorales, como por ejemplo, el gen supresor de tumores PTEN, una fosfatasa que inactiva los productos de PI3K e inhibe la actividad de Akt, y que se encuentra frecuentemente mutado en cáncer (Franke et al. 2008a). Sin embargo, estos no son los únicos cambios oncogénicos que permiten incrementar la actividad de Akt. La alteración de receptores de factores de crecimiento así como alteraciones en Ras también resultan en la hiperactivación de Akt (Franke et al. 2008b).

Uno de los primeros blancos identificados de Akt que tiene implicaciones anti-apoptóticas es *BAD*, el cual al dimerizar con *BCL-X* cancela las funciones anti-apoptóticas de esta última. La regulación de *BAD* por Akt ejemplifica una de las posibles vías moleculares que suprimen el mecanismo de apoptosis (Franke et al. 2008b). Cuando *BAD* no está fosforilado, inhibe a *Bcl-XL* y a otros miembros anti-apoptóticos de la familia de *Bcl-2*. Una vez fosforilado *BAD* es retenido en el citoplasma en donde su actividad pro-apoptótica es neutralizada (Zha et al. 1996). Por lo que la activación de Akt protege a las células tumorales de entrar en apoptosis.

El ciclo celular es otro proceso donde Akt juega un papel importante, ya que esta molécula afecta al menos a dos reguladores negativos del ciclo celular: p21 y p27. Específicamente p21 es estabilizado después de la activación de la vía de Akt, ya

sea por su fosforilación directa o por la inactivación de GSK3. Akt también fosforila a p27, induciendo su inhibición mediante su retención en el citoplasma (Rossig et al. 2001).

Se han encontrado evidencias adicionales de la participación de Akt en la regulación de la proliferación celular, como la capacidad de suprimir la actividad de un supresor de tumores como es p53. Específicamente, al estar activa Akt fosforila a la E3 ubiquitin ligasa HDM2 (o su homólogo en ratón Mdm2), promoviendo de esta manera la degradación de p53 (Fig.1). Aunado a esto se ha demostrado que los niveles de p53 son regulados positivamente al interactuar directamente con PTEN, aumentando la actividad transcripcional de p53 (Freeman et al. 2003).



(Engelman JA., 2009, p.555)

Fig.1 Vía de señalización de PI3K/Akt.

El esquema ejemplifica la participación que tiene la vía de PI3K/Akt en inhibir moléculas claves en apoptosis, *BAD*, *BIM*, p53, y estimular positivamente reguladores del ciclo celular, como *Myc* y ciclina D1. Todo esto al recibir un estímulo de un receptor de membrana, en este caso un receptor con actividad de cinasa de tirosina.

2.3 Invasión a tejidos y metástasis.

El fenómeno de metástasis continua siendo la causa más común de muerte en pacientes en cáncer (Ren et al. 2009). En estudios recientes en células tumorales se le ha atribuido un papel importante en este fenómeno a la Ezrina, una molécula de unión al citoesqueleto de actina. Ezrina y los demás miembros de la familia de las ERMs tiene una función esencial en procesos celulares fundamentales, que incluyen la determinación de la morfología celular, polaridad y estructura, adhesión celular, motilidad, citoquinesis, fagocitosis y el transporte membranal (Wu et al. 2004). A pesar de la expresión de otras proteínas de la familia, la represión de ezrina en modelos de cáncer humano y murino resulta en la inhibición de metástasis. Esto sugiere que ezrina, más que cualquier otra proteína ERM, es esencial en el proceso de invasión celular, durante la metástasis (Pang et al. 2004; Weng et al. 2005). La activación de las proteínas ERM es mediada tanto por la fosforilación de la treonina del carboxilo terminal como por la exposición a fosfatidilinositol (C Khanna et al. 2008). Se ha encontrado que múltiples cinasas fosforilan a la treonina del carboxilo terminal de las proteínas ERM, como por ejemplo: la proteína cinasa $C\alpha$ ($PKC\alpha$), $PKC\theta$, $PKC\iota$, Rho cinasa/ROCK, GRK2 (G protein-coupled receptor kinase 2), MRCK (Myotonic dystrophy kinase-related CDC42-binding kinase) (Ren et al. 2009). Otra proteína que se ha visto asociada a la familia de las ERMs es Merlín, la cual también se ha asociado a procesos como metástasis (Morrison et al. 2001).

De acuerdo con esto, en células de osteosarcoma humano y murino, se encontró una alta fosforilación de ezrina en etapas tempranas del proceso de invasión, antes de que las células llegaran al pulmón. Sorprendentemente, en etapas posteriores del proceso de metástasis se pierde la fosforilación de ezrina, más notablemente días después de que las células llegan al pulmón (Ren et al. 2009). Estudios posteriores evidenciaron que PKC (α , γ , ι) son los responsable de esta fosforilación temprana de ezrina. La conexión entre ezrina y PKC (α , γ , ι) fue aun

más sustentada al demostrar que al inhibir cualquiera de los dos, también se inhibe la metástasis (Ren et al. 2009).

2.4 Inflamación asociada a cáncer.

En condiciones inflamatorias las células pueden promover la transformación oncogénica y cambios genéticos y epigenéticos, los cuales pueden generar un microambiente inflamatorio que puede favorecer la progresión del tumor. La inflamación asociada a cáncer está marcada por la presencia de marcadores inflamatorios, como citosinas y quimiocinas. Evidencias recientes sugieren que STAT3 (Signal Transducer and Activator of Transcription 3) participa en la inducción y mantenimiento de un microambiente inflamatorio pro-carcinogénico, ya que regula: citocina, quimiocinas y otros mediadores, como IL-6, IL-1 β , factor estimulador de colonias, prostaglandinas y ciclooxigenasa 2 (CoX2), que son indispensables para inducir y mantener este ambiente pro-inflamatorio, Tabla1 [revisado en (Yu et al. 2009)].

Tanto lipopolisacáridos y bacterias son capaces de activar a STAT3, resultando en la producción de IL-1 β y IL-6. Se sabe que los lipopolisacáridos lo hacen al activar a los receptores TLR4 y TLR9 (Toll-like receptors). No obstante también se ha demostrado que tanto la luz ultravioleta, el humo del cigarro y el estrés crónico son capaces de activar a STAT3 [revisado en (Yu et al. 2009)].

No sorprendentemente a STAT3 se le ha asociado con *NF- κ B*, ya que ambas proteínas participan en el proceso de proliferación, inflamación, sobrevivencia, angiogénesis e invasión tumoral, sin mencionar que co-regulan varios oncogenes y genes inflamatorios [revisado en (Yu et al. 2009)]. Específicamente a STAT3 se le ha relacionado con la acumulación de la localización de β -catenina en el núcleo, la cual contribuye a la carcinogénesis colorectal [revisado en (Yu et al. 2009)].

Tabla 1. Genes blanco de STAT3 y NF- κ B.

<i>BCL-X_L</i>	<i>HSP70 y HSP90</i>	<i>IL-12A (también llamado P35)</i>
<i>MYC</i>	<i>IL-10</i>	<i>CD80</i>
<i>BIRC5</i>	<i>VEGF</i>	<i>CD86</i>
<i>MMP9</i>	<i>FGF2 (también llamado BFGF)</i>	<i>CXCL10 (también llamado IP-10)</i>
<i>MMP2</i>	<i>COX2</i>	<i>IFNγ</i>
<i>CCND1 (codifica para ciclina D1)</i>	<i>CXCL12 (también llamado SDF1)</i>	<i>IFNβ</i>
<i>HIF1α</i>	<i>IL-11</i>	<i>CCL5 (también llamado RANTES)</i>
<i>ICAM1</i>	<i>IL-23</i>	<i>NOS2</i>
<i>TWIST1</i>	<i>IL-21</i>	<i>IL-8</i>
<i>VIM (codifica para vimentina)</i>	<i>IL-17</i>	<i>IL-1β</i>
<i>MCL1</i>	<i>IL-6</i>	<i>CCL2 (también llamado MCP1)</i>

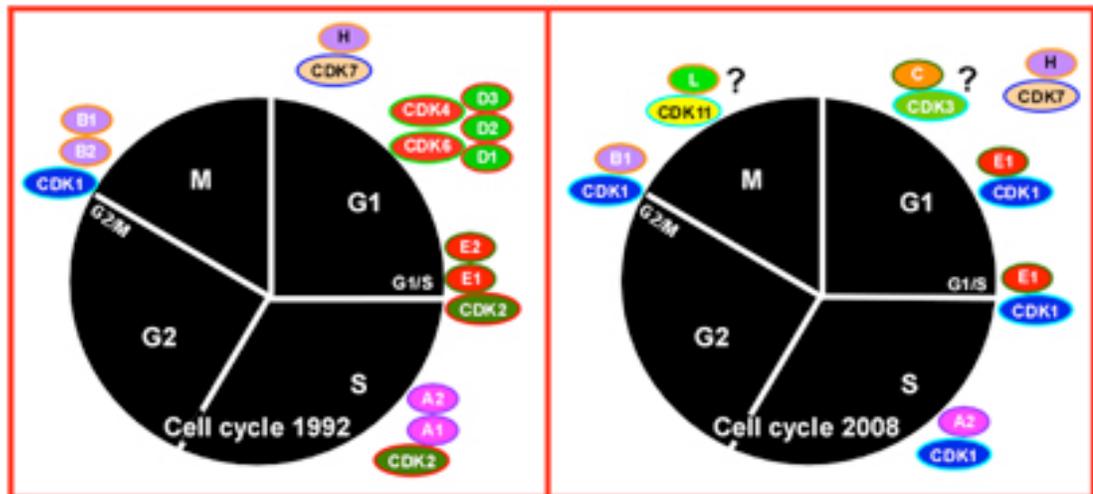
Tomado de Hua Yu (2009, p.801)

STAT3 también participa en el control de la expansión de células T reguladoras en tumores y es necesario para el desarrollo de células TH₁₇, las cuales promueven el desarrollo de tumores, por lo que ha STAT3 se le ha asociado con el control de la inmunidad anti-tumoral. Cabe mencionar que STAT5 y STAT6 también están implicados en proceso anti-apoptóticos, proliferación e invasión [revisado en (Hua Yu et al. 2009)].

2.5 Autosuficiencia en señales de crecimiento.

La división celular es un proceso meticulosamente regulado que permite la generación de células hijas. La habilidad de las células de dividirse se ha atribuido principalmente a la presencia de dos clases de moléculas: cinasas ciclina-dependientes (Cdks), una familia de cinasas de serina/treonina y, sus socias de unión, las ciclinas (Satyanarayana and Kaldis 2009). El descubrimiento de aproximadamente 20 Cdks ha permitido argumentar que, en células eucariotas, la transición de una fase a otra del ciclo celular ocurren debido a la formación de complejas combinaciones entre las Cdks (Cdk 1, Cdk 2, Cdk 3,....., Cdk 20) y ciclinas (A1, A2, B1, B2, B3, C, D1, D2, D3, E1, E2, F, etc.) en diferentes fases (G1/S, S y G2/M) del ciclo celular. Sin embargo, evidencias recientes sugieren que la mayoría de las Cdks y ciclinas son prescindibles para la regulación del ciclo celular en mamíferos, por lo que Cdk1, sola, formando complejos con un número mínimo de ciclinas puede dirigir a las células a través de las diferentes fases del ciclo celular, Fig.2 (Satyanarayana and Kaldis 2009).

Las funciones de los complejos Cdks/ciclinas en condiciones normales, así como en condiciones extremas, como estrés, daño al DNA, disfunción en los telómeros entre otras, están reguladas por dos familias de inhibidores de Cdks: INK4 (p16^{INK4a}, p15^{INK4b}, p18^{INK4c}, p19^{INK4d}), los cuales actúan uniéndose a Cdk4 y Cdk6, previniendo la actividad de las ciclinas de tipo D, y la familia de Cip/Kip (p21^{Cip1/Waf1/Sdi1}, p27^{Kip1}, p57^{Kip2}), inhiben la actividad de los complejos Cdk2/ciclina E, Cdk2/ ciclina A, Cdk1/ ciclina A y Cdk1/ ciclina B (Satyanarayana and Kaldis 2009).



(P Kaldis, 2009, p.2933)

Fig.2 Regulación del ciclo celular en mamíferos.

De acuerdo con el modelo clásico del ciclo celular, la regulación de los complejos de Cdk/ciclina de determinada fase del ciclo celular coordina la progresión del ciclo celular. Evidencias recientes sugieren que Cdk1 por sí solo, formando complejos con un número mínimo de ciclinas puede regular la progresión de una fase a otra en el ciclo celular.

CDKS en cáncer.

La desregulación del ciclo celular es uno de los principales problemas en células tumorales, las cuales acumulan mutaciones que resultan en señales mitogénicas constitutivas, que desencadenan la proliferación celular no programada, inestabilidad genómica y cromosómica (Malumbres et al. 2009).

Las mutaciones asociadas a tumores frecuentemente desregulan los complejos Cdk/ciclinas, evitando de esta manera el arresto celular en cierta fase del ciclo celular, lo que resulta en una continua proliferación (Malumbres and Barbacid 2009). Estas mutaciones son asociadas frecuentemente a diferentes agentes genotóxicos tanto exógenos como endógenos (por ejemplo, químicos, radicales libres, radiación ionizante, productos del metabolismo intracelular o por terapias médicas específicas), los cuales inducen diversas alteraciones en el DNA,

causando de esta manera la transformación celular (Malumbres and Barbacid 2009).

La progresión correcta del ciclo celular está monitoreada por puntos de control (checkpoints) que sensan posibles defectos en la síntesis del DNA y en la segregación cromosomal, modulando la actividad de las Cdks. Estas alteraciones son controladas por diferentes vías de señalización que permiten el arresto del ciclo celular o, en su caso la apoptosis.

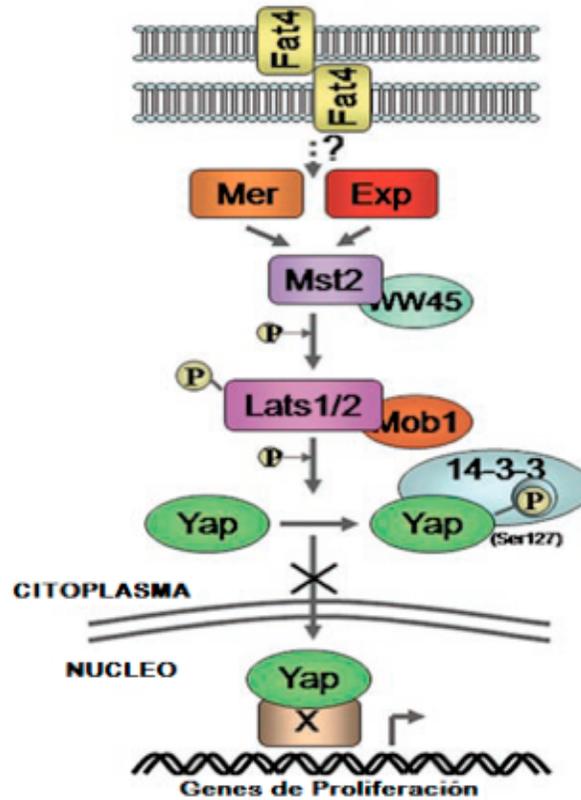
La ubiquitinación y degradación del inhibidor ciclina-cinasa dependiente p27, es un proceso desregulado en células tumorales, asociado a la activación de ciertas vías de señalización. La SKP2 (S-phase kinase-associated protein 2), subunidad de la ubiquitín ligasa SCF (SKP1-CUL1-F-box) E3, ubiquitina a p27, por lo que la sobre-expresión de SKP2 y relocalización en el citoplasma se ha asociado con cáncer (Lin et al. 2009). Estudios recientes muestran que Akt media la fosforilación de SKP2 y promueve su acumulación en el citoplasma, aumentando la formación del complejo SCF, resultando en la ubiquitinación y degradación de p27 (Lin et al. 2009). Estos estudios establecen que la conexión entre la vía de PI3K/Akt y SKP2 juega un papel importante en la progresión celular.

Aunque Akt promueve la proliferación celular mediante la regulación específica de componentes relacionados con la maquinaria del ciclo celular y de respuesta al daño al DNA, se ha encontrado una función conservada de la vía de señalización PI3K/Akt en la regulación del tamaño celular. Esto se podría atribuir a la participación que tiene Akt en ciertas vías de señalización, como la de Hippo/Mts1/2, relacionadas en el control del tamaño celular. Específicamente la señalización a través de PI3K regula la actividad del supresor de tumores Merlín al fosforilarlo, ya sea vía Akt o mediante la unión de los lípidos de fosfatidilinositol a Merlín, lo cual lo lleva a la ubiquitinación y posteriormente a la degradación (Okada et al. 2009).

El rol emergente de la vía Hippo en el desarrollo de cáncer en mamíferos.

Durante el desarrollo normal, el tamaño de los órganos es controlado por el crecimiento, proliferación y la muerte celular, que en conjunto definen el número y tamaño celular. El control de estos procesos celulares puede ser regulado por varias vías de señalización, incluyendo la recientemente descrita vía de hippo (Barry M. Gumbiner et al., 2011). Por lo que no es sorprendente que el descontrol de esta vía ha sido también recientemente asociada a cáncer.

Estudios *in vitro* indican que cuando un cultivo celular alcanza un estado de confluencia, la interacción célula-célula desencadena una cascada de señalización que activa la vía de Hippo/Mts1/2, una de las vías que regula la inhibición por contacto (Blandino et al. 2009). Los cuatro componentes de esta vía son Mts1/2, WW45, LATS1/2, Mob1, actúan en conjunto mediante una cascada de señalización para regular a YAP (Fig.3). Cabe mencionar que la molécula Merlín/NF2 es la responsable de activar la vía de Hippo/Mts1/2 (Harvey and Tapon 2007). Específicamente los cuatro componentes de la vía regulan negativamente a YAP directamente por fosforilación, lo que resulta en el secuestro de YAP en el citoplasma inhibiendo de esta manera su translocación al núcleo y por lo tanto su actividad transcripcional (Zhao et al. 2008). Muchos promotores de crecimiento o genes antiapoptóticos son regulados por YAP, incluyendo a c-Myc, ciclina D1, Sox4, H19, AFP, *BIRC5/survivin*, y *BIRC2/cIAP1*. Se ha observado que la pérdida de función de WW45 o la sobre expresión de YAP, resulta en la sobre expresión de ciclina E y *dIAP1* que promueven la proliferación celular y la inhibición de la muerte celular, respectivamente. Por otra parte Merlín/NF2 puede coordinar el establecimiento del contacto intercelular (adhesión celular) mediante la supresión de señales mitógenas en la membrana, regulando negativamente la señalización del EGFR, por lo que, se considera que, Merlín actúa como supresor de tumores (Bertini et al. 2009).



(Zhao, 2007, p.2758)

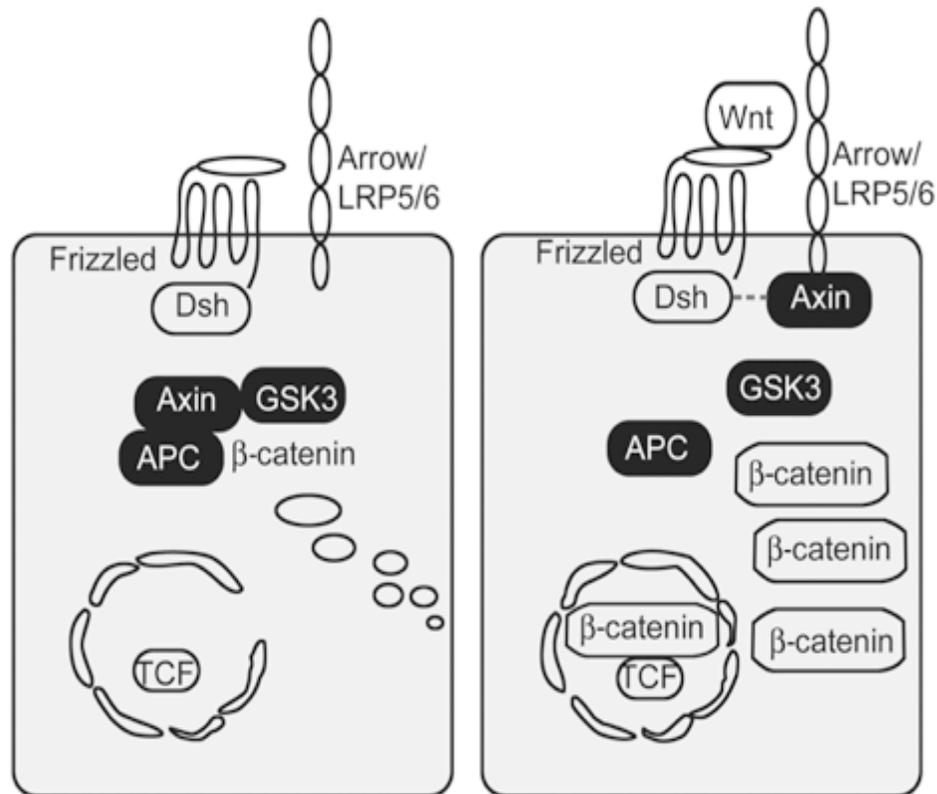
Fig.3 Vía de Hippo en mamíferos.

El mecanismo de acción de la proteína Yap, en el cual se observa que la inactivación de Yap se debe a su fosforilación mediada por Lats1/2, desencadenada por alguna señal de membrana aun no definida. Esta inactivación resulta en la inhibición de la transcripción de genes involucrados en proliferación celular.

La vía de Wnt.

Existe otra clase de proteínas como Wnt (lípidos-modificados que actúan como factores de crecimiento), a las cuales se le han atribuido múltiples funciones en procesos tales como metástasis, adhesión celular, polaridad y en el control del ciclo celular. El estudio de estas moléculas se ha basado principalmente en su capacidad de activar ciertas vías de señalización, como la de β -catenina, la cual se ha demostrado que regula la expresión de ciertos factores de transcripción implicados en el control del ciclo celular, como por ejemplo c-Myc y Ciclina D1 (Nusse et al. 2005).

En la ausencia de Wnt, β -catenina es fosforilada por serina/treonina cinasas como Caseína cinasa y GSK-3. Esta interacción entre β -catenina y la cinasa es facilitada por la unión de auxina y APC, las cuales forman el complejo de degradación de β -catenina, lo que permite que esta sea fosforilada y reconocida por el complejo de ubiquitinación para ser degradada en el proteosoma, Fig.4. En cambio, en presencia de Wnt, se promueve la fosforilación de GSK3 (inactivándola), permitiendo de esta manera que β -catenina no sea degradada y se transloque al núcleo, en donde forma un complejo con los factores de transcripción LEF/TCF, que induce la transcripción de genes como, c-Myc y Ciclina D1, Fig.2 (Nusse et al. 2005; Witze et al. 2008).



(Roel NUSSE, 2005, p.29)

Fig.4 Vía canónica de Wnt.

En células no expuestas a señales de Wnt (izquierda), β -catenina es degradada a través de la interacción con Axina, APC y GSK3. Las proteínas Wnt (derecha) unidas al complejo receptor Frizzled/LRP en la superficie celular. Este receptor traduce una señal a Dsh (Dishevelled) y Auxina, permitiendo de esta manera la inhibición de la degradación de β -catenina. Su acumulación en el núcleo induce la transcripción de genes involucrados en la proliferación celular.

Factores de transcripción involucrados en proliferación: Myc, Yap.

Específicamente c-Myc juega un papel muy importante en el control del tamaño celular y la tasa de síntesis de proteínas, ya que es un oncogén que regula la expresión de varios componentes de la maquinaria de síntesis de proteínas, incluyendo proteínas ribosomales, factores de iniciación de la traducción, la RNA polimerasa III y DNA ribosomal. Cabe mencionar que blancos importantes del ciclo celular son transcripcionalmente regulados por c-Myc, tanto negativamente como p27 (cdk1b), p21 (cdk1a), o positivamente como ciclina D1. La desregulación de la actividad de c-Myc es una de las más frecuentes alteraciones oncogénicas que se encuentran en cáncer (Barna et al. 2008).

Otra molécula clave en el control de la proliferación celular es Yap, la cual incrementa la habilidad de p73, miembro de la familia de p53, para inducir apoptosis, esto en respuesta a daño al DNA. Sin embargo, otros estudios, recientemente mostraron que Yap también juega un papel importante en la inducción de proliferación, transformación y diferenciación celular, sin mencionar la regulación del tamaño de órganos. Congruente con esto se ha identificado a Ciclina-E como un blanco transcripcional de Yap activo. También se le ha asociado con la inducción de la transcripción de reguladores negativos de apoptosis, como *Birc2/clAP1* y *Birc5*, así como genes involucrados en migración, adhesión y ciclo celular (Bertini et al. 2009).

Recientemente, también se ha visto asociado a otra molécula de adhesión celular, E-caderina en la regulación negativa de factores de transcripción que regulan la proliferación celular, ya que de manera específica se ha reportado que la pérdida de esta molécula de adición celular en membrana induce la proliferación celular.

2.6 Receptores de adhesión celular en cáncer.

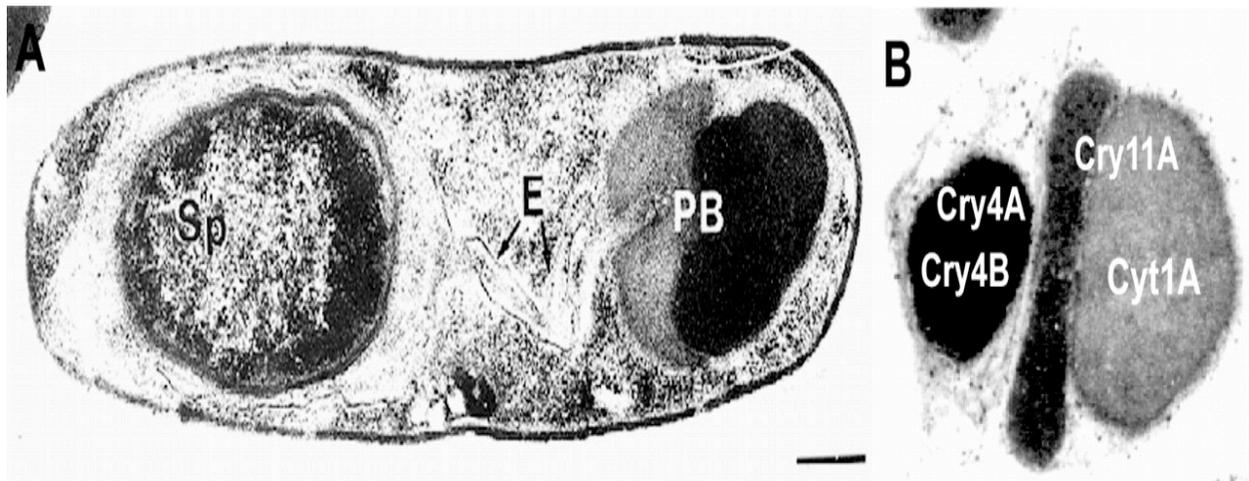
Generalmente, el estudio de las moléculas de adhesión celular (MACs) dependientes de calcio ha sido enfocado a su participación indispensable en la adhesión celular. Estas pertenecen a la superfamilia de proteínas

transmembranales que unen células adyacentes mediante interacciones homofilicas calcio-dependientes (Yagi and Takeichi, 2000). Son proteína con actividad supresora de tumores ya que su pérdida promueve el crecimiento e invasión del tumor mediante un mecanismo asociado a β -catenina (Wong and Gumbier, 2003). Aunado a esto también se ha demostrado que la expresión de p53 en líneas celulares de cáncer de ovario está correlacionada con los niveles de estas moléculas. Conforme a todos estos estudios han asociado a las MACs dependientes de calcio como un posible blanco en células tumorales involucrado en los procesos de invasión, proliferación, migración y transformación celular, por lo que la regulación de estas moléculas resulta fundamental para el control de la progresión de células tumorales.

Conforme a todos estos antecedentes, la regulación positiva de las vías de señalización activadas por las MACs y la regulación negativa PI3K/AKT permitiría proponer un mecanismo de control de la proliferación celular aberrante en células tumorales, por lo que las toxinas Cry de *Bacillus Thuringiensis* podrían estar promoviendo este mecanismo de control celular.

2.7 *Bacillus thuringiensis*.

Esta bacteria es un bacilo gram positivo, que mide de 3 a 5 μm de largo por 1 a 1.2 μm de ancho y que posee la característica de desarrollar resistentes esporas elipsoidales que no provocan el hinchamiento del perfil bacilar (Fig.5A) (Pang C. et. al. 1973). Es un microorganismo anaerobio facultativo, quimioorganotrofo y con actividad catalasa. Sin embargo, la característica principal de *B.thuringiensis* es que durante el proceso de esporulación produce una inclusión parasporal formada por uno o más cuerpos cristalinos de naturaleza proteica que son tóxicos para distintos invertebrados, especialmente larvas de insectos. Estas proteínas se llaman Cry (δ -endotoxinas) y constituyen la base del insecticida biológico mas difundido en el mundo (Feitelson j, et al. 1998).



(J. J. Johnson, 2003, p.3878)

Fig.5 Estructura de *Bacillus Thuringiensis*.

(A) Célula de *Bacillus thuringiensis* en estado esporangio. (B) Cuerpo parasporal típico de esta especie mostrando las inclusiones de toxinas y su composición individual. Sp, espora; E, exosporium; PB, cuerpo parasporal.

Cristales parasporales.

Desde el instante que ocurre el englobamiento de la pre-espora hasta su maduración, en simultaneidad con la formación de la espora, tiene lugar en *B.thuringiensis* la síntesis de uno a varios cristales parasporales que pueden presentar hasta el 30% del peso seco del esporangio (Fig.5A) (Fitz-James P., et al 1980). Estos cristales pueden presentar distintas morfologías y pueden clasificarse en bipiramidales, cúbicos, cuadrados aplanados, esféricos y otras formas atípicas menos frecuentes (Khetan S, et al. 2001). Se logró en muchos casos establecer asociaciones entre la morfología del cristal, sus proteínas Cry constituyentes, el peso molecular (entre 25 a 140 KDa) y su espectro de actividad insecticida. Sin embargo, existen trabajos en los que se describen cristales parasporales que, a pesar de tener morfologías asociadas a una toxina específica, no parecen poseer actividad insecticida alguna (Fig.5B) (Ibarra J. et al. 1996).

Los cristales pueden ser degradados por la acción de los microorganismos del suelo, y, al igual que sus esporas, también pueden ser inactivados por la acción de la luz ultravioleta (Carey P. et al. 1991). El cristal parasporal se ubica en el interior del esporangio y, por lo general, fuera del exosporio de la espora, y ambos son finalmente liberados tras la lisis celular. Existen algunos casos donde se describieron cristales dentro del exosporio, por lo que estos continúan junto a las esporas tras la lisis (Ibarra J. et al. 1996). En otro caso muy atípico, se pudo observar que los cristales se forman fuera del exosporio, pero ambos permanecen indefinidamente dentro de un esporangio que no se lisa, preservándolos de una rápida degradación.

Cada cuerpo de inclusión cristalino puede estar constituido por proteínas Cry de una o varias clases que se agrupan entre si mediante puentes disulfuro. La estabilidad de estas uniones condiciona el pH de solubilización del cristal. Particularmente en el caso de los cristales bipiramidales, cuando estos puentes están distorcionados, estos cristales son solubles a pH mayor de 9.5; mientras que si permanecen en su estado más estable necesitan un pH superior a 12 para lograrlo (Dean D. et al. 1996).

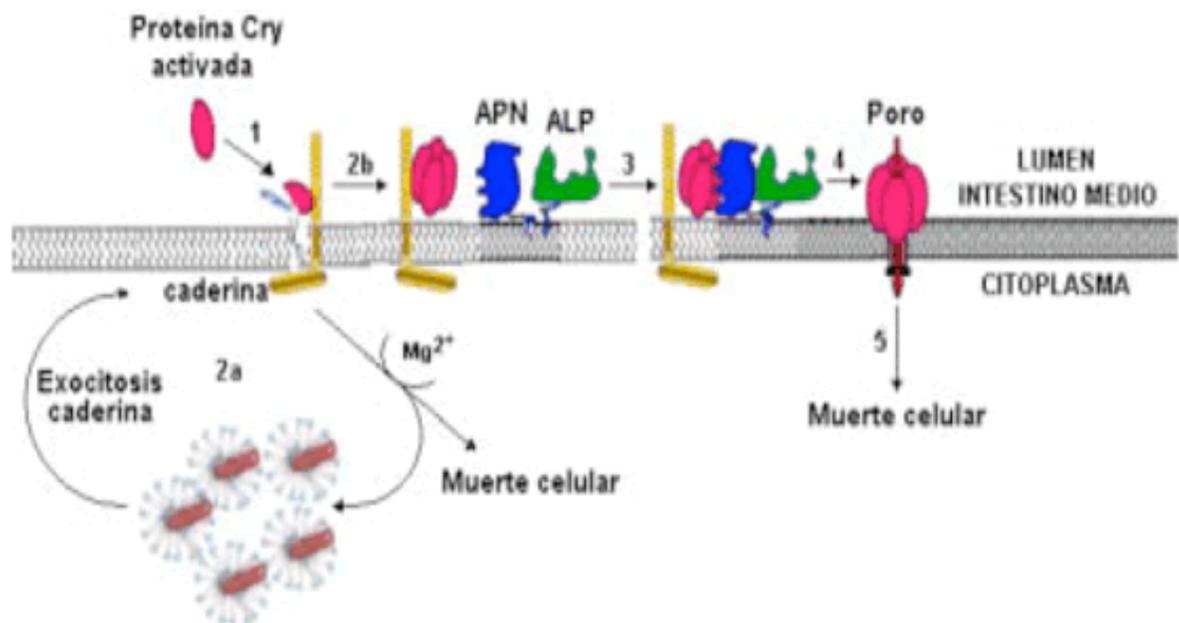
Mecanismo de acción.

El modelo de operación de las proteínas Cry se describió principalmente en lepidópteros como un proceso de múltiples etapas. Los cristales de *B.thuringiensis* son ingeridos y luego solubilizados en el intestino medio del insecto, tras lo cual se liberan las proteínas cristalinas en forma de protoxinas. Estas no producirán daño per se, sino que deberán ser procesadas por proteasas intestinales para generar las toxinas activas que llevaran a la muerte de la larva (Bravo A. et al. 2004). Bajo su forma monomérica, las toxinas atraviesan la membrana peritrófica y se unen de forma univalente a la caderina, con gran afinidad en la cara apical de la membrana epitelial (Bravo A. et al. 2004). Luego, de acuerdo con estudios

realizados en cultivos de células de insectos, se inicia una cascada de señalización dependiente del ion magnesio que sería responsable de la muerte celular (Bulla L Jr. et al. 2006). Además, el inicio de esa cascada de señalización estimula la exocitosis de caderina desde vesículas intracelulares hacia la membrana apical de la célula y aumenta el número de receptores; por ende, recluta un número mayor de toxinas libres que amplificarían la señal inicial. Por otro lado con base en experimentos *in vitro* y bioensayos, se propone que la unión de los monómeros a caderina facilita el clivaje proteolítico sobre el extremo N-terminal de la toxina (Bravo A. et al. 2007). Este último clivaje induce el ensamblaje de los monómeros y se establece una forma oligomérica pre-poro. Esta estructura incrementa la afinidad por un receptor secundario como puede ser la aminopeptidasa N o la fosfatasa alcalina. Por último, la unión a ese segundo receptor facilita la formación del poro en el epitelio del intestino medio, esto provoca un desequilibrio osmótico y en consecuencia la lisis celular (Fig.6) (Bravo A. et al. 2004).

Sin embargo, más del 40% de las toxinas *B. thuringiensis* identificadas no son activas en insectos debido a diversas razones. Estas proteínas Cry se distinguen por no ser hemolíticas y presentar alta toxicidad hacia un amplio rango de diversas células de cáncer (Saraswathy and Kumar 2004). Estas proteínas Cry nuevas han sido denominadas parasporinas, no obstante no presentan gran similitud con las proteínas Cry antes mencionadas, tanto en el mecanismo de acción como en su estructura, ya que las parasporinas se actúan uniéndose a ciertos canales iónicos ocasionando su lisis parcial, así como diversos cambios en su estructura como encogimiento (Kitada, S. et al. 2008).

Sin embargo, todavía no existe suficientes estudios que comprueben la regulación tanto positiva o negativa de alguna ruta metabólica o vía de señalización con exactitud o su efecto y especificidad citotóxica en contra de una línea celular cancerígena (Ohba, M. et al. 2006).



(Sauka Diego H., 2008, p.127)

Fig.6 Mecanismo de acción de las toxinas de *Bacillus thuringiensis*.

Unión de la toxina a caderina y su clivaje desde su C-terminal para generar la forma monomérica activa; 2a) inicio de la cascada de señalización dependiente de Mg^{2+} , estimulación de exocitosis de caderinas desde vesículas intracelulares hacia la membrana apical y consiguiente muerte celular; 2b) formación de la estructura oligomero pre-poro; 3) unión del oligomero a la aminopeptidasa N (APN) y/o fosfatasa alcalina (ALP) y migración a zonas específicas de la membrana; 4) formación del poro; 5) desequilibrio osmótico y consiguiente muerte celular (Bravo A et al. 2004).

3. Justificación.

Elucidar las vías de señalización que activan las toxinas de *Bacillus* en células tumorales que promueven los mecanismos de control celular como apoptosis, dará la posibilidad de activar dichas vías en pacientes cuyos tumores expresen el receptor específico para dichas toxinas. Cabe mencionar que no hay reporte alguno del papel que juegan estas toxinas de *Bacillus* en la inactivación de la vía PI3K/AKT en células tumorales que presentan alteraciones en los receptores de adhesión celular.

4. Hipótesis.

En células tumorales de origen no linfoide, las toxinas Cry de *Bacillus thuringiensis* reconocen a los receptores de adhesión celular dependientes de calcio, lo que permite inactivación de la vía de PI3K/Akt, generando señales que bloqueen el mecanismo de proliferación celular e induciendo apoptosis.

5. Objetivo.

Demostrar que en células tumorales las toxinas Cry inactivan la vía de PI3K/AKT y bloquean la expresión de ciertos factores de transcripción que promueven migración y proliferación celular.

Objetivos específicos:

1. Demostrar que en células tumorales las toxinas Cry inactivan la vía de PI3K/AKT.
2. Demostrar que las toxinas Cry inactivan la vía de PI3K/AKT a través del bloqueo de un receptor de adhesión celular.
3. Demostrar que el bloqueo de la vía de PI3K/AKT por las toxinas Cry inactivan la migración y proliferación celular.
4. Demostrar que en células tumorales las toxinas Cry promueven la muerte celular programada.
5. Demostrar que las toxinas Cry no estimulan o señalizan de manera significativa a ningún receptor de membrana en células no transformadas.

6. Materiales y Métodos.

6.1 Cultivo celular.

Las líneas celulares MDA-231, HaCat, Hela se mantuvieron en medio RPMI (Invitrogen). El medio es suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), 2mM de glutamina y 2% del antibiótico comercial anti-anti (penicilina/estreptomicina) de invitrogen. Todas las células se mantuvieron a 37^o C en una atmosfera húmeda con 5% de CO₂.

6.2 Análisis de viabilidad celular.

Se inocularon 10,000 células de las líneas celulares HaCat y MDA-231 en placas de 96 pozos, suplementados con medio RPMI al 5% de SFB. Las células se mantuvieron en estas condiciones durante 6 horas con la finalidad de que se fijaran. Posteriormente se intercambió el medio por uno sin suplementar para incubarlas durante 12 horas con el objetivo de arrestar su ciclo celular y de esta manera sincronizar el cultivo. Cumplido este periodo se retaron las células durante 12 horas con 1.5 µg de las toxinas establecidas. La viabilidad celular se midió mediante el ensayo colorimétrico MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazoilo).

6.3 Detección de receptores en membrana.

Inmunofluorescencia.

Las líneas celulares MDA-231 y HaCat se adhirieron a un porta objeto (preincubado con poli-lisina) durante 30 minutos a 37 °C (con la finalidad de secar la muestra), para posteriormente fijar las muestras con NaP04 30mM, formaldehído al 3% y glutaraldehido al 0.4% durante 15 min. a temperatura ambiente. Cumplido este lapso se incubó durante 10 segundos en metanol al

100% a 20 °C para posteriormente proceder a lavar 3 veces las muestras con PBS-1X durante 5 minutos. Concluida la fijación se incubó con el anticuerpo primario (caderina-E y caderina-11) a una dilución de 1:100 en PBS-1X durante 12 horas a 4 °C. De igual forma se lavó 3 veces las placas con PBS-1X durante 5 minutos. Posteriormente se procedió a incubar las muestras con el anticuerpo secundario, en este caso un anti-cabra acoplado al fluoroforo Texas Red, durante 1 hora a temperatura ambiente. Por último se concluyó el ensayo con 3 lavados mas con PBS-1X durante 5 min. Las muestras se visualizaron en un microscopio de epifluorescencia en objetivos de 100x.

6.4 Determinación de muerte celular programada.

Tinción con Dapi .

Se realizó un ensayo de toxicidad con las proteínas Cry para evaluar su capacidad de inducir la condensación de la cromatina y de esta forma inducir cuerpos apoptoticos. Las células de las líneas MDA-231 y HaCat se fijaron utilizando el procedimiento redactado para inmunofluorescencia. Una vez fijadas las muestras se tiñeron con el colorante DAPI a una concentración de 1ng/µl durante 30 minutos a 37 °C. Las muestras se lavaron 2 veces con PBS-1X durante 5 minutos. Por último las muestras se visualizaron en un microscopio de epifluorescencia en objetivos de 100x.

6.5 Análisis de fragmentación del DNA.

Ensayo del Cometa.

Se recolectaron células tratadas bajo las mismas condiciones de los ensayos de toxicidad, las cuales se resuspendieron en agarosa de bajo punto de fusión y se vertieron en porta objetos de vidrio pre-cargados con agarosa normal. A las

células se le agregó una última capa de agarosa de bajo punto de fusión con la finalidad de inmovilizarlas dentro de la agarosa. Concluido este montaje las células se sometieron a una solución de lisis (2.5 M NaCl, 0.1 M EDTA, 10mM Tris, pH10, 10% DMSO, 1% Triton X-100) durante 1 hora, con la finalidad de permeabilizar la membrana. Una vez concluido este periodo se incubó en el buffer de electroforesis (0.3 M NaOH, 1 mM EDTA, pH13) durante 40 minutos para permitir el desenrollamiento del DNA y poder correr de esta manera las muestras en una cámara de electroforesis a 300 mA durante 24 minutos. Posteriormente las células se lavaron 2 veces con el buffer neutralizante (0.4 M Tris pH 7.5) durante 15 minutos. Por último el gel se deshidrató a 4 °C durante 12 horas y se tiñó con DAPI para su posterior análisis en un microscopio de epifluorescencia a 100X.

6.6 Determinación del nivel de degradación del DNA.

Escalera de DNA.

Bajo las mismas condiciones de los ensayos de toxicidad anteriormente descritos se realizó una cinética de tres tiempos (2,6,12 horas) en donde se recolectaron células con la finalidad de extraer su material genético (DNA) y de esta manera evaluar la fragmentación del DNA y así inferir si estas células están sufriendo un proceso de muerte celular programada. Para ello se utilizó el kit comercial de omega para extraer el DNA de las células tumorales sometidas al ensayo de toxicidad. Una vez recolectado el material genético se cargó en un gel de agarosa al 2% y se corrió por electroforesis a 40V durante 3 horas. Cumplido este tiempo el DNA se tiñó con bromuro de etidio para evaluar la fragmentación y degradación de las muestras.

6.7 Aislamiento de proteínas totales.

Las células de las distintas condiciones experimentales, se tripsinizaron y se centrifugaron a 20,000 g durante 15 segundos. El pellet se lavó con 1 ml de PBS y se centrifugó a 20,000 g durante 15 segundos. Se desechó el sobrenadante, las células se resuspendieron en 100 μ l de Buffer de lisis (Tris 20mM pH 7.4, NaCl 250mM, β -glicerolfosfato 25mM, PPINa 2mM, EDTA 2mM pH 7.4, Tritón X-100 1%, Glicerol 10%) suplementado con inhibidores de proteasas y fosfatasas (Antipaína 5 μ g/ml, PMSF 1mM, Aprotinina 5 μ g/ml, Leupeptina 5 μ g/ml, Pepstatina 5 μ g/ml, Na₃VO₄ 200mM, DTT 0.5mM) y se incubaron a 4°C por 10 minutos. Las muestras se centrifugaron 10 minutos a 20,000 g a 4°C y se recuperaron los sobrenadantes, su concentración de proteína se determinó por el método de Bradford.

6.8 Análisis del nivel de expresión de la cinasa AKT.

Electroforesis en geles de poliacrilamida e inmunoblot.

Para su análisis, se corrieron los extractos celulares (30 μ g/carril) en geles de poliacrilamida desnaturalizante al 10%, y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa, en buffer de transferencia (Glicina 200nM, Tris 25mM, SDS 1% y MeOH 20%) a 100 V durante 90 min. Las membranas se bloquearon en leche disuelta en TBS-T (NaCl 1.5 M, Tris base 200 mM, HCl pH 7.4 y Tween 0.05%) al 5% durante 1 hora en agitación a temperatura ambiente. Posteriormente se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente durante toda 12 horas a 4°C en agitación constante. Terminado este periodo de incubación se lavaron las membranas 3 veces con TBS-T durante 10 min cada uno, y se agregó el anticuerpo secundario apropiado, acoplado a peroxidasa de rábano (HRP) a una concentración 1:5000, incubándose durante 1h a temperatura ambiente. Las

membranas se lavaron 3 veces más con TBS-T durante 10 min cada uno y se revelaron por el método de quimioluminiscencia.

6.9 Evaluación de la capacidad de migración celular.

Ensayos de cicatrización.

Se realizaron ensayos de cicatrización para evaluar la actividad de las toxinas Cry tanto en líneas celulares de origen tumoral (MDA-231 y HELA) como en queratinocitos humanos (HaCat). Para esto se cultivaron las células en cajas de 35 mm de diámetro hasta alcanzar 100% de confluencia. Las células se lavaron con 2 ml de PBS y se agregó medio libre de suero durante 12 hrs, con el fin de sincronizarlas en la fase G0/G1 del ciclo celular (condiciones de arresto). Posteriormente las células se estimularon con medio F-12 suplementado con 5% de SFB y se realizó la herida transversal al cultivo. Las placas fueron monitoreadas a las 0 y 48hrs por microscopia, y se determinó la amplitud de la cicatriz.

7. Resultados.

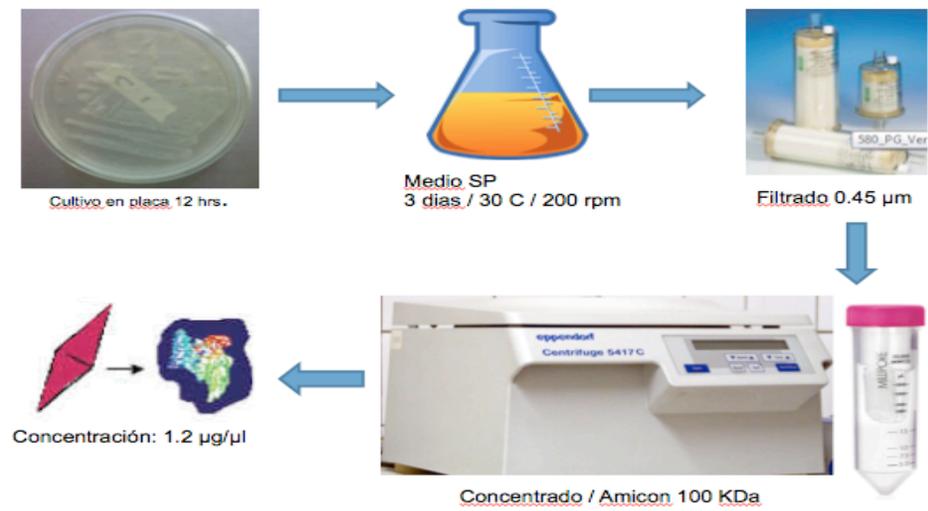
7.1 Caracterización y purificación de las toxinas Cry.

Durante trabajos previos en el laboratorio se aisló y caracterizó de cierta medida diferentes clonas de *Bacillus* en la región de baja California, de las cuales se demostró que algunas presentaban actividad anticancerígena (Mendoza Almanza Gretel 2011, Olmos Soto Jorge et al. 2012). Basándonos el trabajo de Gretel Mendoza observamos los principales inconvenientes presentados, por lo que ideamos un nuevo sistema de purificación que nos permitiera caracterizar de manera más específica las proteínas aisladas con actividad anticancerígenas. Este nuevo sistema de purificación se basa en la separación de las proteínas por tamaño, tomando en cuenta que los cristales son de menor tamaño que las esporas y desechos células presentes en nuestro cultivo. Utilizando filtros con membranas de nitrocelulosa de $0.45\mu\text{m}$ se logró aislar principalmente nuestras proteínas de interés, eliminando algunas proteínas y esporas que representaban un ruido de fondo en muchos ensayos de caracterización. Una vez realizado lo anterior se procedió a concentrar la muestra utilizando Amicones de 100 KDa, los cuales son tubos con capacidad para 15ml de muestra, que mediante membranas de nitrocelulosa de 100 KDa y por centrifugación nos permiten concentrar la muestra a menor escala (Fig.7). Se realizó un análisis genómico para caracterizar a las toxinas presentes en las distintas clonas, confirmando mediante PCR (polymerase chain reaction) los resultados obtenidos con anterioridad en el laboratorio (Efraín Arias Bañuelos 2011, Olmos Soto Jorge et al. 2012). Estos resultados evidenciaban que la clona X formaba un consorcio de cinco proteínas mientras que la clona Y mostraba la expresión de una sola toxina. Confirmando lo anterior y utilizando el nuevo sistema de purificación se realizó el análisis de las toxinas por el método de separación por cargas,

esto mediante el uso de electroforesis, en un gel de poliacrilamida al 10% (SDS-PAGE), y HPLC (High-performance liquid chromatography), con la finalidad de obtener un resultado más detallado de la caracterización de las toxinas (Fig.8a,b). Los resultados obtenidos mediante el uso de estas técnicas concordaron con los obtenidos en el análisis genómico, evidenciando la presencia de un consorcio en una de las clonas y la expresión de una sola toxina en la otra clona (Fig. 8b).

A)

Purificación de toxinas.



B)

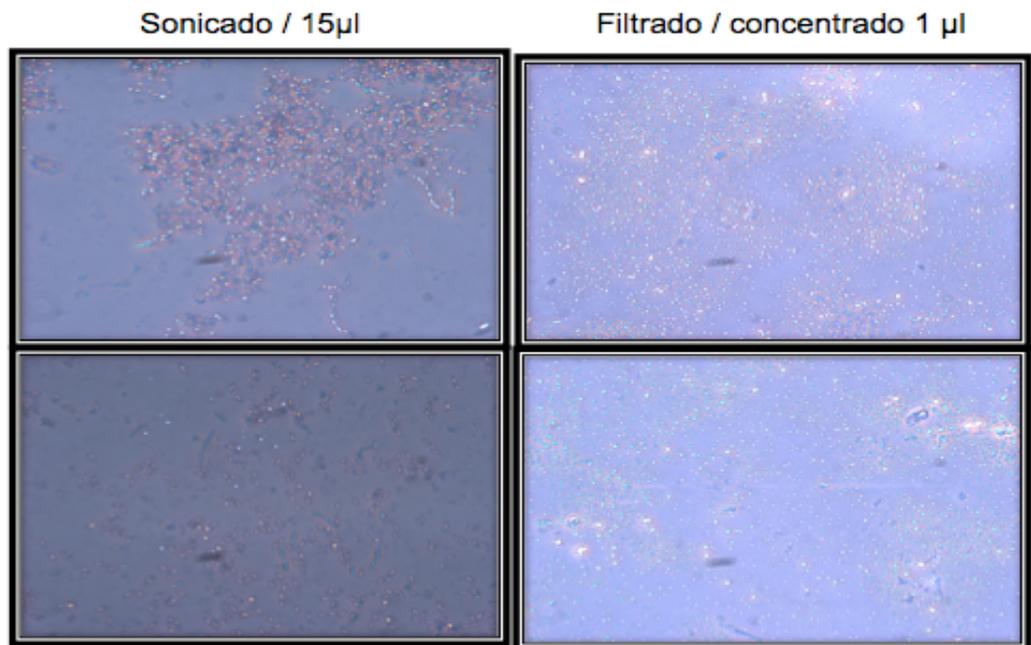
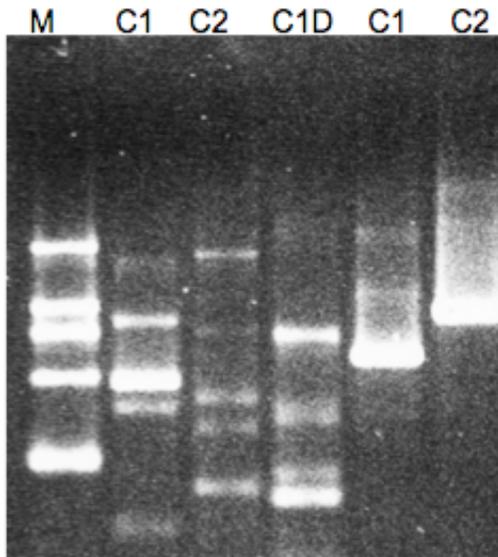


Fig.7 Purificación de las proteínas Cry.

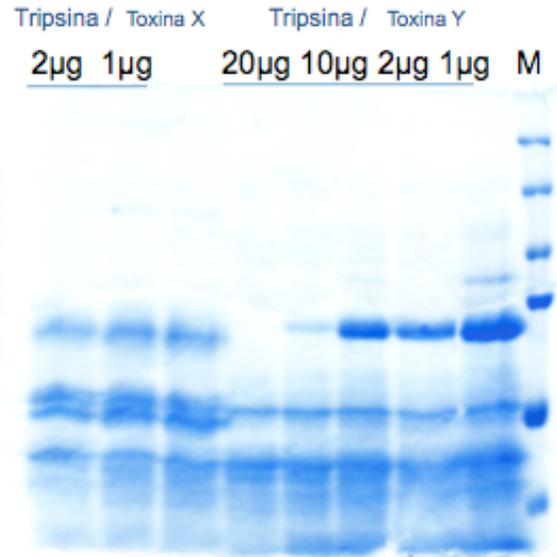
A) Representación esquemática de la metodología de purificación de las proteínas parasporales. B) Imagen en contraste de fases de los cristales purificados por filtración.

A)

a.1)

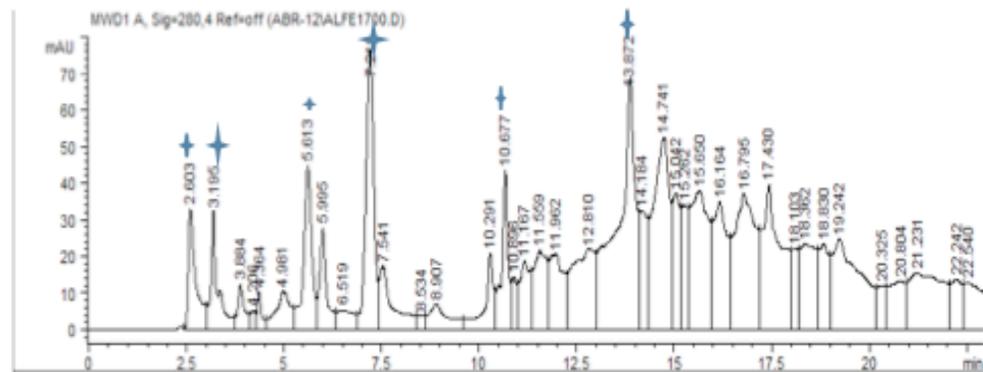


a.2)

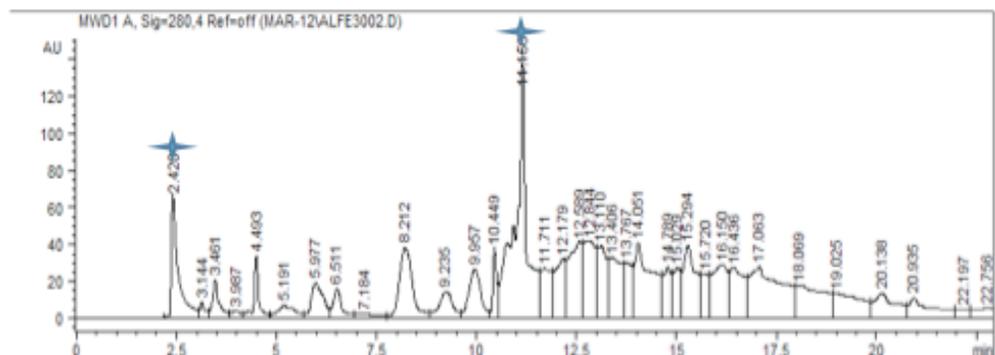


B)

Toxina X



Toxina Y



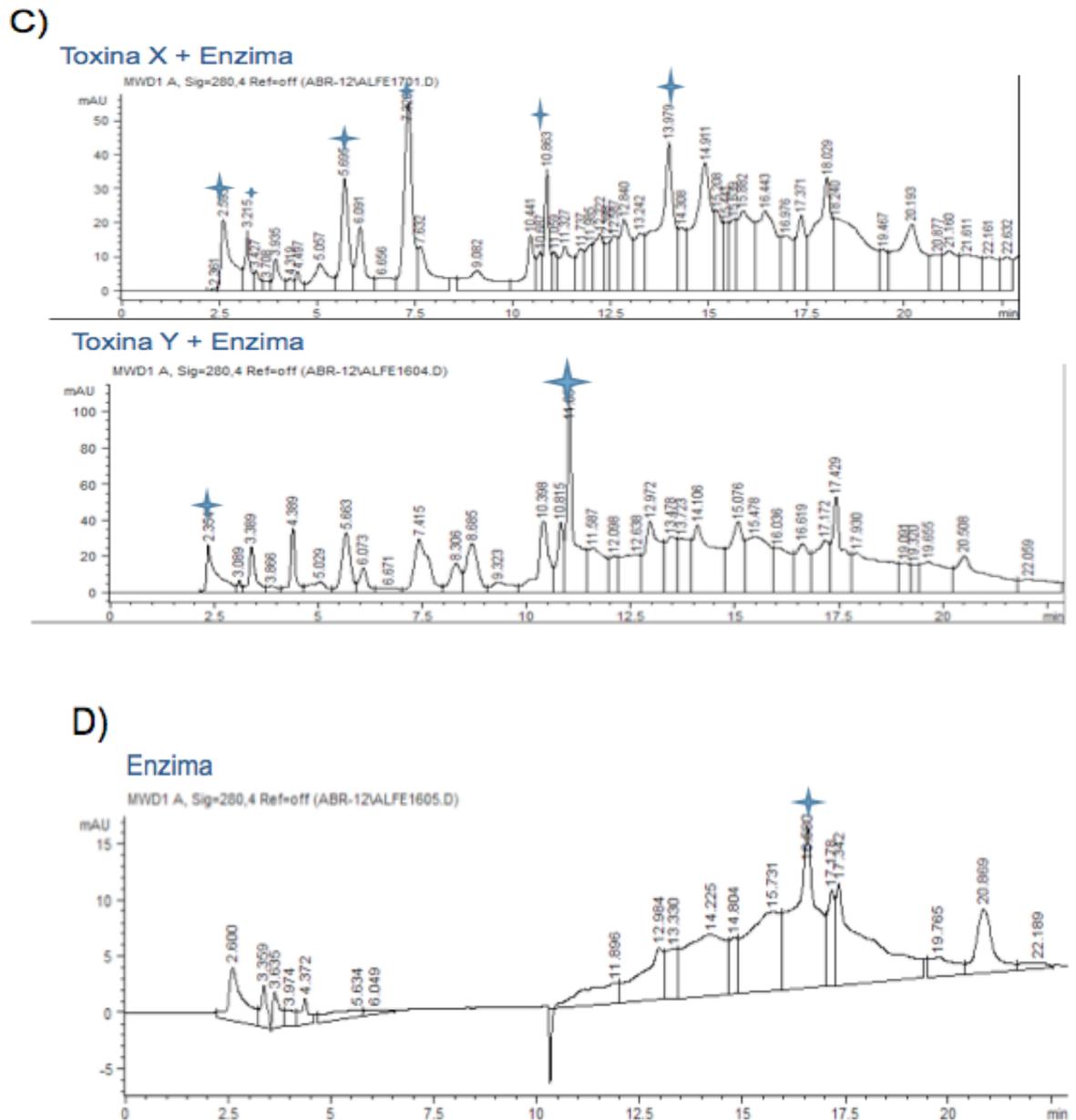


Fig.8 Caracterización de las clonas.

Se realizó un análisis tanto genómico como molecular de las proteínas Cry presentes en las clonas aisladas de la región de Baja California. A.1) Mediante la técnica de PCR se analizó que genes se están expresando en las distintas clonas aisladas, se utilizaron los oligos generales para la familia tanto de las toxinas Cry1 (C1) como de la Cry2 (C2) así como el específico para Cry1D (C1D). A.2) Las proteínas purificadas se analizaron en un gel de poliacrilamida al 10% incubándolas a diferentes concentraciones de la enzima tripsina. B) Se realizó el ensayo de HPLC de las muestras purificadas por el método de filtración. C) Las muestras de igual forma que en el gel de proteínas se incubaron con $2\mu\text{g}$ de tripsina. D) Control del ensayo de HPLC en donde se corrió solamente la enzima para evaluar el tiempo de retención de la enzima.

7.2 En células tumorales las toxinas Cry inactiva la vía de PI3K/AKT.

La vía de señalización PI3K/Akt (fosfatidilinositol 3-cinasa / proteína cinasa B) desempeña un papel crucial en el crecimiento y supervivencia celular. La desregulación positiva de esta vía se ha manifestado en diferentes líneas celulares de origen cancerígeno, por lo que la inhibición o bloqueo constitutivo de esta vía de señalización provee una nueva terapia prometedora contra el cáncer (Jonathan M. Backer et al. 2012). El bloqueo determinado de la vía podría permitir la activación del mecanismo de inhibición por contacto, el cual se presenta en células normales, en donde la expresión del factor de transcripción merlín permitiría la represión de genes involucrados en proliferación (Barry M. Gumbiner et al. 2011).

Recientemente se ha reportado en células epiteliales que ha determinadas concentraciones (sublíticas) de diferentes toxinas formadoras de poro como hemolisinas (HlyA), aerolisina, α -toxinas son capaces de estimular fosfatasaes específicas que inactivan a Akt (Alejandra Bravo et al. 2011). Sin embargo, no existe reporte alguno del papel que juegan las toxinas Cry en la inactivación de la vía PI3K/Akt en líneas cancerígenas. Tomando en cuenta estos antecedentes sensamos la participación de las toxinas Cry en la inactivación de Akt mediante Western blot (Fig.9). Contrario a lo anteriormente reportado, en donde se establece que las toxinas Cry no presentan actividad significativa en células de mamíferos, nosotros demostramos que en la línea celular de cáncer de mama MDA-231 las toxinas "Y" y el consorcio "X" inactiva la fosforilación de Akt, por lo que esto repercute de manera directa en los procesos de proliferación, migración y muerte celular.

De manera sorprendente también se demostró que dichas toxinas Cry no presentaban actividad citotóxica, de manera significativa, en células no tumorales de queratinocitos humanos (HaCat). Estos resultados demuestran la especificidad de las toxinas sobre receptores expresados en

mayor medida en células tumorales, en este caso en células de cáncer de mama (MDA-231).

Lo anterior mencionado nos lleva a pensar que las toxinas Cry inducen señalización celular al interactuar con un receptor de membrana y no solo presentan actividad mediante la formación de poro, esto en células tumorales.

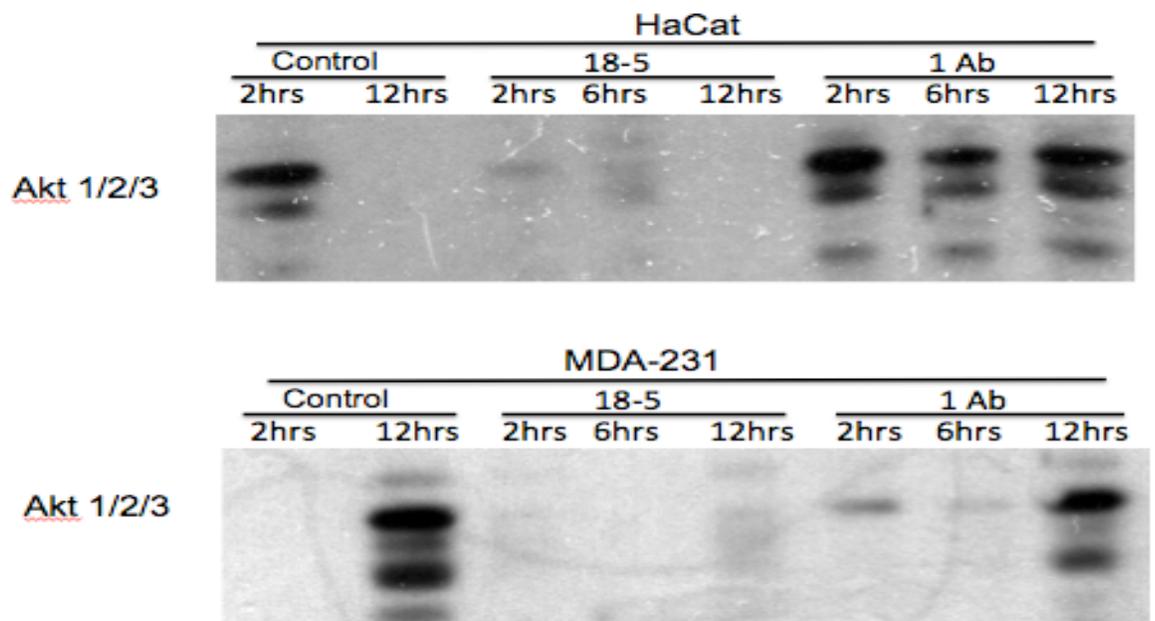


Fig.9 Inactivación de la Akt.

Se realizó una cinética de 3 tiempos (2,6,12 horas) para evaluar la capacidad de las toxinas para inhibir a la cinasa Akt. A) Muestra el ensayo realizado en queratinocitos humanos (HaCat), en donde mediante Western blot se analizó la activación de Akt. B) En células tumorales MDA-231 se midió la activación de Akt mediante Western blot.

7.3 Las toxinas Cry inactivan la vía de PI3K/AKT a través del bloqueo de un receptor de adhesión celular.

Mediante y envase a la especificidad mostrada sobre células tumorales MDA-231, nos planteamos la idea de identificar un posible receptor sobre expresado en dichas células y que a su vez no este presente en células no transformadas HaCat, ya que en estas últimas las toxinas Cry no presentaron actividad significativa.

El mecanismo de acción de las toxinas Cry se ha caracterizado muy bien en insectos ya que su principal actividad ha sido relacionada como un potente bioinsecticida. En base a este modelo, en donde las toxinas reconocen a un receptor de adhesión celular tipo caderina para iniciar su actividad citotóxica, analizamos el perfil de receptores de adhesión celular tipo caderinas que estuviesen presentes en mencionadas células de origen tumoral (MDA-231) y no transformadas (HaCat) (Fig.10). Siguiendo esta lógica se identifico a la cederina-11 como receptor expresado en mayor medida en las células tumorales MDA-231, y a su vez se identificó a la caderina-E como receptor expresado en las células de queratinocitos humanos (HaCat). Estos resultados se obtuvieron utilizando anticuerpos específicos contra caderina-E y caderina-11 en los ensayos de western blot e inmunofluorescencia (los ensayos de western blot fueron reportados, J. Wheelock et al. 1999).

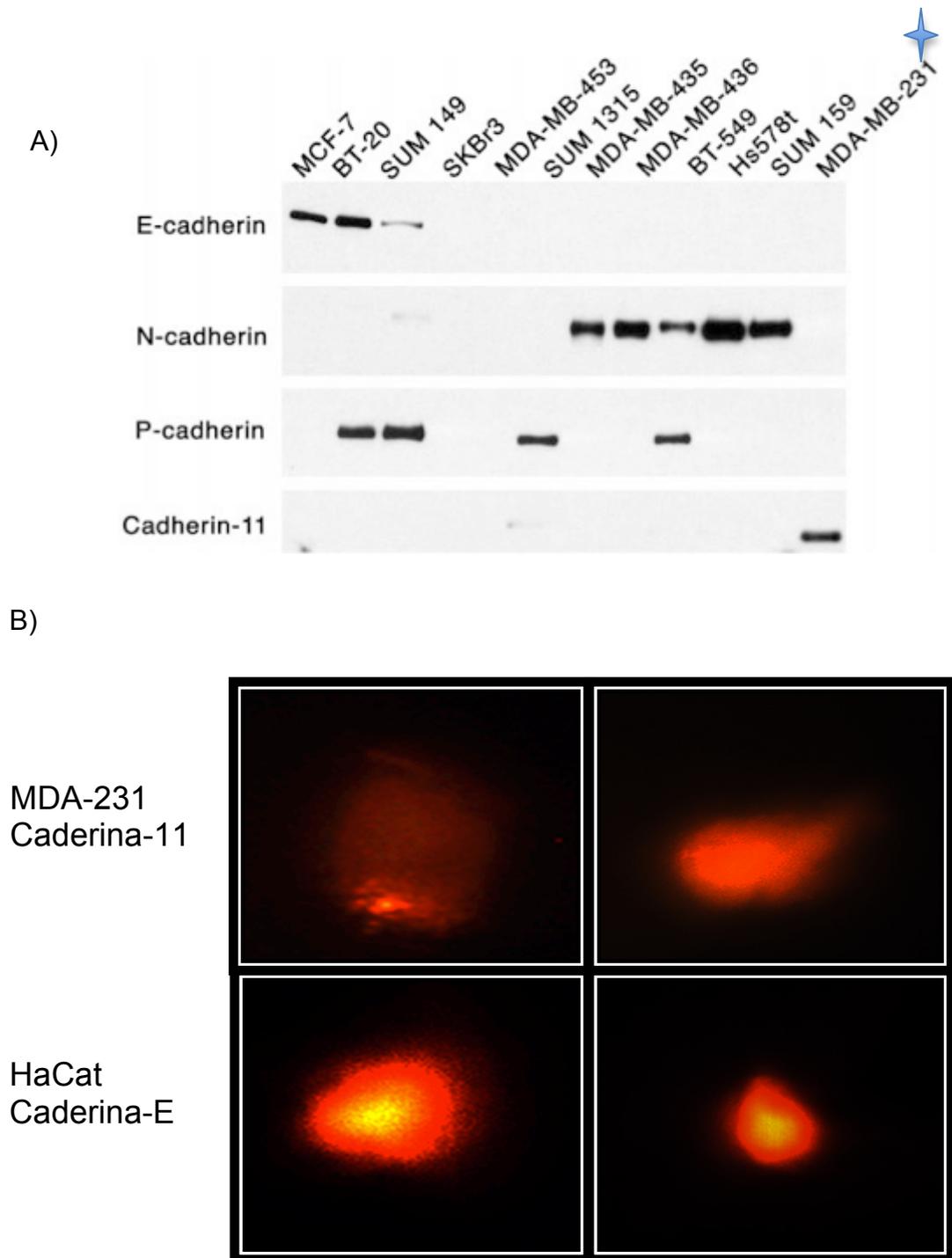


Fig. 10 Expresión de receptores de tipo caderina en células tumorales.

Se identificó mediante western Biot e inmunofluorescencia los diferentes receptores de adhesión celular que pudieran estar interaccionando con las toxinas. A) Ensayo de western blot, B) Inmunofluorescencia.

7.4 Las toxinas Cry no estimulan o señalizan de manera significativa a algún receptor de membrana en células no transformadas.

Como se mencionó con anterioridad en insectos el receptor de mayor especificidad de las toxinas Cry es tipo caderina, sin embargo existen algunos otros receptores que pudieran estar interaccionando con las toxinas y desencadenar de esta manera su potencial bioinsecticida, como es el caso de la aminopeptidasa-N (APN), glucolípidos de membrana y la fosfatasa alcalina (ALP). Conforme a estos antecedentes se evaluó el papel que podría estar jugando la caderina-E, presente en las células no transformadas, al no interaccionar con las toxinas, así como la presencia y posible interacción con la toxina de los demás receptores mencionados.

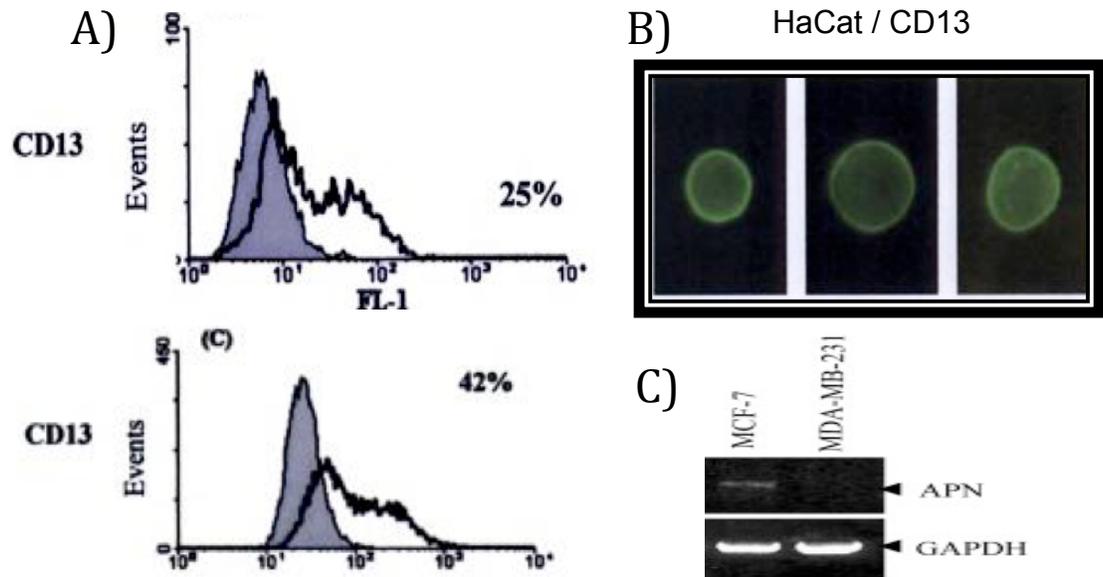
Tomando en cuenta que las toxinas presentaron actividad en las células que expresan caderina-11 se realizó una caracterización in silico de ambos receptores con la finalidad de evaluar las principales diferencias que pudieran estar atribuyendo la actividad citotóxica a las toxinas.

Aunado a esto también se analizaron los niveles de expresión, tanto en las células tumorales (MDA-231) como en las no transformadas (HaCat), de los receptores anteriormente mencionados que pudieran tener interacción con las toxinas Cry (Fig.11-12), (Milivoj Boranic et al. 2003).

Como se observó con anterioridad las células de queratinocitos humano no presentaron expresión de caderina-11 ni ALP (de forma significativa), sin embargo sí expresan APN aunque en menor medida. Cabe mencionar que la especificidad de las toxinas Cry sobre la APN es muy baja. Por lo que la poca actividad de las toxinas en células HaCat se puede atribuir a la interacción con APN y con glucolípidos de membrana.

La caracterización de ambos receptores de adhesión reveló que existen diferencias en la estructura cuaternaria de las proteínas, ya que el porcentaje de alfa hélices y beta plegadas difiere, así como el contenido de dominios Pfam. Estos dominios (WD40 y BSD_transp_1) se expresan solo

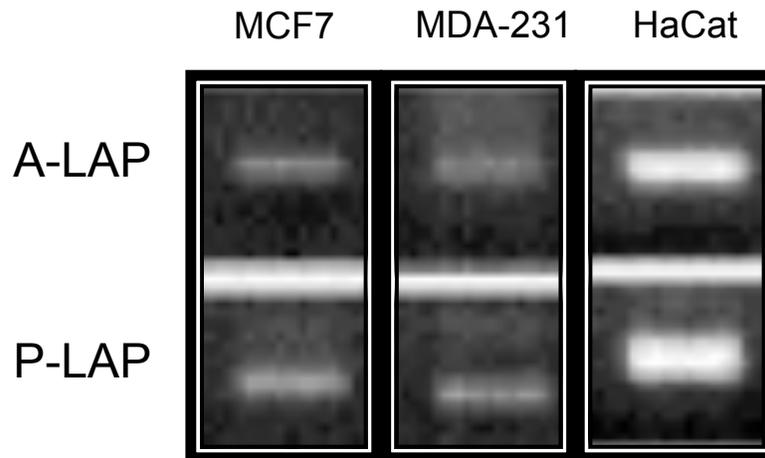
en los receptores caderinas-11, los receptores caderina-E no presentaron ningún dominio Pfam. Estos resultados sustentan aún más el potencial de interacción de las toxinas Cry con los receptores caderina-11.



(Milivoj Boranic, 2003, p. 41)

Fig.11 Expresión de APN.

Se analizó el nivel de expresión de aminopeptidasa-n (CD13). A) Análisis mediante citómetro de flujo en células de cultivo celular y biopsias de tejido primario en células de queratinocitos humanos. B) Inmunofluorescencia anti-CD13 en células HaCat. C) Western blot anti-APN en células de cáncer de mama (MCF-7, MDA-231).



(Milivoj Boranic, 2003, p. 43)

Fig.12 Expresión de fosfatasa alcalina en diversas líneas celulares.

Ensayo de western blot anti-LAP en células de cáncer de mama (MCF-7, MDA-231) y en células de queratinocitos humanos (HaCat) así como en células tumorales MCF7 y MDA-231.

7.5 El bloqueo de la vía de PI3K/AKT por las toxinas inactivan la migración y proliferación celular.

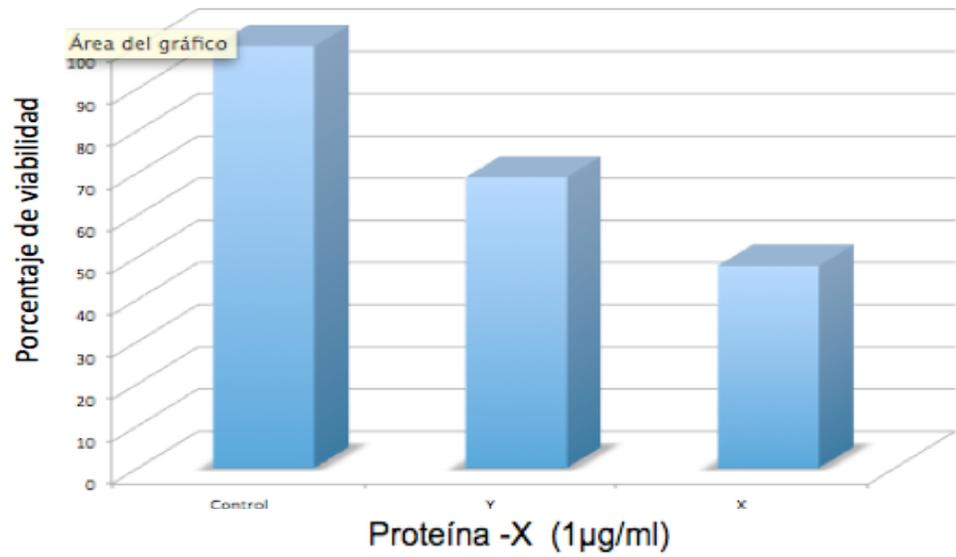
El control del ciclo celular, tráfico vesicular, la inhibición de la apoptosis y la respuesta inflamatoria se han asociado de manera directa a la activación de Akt.

Para evaluar el proceso de proliferación celular se realizó el ensayo de MTT (3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol) con la finalidad de evaluar el número de células viables (Fig. 13a). En este ensayo se pudo determinar que las toxinas "X" e "Y" inducen muerte celular, esto sólo en células tumorales, pudiendo atribuir esta característica a la inactivación de la vía PI3K/Akt. Al inhibir esta vía de señalización se podría argumentar que diversos factores de transcripción como c-Myc, β -catenina y ciclina D1

podrían estar disminuidos, lo que conllevaría a la disminución de la proliferación celular y a su vez a la activación del mecanismo de muerte celular programada.

Al presentarse la inhibición de la proliferación celular se planteó el ensayo de herida en placa para evaluar la capacidad de migración celular en presencia o ausencias de las toxinas Cry (Fig.13b). Conforme con los resultados obtenidos con anterioridad las toxinas evitaron el cerrado de la herida en células tumorales (MDA-231 y Hela (cáncer de próstata)), y de forma contraria aun en presencia de las toxinas las células no transformadas (HaCat) fueron capaces de migrar y cerrar la herida en un periodo de 48 horas. Estos resultados demuestran que las toxinas Cry inhiben tanto el proceso de proliferación como de migración celular.

A)



B)

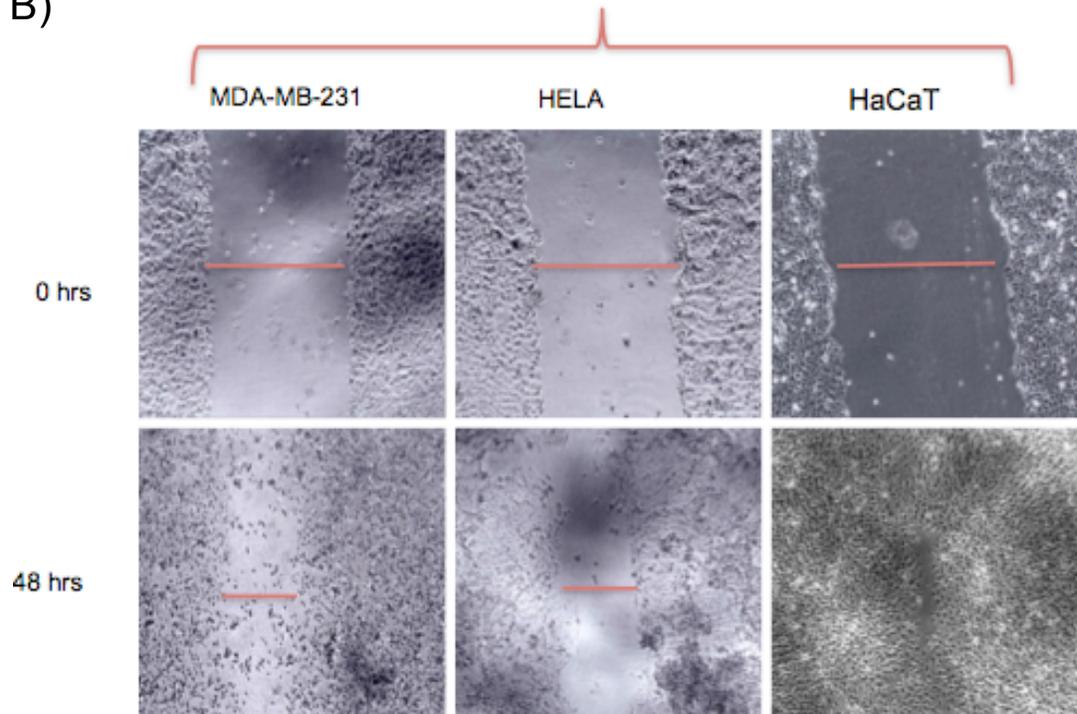


Fig.13 Inhibición de la proliferación y migración celular a través del uso de toxinas Cry.

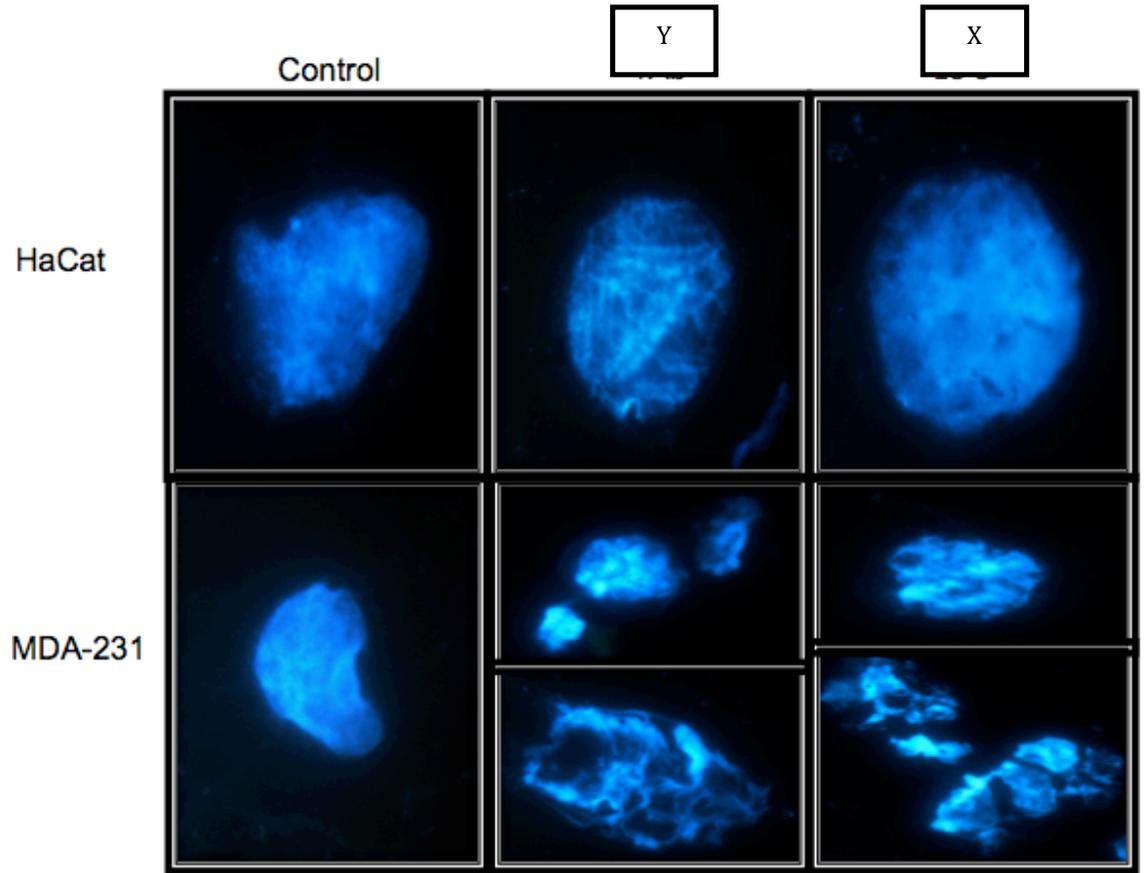
Se realizaron ensayos de viabilidad celular utilizando proteínas parasporales. A) Se midió la proliferación celular mediante el ensayo de MTT. B) La migración celular se analizó realizando un ensayo de herida en placa. En ambos ensayos se utilizó 1 µg de toxina por cada 10,000 células empleadas.

7.6 En células tumorales las toxinas Cry promueven la muerte celular programada.

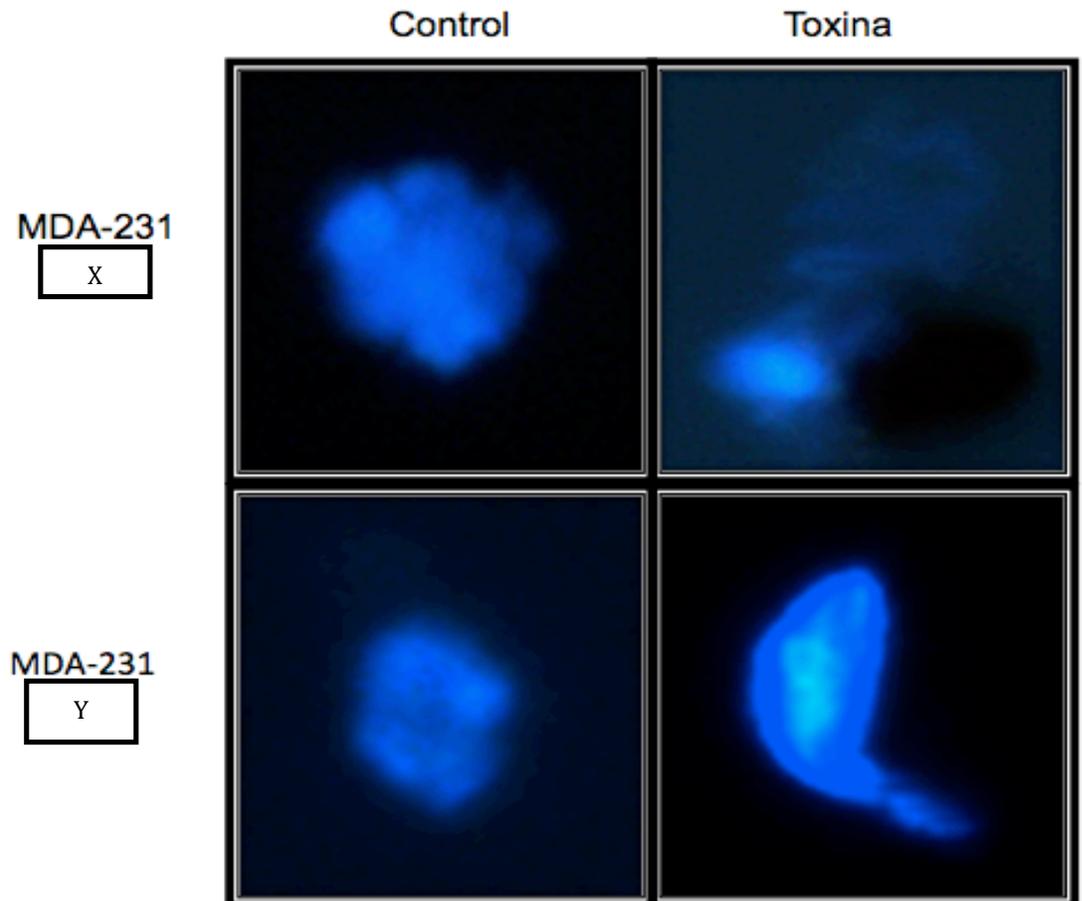
En base a los datos obtenidos en los ensayos de MTT (3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol) se evaluó si las células tratadas con las toxinas Cry sufren un proceso de muerte celular programada (apoptosis) o algún otro proceso como lisis celular. Las características principales observadas en el proceso de apoptosis son la condensación de núcleos y la fragmentación del DNA. Para evaluar si las células tumorales, en presencia de la toxina, sufren estos procesos se realizaron los ensayos de escaleras de DNA, para determinar la fragmentación, y el de tinción de núcleos con DAPI para analizar la condensación (Fig.14 a,c).

Los resultados determinaron lo ya especulado, las células tumorales (MDA-231) presentaron muerte celular programada al estar expuestas a las toxinas Cry manifestando tanto condensación de núcleos como fragmentación de DNA. Estos procesos de muerte no se observaron en las células no transformadas (HaCat) en presencia de toxina. Para confirmar estos resultados se realizó el ensayo de cometa para evaluar la capacidad de migrar el DNA fragmentado en comparación a la incapacidad de hacerlo en células que el DNA aun conserva su estructura de súper enrollamiento (Fig.14b) Estos ensayos confirmaron y sustentaron los datos ya mostrados, donde especulamos que las toxinas Cry inactivan la vía de PI3K/Akt desencadenando una respuesta de muerte celular programada.

A)



B)



C)

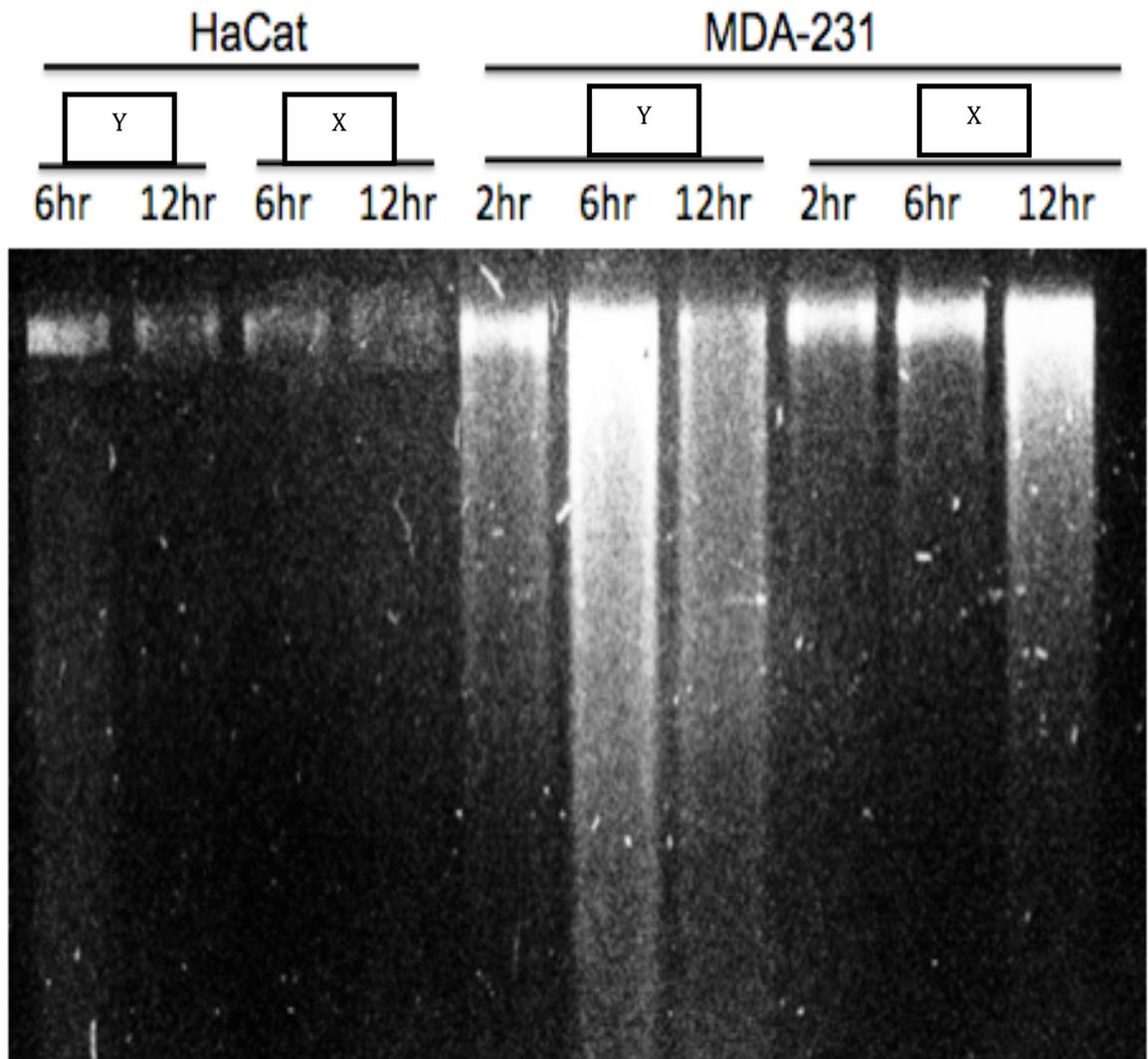


Fig.14 Las toxinas Cry inducen la muerte celular programada.

Se analizó la capacidad de las toxinas Cry para inducir muerte celular programada a través de la inhibición de la vía PI3K/Akt. A) Las células se tiñeron con CAP11 para observar la condensación de la cromatina. B) Se realizó el ensayo de cometa para evaluar la fragmentación del DNA. C) Mediante una cinética de tiempos se analizó la fragmentación del DNA mediante la técnica de escaleras de DNA, esto en un gel de agarosa al 2%.

8. Discusión.

En base a los experimentos realizados y a la literatura citada podemos argumentar que la inactivación de la vía PI3K/Akt es el mecanismo molecular que las toxinas Cry analizadas están utilizando preferencialmente al inducir muerte celular en células tumorales.

Como se planteó en un principio la vía de señalización PI3K/Akt juega un papel crucial en el control de ciclo celular, por ende en la proliferación celular, por lo que su regulación negativa se ha asociado de manera directa a la activación del mecanismo de muerte celular programada (Franke et al. 2008a). En células cancerígenas la regulación positiva de esta vía de señalización se ha relacionado recientemente con la activación de ciertos receptores de adhesión celular, como es el caso de las caderinas, y a diversos receptores de factores de crecimiento, consecuentemente la expresión y presencia en membrana de estos receptores es crucial para la activación de la vía (L. Larue and A. Bellacosa 2010). En el caso de la expresión de las caderinas es un modelo muy estudiado en células tumorales, en donde se ha reportado que dependiendo de la línea celular así como su nivel de confluencia la expresión de estos receptores puede fluctuar. La expresión de la caderina-11 se ha relacionado directamente con la capacidad de migrar y de formar metástasis, así como en ciertas condiciones inducir proliferación, por lo que su expresión se asocia como un mal pronóstico. De forma contraria, a la caderina-E se le ha atribuido un perfil de gen supresor de tumores, el cual se ha reportado que es capaz de inhibir la migración celular y de manera directa induce la expresión de PTEN, el inhibidor natural de Akt (L. Larue and A. Bellacosa 2010). Conforme a estos antecedentes la expresión de caderinas en cáncer es de vital importancia ya que de esta forma las células controlan diversos

procesos durante el desarrollo celular. Por lo tanto dichos receptores se han convertido en blancos moleculares de posibles terapias contra cáncer. En base a los resultados obtenidos en células de cáncer de mama (MDA-231), en donde las toxinas presentan mayor actividad, el mecanismo de acción que estas están siguiendo se podría resumir a su interacción con el receptor de adhesión caderina-11 y al bloqueo de la vía PI3K/Akt.

En este modelo las toxinas interactúan preferencialmente con el receptor de adhesión celular caderina-11 permitiendo de esta manera bloquear la señalización celular emitida por la vía PI3K/Akt, reprimiendo de esta forma la expresión de genes involucrados en proliferación celular como c-Myc y Ciclina D1, lo que conlleva a la regulación positiva de señales apoptóticas (Fig.15). Sin embargo, la señalización celular no es el único mecanismo de acción por el cual las toxinas pudieran estar induciendo muerte en células tumorales, estas al interactuar con el receptor de adhesión celular podrían inducir la formación de un poro en membrana lo que provocaría la lisis y la muerte celular manifestada. La interacción con algún otro receptor de membrana se podría estar dando pero en mucho menor medida ya que la especificidad observada es muy baja pero no nula, en estos casos la concentración de toxina utilizada tendría que ser mucho mayor. Cabe mencionar que estos dos mecanismos de señalización y lisis celular podrían también estar actuando de manera sinérgica y no ser excluyentes uno del otro.

En base a toda esta información podemos inferir que las toxinas Cry de *Bacillus Thuringiensis* presentan actividad anticancerígena interactuando con un receptor de adhesión celular en membrana permitiendo de esta forma tanto la inactivación de la vía de señalización PI3K/Akt como la formación de un poro en membrana que conlleva a la lisis celular. Esta regulación celular permite inhibir tanto la proliferación como la migración celular, esto al inducir muerte celular programada.

Sin embargo, aunque se conocen los mecanismos moleculares que las toxinas desempeñan, aun se desconocen los genes que estas toxinas están regulando transcripcionalmente, ya sea positiva o negativamente, lo que nos permitiría contar la historia completa del mecanismo de acción de las toxinas Cry en células tumorales.

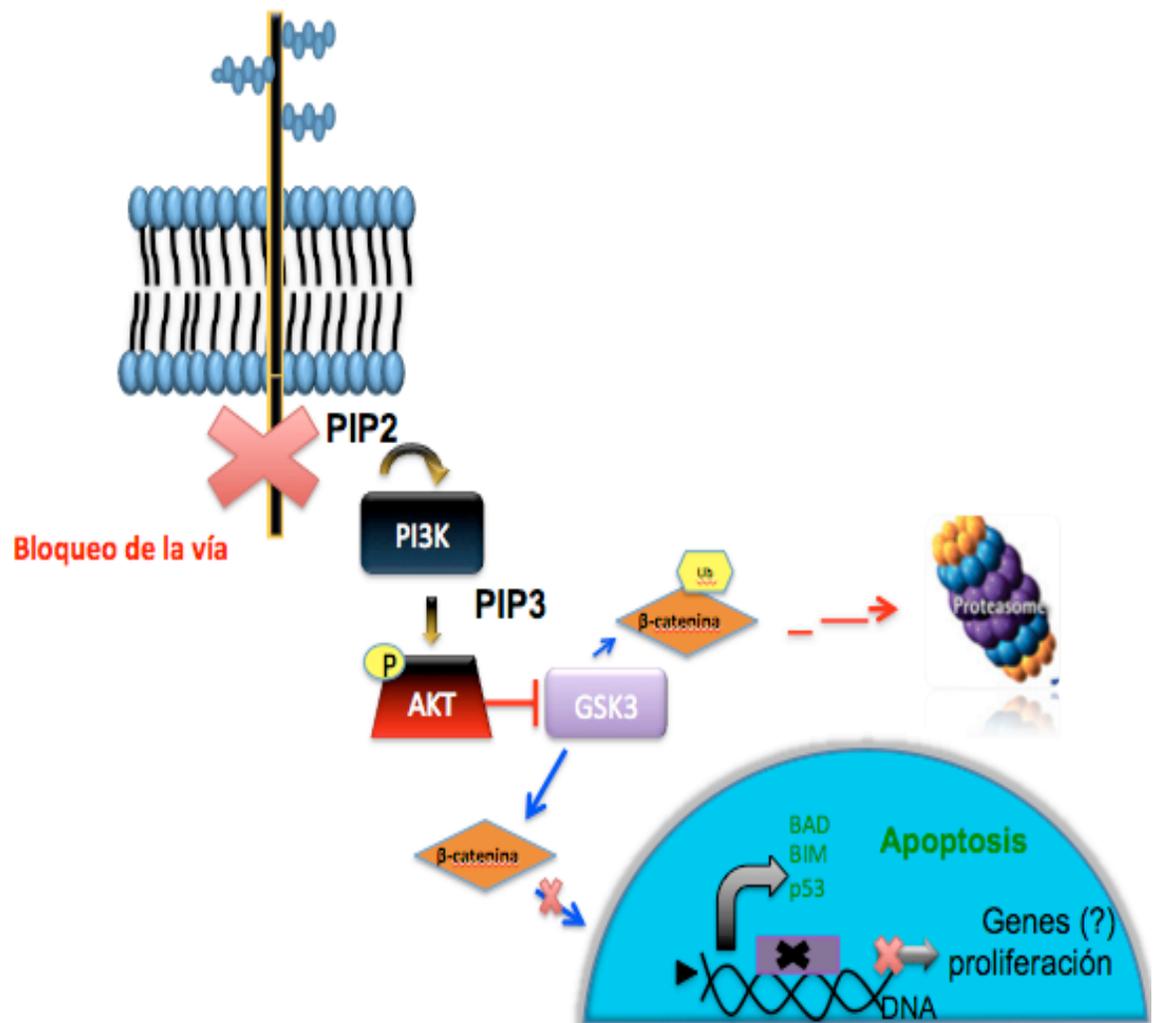


Fig.15 Mecanismo de acción.

En este modelo el receptor de adhesión celular reconoce a las toxinas e induce el bloqueo de la vía de señalización PI3K/Akt induciendo de esta forma la degradación del factor de transcripción β-catenina así como el bloqueo de la expresión de los oncogenes c-Myc y Ciclina D1.

9. Conclusiones.

- En células de cáncer de mama (MDA-231) las toxinas Cry presentaron una mayor actividad citotóxica.
- Las toxinas Cry presentaron una mayor afinidad al interactuar con el receptor de adhesión celular caderina-11.
- Las toxinas Cry en células tumorales MDA-231 inhiben la vía de PI3K/Akt.
- Las proteínas parasporales Cry inhiben tanto la proliferación como la migración celular a través del bloqueo de la vía de señalización PI3K/Akt.
- Las toxinas Cry inducen la muerte celular programada.

10. Perspectivas.

- Determinar los genes regulados tanto positivamente como negativamente por las toxinas Cry al inhibir la vía de señalización PI3K/Akt.
- Descifrar los dominios específicos de interacción entre la toxina y el receptor.
- Realizar los ensayos de actividad citotóxica *in vivo* en modelos de ratones desnudos.
- Realizar un RNAi contra la caderina-11 con la finalidad de sensor su capacidad de interacción con las toxinas Cry. Estos ensayos se realizarían tanto *in vitro* como *in vivo*.
- Evaluar la capacidad citotóxica de las toxinas Cry por separado, en el caso del consorcio, o en diferentes combinaciones entre ellas, con la finalidad de evaluar cual de ellas pudiera presentar una mayor actividad.

Referencias Bibliográficas.

- Abe, Y., Shimada, H. and Kitada, S. 2008. Raft-targeting and oligomerization of Parasporin-2, a *Bacillus thuringiensis* crystal protein with anti-tumour activity. *J. Biochem* 143(2): 269-275.
- Arboleda, M.J., Lyons, J.F., Kabbinar, F.F., Bray, M.R., Snow, B.E., Ayala, R., Danino, M., Karlan, B.Y., and Slamon, D.J. 2003. Overexpression of AKT2/protein kinase Bbeta leads to up-regulation of beta1 integrins, increased invasion, and metastasis of human breast and ovarian cancer cells. *Cancer Res* 63(1): 196-206.
- Arias Bañuelos Efraín 2011. Identificación y caracterización de genes y proteínas CRY de *Bacillus thuringiensis* con actividad citotóxica hacia células de cáncer humano. Tesis de maestría CICESE.
- Barna, M., Pusic, A., Zollo, O., Costa, M., Kondrashov, N., Rego, E., Rao, P.H., and Ruggero, D. 2008. Suppression of Myc oncogenic activity by ribosomal protein haploinsufficiency. *Nature* 456(7224): 971-975.
- Bellacosa A. and Larue L. 2010. PI3K/AKT Pathway and the Epithelial–Mesenchymal Transition. *Cancer Genome and Tumor Microenvironment*, chapter 2: 11-32.
- Bertini, E., Oka, T., Sudol, M., Strano, S., and Blandino, G. 2009. YAP: at the crossroad between transformation and tumor suppression. *Cell Cycle* 8(1): 49-57.
- Blandino, G., Shaul, Y., Strano, S., Sudol, M., and Yaffe, M. 2009. The Hippo tumor suppressor pathway: a brainstorming workshop. *Sci Signal* 2(95): mr6.
- Bowman, T., Broome, M.A., Sinibaldi, D., Wharton, W., Pledger, W.J., Sedivy, J.M., Irby, R., Yeatman, T., Courtneidge, S.A., and Jove, R. 2001. Stat3-mediated Myc expression is required for Src transformation and PDGF-induced mitogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(13): 7319-7324.

- Bravo Alejandra., Gill Sarjeet S., and Mario Soberón Mario 2004. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon* 49(4): 423–435.
- Burgering, B.M. and Coffey, P.J. 1995. Protein kinase B (c-Akt) in phosphatidylinositol-3-OH kinase signal transduction. *Nature* 376(6541): 599-602.
- Carlsson, S.R. and Fukuda, M. 1986. Isolation and characterization of leukosialin, a major sialoglycoprotein on human leukocytes. *J Biol Chem* 261(27): 12779-12786.
- Cheng, J.Q., Ruggeri, B., Klein, W.M., Sonoda, G., Altomare, D.A., Watson, D.K., and Testa, J.R. 1996. Amplification of AKT2 in human pancreatic cells and inhibition of AKT2 expression and tumorigenicity by antisense RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(8): 3636-3641.
- Dbouk HA, Vadas O, Shymanets A, Burke JE, Salamon RS, Khalil BD, Barrett MO, Waldo GL, Surve C, Hsueh C, Perisic O, Harteneck C, Shepherd PR, Harden TK, Smrcka AV, Taussig R, Bresnick AR, Nürnberg B, Williams RL, Backer JM. 2012. G Protein–Coupled Receptor–Mediated Activation of p110b by Gbg Is Required for Cellular Transformation and Invasiveness. *Science Signaling* 5 (253): 1937-9145.
- Franke, T.F. 2008a. Intracellular signaling by Akt: bound to be specific. *Sci Signal* 1(24): pe29.
- Franke, T.F. 2008b. PI3K/Akt: getting it right matters. *Oncogene* 27(50): 6473-6488.
- Freeman, D.J., Li, A.G., Wei, G., Li, H.H., Kertesz, N., Lesche, R., Whale, A.D., Martinez-Diaz, H., Rozengurt, N., Cardiff, R.D. et al. 2003. PTEN tumor suppressor regulates p53 protein levels and activity through phosphatase-dependent and -independent mechanisms. *Cancer Cell* 3(2): 117-130.

- Fukuda, M. and Carlsson, S.R. 1986. Leukosialin, a major sialoglycoprotein on human leukocytes as differentiation antigens. *Med Biol* 64(6): 335-343.
- Gabrilovac Jelka, Čupić Barbara, Breljak Davorka, Zekušić Marija, Boranić Milivoj 2003. Expression of CD13/aminopeptidase N and CD10/neutral endopeptidase on cultured human keratinocytes. *Immunology Letters* 91(1): 39-47.
- Golias, C.H., Charalabopoulos, A., and Charalabopoulos, K. 2004. Cell proliferation and cell cycle control: a mini review. *Int J Clin Pract* 58(12): 1134-1141.
- Gordon R.E., Haynes W.C., Hor-Nay Pang C. 1973. The genus *Bacillus*. USDA handbook, 427. Washington, D.C.
- Hanahan, D. and Weinberg, R.A. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell* 100(1): 57-70.
- Harvey, K. and Tapon, N. 2007. The Salvador-Warts-Hippo pathway - an emerging tumour-suppressor network. *Nat Rev Cancer* 7(3): 182-191.
- Hay, B.A. and Guo, M. 2003. Coupling cell growth, proliferation, and death. Hippo weighs in. *Dev Cell* 5(3): 361-363.
- Khetan SH 2001. Bacterial insecticides, Part 1. Marcel Decker, Massachusetts USA, 99. 3-71.
- Kim Nam-Gyun, Koh Eunjin, Chen Xiao, and M. Gumbiner Barry 2011. E-cadherin mediates contact inhibition of proliferation through Hippo signaling-pathway components. *PNAS* 108 (29): 11930–11935.
- Lin, H.K., Wang, G., Chen, Z., Teruya-Feldstein, J., Liu, Y., Chan, C.H., Yang, W.L., Erdjument-Bromage, H., Nakayama, K.I., Nimer, S. et al. 2009. Phosphorylation-dependent regulation of cytosolic localization and oncogenic function of Skp2 by Akt/PKB. *Nat Cell Biol* 11(4): 420-432.
- Lopez-Meza Joel E. and Ibarra Jorge E. 1996. Characterization of a Novel Strain of *Bacillus thuringiensis*. *Applied and Environmental Microbiology* 62(4): 1306–1310.

- Maemura, K. and Fukuda, M. 1992. Poly-N-acetyllactosaminyl O-glycans attached to leukosialin. The presence of sialyl Le(x) structures in O-glycans. *J Biol Chem* 267(34): 24379-24386.
- Malumbres, M. and Barbacid, M. 2009. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nat Rev Cancer* 9(3): 153-166.
- Malumbres, M., Harlow, E., Hunt, T., Hunter, T., Lahti, J.M., Manning, G., Morgan, D.O., Tsai, L.H., and Wolgemuth, D.J. 2009. Cyclin-dependent kinases: a family portrait. *Nat Cell Biol* 11(11): 1275-1276.
- Marianne Puztai., Paul Fast., Larry Gringorten., Harvey Kaplan., Timothy Lessard and Paul R. Carey 1991. The mechanism of sunlight-mediated inactivation of *Bacillus thuringiensis* crystals. *Biochem J.* 273(1): 43-47.
- McClatchey, A.I. 2003. Merlin and ERM proteins: unappreciated roles in cancer development? *Nat Rev Cancer* 3(11): 877-883.
- McFarland, T.A., Ardman, B., Manjunath, N., Fabry, J.A., and Lieberman, J. Moon, N.S., Di Stefano, L., Morris, E.J., Patel, R., White, K., and Dyson, N.J. 2008. E2F and p53 induce apoptosis independently during *Drosophila* development but intersect in the context of DNA damage. *PLoS Genet* 4(8): 1-10.
- Mendoza Almaza Gretel 2011. Aislamiento y caracterización de las toxinas CRY de *Bacillus Thuringiensis* con actividad citócidica sobre células de cáncer cervicouterino *in vitro* e *in vivo*. Tesis de doctorado CICESE.
- Morris, E.J., Ji, J.Y., Yang, F., Di Stefano, L., Herr, A., Moon, N.S., Kwon, E.J., Haigis, K.M., Naar, A.M., and Dyson, N.J. 2008. E2F1 represses beta-catenin transcription and is antagonized by both pRB and CDK8. *Nature* 455(7212): 552-556.
- Morrison, H., Sherman, L.S., Legg, J., Banine, F., Isacke, C., Haipek, C.A., Gutmann, D.H., Ponta, H., and Herrlich, P. 2001. The NF2 tumor suppressor gene product, merlin, mediates contact inhibition of growth through interactions with CD44. *Genes Dev* 15(8): 968-980.

- Nachimuthu Saraswathy., Polumetla Ananda Kumar 2004. Protein engineering of d-endotoxins of *Bacillus thuringiensis*. *Electronic Journal of Biotechnology* 7(2): 2311-2317.
- Nieman MT, Prudoff RS, Johnson KR, Wheelock MJ 1999. N-Cadherin Promotes Motility in Human Breast Cancer Cells Regardless of their E-Cadherin Expression. *The Journal of Cell Biology* 147(3): 631-643.
- Nuria Jiménez-Juárez Nuria, Muñoz-Garay Carlos, Gómez Isabel, Saab-Rincon Gloria, Y. Juanita, Almazo-Damian, Gill Sarjeet S., Mario Soberón Mario, and Bravo Alejandra 2007. *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab Mutants Affecting Oligomer Formation Are Non-toxic to *Manduca sexta* Larvae. *The American Society for Biochemistry and Molecular Biology* 282 (29): 21222–21229.
- Nusse, R. 2005. Wnt signaling in disease and in development. *Cell Res* 15(1): 28-32.
- Okada, M., Wang, Y., Jang, S.W., Tang, X., Neri, L.M., and Ye, K. 2009. Akt phosphorylation of merlin enhances its binding to phosphatidylinositols and inhibits the tumor-suppressive activities of merlin. *Cancer Res* 69(9): 4043-4051.
- Olmos Soto Jorge, Arias Bañuelos Efraín, Mendoza Almaza Gretel 2012. Proteínas CRY insecticidas de *Bacillus Thuringiensis* con actividad anticancerígena. PCT (solicitud de patente), número de publicación internacional: W0 2012/080985 A2.
- Pang, S.T., Fang, X., Valdman, A., Norstedt, G., Pousette, A., Egevad, L., and Ekman, P. 2004. Expression of ezrin in prostatic intraepithelial neoplasia. *Urology* 63(3): 609-612.
- Porta Helena, Cancino-Rodezno Angeles, Soberón Mario, Bravo Alejandra 2010. Role of MAPK p38 in the cellular responses to pore-forming toxins. *Peptides* 32 (3): 601–606.

- Rajamohan Francis, Alzate Oscar, A. Cotrill Jeffrey, Curtiss April, and H. Dean Donald 1996. Protein engineering of *Bacillus thuringiensis* endotoxin: Mutations at domain II of CryIAb enhance receptor affinity and toxicity toward gypsy moth larvae. *Applied Biological Sciences* 93 (25):14338–14343.
- Ren, L., Hong, S.H., Cassavaugh, J., Osborne, T., Chou, A.J., Kim, S.Y., Gorlick, R., Hewitt, S.M., and Khanna, C. 2009. The actin-cytoskeleton linker protein ezrin is regulated during osteosarcoma metastasis by PKC. *Oncogene* 28(6): 792-802.
- Rossig, L., Jadidi, A.S., Urbich, C., Badorff, C., Zeiher, A.M., and Dimmeler, S. 2001. Akt-dependent phosphorylation of p21(Cip1) regulates PCNA binding and proliferation of endothelial cells. *Mol Cell Biol* 21(16): 5644-5657.
- Rouleau, G.A., Merel, P., Lutchman, M., Sanson, M., Zucman, J., Marineau, C., Hoang-Xuan, K., Demczuk, S., Desmaze, C., Plougastel, B. et al. 1993. Alteration in a new gene encoding a putative membrane-organizing protein causes neuro-fibromatosis type 2. *Nature* 363(6429): 515-521.
- Ryoo, H.D. and Steller, H. 2003. Hippo and its mission for growth control. *Nat Cell Biol* 5(10): 853-855.
- Santra, M.K., Wajapeyee, N., and Green, M.R. 2009. F-box protein FBXO31 mediates cyclin D1 degradation to induce G1 arrest after DNA damage. *Nature* 459(7247): 722-725.
- Saitoh, H., Okumura, S., Ishikawa, T., Akao, T., Mizuki, E. and Ohba, M. 2006. Investigation of a novel *Bacillus thuringiensis* gene encoding a parasporal protein, parasporin-4, that preferentially kills leukaemic T cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 70(20): 2935-2941.
- Satyanarayana, A. and Kaldis, P. 2009. Mammalian cell-cycle regulation: several Cdks, numerous cyclins and diverse compensatory mechanisms. *Oncogene* 28(33): 2925-2939.

- Schnepf E., Crickmore N., Van rie J., Lereclus D., Baum J., Feitelson J., Zeigler D. R., Dean D. H. 1998. *Bacillus thuringiensis* and Its Pesticidal Crystal Proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(3): 775–806.
- Stelma GN, Jr, Aronson AI, Fitz-James PC 1980. A *Bacillus cereus* mutant defective in spore coat deposition. *J Gen Microbiol.* 116(1):173–185.
- Suzuki, J. and Shishido, T. 2007. Regulation of cellular transformation by oncogenic and normal Abl kinases. *J Biochem* 141(4): 453-458.
- Takeshi Yagi and Masatoshi Takeichi 2000. Cadherin superfamily genes: functions, genomic organization, and neurologic diversity. *Genes Dev.* 14: 1169-1180.
- Tang, X., Jang, S.W., Wang, X., Liu, Z., Bahr, S.M., Sun, S.Y., Brat, D., Gutmann, D.H., and Ye, K. 2007. Akt phosphorylation regulates the tumour-suppressor merlin through ubiquitination and degradation. *Nat Cell Bio/* 9(10): 1199-1207.
- Van Maerken, T., Vandesompele, J., Rihani, A., De Paepe, A., and Speleman, F. 2009. Escape from p53-mediated tumor surveillance in neuroblastoma: switching off the p14(ARF)-MDM2-p53 axis. *Cell Death Differ* 16(12): 1563-1572.
- Weng, W.H., Ahlen, J., Astrom, K., Lui, W.O., and Larsson, C. 2005. Prognostic impact of immunohistochemical expression of ezrin in highly malignant soft tissue sarcomas. *Clin Cancer Res* 11(17): 6198-6204.
- Whibley, C., Pharoah, P.D., and Hollstein, M. 2009. p53 polymorphisms: cancer implications. *Nat Rev Cancer* 9(2): 95-107.
- Whitfield, M.L., George, L.K., Grant, G.D., and Perou, C.M. 2006. Common markers of proliferation. *Nat Rev Cancer* 6(2): 99-106.

- Witze, E.S., Litman, E.S., Argast, G.M., Moon, R.T., and Ahn, N.G. 2008. Wnt5a control of cell polarity and directional movement by polarized redistribution of adhesion receptors. *Science* 320(5874): 365-369.
- Wong Alice S.T. and Gumbiner Barry M. 2003. Adhesion-independent mechanism for suppression of tumor cell invasion by E-cadherin. *The Journal of Cell Biology*, Volume 161, (6): 1191–1203.
- Wu, K.L., Khan, S., Lakhe-Reddy, S., Jarad, G., Mukherjee, A., Obejero-Paz, C.A., Konieczkowski, M., Sedor, J.R., and Schelling, J.R. 2004. The NHE1 Na⁺/H⁺ exchanger recruits ezrin/radixin/moesin proteins to regulate Akt-dependent cell survival. *J Biol Chem* 279(25): 26280-26286.
- Yu, H., Pardoll, D., and Jove, R. 2009. STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3. *Nat Rev Cancer* 9(11): 798-809.
- Zeller, K.I., Zhao, X., Lee, C.W., Chiu, K.P., Yao, F., Yustein, J.T., Ooi, H.S., Orlov, Y.L., Shahab, A., Yong, H.C. et al. 2006. Global mapping of c-Myc binding sites and target gene networks in human B cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(47): 17834-17839.
- Zha, J., Harada, H., Yang, E., Jockel, J., and Korsmeyer, S.J. 1996. Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L). *Cell* 87(4): 619-628.
- Zhang X, Candas M, Griko NB, Taussig R, Bulla LA Jr. 2006. A mechanism of cell death involving an adenylyl cyclase/PKA signaling pathway is induced by the Cry1Ab toxin of *Bacillus thuringiensis*. *PNAS* 103 (26): 9897-9902.
- Zhao, B., Lei, Q.Y., and Guan, K.L. 2008. The Hippo-YAP pathway: new connections between regulation of organ size and cancer. *Curr Opin Cell Biol* 20(6): 638-646.

- Zhao, B., Wei, X., Li, W., Udan, R.S., Yang, Q., Kim, J., Xie, J., Ikenoue, T., Yu, J., Li, L. et al. 2007. Inactivation of YAP oncoprotein by the Hippo pathway is involved in cell contact inhibition and tissue growth control. *Genes Dev* 21(21): 2747-2761.

12. ANEXOS

ABREVIATURAS.

AFP	Alfa-fetoproteína.
APC	Adenomatous Polyposis Coli.
APN	Aminopeptidasa.
ARF	Marco de lectura abierto.
BCR	Receptor de células B.
BT	Bacillus Thuringiensis.
CDKs	Cinasas dependientes de ciclinas.
CoX2	Ciclooxigenasa 2.
DTT	Ditiotretiol.
EGF	Factor de crecimiento epitelial.
EGF-R	Receptor para el factor de crecimiento epidérmico.
ERM	Familia de proteínas de Ezrina, Radixina, Moesina.
ERK1/2	Cinasa regulada por señales extracelulares 1 y 2.
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos.
GAD54	Acido glutamico decarboxilasa.
GSK3	Cinasa 3 de la glicógeno sintetasa.
Grb2	Proteína unida al receptor para el factor de crecimiento
GRK2	Cinasa 2 acoplada al receptor de proteína G.
HGF-R	Receptor para el factor de crecimiento de hepatocitos.
ICAM-1	Molécula de adhesión intracelular 1.
LB	Medio de cultivo bacteriano (Luria-Bertani).
MAPKs	Proteínas cinasas activadas por mitogeno.
MACs	Moleculas de adhesión celular.
MDM2	Doble "minute" murino.
NF-κB	Factor nuclear κB.
NGF-R	Receptor para factor de crecimiento neuronal.
NLS	Secuencia de localización nuclear.

PBS	Buffer de fosfatos salino.
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas.
PI3K	Fosfatidil-inositol 3 cinasa.
PKC	Proteína cinasa C.
PTEN	Fosfatasa y homologo de tensina.
Rb	Proteína retinoblastoma.
RTK	Receptor con actividad de cinasa de tirosina.
SDS-PAGE	Gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sodio.
SFB	Suero fetal bovino.
SH2 (dominio)	Dominio tipo 2 con homología a Scr.
SH3 (dominio)	Dominio tipo 3 con homología a Scr.
SKP2	Proteína 2 cinasa asociada a la fase-S.
STAT	Transductores de señales y activadores de la transcripción.
TCF-4	Factor 4 "enhancer" de células T.
TGF α	Factor de crecimiento tumoral α .
TNF	Factor de necrosis tumoral.
VEGF	Factor de crecimiento del endotelio vascular.