

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS**



“Aislamiento y caracterización de proteínas capa s de *Bacillus sp*
que presenten actividad citotóxica sobre líneas celulares de cáncer”

T E S I S

QUE PARA CUBRIR PARCIALMENTE LOS REQUISITOS NECESARIOS
PARA OBTENER EL GRADO DE

**DOCTOR EN CIENCIAS EN ECOLOGÍA MOLECULAR y
BIOTECNOLOGÍA**

PRESENTA

SILVIA VIVIANA PITONES RUBIO

ENSENADA, BAJA CALIFORNIA, MEXICO. Noviembre, 2016.

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS
POSGRADO EN ECOLOGÍA MOLECULAR y BIOTECNOLOGÍA

“Aislamiento y caracterización de proteínas caps de *Bacillus sp*
que presenten actividad citotóxica sobre líneas celulares de cáncer”

T E S I S

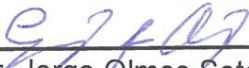
QUE PARA CUBRIR PARCIALMENTE LOS REQUISITOS NECESARIOS
PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

SILVIA VIVIANA PITONES RUBIO

Aprobada por:



Dr. Jorge Olmos Soto
Director de tesis



Dra. Amelia Portillo López
Codirectora



Dr. José de Jesús Paniagua Michel
Sinodal



Dra. Ivone Giffard Mena
Sinodal



Dr. Heriberto Márquez Becerra
Sinodal

Resumen

Bacillus thuringiensis es un microorganismo que se caracteriza por producir varios tipos de proteína; Cry, Cyt, Vip, Sip y parasporinas. Adicional a estas, produce una proteína denominada proteína capa s, que está formada por arreglos monomoleculares de glicoproteínas y cubre gran parte de la superficie externa de la célula bacteriana. A esta proteína se le atribuyen varias aplicaciones; desde actividad insecticida, hasta su funcionamiento como antimicrobiano, pero no como anticancerígeno.

Por tal motivo, en este trabajo se purificó e identificó una proteína capa s de una cepa de *Bacillus thuringiensis* (AP11), recolectada de la región de Baja California.

La proteína identificada se sometió a ensayos *in vitro* utilizando la línea celular de cáncer MDA-MB-231. HaCat se usó como control celular no canceroso. Se obtuvo la dosis letal media (DL₅₀), usando 0.25 µg/ml de concentración de proteína capa s para las células de cáncer de mama, mientras que HaCat con la misma concentración, mostró 90% de sobrevivencia en los ensayos de viabilidad celular.

Este es el primer trabajo que demuestra que una proteína capa s proveniente de una cepa de *Bacillus thuringiensis* (AP11), presenta actividad citotóxica específica sobre esta línea celular. Estos resultados convierten a la proteína capa s en una molécula con posibles aplicaciones terapéuticas en la lucha contra el cáncer de mama.

Palabras clave: *Bacillus thuringiensis*; proteína capa s; cáncer de mama; citotoxicidad; anticancerígeno; MDA-MB-231

**A mis padres Antonio y Silvia,
por siempre estar presente**

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por brindarme el apoyo para la realización de mi tesis a través de la beca otorgada.

A la UABC y el CICESE por permitirme ser una de sus estudiantes para realizar este proyecto de tesis

Agradezco a mi director de tesis, Dr. Jorge Olmos Soto, por el apoyo invaluable que me brindó a lo largo de estos años con sus consejos continuos y ser un mentor en esta etapa de mi vida.

A la Dra. Amelia Portillo López, por aceptar ser codirectora de este trabajo y brindarme comentarios y sugerencias muy acertadas.

Quiero agradecer a los demás miembros del comité de tesis, Dr. José de Jesús Paniagua Michel, Dr. Heriberto Márquez Becerra, Dra. Ivonne Giffard Mena por la atención e interés que siempre dieron a mi trabajo. De igual manera agradezco a la Dra. Irma E. Soria Mercado por el apoyo que me brindó durante el tiempo que formó parte de este comité.

A todos los técnicos del CICESE: Ing. Ernesto Lerma, Tec. Guillermo González López, Dra. Olga Callejas Negrete, Dra. Edna Sánchez Castrejón, M.C. Rosalía Contreras Flores, M.C. Eduardo Morales Guerrero, Ing. Luis Gradilla, M.C. H. Fabián Alonso, así como al técnico de la UNAM, Ing. Israel Gradilla, por su apoyo para la realización de este trabajo, desde la plena confianza para acceder a las instalaciones o equipo, así como su asistencia técnica. De igual forma al M.C. Christian Hernández, por darme algunos consejos para las técnicas de laboratorio.

A la secretaria de posgrado de UABC, Angélica Arce, por su apoyo y gran ayuda en todos los asuntos administrativos.

Mi sincero agradecimiento a los investigadores y profesores que compartieron sus conocimientos para contribuir a mi formación

Agradezco a **Dios** y a la **vida**.

Toda mi gratitud a mis padres. Porque solo ustedes saben lo difícil que fue todo este proceso, pero siempre estuvieron allí dando su ánimo y apoyo. A mi padre, **Antonio Pitones**, porque me has dado lo mejor, me has enseñado el valor de ser leal a mis sueños y la importancia de ser agradecido. A mi madre, **María Silvia Rubio**, porque me has enseñado a levantarme y seguir a pesar de todo y contra todo. Porque como dices, la vida siempre nos regresa lo que damos. *Los amo!!!*

A mi hermano **Juan Antonio**, porque de ti he aprendido a soñar y a trabajar por esos sueños. También te agradezco junto con **Alicia**, que me hayan dado el mejor regalo del mundo, que es la dicha de ser tía. A mi muñeca, mi sobrina **Aurora**, *mi auténtica inspiración*, porque llegaste en el mejor momento a dar luz y recordarme que aún hay esperanza en este mundo.

Un agradecimiento especial a mi prima **Paty Silva** por regalarme parte de su tiempo en ayudarme con cuestiones informáticas; a mis tías **Santitos y Lety**, por su apoyo. A mi tía **Ana María** (†), gracias por dejarme buenos recuerdos. Tía **Carmen**, te agradezco por todo este tiempo que has estado pendiente de mis papás y por tu apoyo.

A mis amigos que me acompañaron de alguna manera en esta etapa, **Angie, Vero, Jessica, José Ramón, Javier, Dulce, Aldo, Rocío**, gracias por su amistad y apoyo.

Finalmente, gracias a toda la gente que conocí en todo este proceso, a todos.

Gracias a ti, por tu gran apoyo en los momentos difíciles, por creer en mí, por hacerme más fuerte y animarme siempre en continuar con la realización de mis sueños, eso no lo olvidaré.

Hacer este trabajo representó mucho para mí. Fue una lección que me hizo restaurar mi fé y volver a creer... por momentos me hizo pasar por pruebas muy difíciles, que aunque me hicieron sufrir también me hicieron crecer. Como dice *the boss Bruce hard times come, hard times go...* Este trabajo me dió otra visión y mucho aprendizaje el cual no fue solo académico. Me hizo recordar que las cosas pueden ser muy difíciles, pero con trabajo duro y constante se pueden conseguir los objetivos. Me hizo saber en quien puedo confiar. Pero lo principal, me hizo entender que todo lo que se hace con *amor, pasión y determinación*, siempre tendrá un resultado positivo. **¡Gracias por todo!**

Tabla de Contenido

Resumen.....	i
Dedicatoria.....	ii
Agradecimientos.....	iii
Contenido	v
Lista de Figuras	vii
Lista de tablas	ix
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. ANTECEDENTES.....	3
II.1. <i>Bacillus thuringiensis</i> y sus proteínas.....	3
II.2. Proteínas de capa superficial ó capa s (s-layer ó SLP, por sus siglas en inglés)	12
II.2.1. Estructura de la proteína capa s	14
II.2. 2. Bioquímica y dominios SLP	17
II.2.3 Diversidad genética	18
II.2.4 Secreción	20
II.2. 5 Anclaje	22
II.2.6 Glicosilación	23
II.2.7 Funciones y Aplicaciones	26
II.3 Cáncer.....	29
II.3. 1. Cáncer de mama; MDA MB 231	30
II.3.2 Genes supresores de tumor	32
III. JUSTIFICACIÓN.....	36
IV. OBJETIVOS.....	38
IV.1 Objetivo General	38
IV.2 Objetivos específicos.....	38
V. MATERIAL Y MÉTODOS.....	39
V.1 Diagrama de Flujo.....	39
V.2. Cepa bacteriana y condiciones de crecimiento.....	40
V.3. Microscopía electrónica.....	41

V.4	Identificación molecular de gen <i>slp</i>	41
V. 5.	Secuenciación de productos de PCR.....	44
V. 6.	Extracción y purificación de proteína capa s.....	44
V.7.	Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).....	45
V.8.	Identificación y cuantificación de proteína capa s.....	46
V.9.	Identificación de proteína capa s por medio de espectrometría de masas de alta resolución (LC MS/MS).....	46
V.10.	Cultivo celular.....	48
V.11.	Ensayos de viabilidad celular.....	48
V.12.	Análisis estadístico.....	51
VI.	RESULTADOS	52
VI.1.	Identificación de cepa Bt	52
VI.1.1.	Curvas de crecimiento.....	52
VI.1.2.	Análisis microscópico.....	55
VI.2.	Identificación y producción de proteína capa s en Bt	59
VI.2.1.	Identificación molecular del gene <i>slp</i> de la cepa Bt AP11.....	59
VI.2.2.	Producción de proteínas capa s de la cepa AP11 con diferentes condiciones de oxígeno.....	61
VI.2.3.	Extracción y purificación de proteína capa s de la cepa AP11.....	62
VI.2.4.	Identificación de proteína capa s con espectrometría de masas de alta resolución (LC-MS/MS).....	65
VI.3.	Actividad anticancerígena de proteína capa s de la cepa Bt AP11	66
VI.3.1.	Cultivo celular.....	66
VI.3.2.	Efecto de la proteína capa s en MDA-MB-231.....	67
VI.3.3.	Efecto de la proteína capa s en células HaCat.....	69
VI.3.4.	Ensayos de citotoxicidad in vitro comparativos.....	71
VII.	DISCUSIÓN	72
VII.1.	Aislamiento y caracterización de cepa Bt AP11	72
VII.2.	Genes <i>slp</i>	74
VII.3.	Producción, extracción y purificación de proteína SLP	76
VII.4.	Actividad citotóxica de la proteína capa s en células en MDA MB 231	79
VIII.	CONCLUSIÓN	84
IX.	PERSPECTIVAS	85
X.	REFERENCIAS	86

Lista de Figuras

Figura		Página
1	Morfología de una cepa de <i>Bacillus thuringiensis</i>	4
2	Blancos de las proteínas Cry ó δ -endotoxinas	5
3	Modelo esquemático de una proteína Cry y su estructura de tres dominios	7
4	Diagrama de Venn que muestra la relación estructural y funcional entre las diferentes proteínas de <i>Bacillus thuringiensis</i>	12
5	Estructura de la proteína SLP en arqueas, bacterias Gram positivas y Gram negativas	15
6	Diferentes entramados de la proteína SLP	16
7	Secreción de las proteínas SLP en bacterias Gram positivas y Gram negativas	21
8	Propuesta de biosíntesis de glicanos en <i>G. stearothermophilus</i>	26
9	Funciones de la proteína SLP	28
10	Esquema que representa carcinoma ductal <i>in situ</i> (DCIS)	33
11	Alineamiento de secuencias del gen <i>slp</i> entre especies del género <i>Bacillus</i>	44
12	Representación esquemática de una placa de 96 pozos con los ensayos citotóxicos y sus controles de una sola línea celular	51
13	Curvas de crecimiento de 4 cepas de Bt reservadas en el laboratorio de Microbiología molecular de CICESE	53
14	Curva de crecimiento de cepa AP11 con la condición de crecimiento de nivel alto de oxígeno	55

15	Morfología celular de la cepa AP11 en diferentes tiempos de cultivo	57
16	Morfología de la cepa Bt AP11 a las 6 h	58
17	Morfología de cepa Bt AP11 y cepa <i>Bacillus subtilis</i> W168	59
18	Productos de PCR en Gel de agarosa 1.2%	60
19	Identificación de proteína SLP en Gel SDS Page teñido con azul de Coomassie	62
20	Cromatograma de la muestra concentrada que contiene a la proteína SLP de la cepa Bt AP11	63
21	Identificación de proteína SLP con diferentes condiciones en Gel SDS PAGE con diferentes tinciones	65
22	Secuencia de la proteína SLP de la cepa Bt AP11	66
23	Microfotografías del ensayo de viabilidad celular de MDA-MB-231	68
24	Efecto citotóxico de forma cuantitativa en la línea celular MDA-MB-231	69
25	Microfotografías del ensayo de viabilidad celular de HaCat	70
26	Efecto citotóxico de forma cuantitativa en la línea celular HaCat	71
27	Árbol filogenético de diferentes receptores que interactúan con las proteínas CRY y SLP	81
28	Alineamiento de secuencias de aminoácidos de diferentes receptores que interactúan con proteínas CRY y SLP	82

Lista de tablas

Tabla		Página
II	Espectro citotóxico de 4 parasporinas sobre diferentes líneas celulares de cáncer	10
III	Oligonucleótidos específicos del gen <i>slp</i> para especies del género <i>Bacillus</i>	44
III	Gradiente utilizado para eluir a la proteína SLP de la cepa AP11	45

I. INTRODUCCIÓN

El cáncer es una de las principales causas de muerte a nivel mundial, tanto en hombres como en mujeres. La organización Mundial de la Salud (OMS) refiere que hasta el año 2012, hubo 8.2 millones de muertes asociadas a esta enfermedad. La situación en México no es muy diferente de la expuesta a nivel mundial, ya que el Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI) cita que hasta el año 2014, las muertes por cáncer representaban el 14.84% del total de muertes en el país. Se espera que estas cifras vayan en aumento en las próximas dos décadas. En ambos casos, mundial y nacional, el cáncer de mama se distingue por ser uno de los más devastadores con un elevado porcentaje de muertes.

Actualmente, los tratamientos contra el cáncer siguen siendo la remoción del tumor, quimioterapia o radiación, los cuales suelen ser efectivos, pero generalmente si se aplican en fases tempranas de la enfermedad. Sin embargo, estos tratamientos son muy costosos y conllevan muchos efectos adversos al paciente. Por ello, la búsqueda de sustancias bioactivas tanto en ecosistemas terrestres como marinos es interminable (Amaro et al., 2013; Olmos et al., 2015; Paniagua et al., 2015; Phonnok et al., 2010; Priya y Jayachandran, 2001).

Dentro de la búsqueda de alternativas, se ha demostrado que *Bacillus thuringiensis* (Bt) produce proteínas que tienen actividad citotóxica hacia líneas

celulares de cáncer humano, sin actividad insecticida y a las cuales se les denomina parasporinas (Jung et al, 2006; Kitada et al, 2006; Mizuki, et al, 2000; Ohba et al, 2009; Yamashita et al, 2005). Asimismo, produce las proteínas Cry las cuales usualmente son reconocidas por su actividad insecticida, pero recientemente se les ha reportado actividad anticancerígena (Mendoza et al, 2011; Olmos et al, 2011). Se puede inferir que esta actividad podría estar modulada por el reconocimiento de algún receptor de la célula por parte de la proteína Cry.

En los últimos años, se ha presentado evidencia de que el cáncer está asociado a diferentes vías de señalización, las cuales pueden ser moduladas por compuestos proteínicos o peptídicos, al reconocer receptores específicos en la célula y producir efectos en la regulación del ciclo celular. Estos compuestos pueden ser sintéticos u obtenidos a partir de animales, plantas o bacterias (Chu y Radhakrishnan, 2008; Chu et al., 2010; Phonok et al., 2010;).

Por consiguiente, *Bt* adquiere un gran valor por sus antecedentes. Además produce otras proteínas conocidas como SLP (por su siglas a inglés: Surface Layer Protein), de las cuales no se ha reportado que esta proteína tenga actividad citotóxica contra líneas celulares de cáncer. Es por ello que en este trabajo se purificó, caracterizó e identificó el perfil de una proteína SLP de la cepa *Bt* AP11 de la región, para evaluar su citotoxicidad contra la línea celular de cáncer de mama, MDA MB 231.

II. ANTECEDENTES

II.1. *Bacillus thuringiensis* y sus proteínas

El género *Bacillus* fue identificado por primera vez en 1872 por Ferdinand Cohn. Es una bacteria gram positiva, esporulada, en forma de bastón, en la etapa estacionaria de crecimiento produce una endospora, la cual es altamente resistente al calor y otros factores ambientales. Las cepas de *Bacillus* pueden crecer aeróbica y anaeróbicamente en su mayoría, son cosmopolitas, habitan en el agua, tierra y aire. Las especies de este género se distinguen por su gran aplicación comercial en varios campos, principalmente la industria, biotecnología y la medicina (Gordon, 1973; Harwood, 1989).

Bacillus thuringiensis (Bt), es una bacteria que contiene peritricos en su membrana externa, mide de 3 a 5 μm de largo por 1 a 1.2 μm de ancho (figura 1). Es un microorganismo quimioorganótrofo que pertenece a la familia *Bacillaceae* y se ubica dentro del grupo 1 del género *Bacillus*. Forma parte del grupo de *Bacillus cereus*, que incluye a *Bacillus anthracis*, *B.cereus*, *B. mycoides*, *B. Pseudomycoides* y *B. weihenstephanensis*. No tiene mucha diferencia metabólica o morfológica de *B. anthracis* y *B. cereus* sin embargo, lo que lo distingue de estas especies es la presencia de una inclusión parasporal con propiedades insecticidas. Puede ser aislado del suelo, agua, hojas de plantas, insectos muertos, telarañas, etc. (Gordon, 1973; Harwood, 1989;

Schnepf et al., 1998; Sauka y Benintede, 2008; Palma et al. 2014). Las etapas de crecimiento de Bt pueden dividirse en 4 fases; fase I: crecimiento vegetativo, fase II: transición a esporulación, fase III: esporulación y fase IV: Maduración de la espora y lisis celular (George y Crickmore, 2012).

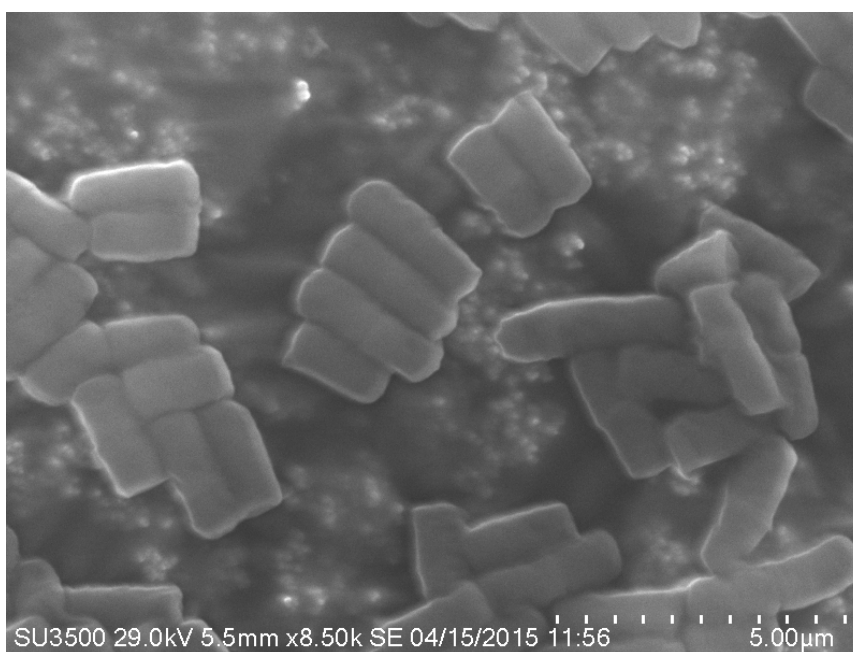


Figura 1. Morfología de una cepa de *Bacillus thuringiensis*. Se observa Imagen tomada con microscopio electrónico de barrido (MEB) (Alonso, 2015).

Bt se caracteriza porque en su proceso de esporulación dentro del esporangio (célula madre), produce una inclusión parasporal formada por uno o más cuerpos cristalinos de naturaleza proteica, los cuales son liberados al medio después de la lisis celular que tiene lugar al final de la etapa de esporulación (Sauka y Benintede, 2008). Estas proteínas o cristales son conocidas como proteínas Cry ó δ -endotoxinas y son tóxicas para distintos invertebrados,

especialmente larvas de insectos del género Lepidóptera, Díptera y Coleóptera. Hay reportes de algunas δ -endotoxinas que muestran su efectividad contra insectos del orden Hymenoptera, Homoptera, Orthoptera, Mallophaga y algunos nemátodos, ácaros y protozoarios, así como contra células de cáncer humano lo que se ilustra con la figura 2 (Bravo et al., 2012; Palma et al., 2014). Las proteínas pueden tener morfología bipiramidal, cúbica, cuadrada, aplanada, esférica o ser atípicas (Luckevich and Beveridge, 1989; Crickmore et al., 1998; Schnepf et al., 1998; Güereca y Bravo, 1999; Sauka y Benintede, 2008; Ohba et al., 2009; Rosas-García 2009; Adang et al., 2014;).

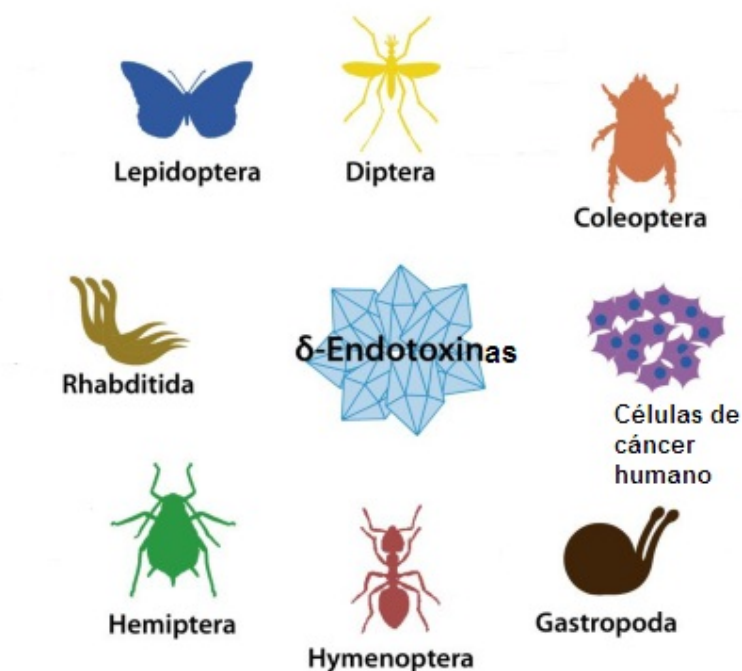


Figura 2. Blancos de las proteínas Cry ó δ -endotoxinas. Pueden estar constituidos por insectos de diferente orden, así como células de cáncer humano (Modificado de Palma et al., 2014).

Las inclusiones cristalinas se clasifican principalmente como proteínas Cry que van de 60 a 140 kDa y como proteínas Cyt que van de 22 a 30 kDa. Ambas pertenecen a una clase de toxinas bacterianas conocidas como formadoras de poro (TFP), cuya característica es que son secretadas como proteínas solubles a pH básico y se someten a cambios conformacionales para insertarse en la membrana del huésped y alterar su homeostasis. Por esta razón y por su inocuidad en seres humanos, las proteínas Cry son utilizadas frecuentemente en insecticidas comerciales a nivel mundial (Güereca y Bravo, 1999; Rukmini et al., 2000; Jung et al., 2006; Guo et al., 2008; Frankenhuyzen, 2009; Ohba et al. 2009). Los cristales al ser ingeridos son solubilizados en el intestino del insecto, donde por efecto del pH básico y de las proteasas presentes se activan las toxinas Cry. Estas se unen a receptores específicos en la membrana del insecto, induciendo su muerte, debido al desequilibrio iónico (Bravo et al., 2007, 2012; George and Crickmore, 2012; Palma et al., 2014; Xu et al., 2014).

Las proteínas Cry se clasifican en grupos de acuerdo a su homología y estructura molecular. Algunos trabajos indican que hay alrededor de unos 75 subgrupos primarios de toxinas Cry y que pertenecen al grupo denominado como clase de tres dominios (Figura 3). Estos se distinguen entre sí por su diferencia en la secuencia de aminoácidos, pero comparten una estructura similar y conservada de tres dominios. (Pardo López et al., 2012; Bravo et al., 2013; Adang et al., 2014).

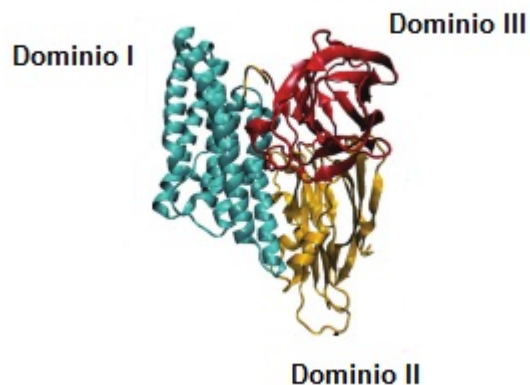


Figura 3. Modelo esquemático de una proteína Cry y su estructura de tres dominios (Modificado de Bravo et al., 2012).

El segundo grupo de proteínas Cry se identifica como MTX (mosquitocidal toxins por sus siglas en inglés), que difiere de las anteriores por su estructura proteica terciaria. Presenta similitud con la secuencia de la toxina épsilon ETX de *Clostridium perfringens*, por lo que se llega a denominar ETX/MTX y está relacionada con la toxina MTX de *Lysinabacillus sphaericus* (Wirth et al., 2013; Adang et al., 2014;). *Bacillus sphaericus* y *Bacillus thuringiensis var israelensis*, pueden producir este tipo de proteínas y hasta el momento se han caracterizado MTX1, MTX2 y MTX3, las cuales están presentes en la fase vegetativa de la bacteria pero no produce cuerpos cristalinos o cristales (Charles et al., 1996; Park et al., 2010; Rahman et al., 2012;). Se cree que igual que las proteínas Cry, forman poros para dañar a su huésped (Adang et al., 2014).

El tercer grupo de proteínas pertenece a la familia de las toxinas Binarias (Bin), que también son producidas por *Bacillus sphaericus* y *Bacillus thuringiensis var israeliensis* (Bravo et al., 2012; Adang et al., 2014; Palma et al., 2014). La proteína Bin consiste en dos toxinas; BinA con tamaño de 42 kDa y BinB con tamaño de 51 kDa que en conjunto producen una alta actividad insecticida, principalmente contra los mosquitos *Culex* y *Anopheles* (Pauchet et al., 2005; Opota et al., 2011; Rahman et al., 2012). Las toxinas Bin se producen durante la esporulación al igual que las proteínas Cry, pero ambas difieren en su mecanismo de producción. (Poopathi et al., 2010; Allievi et al., 2014).

Otro tipo de proteínas son las Cyt, que tienen actividad hemolítica y citolítica *in vitro* e *in vivo* y presentan toxicidad específica contra lepidópteros (de Maagd et al., 2003; Sauka y Benintende, 2008; Bravo et al., 2012;). La diferencia entre las proteínas Cry y Cyt está dada por el mecanismo de acción insecticida. Cabe destacar que las proteínas Cyt actúan de manera sinérgica con algunas proteínas Cry, aumentando su actividad insecticida (Wu et al., 2008; Soberón et al., 2011a; Soberon et al., 2012b; Adang et al., 2014; Xu et al., 2014).

Existen otras proteínas denominadas como proteínas insecticidas vegetativas (Vip), pero estas no entran dentro de la clasificación de las inclusiones parasporales, ya que no forman dicha inclusión y son secretadas durante el crecimiento de la bacteria. Actualmente, se han identificado a 4 familias Vip, de las cuales tres toxinas Vip han sido caracterizadas; VIP1/VIP2 en conjunto

conforman una toxina binaria con potencial insecticida contra coleópteros, VIP3 presenta 40 genes clasificados en A y B con actividad insecticida contra lepidópteros (de Maagd et al., 2003; Sauka y Benintede, 2008; Palma et al., 2014). Aunque presentan potencial actividad insecticida contra Lepidópteros, su modo de acción las hace diferentes de las proteínas Cry. De las proteínas Vip4 no se conoce mucho hasta el momento (Estruch et al., 1996; Lee et al., 2003; de Maagd et al., 2003; Bhalla et al., 2005; Sauka y Benintede, 2008; Bravo et al., 2012; Palma et al., 2014).

Recientemente se ha descrito una nueva proteína secretada por Bt denominada; Proteína insecticida secretada (Sip: por sus siglas en inglés). Donovan y colaboradores (2006) reportaron la proteína Sip1A con actividad insecticida contra el orden Coleóptera. Aunque es poco lo que se sabe de ella, se cree que esta proteína es secretada como parte del efecto espora, es decir, al ingerir los insectos a las proteínas Cry en conjunto con esporas, las proteínas Cry dañan la membrana del insecto y las esporas consumidas germinan dentro de él, dando lugar a nuevas células de Bt que secretan a las proteínas Sip con actividad insecticida (Donovan et al., 2006; Sauka y Benintede, 2008; Palma et al., 2014).

Bt produce otras proteínas parasporales conocidas como parasporinas (PS) que entran dentro de la clasificación de las proteínas Cry por la producción de cristales. La diferencia de estas proteínas con las anteriores, es que no tienen

actividad insecticida, pero si presentan una actividad citotóxica contra líneas celulares de cáncer (Mizuki et al., 2000; Yamashita et al., 2005; Jung et al., 2006; Ohba et al., 2009; Adang et al., 2014). Mizuki y colaboradores en 1999, fueron los encargados de demostrar que estas proteínas no presentaban actividad hemolítica ni insecticida, sin embargo, si tenían un efecto citócido contra células de leucemia. Otros trabajos reportan la actividad en otras líneas celulares de cáncer como HeLa y Molt4. Tener esta actividad sobre diferentes líneas celulares de cáncer, hace de las PS un posible candidato para figurar como agente anticancerígeno de uso médico (Ohba et al. 2009; Okasov et al. 2015). La tabla I, muestra el efecto de 4 PS sobre diferentes líneas celulares de cáncer en humanos.

Tabla I. Espectro citotóxico de 4 parasporinas sobre diferentes líneas celulares de cáncer (Modificado de Ohba et al., 2009). (+)Con efecto citotóxico (-)Sin efecto citotóxico

Línea celular humana	Origen	PS1	PS2	PS3	PS4
HeLa	Cáncer cervico uterino	+++	-	-	-
Sawano	Adenocarcinoma endometrial	-	++++	-	+++
TCS	Cáncer cervico uterino	-	-	-	+++
UtSMC	Músculo uterino normal	-	++	-	-
MOLT-4	Leucemia linfoblástica aguda	++	++++	-	+++
HL-60	Leucemia promielocítica	+++	++++	++	+++
Jurkat	Leucemia células T	-	++++	-	-
T-cell	Linfocito Normal T	-	+++	-	-
HepG2	Carcinoma Hepatoceleular	++	++++	++	++
HC	Hepatocito normal	-	-	-	-
A549	Adenocarcinoma de pulmón	-	+++	-	-
MRC5	Fibroblasto de pulmón normal	-	+	-	-
Caco 2	Carcinoma colorectal	-	+	-	+++

Hasta el momento existen 6 clases de parasporinas; La PS1, la PS3 y las PS6 pertenecen a las Cry de tres dominios, mientras que las PS4 y PS5 se asocian a las Cry MTX. La PS 2 no presenta similitud con ninguna Cry pero si con hidralisina (Adang et al., 2014; Okasov et al., 2015). A la fecha se han aislado 13 PS de 11 cepas de Bt, 8 pertenecen al tipo PS 1, 2 al tipo PS2, 2 al PS3 y 1 a PS4 (Okasov et al., 2015; Ohba et al., 2009). Los mecanismos de acción de las PS son diferentes entre ellas, las PS de tres dominios son asociadas a la formación de poro, además presentan un efecto en alguna cascada de señalización. Las PS2 y PS4 que son similares a las proteínas ETX/MTX, están relacionadas con el reconocimiento de lípidos. Para la PS5 aún es desconocido su mecanismo de acción (Adang et al., 2014). En años recientes se han realizado técnicas de ingeniería genética para la producción de parasporinas y se ha logrado expresar el gen de esta proteína en *Escherichia coli*, obteniendo resultados muy similares con los obtenidos de PS2 silvestre (Okumura et al. 2004; Okasov et al. 2015). La figura 4, muestra la relación estructural y funcional de las proteínas producidas por Bt, así como la presencia de la proteína SLP.

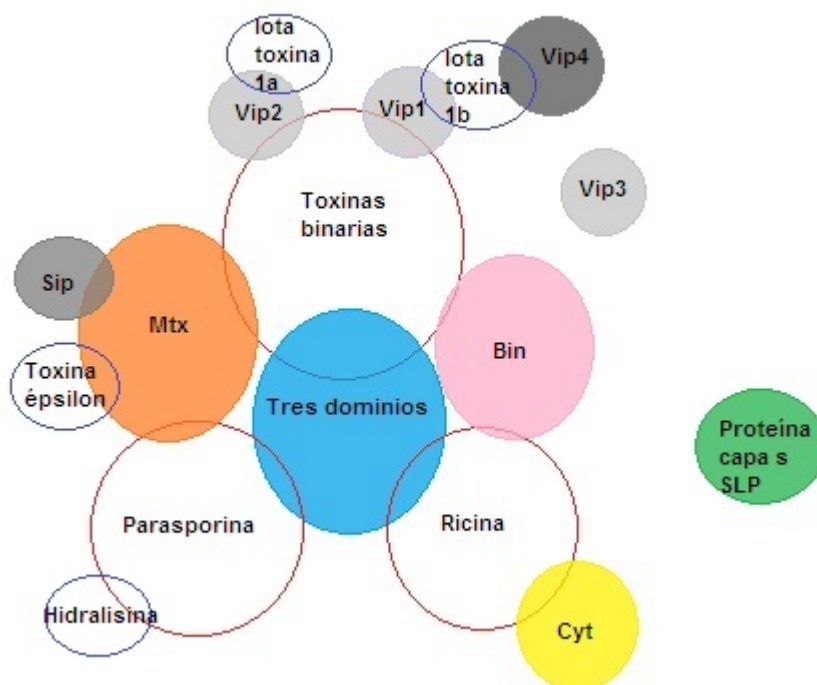


Figura 4. Diagrama de Venn que muestra la relación estructural y funcional entre las diferentes proteínas de *Bacillus thuringiensis*. Cada tipo de proteína está representada por un círculo de color específico. Los círculos abiertos de color rojo, representan los grupos estructurales que contienen miembros que comparten características con toxinas binarias, parasporinas o ricina. Los círculos abiertos con color azul, representan grupos de proteínas o toxinas que no pertenecen a Bt, pero tienen secuencias similares. (Modificado de Adang et al., 2014).

II.2. Proteínas de capa superficial ó capa s (s-layer ó SLP, por sus siglas en inglés)

Además de producir las proteínas *Cry*, *Cyt*, *Vip*, *Sip* y *PS* mencionadas anteriormente, *Bt* produce otras proteínas extracelulares conocidas como SLP (Guo et al., 2008). Estas proteínas son frecuentemente localizadas en bacterias Gram positivas, Gram negativas y en mayor grado en arqueas (Fagan y

Fairweather, 2014). Fueron reportadas por primera vez en 1952, cuando Houwink y Le Poole observaron en un microscopio electrónico fragmentos de la pared celular de la bacteria *Spirillum serpens*. Sin embargo, no fue tanto su impacto hasta la actualidad (Engelhardt, 2007; Sleytr et al., 2014). La proteína SLP forma parte de la estructura de la superficie de la célula de algunas especies bacterianas que las provee de una capa adicional (capa s) (Luckevich y Beveridge 1989; Sará y Sleytr 2000; Sleytr 1997; Sleytr y Beveridge1999). Se han identificado alrededor de 19 miembros del género *Bacillus* que poseen proteína SLP (Luckevich y Beveridge, 1989).

Estas proteínas se caracterizan por ser arreglos cristalinos de dos dimensiones (2D) y cubrir toda la célula, representando desde un 10 a un 15% del total de las proteínas presentes en la célula. Por ello, se convierte en un modelo interesante para estudiar los procesos involucrados en la síntesis, secreción y ensamblaje de proteínas extracelulares. Además, puede considerarse una de las proteínas más abundantes en el planeta, dado que hay más organismos procariotes que eucariotes y está presente en todos los estadios del crecimiento y división celular (Allievi et al., 2012; Sleytr et al., 2014). Se caracterizan por tener una masa molecular entre 66 y 255 kDa para el género *Bacillus* (Luckevich y Beveridge, 1989; Deblaere, 1999; Peña et al., 2006; Sun et al., 2013). Estudios han demostrado que a altas velocidades de crecimiento aproximadamente 500 unidades por segundo pueden ser sintetizadas y traslocadas a la superficie celular e incorporadas en la matriz de proteínas SLP

(Sleytr et al., 2014).

II.2.1 Estructura de las proteínas SLP

Estas proteínas se conforman por arreglos monomoleculares cristalinos de una o varias glicoproteínas, que se autoensamblan a una forma multimérica. La proteína SLP representa el único componente de la pared celular fuera de la membrana plasmática (Sleytr et al., 2014). La figura 5, muestra la estructura de la proteína SLP. En la mayoría de las arqueas, las proteínas SLP representan el único componente externo de la membrana plasmática (Sleytr et al., 2014). Las bacterias Gram positivas y algunas arqueas poseen una pared rígida (como pseudomureina o peptidoglicano), donde se une la proteína SLP y además funciona como intermediaria entre la membrana plasmática y la proteína SLP. Las bacterias Gram negativas presentan a la proteína SLP adherida a los liposacáridos externos de la membrana (Sleytr et al., 2000).

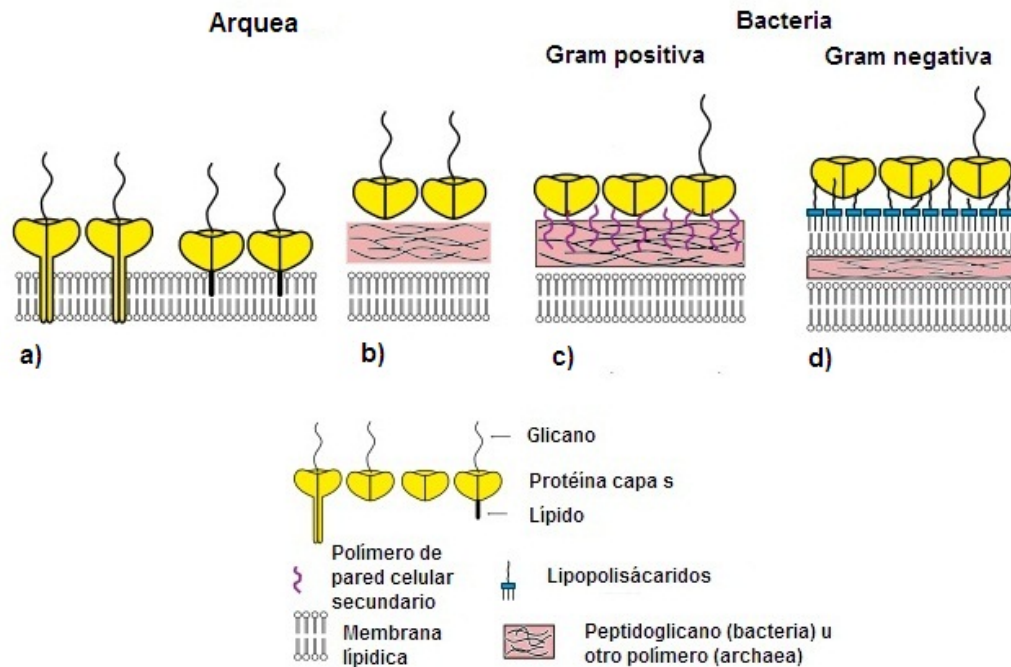


Figura 5. Estructura de la proteína SLP en arqueas, bacterias Gram positivas y Gram negativas. Se muestra: a) Proteína SLP como componente exclusivo de arquea con dominios hidrofóbicos o subunidades de glicoproteína modificada por lípidos; b) Pocas arqueas poseen una pared celular rígida como una capa intermedia entre membrana plasmática y la capa s; c) En bacterias gram positivas, la proteína SLP se une al peptidoglicano, via Polímero secundario de pared celular (SWCP); d) en bacteria gram negativa, la proteína SLP se asocia con lipopolisacáridos de la membrana exterior (Tomado de Sleytr et al., 2014).

Las proteínas SLP pueden clasificarse de acuerdo a su entramado, el tamaño de la unidad celular y la posición de los protómeros y poros que están relacionados a la simetría del entramado. Las proteínas SLP exhiben un entramado oblicuo (p1, p2), cuadrado (p4) o hexagonal (p3, p6), esta última es predominante en arquea (Sleytr et al., 2000). Dependiendo de la estructura del entramado las unidades morfológicas consisten en uno, dos, tres, cuatro y seis

monómeros de proteínas, que pueden tener una separación centro a centro en un rango de 2.5 a 35 nm (Sleytr et al., 2000; Sleytr et al., 2014). Las proteínas SLP en bacterias, exhiben un grosor entre 5-10 nm, que es menor en comparación al grosor en arquea, que son muchos más gruesas. Estudios de permeabilidad demuestran que las proteínas SLP, son altamente permeables ya que presentan poros que van desde el 30 a un 70% en toda la superficie, siendo estos de tamaño uniforme y una morfología entre 2-8 nm, aunque hay proteínas SLP con dos o más clases de poros (Sleytr et al., 2000; Sleytr et al., 2014).

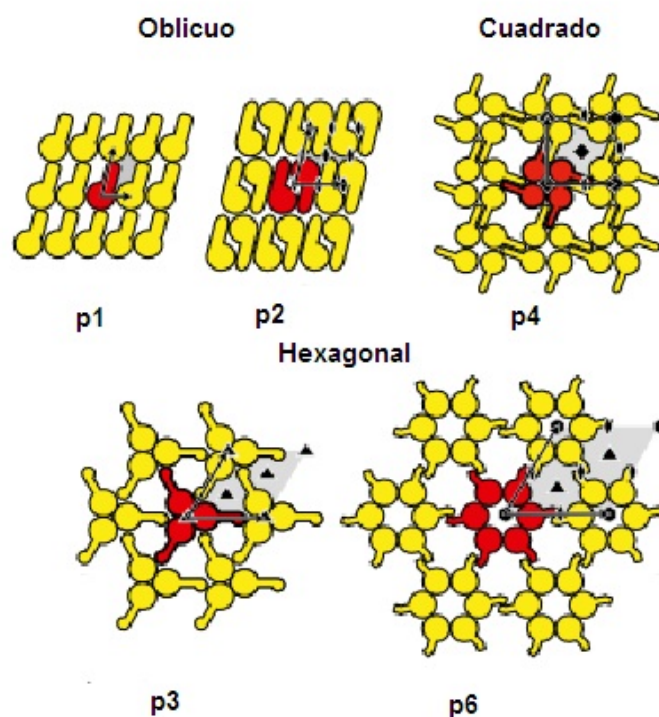


Figura 6. Diferentes entramados de la proteína SLP. La unidad morfológica de la proteína se muestra en rojo. En color gris se muestra su unidad celular y su eje correspondiente (Tomado de Sleytr et al., 2014).

II.2.2. Bioquímica y dominios SLP

La mayoría de las proteínas SLP son débilmente ácidas, con puntos isoeléctricos en el rango de pH de 4.0 a 6.0. Existen excepciones en algunas especies de arquea y en las especies de *Lactobacillus*, donde su punto isoeléctrico va de pH de 8.0 a 10.0. Análisis químicos y genéticos revelan que muchas proteínas SLP tienen composición similar. La mayoría de las proteínas SLP en bacterias contienen entre un 40-60% de aminoácidos hidrofóbicos y poseen pocos o ningún aminoácido que tenga sulfuro (Sleytr et al., 2000; Sleytr et al., 2014). En la mayoría de las SLP el 40% de los aminoácidos están organizados como hojas β y de 10-20% como α -hélices (Sleytr et al., 2000).

Las proteínas SLP presentan dos regiones morfológicas separadas: una responsable de la unión a pared celular y otra encargada del autoensamblaje. La posición del anclaje a la pared celular puede variar entre las especies. En el caso de *Bacillus* se ha revelado la existencia de dominios de unión del N-terminal para polímeros secundarios de la pared celular (SWCP), que a su vez se unen covalentemente a la pared celular (Sleytr et al., 2014).

Las modificaciones postraduccionales que se conocen son; el corte del fragmento carboxy o amino terminal, la fosforilación de la proteína y la glicosilación de la proteína (Sleytr et al., 2014).

II.2.3. Diversidad genética

La capa S comúnmente está formada por una sola proteína, sus genes estructurales pueden estar vinculados a genes que codifican componentes de rutas de secreción o modificación (Fagan y Fairweather, 2014). Las proteínas SLP en bacterias y arqueas predominan más que otras proteínas, por lo que se necesitan genes de alta expresión (Mesnage et al., 2001; Sun et al., 2013).

Diferentes especies bacterianas muestran variación genética en la expresión de proteínas SLP. En algunas especies se ha podido determinar que más de un gen interviene en su síntesis y que estos no se expresan simultáneamente (Pollman et al., 2005), indicando que responden a diferentes estados o condiciones ambientales (Mignot et al., 2002; Pollman et al., 2005). Como ejemplo de lo anterior, se encuentra *Campylobacter fetus* cuya expresión se encuentra bien estudiada y caracterizada. El serotipo A de esta especie, contiene 8 arreglos homólogos del gen A (*sapA*) y un solo promotor (Fagan y Fairweather, 2014).

La primera secuencia caracterizada de un gen *slp* fue de *Bacillus brevis* 47 y a la fecha hay más de 4000 reportes en la base de nucleótidos del banco de genes del National Center for Biotechnology Information (NCBI), donde muchos de ellos han sido clonados en la última década (Mesnage et al., 2001; Sleytr et al., 2014). Aunque la homología de las secuencias de genes *slp* es baja, muestran un orden en su estructura organizacional (Mesnage et al., 2001).

Los ejemplos mejor estudiados de la familia de genes *slp* se encuentran en *Bacillus anthracis* y *Clostridium difficile*. Las proteínas SLP de *B. anthracis* son producidas en diferentes etapas de crecimiento y son dos: Sap y EA1. La primera se manifiesta en la fase exponencial y es reemplazada en la fase estacionaria por EA1 (Mesnage et al., 2001; Peña et al., 2006; Sleytr et al., 2014). Por otra parte, *Lactobacillus acidophilus* posee dos genes que codifican proteína SLP, *slpA* y *slpB*, los cuales dependen de las condiciones de crecimiento, ya que mientras *slpA* se encuentra activo en la fase exponencial, *slpB* se mantienen como un gen inactivo (Kalheghi y Kermanshahi, 2012). En el caso de *Lactobacillus crispatus*, se ha logrado aislar hasta tres genes *slpA*, *slpB* y *slpC* (Sun et al., 2013).

Para el caso de *B. thuringiensis subsp galleria* se ha encontrado un gen *slpA* similar al gen *sap* de *B. anthracis*. Así mismo, *B. thuringiensis finimitus* muestra alta similitud con la proteína SLP del gen *ea1* de *B. anthracis* (Peña et al., 2006).

Se ha atribuido que las bacterias que tienen proteína SLP, hacen uso de la variación genética expresando diferentes genes *slp*, esto como respuesta a factores de estrés o cambios ambientales (Kalheghi y Kermanshahi, 2012).

II.2.4. Secreción

Las proteínas SLP son transportadas a la superficie celular donde se autoensamblan, anclándose a la pared celular y formando la estructura de la proteína SLP en la célula. Como se sabe, la estructura de la proteína SLP en Gram negativas y Gram positivas es diferente, por lo que el sistema de secreción también lo es.

En el caso de Gram positivas, como son *B. anthracis* y *C. difficile*, la secreción de la proteína SLP depende de un sistema llamado Sec. Este sistema fue identificado en *Mycobacterium tuberculosis* y los organismos que lo poseen tienen dos copias de ATPase SecA (SecA1 y SecA2), algunos organismos como *B. anthracis* puede tener un tercero SecY2. La figura 7, muestra el proceso de secreción de estas proteínas. En la imagen se puede ver en el caso de Gram positivas, donde la proteína contiene un péptido señal en la parte amino terminal, el cual dirige al polipéptido al aparato de secreción y es anclado en la membrana con ayuda de ATPase Sec. Posteriormente, el polipéptido es traslocado a través de la membrana por medio de un poro (Fagan y Fairweather, 2014).

Para el caso de bacterias Gram negativas se requiere de otro tipo de sistema, denominado tipo II. Este tipo de sistema de secreción consiste en dos pasos; primero, el precursor desplegado es traslocado a través de la membrana citoplasmática por el sistema Sec y segundo, la proteína se pliega y es

transportada a través de la membrana externa por un complejo multiproteico (Fagan y Fairweather, 2014).

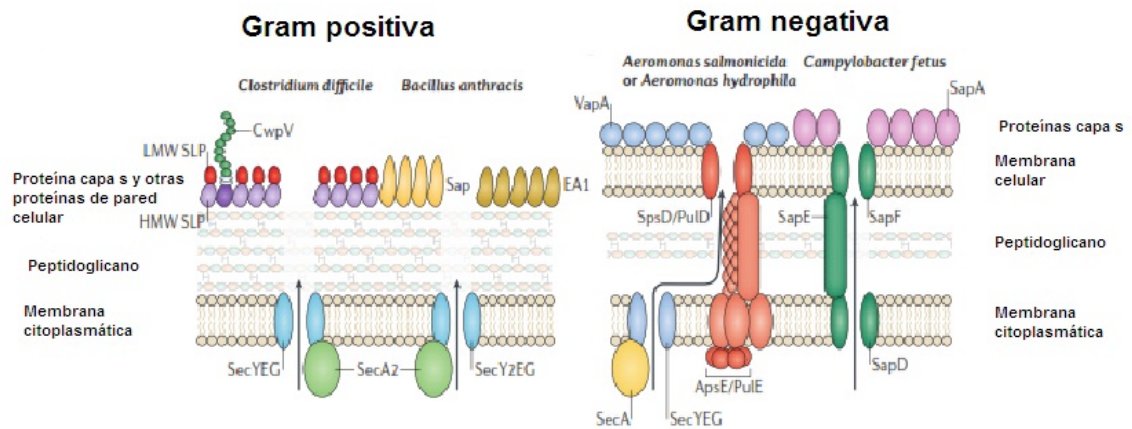


Figura 7. Secreción de las proteínas SLP en bacterias Gram positivas y Gram negativas. En bacterias Gram positivas, como *Clostridium difficile* o *Bacillus anthracis*, por ejemplo, la secreción de las proteínas SLP está mediada por el sistema Sec. El péptido señal se dirige y ancla con la membrana citoplasmática para ser traslocado (flecha negra). Una vez reconocido por SecA2, el péptido es traslocado a través de la membrana por medio de un poro que consiste en SecY, SecY2, Sec E, y SecG. En bacterias Gram negativas como *Aeromona salmonicida* o *Aeromona hydrophila* o *Campilobacter fetus*, se requiere de un sistema de secreción tipo II que consiste en dos pasos. El péptido se trasloca a través de la membrana citoplasmática por el sistema Sec y la proteína se pliega y es transportada a la membrana externa por un complejo multiproteico de secreción. Significado de ApsE, proteína de secreción; CWP, Proteína de pared celular; HMW, peso molecular alto; LMW, peso molecular bajo, Sap y EA1, proteína SLP (Modificado de Fagan y Fairweather, 2014).

II.2.5. Anclaje

Las proteínas SLP no están unidas covalentemente entre sí, ni tampoco a la pared celular, lo que facilita que puedan desagregarse con agentes como cloruro de litio (LiCl) e Hidrocloruro de Guanidina. Las subunidades de las proteínas SLP pueden volver a formar una estructura cristalina sobre soportes, interfaces líquidas, films, liposomas o en suspensión, una vez que se remueva el agente desagregante, lo que es muy común en nanotecnología (Ilk et al., 2011; Sleytr *et al.*, 2011).

Las proteínas SLP exhiben en su mayoría dos regiones separadas; una es la responsable de la unión a la pared celular y la otra es requerida para el autoensamblaje (Sleytr et al., 2014). La posición de la región de anclaje a la pared celular, puede variar entre especies bacterianas. En arqueas ocurre una asociación natural de las proteínas SLP con la membrana citoplasmática (Engelhardt, 2007). En el caso de bacterias Gram negativas la proteína SLP es anclada a través de su N-terminal o C-terminal de forma divalente a los lipopolisacáridos (LPS) (Engelhardt, 2007; Fagan y Fairweather, 2014; Sleytr et al., 2014). Para el caso de bacterias Gram positivas la proteína SLP se une a los polímeros secundarios de la pared celular (SWCP) (Sleytr et al. 2014).

En el género *Bacillus* se ha encontrado que las proteínas SLP presentan dominios específicos en su N-terminal, los cuales se pueden unir directamente al péptidoglicano (PEG) ó a los polímeros secundarios de la pared celular

conocidos como SCWP (secondary cell wall polymer), estos últimos a su vez se unen covalentemente al peptidoglicano de la pared celular (Engelhardt, 2007; Sleytr et al. 2014). Estos dominios se conocen como homólogo S layer (SLH, por sus siglas en inglés) y también se encuentran en especies de *Clostridium*, *Thermus*, *Deinococcus*, entre otras (Fagan y Fairweather, 2014). El dominio SLH se caracteriza por ser un motivo estructural de aproximadamente 55 aminoácidos, que se encuentra por triplicado generalmente en la parte N terminal de la proteína SLP (Engelhardt, 2007; Sleytr et al. 2014). En bacterias Gram positivas, los motivos SLH han sido localizados en su mayoría en el N-terminal de la proteína y muy rara vez en la parte media ó C-terminal (Sleytr et al. 2014). Existe un segundo dominio denominado CWB2 que es un dominio en CwIB, una autolisina en la pared celular de *Bacillus*, que también es común en especies de *Clostridium*. De este dominio no se conoce el tipo de ligando que se une a la pared celular, pero se cree que puede ser una unión a un polisacárido que se une al peptidoglicano. Al igual que el dominio SLH, las proteínas SLP poseen tres copias del motivo estructural CWB2, lo que es análogo al motivo SLH de otras proteínas SLP (Fagan y Fairweather, 2014).

II.2.6. Glicosilación

La primera descripción de una glicosilación en proteínas SLP fue en *Halobacterium salinarium* y desde entonces se ha encontrado esta característica en una gran cantidad de bacterias y arqueas (Fagan y Fairweather, 2014; Sleytr et al., 2014). Se cree que la adición de azúcares

(glicanos) a moléculas no glicosiladas pueden cambiar su tamaño y forma, afectando su solubilidad, estabilidad térmica y propiedades químicas y físicas. Basados en lo anterior, la glicosilación en las proteínas de la superficie celular pueden proteger a la célula procariota del estrés ambiental y facilitar su adhesión a sustratos sólidos. Se ha reportado que los glicanos de las proteínas SLP aportan una ventaja de selección para la bacteria en su hábitat natural, ya que se ha comprobado que estos pueden modificarse o incluso perderse, al ser procesados con medios de cultivo en el laboratorio (Ristl et al., 2011). Estas glicosilaciones pueden considerarse como un factor importante en simbiosis, patogénesis, interacción célula-célula, procesos celulares que incluyen respuestas inmunes como reconocimiento intercelular y plegamiento de proteínas. Sin embargo, solo son hipótesis ya que la mayoría de las funciones de las proteínas SLP no han sido determinadas aún (Messner et al., 1996; Ristl et al., 2011; Schuster y Sleytr, 2015).

La mayoría de los microorganismos procariotas pueden presentar N-glicanos u O-glicanos. Son pocos casos en los que se presentan ambas modificaciones en una proteína al mismo tiempo, como por ejemplo *Halobacterium volcanii*. Los glicanos de las proteínas SLP en arqueas son heteropolisacáridos cortos, que no presentan unidades repetitivas y se unen a la proteína por N-glicosilación. En el caso de bacterias se da la O-glicosilación, para *Bacillus*, este O-glicano se une generalmente a residuos de serina, treonina y tirosina. Ejemplos como *Clostridium difficile* normalmente no produce proteínas SLP glicosiladas (Fagan

y Fairweather, 2014). Hay más de quince estructuras diferentes de glicanos reportadas, por lo que el grado de glicosilación de las proteínas SLP puede variar entre el 1 y 10% (peso/peso) (Ristl et al., 2011; Sleytr et al., 2014).

Las rutas de glicosilación de las proteínas SLP han sido descritas en varias especies como *G. stearothermophilus*, donde se ha propuesto una ruta biosintética que involucra la transferencia de galactosa de UDP- α -galactosa a un vehículo lipídico. Donde se da la unión de glicanos para la formación de una cadena de glicosilación la cual es dirigida a través de la membrana por la proteína transportador ABC, que está integrada por los componentes Wzt y Wzm que a su vez son los responsables de unir a la cadena O-glicano a la proteína SLP Figura 8. Es importante mencionar que la secreción de la proteína SLP no depende de la glicosilación de esta (Ristl et al., 2011; Fagan y Fairweather 2014,).

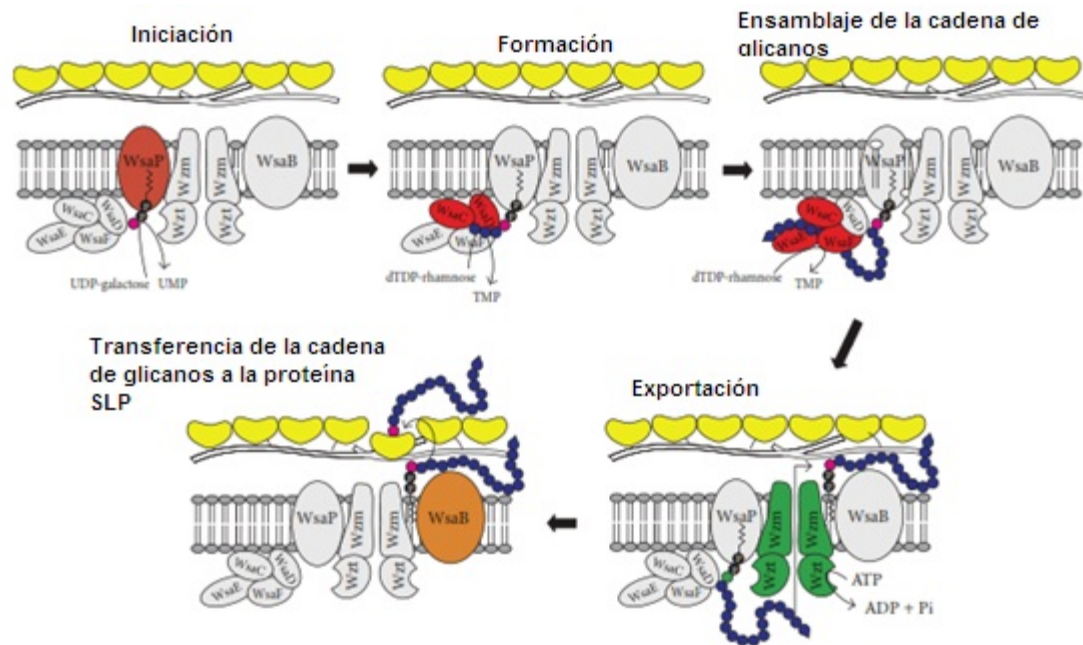


Figura 8. Propuesta de biosíntesis de glicanos en *G. stearothermophilus* (Tomado de Ristl et al., 2011).

II.2.7. Funciones y aplicaciones

La función de las proteínas SLP no ha sido definida por completo, la mayoría de los trabajos mencionan que sus funciones permanecen hipotéticas. Por otra parte, la clonación y caracterización de los genes de la proteína SLP, han hecho pensar que la funcionalidad puede variar (Sleytr et al., 2014)

Algunas funciones que se le atribuyen a las proteínas SLP son mantener la integridad y forma de las células, principalmente en arqueas, ya que esta proteína es el único componente de la pared celular, que determina la forma de

los microorganismos. Esto se ha demostrado al ser removidas las proteínas SLP y perder su forma celular (Eggelser et al., 1996; Sleytr et al., 2014).

Al presentarse las proteínas SLP en la parte más externa de la célula se le puede considerar como un intermediario importante entre la célula y el medio ambiente. Participan además en los procesos de adhesión celular y reconocimiento de superficie. Las proteínas SLP pueden unirse a materiales con cargas negativas o positivas, hidrofílicos e hidrofóbicos, debido a que presentan cargas neutras. Además, pueden servir como barreras de protección contra enzimas líticas como muramidasa y proteasas o de depredadores como *Bellavibrio*, en el caso de bacterias Gram negativas. Por otra parte, las proteínas SLP también se encuentran presentes en la envoltura celular de bacterias consideradas patógenas como *B. anthracis*, por lo que se asocian con la virulencia (Sleytr et al. 2014).

Se ha reportado la función de las proteínas SLP como tamiz molecular y como moléculas de adhesión a exoenzimas (Sleytr et al. 2014). Así como captador de iones y/o metales pesados, sin embargo, hasta el momento todas estas funciones requieren de mayor experimentación (Beveridge et al., 1997; Sleytr et al 2001; Prado et al., 2008; Martínez et al., 2012). La figura 9 presenta un esquema con las principales funciones de la proteína SLP.

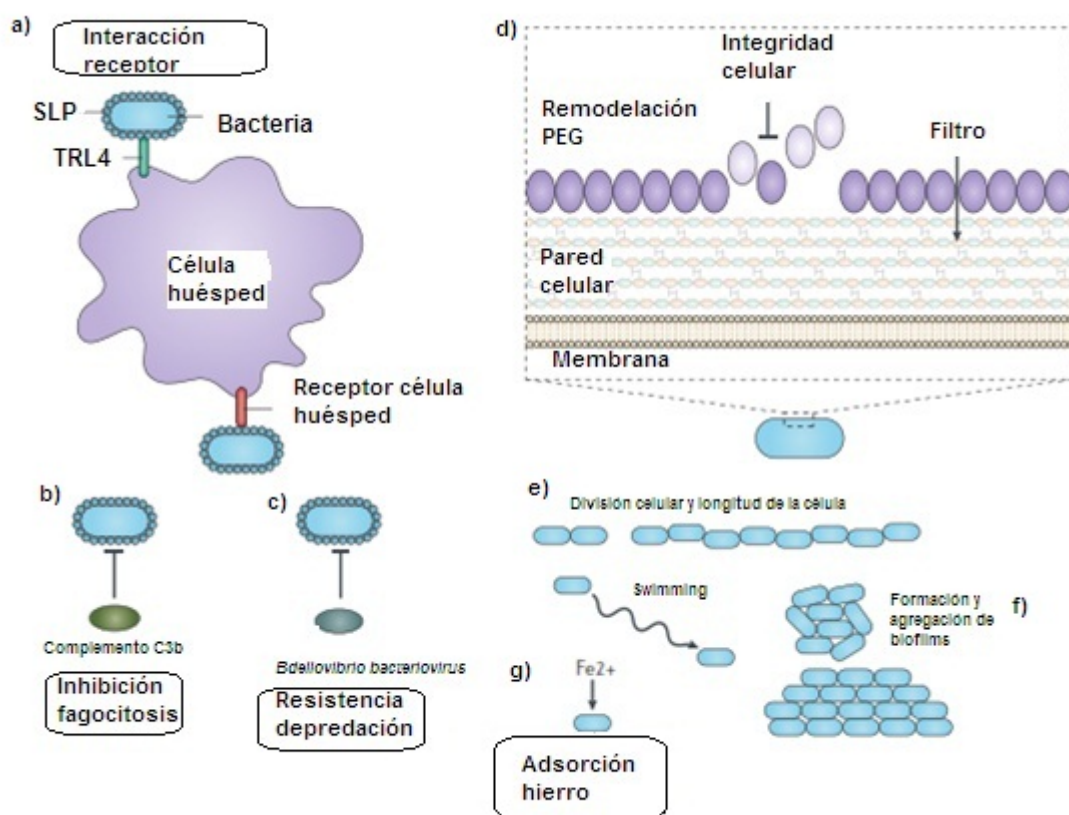


Figura 9. Funciones de la proteína SLP. Posible participación en infecciones: a) interacción de proteína SLP con el receptor TRL4 que está vinculada a la inmunidad en *Clostridium difficile*; b) en *Campilobacter fetus*, la unión de proteínas SLP al factor del complemento C3b inhibe la fagocitosis; c) resistencia a depredadores como *Bdellovibrio*; d) integridad celular; la interacción proteína SLP con el PEG que tiene actividad de hidrolasa, puede remodelar la constitución del PEG; Filtro de selección de moléculas; e) la inactivación de la proteína SLP puede presentar aumento en la longitud de la cadena bacteriana; f) agregación de biofilms y nado "swimming"; g) captador de iones o metales pesados. (Modificado de Fagan y Fairwethear, 2014).

Por lo que se refiere a las aplicaciones de la proteína SLP, el trabajo de Martínez y colaboradores (2012), demuestra la unión que se da entre la proteína SLP y el receptor DC-Sign (ICAM-3-no integrina DC específico) y el efecto que se consigue con esta unión. Como antecedente, se sabe que el receptor DC-Sign facilita la internalización de virus como JUNV, ébola, VIH,

entre otros. En este mismo trabajo se demuestra que células humanas que expresan el receptor DC-Sign, al estar expuestas a la proteína SLP inhiben la internalización del virus.

Por otra parte, se ha demostrado que las proteínas SLP tienen actividad de hidrolizar mureína o peptidoglicano en cepas como *Salmonella entérica serovar Newport* (Prado et al., 2008). En otros trabajos se ha documentado que existen más de 185 especies de bacterias que poseen proteína SLP, reconociendo que al menos 19 pertenecen al género *Bacillus* y confirmando su presencia en Bt. En ese sentido, se han realizado estudios para probar el efecto insecticida con resultados óptimos para Coléopteros (Peña et al., 2006). Sin embargo, hasta el momento no se ha reportado la aplicación de proteína SLP en células cancerígenas.

II.3. Cáncer

El cáncer inicia cuando las células somáticas comienzan a dividirse sin parar y diseminarse por los tejidos (INC, 2016). Las fallas en los mecanismos que controlan el crecimiento y la proliferación celular, dan origen al cáncer. Estas pérdidas de regulación celular se deben principalmente a daños genéticos. En la aparición del cáncer, se han implicado mutaciones en dos clases de genes: los protooncogenes y los genes supresores de tumores. Los primeros son activados mediante mutaciones para volverse oncogenes, lo que los hace excesivamente activos en la promoción del crecimiento y división celular. Los

genes supresores de tumores normalmente restringen el crecimiento y algunos inducen la apoptosis, por lo que si se dañan se produce un crecimiento celular inapropiado (Lodish, 2002; Whitfield et al. 2006; Malumbres y Barbacid 2009).

Las mutaciones asociadas a tumores frecuentemente desregulan los complejos Cdk/ciclinas lo que evita el arresto celular en cierta fase del ciclo celular y dá como resultado una proliferación continua. Estas mutaciones pueden estar causadas por agentes químicos, radicales libres, radiación ionizante, productos del metabolismo intracelular o por terapias específicas que inducen alteraciones en el ADN (Malumbres y Barbacid, 2009). Estas alteraciones pueden ser controladas por diferentes vías de señalización que permiten el arresto del ciclo celular y la apoptosis.

II.3.1. Cáncer de mama; MDA-MB-231

Las glándulas femeninas conocidas como mamas son dos formaciones situadas simétricamente en la cara anterior del tórax. La mama madura está formada por tres estructuras, piel, tejido subcutáneo y glándula mamaria. La glándula mamaria está formada por 15 a 20 lóbulos glandulares de forma cónica, cada uno de los cuales tiene independencia funcional. Cada lóbulo está formado por la unión de numerosos lobulillos donde se encuentran los alvéolos. Cada uno de estos lóbulos posee un conducto excretor conocido como galactóforo. Este a su vez, presenta un seno galactóforo donde se almacena la secreción láctea (Aguilar Cordero et al., 2005; Laterjet et al., 2006). La glándula mamaria se

desarrolla en cinco etapas: embriogénesis, desarrollo puberal, desarrollo en el embarazo, lactancia e involución (Aguilar Cordero et al., 2005). La mayoría de los cánceres de mama inician en esta glándula.

Cánceres llamados adenocarcinoma, que es el carcinoma que comienza en el tejido glandular. Otros tipos de cáncer son los sarcomas que empiezan en las células del músculo, grasa o tejido conectivo. Puede decirse que hay dos clases de cáncer de mama, *in situ* e invasivo (ACS, 2015). El carcinoma ductal *in situ* (DCIS) y el carcinoma lobular *in situ*, representan a la primera clase. Este tipo de cáncer se puede considerar no letal, ya que crece en su lugar de origen dentro de los ductos o lóbulos, es decir, solo es un crecimiento anormal de las células epiteliales. Sin embargo, este tipo de cáncer es muy importante porque puede ser precursor del cáncer invasivo (Allred, 2010). La figura 10, representa al carcinoma ductal *in situ*, que es el inicio del cáncer de mama y casi siempre puede curarse con algún tratamiento.

El cáncer invasivo o infiltrante, se caracteriza porque ha roto las paredes de las glándulas o ductos donde se originó y crece alrededor del tejido mamario. El pronóstico del cáncer de mama infiltrante está dado por la etapa de la enfermedad, utilizando la clasificación TNM (tejido, nodo linfático, metástasis), la cual determina la fase en que se encuentra en base al tamaño del tumor y su expansión. El cáncer de mama se puede propagar a través del sistema linfático (ACS, 2015).

El cáncer de mama se ha clasificado al menos en 21 subtipos histológicos y 4 subtipos moleculares. Estos subgrupos moleculares están en función de las proteínas o biomarcadores que se encuentran sobre la superficie de las células cancerosas o dentro de ellas. Por ejemplo; la presencia o ausencia de los receptores HR+ o HR- (Hormone receptor, por sus siglas en inglés) de las hormonas progesterona (PR) o estrógeno (ER) y el exceso del factor de crecimiento epidérmico humano 2 (HER2+ / HER2-), una proteína que promueve el crecimiento. Con base a lo anterior, los grupos en que se clasifica el cáncer son; Luminal A (HR+/HER2-) que pueden expresar PR y/o ER pero no HER2; Luminal B (HR+/HER2+) que puede expresar PR y/o ER y HER2; Exceso de HER2 (HR-/HER2+) que puede expresar HER2 pero no PR ni ER; Basal ó triple negativo (HR-/HER2-) no expresa PR-, ER- ni HER2- (Perou y Borresen, 2011; Dieci et al., 2014; Parise y Caggiano, 2014;).

La línea celular MDA-MB-231 que es triple negativo fue obtenida de un adenocarcinoma grado III de glándula mamaria, de una paciente de 51 años caucásica (ATTC, 2016).

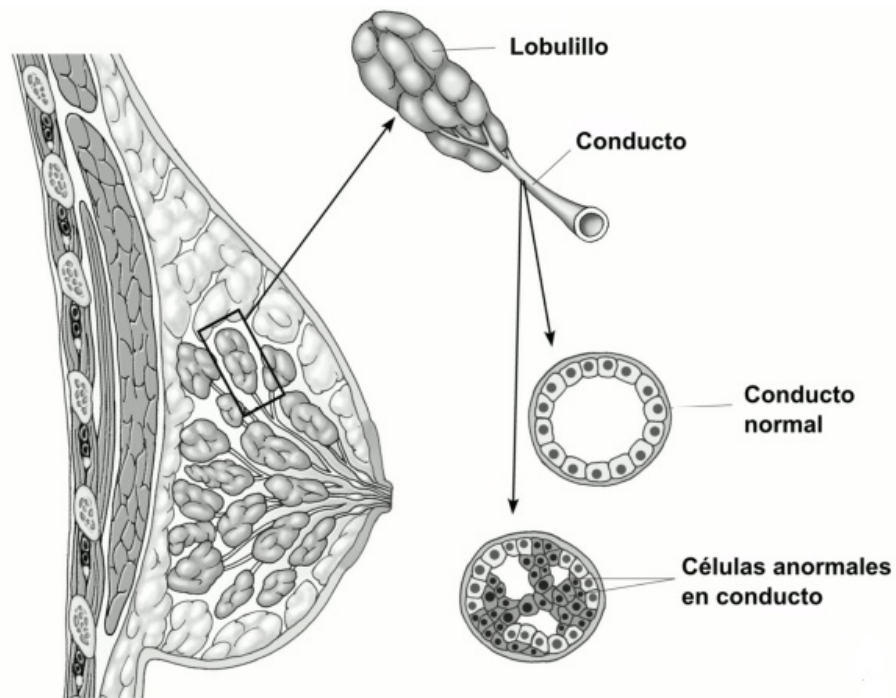


Figura 10. Esquema que representa carcinoma ductal *in situ* (DCIS). Comparación de un conducto normal de la glándula mamaria con un conducto canceroso (Tomado de American Cancer Society).

La genética hereditaria y mutaciones, principalmente en los genes BRCA1, BRCA2 y p53 elevan el riesgo de padecer cáncer de mama, aunque también influye el estilo de vida, la alimentación, actividad física, estrés, entre otros factores (OMS, 2014; ACS, 2015;).

Estadísticamente el cáncer de mama es el más común en las mujeres, tanto en países desarrollados como no desarrollados; representando el 16% del total de cánceres femeninos (OMS, 2012). En México, el cáncer de mama ocupa el primer sitio como el tipo de cáncer más frecuente en la mortalidad de mujeres con un 15.24% (INEGI, 2014).

Actualmente, la lucha contra el cáncer de mama va más dirigida a crear conciencia y prevención. La Secretaría de Salud en México, centra la estrategia de detección en la autoexploración y la exploración clínica a mujeres a partir de los 20 y 25 años de edad respectivamente y la mastografía de tamizaje en mujeres de 40 a 69 años de edad. Sin embargo, aún la cultura de prevención no es lo suficientemente significativa para reducir el número de muertes anuales (SSA, 2016). El control integral del cáncer abarca la prevención, la detección precoz, el diagnóstico y tratamiento, la rehabilitación y los cuidados paliativos (OMS, 2016).

II.3.2. Genes supresores de tumor

Dentro de las proteínas involucradas en la supresión de tumores está p53 y retinoblastoma (Rb), así como también existen otros genes que se caracterizan por ser supresores de tumor como el gen BRCA. Estas proteínas actúan como puntos de control del ciclo celular.

La proteína p53 se activa en respuesta a una gran variedad de estímulos nocivos como puede ser daño del ADN, hipoxia, estrés metabólico y la activación de oncogenes. Esta proteína modula la transcripción de genes que se encargan del arresto del ciclo celular, la apoptosis, el mantenimiento de la integridad genética, la inhibición de angiogenesis y senescencia celular, mecanismos que conforman la mayor defensa contra el crecimiento de tumores

(Ohnishi et al., 2005; Whibley et al., 2009). Las células que tienen mutado o suprimido a p53 se convierten en células cancerígenas, debido a que pierden la estabilidad genética y las mutaciones se acumulan. (Garbe et al., 2000).

La otra proteína importante en la supresión de tumores es Rb ya que participa en la regulación del ciclo celular y por lo tanto en el desarrollo y proliferación de células. Además de la replicación del DNA, reparación del mismo, apoptosis, diferenciación celular y senescencia. Rb funciona como regulador del punto de chequeo G1 en el ciclo celular y algunos cánceres de mama presentan una irregularidad en ese punto, por lo que se puede asociar como un factor importante en este tipo de cáncer (Malumbres et al., 2009; Morris et al., 2008).

Los genes BRCA1 y BRCA2, además del cáncer de mama también están asociados con el cáncer de ovario. Estos genes se encargan de reparar el ADN dañado y así evitar el crecimiento anormal de células, pero una mutación en ellos aumenta la probabilidad de que esto no suceda y da como resultado cáncer (Scully, 2000; Scully y Livingston, 2000; Whelcsh y King, 2001; ACS, 2015). No solo las mutaciones en estos genes pueden llevar a padecer cáncer, también otros genes como CDH1 y CDH11, que pueden verse afectados y aumentar el riesgo. CDH1 es una caderina que funciona como supresora de tumores, mientras que CDH11 se encarga de incrementar la habilidad de migrar a las células cancerígenas (Feldes et al., 2002; Berx et al., 2009; Sarrió et al., 2009; Andrews et al., 2012).

III. JUSTIFICACIÓN

En las últimas décadas, el cáncer se ha convertido en una enfermedad devastadora. Y es que hasta el momento, los tratamientos actuales siguen con la misma problemática; altos costos y por ende baja accesibilidad al público. Además de que son efectivos solo en un pequeño porcentaje de los enfermos, es decir, dependiendo de la etapa en que se encuentre la enfermedad es cómo funciona el tratamiento, aunado a la aparición de efectos adversos. Por lo anterior, es incesante la búsqueda de alternativas que sean económicas, factibles de producir, efectivas y que además generen efectos adversos mínimos, comparados con los tratamientos actuales como son la radio y quimioterapia.

En este sentido, se ha encontrado que proteínas producidas y aisladas de la especie *Bacillus thuringiensis* tienen actividad citotóxica contra líneas celulares de cáncer humano, como es el caso de las parasporinas (Jung et al., 2006; Kitada et al., 2006; Ohba et al., 2009) y las proteínas Cry (Olmos et al., 2010; Mendoza et al., 2012;). Por ello, existe la posibilidad de que las proteínas SLP que son producidas por *Bacillus thuringiensis*, puedan presentar actividad citotóxica sobre líneas celulares de cáncer.

Por tal motivo, se busca aislar, purificar e identificar molecularmente a las proteínas SLP de las cepas de *Bacillus sp*, que tengan efecto citotóxico sobre la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231. Esto dará lugar a identificar

una molécula con alto potencial de convertirse en un fármaco con las propiedades requeridas.

IV. OBJETIVOS

Objetivo General:

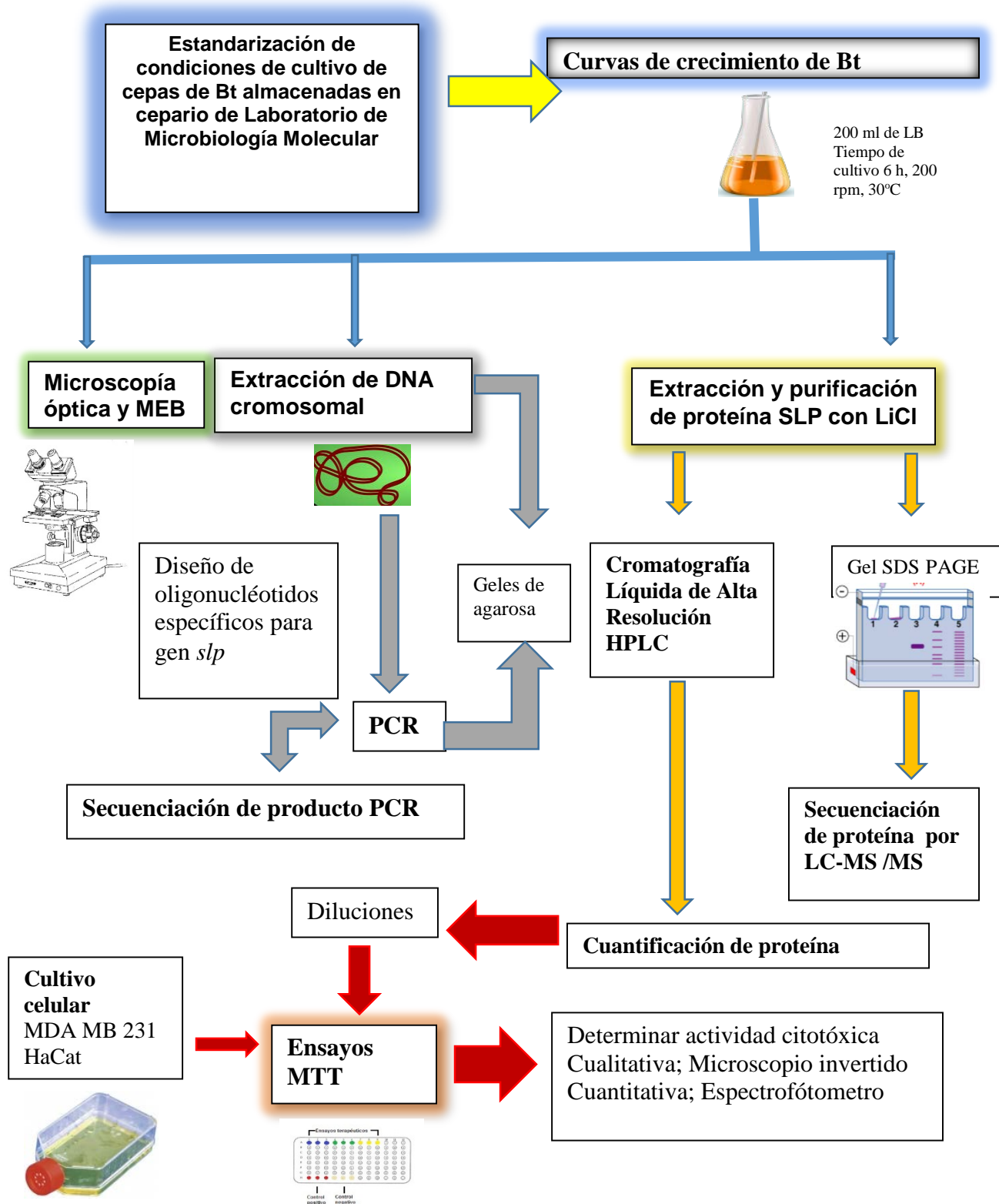
Aislar e identificar proteínas SLP en *Bacillus thuringiensis*, que presenten actividad citotóxica sobre la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231.

IV.1. Objetivos específicos

- 1.- Identificar cepas de *Bacillus thuringiensis* que produzcan proteínas SLP.
- 2.- Determinar las condiciones de cultivo para el crecimiento de las cepas seleccionadas y la producción de las proteínas SLP.
- 3.- Caracterizar molecularmente a los genes que codifiquen para las proteínas SLP en *Bacillus thuringiensis*.
- 4.- Extraer, purificar y caracterizar a las proteínas SLP de las cepas seleccionadas.
- 5.- Evaluar la citotoxicidad de las proteínas SLP aisladas sobre la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231, mediante ensayos *in vitro*.
- 6.- Determinar la DL₅₀ de las proteínas SLP identificadas con actividad citotóxica.

V. MATERIAL Y MÉTODOS

V.1. Diagrama de flujo del protocolo del diseño experimental



V.2. Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento

Se emplearon diferentes cepas de *Bacillus thuringiensis* almacenadas en el cepario del laboratorio de Microbiología Molecular de CICESE. Todas las muestras fueron recolectadas de la región de Baja California, principalmente del suelo. Las cepas bacterianas se crecieron por separado en agar Luria Bertani (LB) a 30°C por 24 h. Se sembró una colonia en 20 ml de medio líquido LB en un matraz de 250 ml y se incubó en un orbital Max Q 5000 Thermo Scientific, a una temperatura de 30°C durante 12 h, con una agitación constante de 200 rpm. Lo anterior, se hizo por separado para cada cepa. Pasado ese tiempo, se tomó el 10% del cultivo para inocular nuevo volumen de medio líquido, el cual se incubó por dos horas con las mismas condiciones de temperatura y agitación. Nuevamente se realizó otro inóculo del 10%. Para ello, se probaron dos condiciones diferentes de oxígeno modificando el volumen de medio líquido en el matraz, usando un matraz 250 ml y otro de 1000 ml para un volumen final de 150 y 200 ml, respectivamente. Esto corresponde a nivel bajo de oxígeno (relación medio oxígeno: 1.5:1) y nivel alto de oxígeno (relación medio oxígeno 1:5), respectivamente. Los matraces se incubaron bajo las mismas condiciones de temperatura y agitación por 6 y 7 h. Del total de 12 cepas empleadas, se eligió la cepa denominada AP11 para hacer posteriores análisis. Para medir el crecimiento se tomaron muestras del cultivo cada hora a lo largo de su fase exponencial y estacionaria, tomando lectura de la densidad óptica a 600 nm usando un espectrofotómetro Hach DR 5000.

V.3. Microscopía electrónica

La proteína SLP fue estudiada por medio de un microscopio electrónico de barrido Hitachi SU3500 Scanning Electron Microscope o Microscopio Electrónico de Barrido (MEB). Las muestras se tomaron de los cultivos de las cepas AP11 y *Bacillus subtilis* W168 a las 7 h. En un portaobjetos se colocaron unas gotas del concentrado de la muestra y se dejaron secar a temperatura ambiente. Una vez fijadas las muestras, el portaobjetos fue cubierto con carbón o con oro para ser observado en el microscopio electrónico de barrido.

También fueron observadas en un microscopio óptico de contraste de fases Olympus BX60, con el objetivo de inmersión a 100X, se tiñeron con verde de malaquita. En este caso se emplearon muestras de los tiempos 7, 18, 40 y 84 h y se observó la producción de cristales.

V.4. Identificación molecular del gen *s/p*

Para la identificación de los genes *s/p*, se empleó una muestra de cultivo de las cepas AP11 y *B. subtilis* que fue recolectada a las 6 h de crecimiento en medio LB. De estas muestras, se realizó la extracción de ADN cromosomal por técnica de fenol-cloroformo (Sambrock et al. 1989). Se realizó la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), para corroborar que existía la presencia de genes *s/p* que codifican para las proteínas SLP. Para poder realizar el PCR, se diseñaron oligonucleótidos específicos para amplificar un fragmento del gen *s/p*. Este diseño se llevó a cabo por medio de un alineamiento de las secuencias del

gen *slp* entre especies del género *Bacillus* tomadas del banco de genes NCBI (Figura 12) las siguientes especies fueron las analizadas : *B. thuringiensis serovar vazensis* (HM626285.1), *B. thuringiensis serovar poloniensis* (HM626284.1), *B. thuringiensis serovar pingluonsis* (HM626296.1), *B. weihenstephanensis* (HM626280.1), *B. cereus* (HM626283.1), *B. mycoides* (HM626282.1). Las secuencias fueron alineadas con el programa Clustal W y se obtuvieron los oligonucleótidos siguientes:

Sentido 5'TGACAGCAGCAATGGTAG'3 (FwSLP) y antisentido 5'GCTGCTTCTGCTTTaGTTA'3 (RvSLP) (Tabla II).

Las reacciones de PCR fueron realizadas en un volumen final de 100 µl conteniendo 50 ng de DNA y 20 ng de cada oligonucleótido. Las condiciones del termociclador fueron las siguientes: un ciclo inicial de 3 min a 95 °C, 25 ciclos de 1 min a 95°C, 1 min a 54°C y 2 min a 72°C.

Los productos de PCR fueron analizados en geles de agarosa al 1.2% utilizando el amortiguador TBE (Tris Borato EDTA), los geles fueron teñidos con Bromuro de Etidio y visualizados con luz UV en un transiluminador UV Eagle. Se empleó el marcador de peso molecular DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific®).

5' <i>slp</i> genes	
Bt vazensis	CAAAGACTAACTCTTACAAAAAAGTAATCGCAGGTACAATGACAGCAGCAATGGTAGCAG
Bt poloniensis	CAAAGACTAACTCTTACAAAAAAGTAATCGCTGGTACAATGACAGCAGCAATGGTAGCAG
Bt pingluonsis	CAAAGACTAACTCTTACAAAAAAGTAATCGCTGGTACAATGACAGCAGCAATGGTAGCAG
B weihenstephanensis	CAAAGACTAACTCTTACAAAAAAGTAATCGCAGGTACAATGACAGCAGCAATGGTAGCAG
B cereus	CAAAGACTAACTCTTACAAAAAATTAATCGCTGGTACAATGACAGCAGCAATGGTAGCAG
B mycoides	CAAAGACTAACTCTTACAAAAAAGTAATCGCTGGTACAATGACAGCAGCAATGGTAGCAG
3' <i>slp</i> genes	
Bt vazensis	ACTGGCGCCAA----TGGGAGCCAGATAAAAATCTAACTAAAGCAGAAGCAGCACAATT
Bt poloniensis	ACTGGCGACAAA----TGGGAACCAAATAAATCTGTAACGAAAGCAGAAGCAGCTCAATT
Bt pingluonsis	ACT-ACAATACTACTTGGGAGCCTGAAAAAAGTAACTAAAGCAGAAGCAGCTCAATT
B weihenstephanensis	ACTGGCGACAAA----TGGGAGCCAAATAAATCTGTAACGAAAGCAGAAGCAGCTCAATT
B cereus	ACTGGCGCCAA----TGGGAGCCAGATAAAAATCTAACTAAAGCAGAAGCAGCACAATT
B mycoides	ACT-ACAATACTACTTGGGAGCCTGAAAAAAGTAACTAAAGCAGAAGCAGCTCAATT

Figura 11. Alineamiento de secuencias del gen *slp* entre especies del género *Bacillus*. Especies utilizadas; *B. thuringiensis* serovar *vazensis* (HM626285.1), *B. thuringiensis* serovar *poloniensis* (HM626284.1), *B. thuringiensis* serovar *pingluonsis* (HM626296.1), *B. weihenstephanensis* (HM626280.1), *B. cereus* (HM626283.1), *B. mycoides* (HM626282.1)

Tabla II. Oligonucleótidos específicos del gen *slp* para especies del género *Bacillus*

Nombre	Longitud	Secuencia	Tm (°C)
FwSLP	18 bp	5'TGACAGCAGCAATGGTAG'3	56
RvSLP	19 bp	3'GCTGCTTCTGCTTTaGTTA 5'	58

*Letras mayúsculas = 100% conservados

V. 5. Secuenciación de productos de PCR

Los productos de PCR correspondientes a la cepa AP11, se purificaron de acuerdo al método de fenol-cloroformo de Sambrook, 1989. Una vez purificados, estos se verificaron a través de un gel de agarosa al 1% y fueron cuantificados con ayuda de un nanodrop modelo 2000 Thermo Scientific®. Una vez cuantificados, se prepararon las muestras para ser secuenciadas en el IBT (UNAM), en Cuernavaca Morelos.

V. 6. Extracción y purificación de proteína SLP

Las proteínas SLP fueron extraídas de muestras de cultivos de AP11 recolectados a las 6 h. Los paquetes celulares se lavaron con agua destilada purificada estéril a 3000 rpm por 10 min a 4°C (Konstantinov et al., 2008). Posteriormente, se adicionó 10 ml de una solución Tris-HCl 20 mM con un pH de 8 y se homogenizaron con ayuda de un homogenizador automático Tissue Tearor 985370 (Biospec products). Una vez homogenizadas las muestras, se centrifugaron a 2000 g por 10 min a 4°C y posteriormente se lavaron con agua destilada estéril. El botón (pellet) bacteriano obtenido se trató con 0.1 volumen de LiCl 1M, a temperatura ambiente por un tiempo de 30 min y en agitación constante. Pasado ese tiempo, la muestra se centrifugó a 2000 g por 10 min a 4°C y al pellet bacteriano se le adicionó 0.1 volumen de LiCl 5M y se incubó a temperatura ambiente, en agitación por 1 hora con la presencia de inhibidor de proteasas. Se centrifugó de nuevo la solución y el sobrenadante que contiene a las proteínas extraídas fue pasado a través de un filtro de 0.2 μm , para

finalmente concentrarse con un filtro amicon de Millipore de 50 kDa. Las muestras se guardaron a -20°C hasta su uso.

V. 7. Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC)

La muestra concentrada se sometió a un análisis cromatográfico con ayuda de un equipo Agilent 1100 con un detector G1365B, usando una columna de fase reversa Eclipse XDBC8 con 4.6 mm ID x 150 mm y 5 μm de tamaño de partícula (Agilent Technology). La proteína SLP fue eluída a temperatura ambiente usando como solvente A (0.1% TFA en agua destilada estéril y solvente B (0.1% TFA en acetonitrilo). El gradiente fue lineal como se presenta en la tabla 3:

Tabla III. Gradiente utilizado para eluir a la proteína SLP de la cepa AP11.

Tiempo (min)	Porcentaje (%)
0-30	30%
31-32	100%

La proteína eluída se obtuvo con una velocidad de flujo de 0.2ml/min y se monitoreó a 210 nm.

V.8. Identificación y cuantificación de proteína SLP

De los concentrados obtenidos de los centricones, así como muestras sin concentrar empleadas como control y las obtenidas del HPLC, se prepararon 25 μ l con 5 μ l del amortiguador de carga, se desnaturalizaron a 100°C y cargaron en un gel SDS-PAGE, con el objetivo de separar las proteínas SLP por su peso molecular. El gel contaba con un gel concentrador al 5% y un gel separador al 10% de poliacrilamida, el cual fue colocado en un sistema Mini-Protean (BIORAD), se realizó a 0.20 mA constante por una hora y 25-30 mA por dos horas. Se usó el marcador molecular Precision Plus Protein Dual Color Standard (BIO-RAD). Los geles se tiñeron con azul de coomasie R-250 ó con la tinción de Nitrato de Plata. Por otra parte, las proteínas se cuantificaron mediante el método de Bradford (Bradford, 1975).

V.9. Identificación de proteína SLP por medio de espectrometría de masas de alta resolución (LC MS/MS).

Una banda de 86 KDa se identificó en el gel y fue cortada para ser identificada posteriormente por LC-MS/MS en el Instituto de Biotecnología (IBT) de la UNAM. La muestra fue previamente reducida con ditioneitol (DTT), alquilada con iodoacetamida (Sigma-Aldrich®) digerida "in gel" con tripsina (Promega Sequencing Grade Modified Trypsin). Los péptidos resultantes fueron aplicados en un sistema LC-MS bomba de nanoflujo EASY-nLC II (Thermo-Fischer ®Co. San Jose, CA) acoplado a un espectrómetro de masas LTQ-Orbitrap Velos

(Thermo-Fisher®) con sistema de ionización tipo nano-electrospray (ESI). La calibración del espectrómetro fue realizado con una solución Calmix (N-butilamina, cafeína, Met-Arg-Phe-Ala (MRFA) y Ultramark 1621 se utilizan para calibrar Thermo Scientific LTQ Velos de trampa de iones y Orbitrap espectrómetros de masas en el modo de ionización positiva ESI. La N-butilamina, se incluye para extender a menor rango de calibración de masas, esto permite determinaciones con exactitudes menores a 5 ppm (partes/millón). En el sistema de cromatografía de líquidos, se utilizó un sistema gradiente de 10-80% de solvente B (agua/acetonitrilo con 0.1% de ácido fórmico) en 120 minutos, utilizando una columna capilar hecha en casa (ID 0.75 μm y 10cm largo RP-C18). El flujo del sistema LC fue de 300 nanolitros/minuto. Para la fragmentación de los péptidos se utilizó los métodos de CID (Collision-Induced Dissociation) y HCD (High energy Collision Dissociation) donde solamente los iones con carga 2⁺, 3⁺ y 4⁺ fueron seleccionados para los eventos de fragmentación. Fueron desconsiderados los iones con cargas 1⁺, superiores a 5⁺ y de cargas indefinidas. Todos los espectros fueron adquiridos en modo de detección positivo. La ejecución y captura de los datos de fragmentación fueron realizados de forma dependiente del escaneo total de iones según las cargas pre-determinadas con un ancho de aislamiento de 3.0 (m/z), energía de colisión normalizada de 35 unidades arbitrarias, activación Q de 0.250, tiempo de activación de 10 milisegundos y tiempo máximo de inyección de 10 milisegundos por micro-escaneo. Durante la captura automática de los datos fue utilizado la exclusión dinámica de iones: (i) lista de exclusión de 400 iones,

(ii) tiempo de pre-exclusión de 30 segundos y (iii) tiempo de exclusión de 300 segundos.

V.10. Cultivo celular

La línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231 y células de HaCat (queratinocitos normales), fueron crecidas por separado en medio DMEM (Thermo Fisher®) suplementado con 10% SFB (Suero Fetal Bovino ATTC®) y con 1% antibiótico-antimicótico 100X (Invitrogen®), dejando incubar a 37°C con 5% de CO₂ y atmósfera humidificada. Las células se mantuvieron en crecimiento exponencial haciendo subcultivos cada tercer día, que consistían en quitar el medio de cultivo de la caja, para después lavar con una solución estéril de PBS (P3030 Spectrum), la cual se descartaba, para posteriormente disociar con tripsina 0.25% (Invitrogen®) por 5 minutos a 37°C. Una vez separadas las células de su soporte se concentraron y se sembraron en un frasco nuevo para el caso del subcultivo, o bien, se cuantificaron con ayuda de una cámara de Neubauer o hematocitómetro, para los ensayos *in vitro*. Para evitar cambios significativos en las características de las células, se usaron entre el pase 6 y 10 en los ensayos.

V.11. Ensayos de viabilidad celular

La viabilidad celular fue determinada por ensayos con Bromuro de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-ilo]-2,5-difeniltetrazol (MTT). Este ensayo se caracteriza por la reducción del MTT a formazán y se manifiesta por el cambio de color amarillo a

morado. Esta reducción se lleva a cabo por las enzimas reductasas mitocondriales de las células vivas o activas, y se mide cuantitativamente por su absorbancia con un espectrofotómetro. De los cultivos crecidos exponencialmente y una vez que alcanzaron el 80% de confluencia, se realizó la técnica descrita en el apartado anterior para realizar un subcultivo, solo que aquí una vez separadas las células de su soporte, estas se cuentan en el hematómetro y en base a este conteo se sembraron en una placa de 96 pozos para efectuar el ensayo.

La cantidad de células sembradas por pozo fue de 1×10^4 células/ml, considerando los ajustes necesarios para tener un volumen final de 100 μ l por pozo. La placa se incubó por 5 horas con las condiciones ya mencionadas en el apartado de cultivo celular. Pasado este tiempo de incubación y una vez adheridas a su soporte (placa), se detiene el ciclo celular descartando el medio de todos los pozos y se sustituye con medio de cultivo sin suplementar, dejando incubar por 18 horas. Posteriormente, se descarta este medio y las células se incubaron con diferentes concentraciones de proteína SLP (0.25, 0.5, 1 μ g/ml) a las condiciones ya establecidas de 37C, 5% CO₂ por un periodo de 24 hrs. Es importante mencionar que para obtener esas concentraciones de proteína SLP, se realizaron los ajustes necesarios basados en la cuantificación de proteína obtenida por el método de Bradford. Todos los ensayos se hicieron por triplicado. Paralelo a los ensayos de citotoxicidad, se empleó como control negativo, células sin ningún tipo de tratamiento y como control positivo células

tratadas con DMSO al 10%, en lugar de la proteína SLP, que garantiza efecto citotóxico.

A las 24 horas de incubación con la proteína SLP, se observan en el microscopio invertido de contraste de fases Olympus modelo CKX41, el efecto que se tiene en las líneas celulares de forma cualitativa, así como de los controles.

Después de hacer ese análisis microscópico, se agrega 100 µl de MTT con una concentración de 5mg/ml a cada pozo y se incubó por 3 hrs a 37 °C y 5% de CO₂. La cantidad de cristal de formazán formado se disolvió con Isopropanol y posteriormente se cuantificó en un espectrofotómetro Microplate Manager de Biorad, por medio de un lector de ELISA a 595 nm. La figura 13, ilustra el montaje de los ensayos citotóxicos con sus controles en una placa de 96 pozos

Para obtener el porcentaje de viabilidad celular, se considera a las absorbancias obtenidas de cada pozo respecto al control negativo el cual es considerado como 100%, ya que se trata de células control sin tratamiento de ningún tipo. Para ello se emplea la siguiente fórmula:

f1.

$$\% \text{ sobrevivencia} = \left(\frac{\text{Abs de la muestra experimental}}{\text{Abs muestra control negativo}} \right) \times 100$$

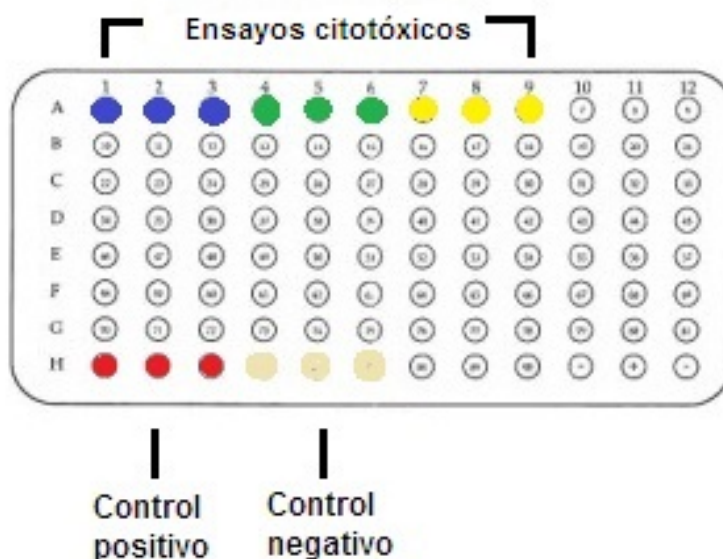


Figura 12. Representación esquemática de una placa de 96 pozos con los ensayos citotóxicos y sus controles de una sola línea celular. Cada triplicado de color, representa un ensayo de citotoxicidad o bien, el control negativo o positivo de la línea celular que se trabaja.

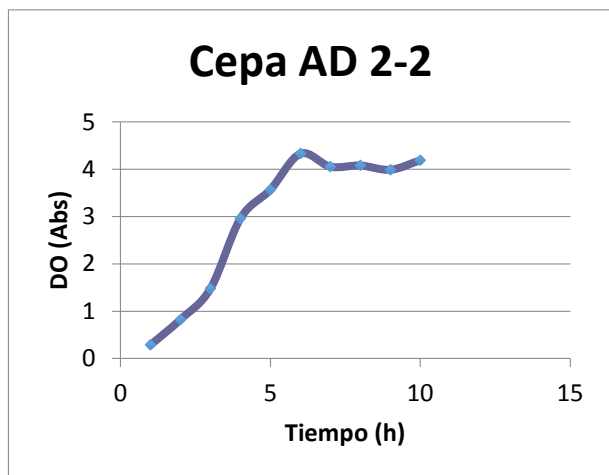
V.12. Análisis estadístico: se realizaron pruebas estadísticas con el programa statistics. Se utilizó una prueba ANOVA de una vía. El nivel de $p > 0.05$ fue considerado estadísticamente significativo.

VI. RESULTADOS

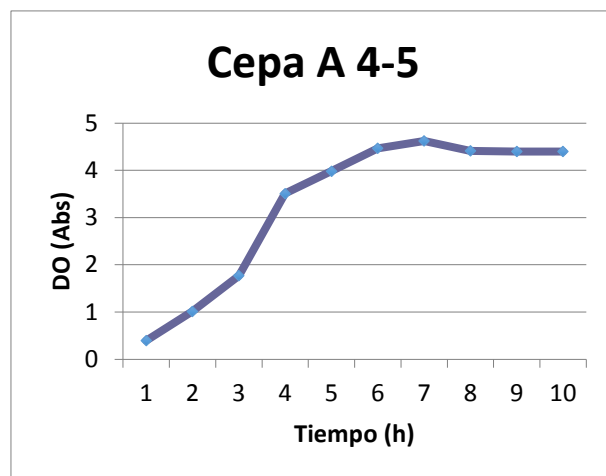
VI.1. Identificación de la cepa Bt AP11

VI.1.1 Curvas de crecimiento

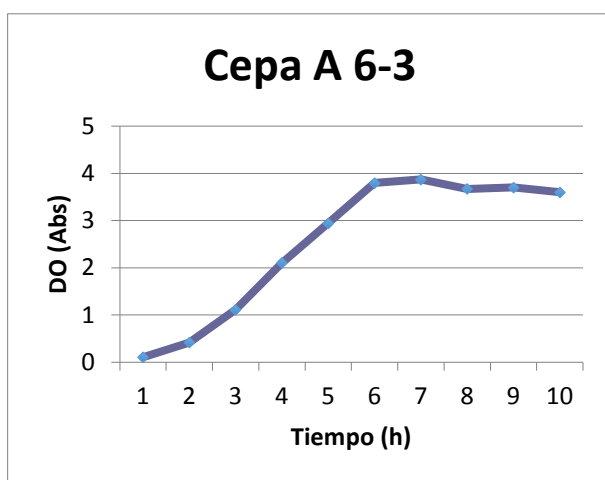
La figura 13 muestra las curvas de crecimiento de 4 de las 12 cepas que se trabajaron, incluyendo la cepa AP11. Estas cepas previamente fueron identificadas como Bt por Mendoza en el 2012. Todos estos cultivos se realizaron con la condición de nivel bajo de oxígeno, lo que se obtuvo utilizando grandes volúmenes de cultivo con respecto al volumen del matraz.



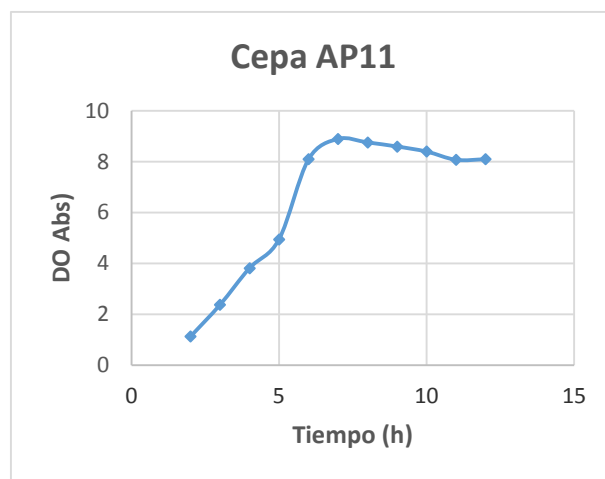
a)



b)



d)



c)

Figura 13. Curvas de crecimiento de 4 cepas de Bt. Las cepas están reservadas en el laboratorio de Microbiología molecular de CICESE a) Cepa AD 2-2 b) Cepa A 4-5 c) Cepa A 6-3 d) Cepa AP11.

Como se observa en la figura 13, el crecimiento de todos los cultivos fue muy similar, solo AP11 alcanzó mayor absorbancia. Se puede determinar que en el rango entre las 6-8 horas (a partir del inóculo) se obtuvieron las fases antes mencionadas, ya que presentan los valores de mayor absorbancia. Las

muestras recolectadas de las curvas se procesaron para detectar la presencia de la proteína SLP, pero primeramente se identificó si estas cepas presentaban genes *s/p* que son los encargados de codificarlas.

La cepa elegida fue la denominada AP11, la cual fue identificada como Bt. Los productos de PCR obtenidos con oligonucleótidos específicos para genes *s/p* fueron secuenciados. Así mismo, la proteína SLP fue secuenciada una vez extraída y purificada.

Como se mencionó en la sección de material y métodos, se trabajaron dos condiciones de oxígeno, por lo que se realizaron curvas de crecimiento en función de una mayor cantidad de oxígeno. En este caso, se observó que la cepa AP11 tiene su crecimiento máximo aproximadamente una hora antes del tiempo establecido en cultivos con menos oxígeno. La figura 14, muestra la curva de crecimiento de la cepa AP11 con esta nueva condición y se puede observar que crece más rápido y en mayor proporción.

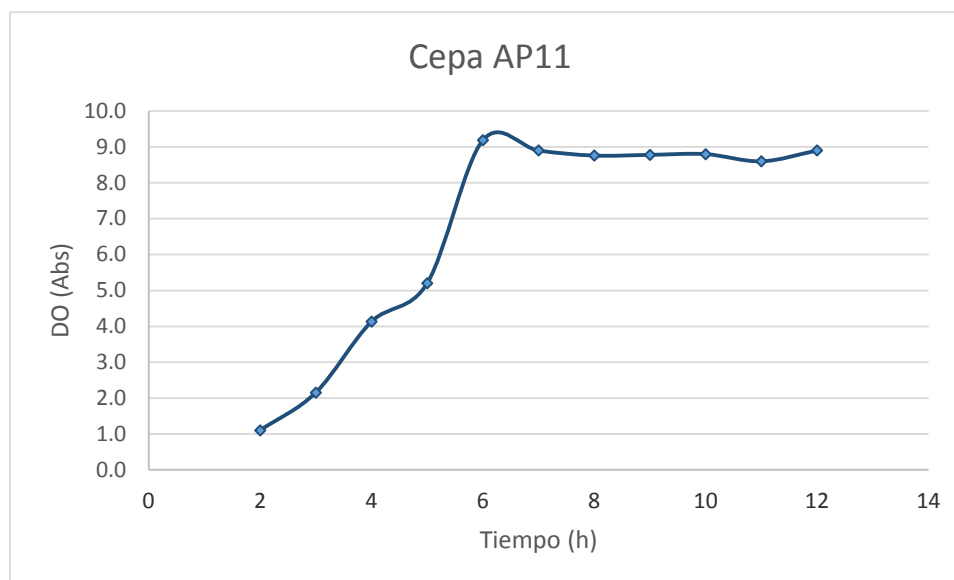


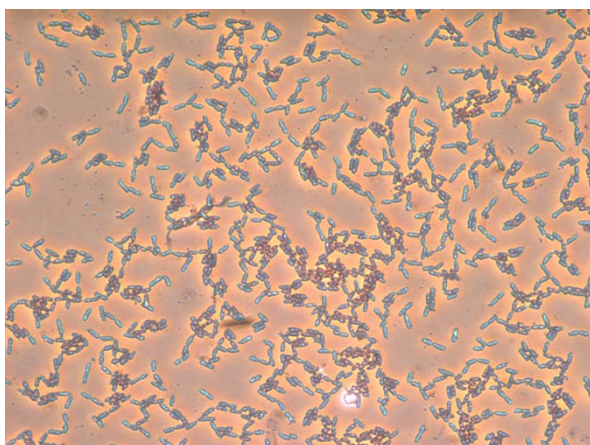
Figura 14. Curva de crecimiento de cepa AP11 con la condición de crecimiento de nivel alto de oxígeno. Relación medio-oxígeno; 1:5.

VI.1.2. Análisis microscópico

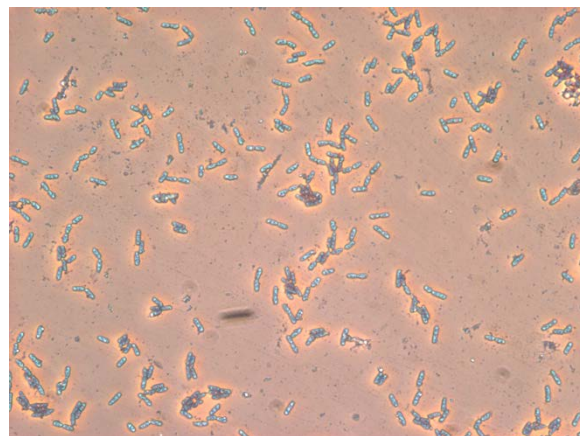
Con muestras recolectadas a las 6 h, así como a las 18, 40 y 84 horas del cultivo, se realizó una tinción verde de malaquita para identificar la morfología celular y examinar la producción de cristales. En estas tinciones se pudo observar a las células vegetativas en color rosa, las esporas en color verde y los cristales en color blanco.

De esta manera, se puede observar que en el tiempo de 6 horas no hay formación de cristales ni de esporas (figura 15), pero en los tiempos siguientes si se presenta la producción de cristales, característico de las cepas de Bt, los cuales se encuentran liberados en el medio y se pueden identificar por ser

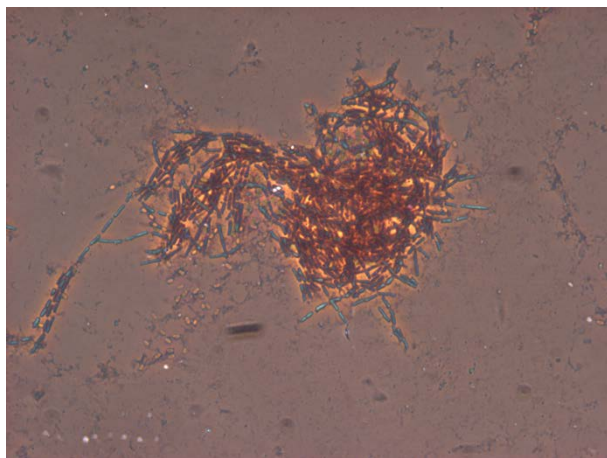
blancos refringentes como se puede observar en los incisos b, c y d de la figura 15.



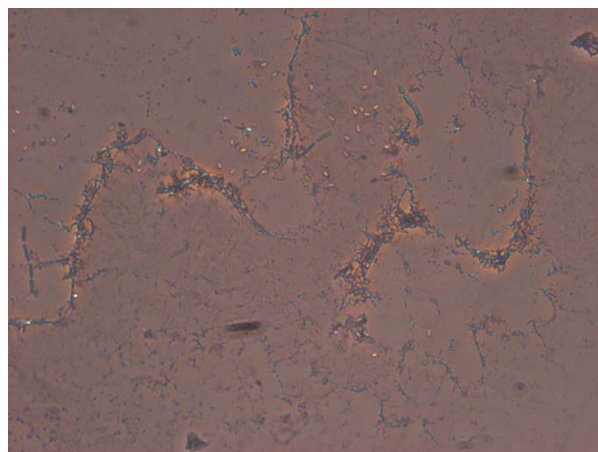
a)



b)



c)



d)

Figura 15. Morfología celular de la cepa AP11 en diferentes tiempos de cultivo. A) 6 h, b) 18 h c) 40 h d) 84 h. Tinción verde malaquita. Observadas con microscopio a 100x.

Además, utilizando un microscopio electrónico de barrido se visualizó a la cepa AP11 en el tiempo de 6 h, la cual se ilustra en la figura 16.

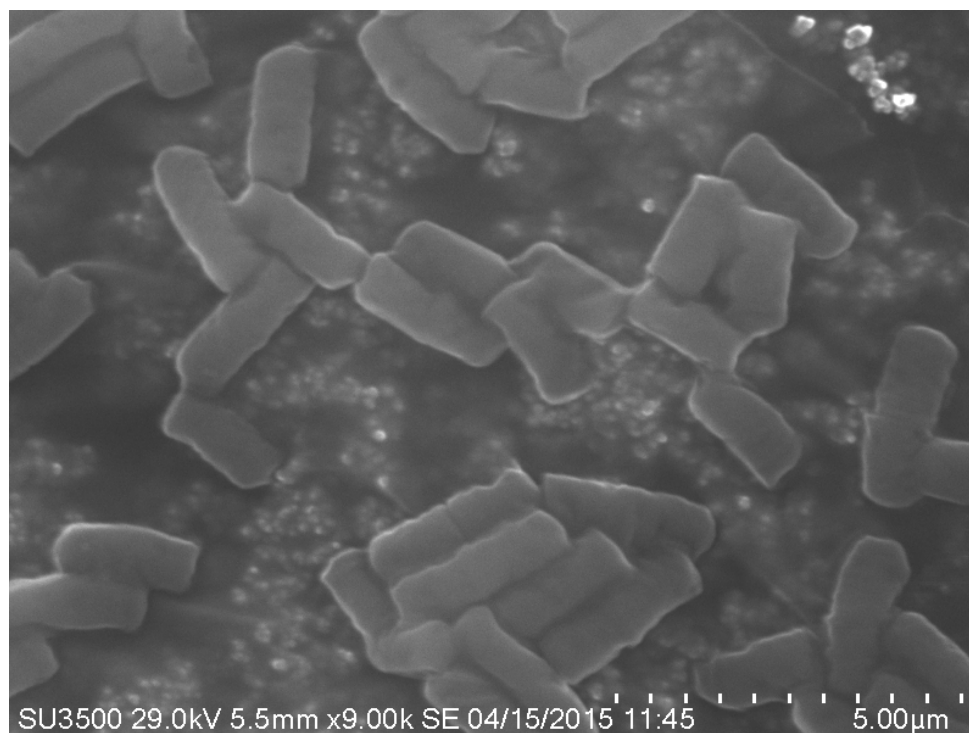


Figura 16. Morfología de la cepa Bt AP11 a las 6 h. Esta imagen fue observada con microscopio electrónico de barrido MEB.

La pared celular puede observarse en la parte externa de la célula y es allí donde se tiene una inclusión que corresponde a la proteína SLP. En la figura 17, se observa la morfología que corresponde al estado en crecimiento exponencial de la cepa AP11 y *Bacillus subtilis* W168. Es evidente la diferente morfología entre ambas especies y de destacar que *Bacillus subtilis* no tiene proteína SLP (Engelhardt, 2007). Además, es importante hacer notar que en ese tiempo no hay producción de cristales como se observa en la imagen.

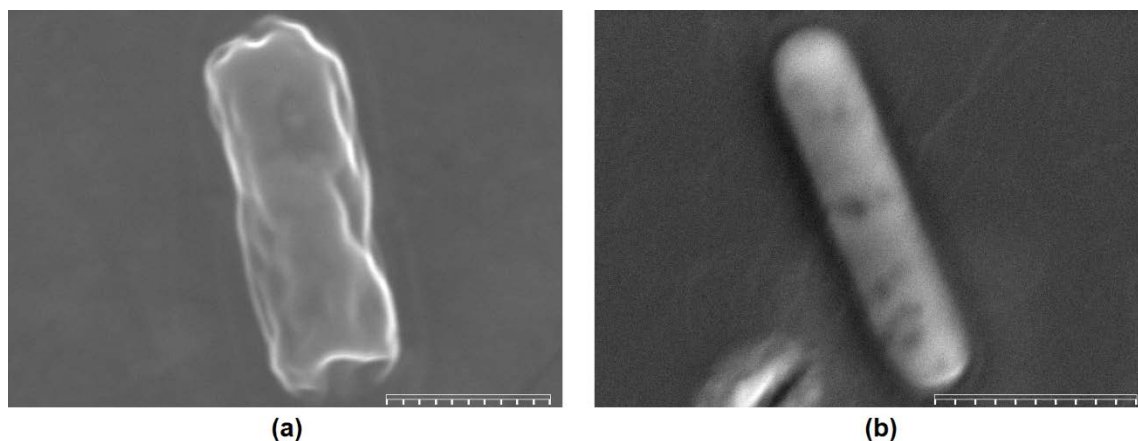


Figura 17. Morfología de cepa Bt AP11 y cepa *Bacillus subtilis* W168. La imagen fue observada con microscopio electrónico de barrido MEB. a) cepa Bt AP11 b) *Bacillus subtilis* W168.

VI.2. Identificación y producción de proteína SLP en Bt

VI.2.1. Identificación molecular del gen *slp* en la cepa Bt AP11

La identificación de los genes *slp* se realizó por medio de la técnica de PCR. Para ello, a la muestra recolectada a las 6 h de la cepa antes mencionada, se le realizó extracción de ADN cromosomal. Para corroborar que fue una extracción limpia, el ADN se observó en un gel de agarosa al 1.2%. Una vez verificado lo anterior, se procesaron las muestras para efectuar PCR con los oligos específicos para los genes *slp*.

En la figura 18, se muestra el gel de agarosa que confirma la presencia del gen *s/p* en los productos de PCR de la cepa AP11, empleando los oligos específicos diseñados. La temperatura de amplificación fue de 54°C y en el carril 2 y 3 se puede observar un fragmento del tamaño esperado que corresponde a 540 pb aproximadamente, con lo que se comprueba la especificidad de los oligos y la presencia del gen *s/p* en AP11.

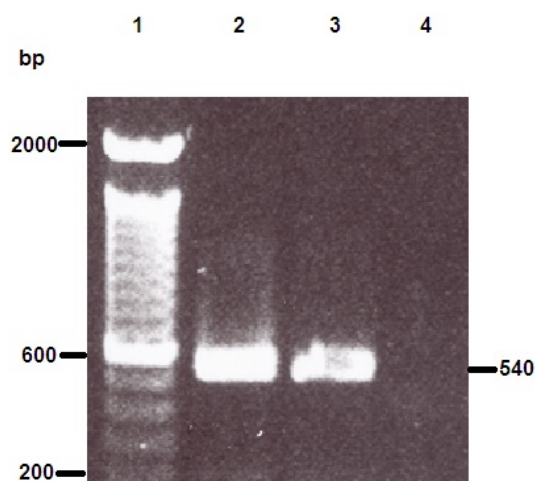


Figura 18. Productos de PCR en Gel de agarosa 1.2% Carril 1) Marcador molecular; carril 2) PCR de la cepa AP11 con fragmento amplificado de 540 pb; carril 3) Cepa *Bacillus thuringiensis* control positivo del laboratorio de Microbiología molecular del CICESE con fragmento de 540 pb; carril 4) Control negativo de la cepa *Bacillus subtilis* W168, sin amplificación.

Además de verificar la presencia del tamaño esperado en AP11, se secuenció el producto de PCR obtenido, con el objetivo de confirmar que se trataba de un gen *s/p*. Lo cual se pudo comprobar una vez que los resultados fueron analizados en el programa BLAST del NCBI.

La secuencia del producto de PCR concuerda en un 87% con una secuencia previamente identificada HM626296.1 de *Bacillus thuringiensis*. A partir de ese momento, a la cepa AP11 se le identificó como cepa Bt AP11.

VI.2.2. Producción de proteínas SLP en Bt AP11 utilizando diferentes condiciones de oxígeno

La cepa Bt AP11, se sometió a dos condiciones de cultivo en función del oxígeno. Para ello, se ajustó el volumen de cultivo en los matraces utilizados para obtener una relación de 1.5:1 medio- oxígeno (nivel bajo) y de 1:5 de medio-oxígeno (nivel alto). Las proteínas obtenidas en ambas condiciones fueron analizadas por SDS-PAGE.

La figura 19, muestra el gel SDS-PAGE teñido con coomassie, donde se puede observar la comparación entre dos concentrados de proteína SLP con diferentes condiciones de oxígeno. Ambas muestras contenían a la proteína SLP con el mismo tamaño de 80-90 KDa. Verificándose la intensidad de la banda con la cantidad de proteína, se puede observar que está ligeramente más concentrada la procesada con nivel alto de oxígeno. De lo anterior se puede interpretar que a mayor oxígeno, se tiene mayor densidad celular y mayor concentración de proteína consecuentemente.

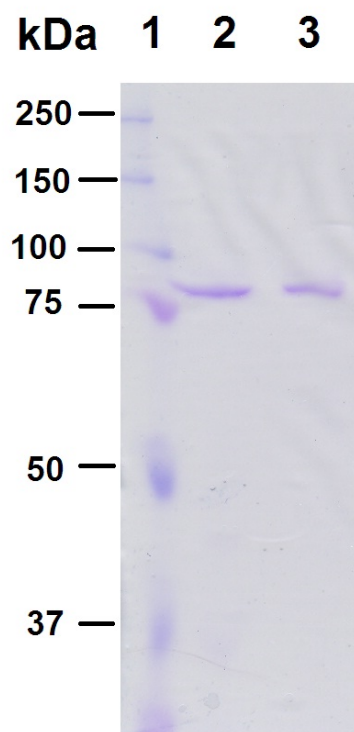


Figura 19. Identificación de proteína SLP en Gel SDS Page teñido con azul de Coomassie. Carril 1) marcador molecular; Carril 2) concentrado de la proteína SLP procedente de un cultivo con nivel alto de oxígeno; Carril 3) concentrado de la proteína SLP procedente de un cultivo con nivel bajo de oxígeno.

VI.2.3. Extracción y purificación de la proteína SLP de la cepa Bt AP11

Partiendo de un cultivo con alto nivel de oxígeno, la extracción de la proteína SLP se realizó con LiCl que es un agente que la desagrega de la membrana celular, sin romper la célula. Se sabe que éste agente es el que efectúa extracciones más limpias, es decir, sin extraer tantas impurezas y con mayor rendimiento (Lortal et al., 1992; Sleytr et al., 2014). Una vez extraída la proteína de la membrana celular, se purificó por medio de un filtro de 0.2 μm y de un

centrición de 50 kDa con lo cual se obtuvo a la proteína SLP con un alto porcentaje de pureza (fig. 19). La misma muestra fue analizada a través de un cromatógrafo de líquidos de alta resolución (HPLC), para identificar el tiempo de retención, la pureza y la concentración en que se encontraba la proteína SLP. De esta manera, en la figura 20, se puede observar que en el minuto 18 aparece un pico definido que corresponde a la proteína SLP.

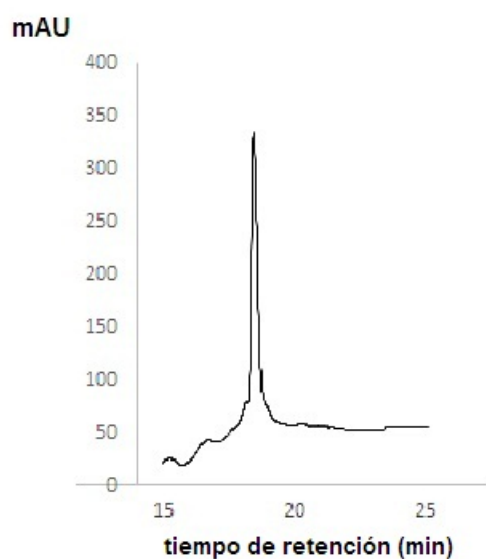


Figura 20. Cromatograma de la muestra concentrada que contiene a la proteína SLP de la cepa Bt AP11. El pico que aparece en el minuto 18 corresponde a la proteína de interés.

Una vez identificado el tiempo donde se obtiene a la proteína SLP, se recolectó la muestra y se verificó por medio de un gel SDS- PAGE con las características descritas en la metodología. En la figura 21, se aprecia una comparación entre muestras procedentes de diferentes etapas del proceso de extracción y purificación de la proteína SLP. Como se puede observar, todos los carriles presentaron una banda de aproximadamente 80-90 kDa, la que puede atribuirse a la proteína SLP de la cepa Bt AP11. Se puede notar que la intensidad de las bandas es diferente en todos los procesos, lo que se puede correlacionar con la cantidad de proteína. En este sentido, los carriles 2 y 3 mostraron una banda única a lo largo del carril, siendo la banda del carril 3 ligeramente más intensa que la del carril 2. Por otra parte, las muestras que no fueron completamente procesadas, presentaron otra serie de bandas a lo largo del carril (carril 4 y 5), demostrando la presencia de otras proteínas o impurezas.

Paralelo a este gel, se puede apreciar el gel SDS PAGE teñido con Nitrato de Plata. La presencia de una sola banda que corresponde a la proteína SLP (carril 4). Mientras que los demás carriles, mostraron una serie de bandas que indicaron la presencia de impurezas proteicas en las muestras.

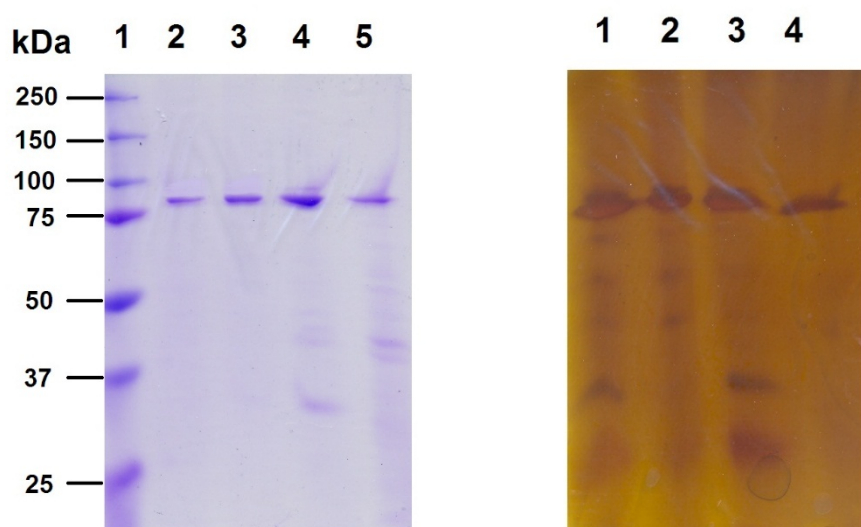


Figura 21. Identificación de proteína SLP con diferentes condiciones en Gel SDS PAGE con diferentes tinciones A) Teñido con Coomassie Carril 1) Marcador molecular; Carril 2) concentrado de la proteína SLP; Carril 3) concentrado procesado por HPLC; Carril 4) Muestra tratada con LiCl 5M sin concentrar; Carril 5) Muestra tratada con LiCl 1M solamente. B) Teñido con Nitrato de plata. Carril 1) Muestra tratada con LiCl 1M solamente; Carril 2) Muestra tratada con LiCl 5M sin concentrar; Carril 3) concentrado de la proteína SLP; Carril 4) concentrado procesado por HPLC.

VI.2.4. Identificación de proteína SLP con espectrometría de masas de alta resolución (LC-MS/MS)

El análisis de espectrometría de masas indicó una masa molecular de 86,575.4 Da, lo que confirmó el tamaño de 86 KDa encontrado para la proteína presente en los geles SDS-PAGE. La secuencia obtenida fue analizada a través de

bases de datos, arrojando más del 50 % de similitud con una proteína SLP de una cepa de Bt (ADU04485.1). En ese sentido, la proteína identificada y la proteína que se obtiene de la secuencia de DNA ADQ08580.1, presentan un 98% de similitud entre ellas.

A continuación se presenta la secuencia parcial de la proteína SLP obtenida de la cepa Bt AP11 (Figura 22):

MAKTNSYKKV	IAGTMTAAMV	AGVVS P V A A A	GKSFDPVPAD	HWGIDSINYL
VEKGAVK G N D	KGMFEPGKEL	TRAE A A T M M A	Q I L N L P I D K D	AKPSFADSQG
QWYTPFIAAV	EKAGVIKGTG	NGFEPNGKID	RVSMASLLVE	AYKLDTKVNG
TPATKFKDLE	TLNWGK E K A N	ILVELGISVG	TGDQWEPKKT	VTKAEAAQF
AKTDKQFGTE	AAKVESAKAV	TTQKVEVKFN	KAVEKLTKEK	VKVTNKANND
KALVKEV T L S	EDKKSATVEL	YGNLAAKQTY	TVDVNVKVGKT	EVAVGSLEAK
TIEMADQTVV	ADEPTALQFT	AKDENGTEVV	SPEGIEFVTP	AAEK I N A K G E
ITLAKGTSTT	VKAVYKKDGK	WAESKTVKV	SAEGAAVAS I	SNWTVAEQNK
ADFTSKDFKQ	NNK V Y E G D N A	YVQVELK D Q F	NVVT T G K V E Y	ESLNTEVAVV
DKATGKVTVL	SAGKAPVKVT	VKDSKDKELV	SKTVEIEAFA	QKAMKEIKLE
KTNVALSTKD	VTDLKV K A P V	LDQYGKEFTA	PVTVKVLDKD	GKELKEQKLE
AKYVNKELVL	NAAGQEAGNY	TVVLTAKSGE	KEAKATLALK	LKAPGAFSKF
EVRGLEKELD	KYVTEENQKN	AMTVSVLPVD	ANGLV L K G A E	AAELKVTTTN
KDGKEVDATD	AQVTVQNNSV	ITVGQGAKAG	ETYKVTV V L D	GKLITTHSFK
VVDTAPTAKG	LAVEFTSTSL	KEVAPNADLK	AALLN I L S V D	GVPATTAKAT
VSNVEFVSAD	TNVVAENGTV	GAKGATSIYV	KNLTVVKDGK	EQKVEFDKAV
QVAVSIKEAK	PATK			

Figura 22. Secuencia de la proteína SLP de la cepa Bt AP11. Se muestra en color gris los péptidos identificados.

VI.3. Actividad anticancerígena de proteína SLP de la cepa Bt AP11

VI.3.1. Cultivo celular

Para evaluar si la proteína SLP obtenida de la cepa Bt AP11 presentaba efecto citotóxico se utilizaron dos líneas celulares; MDA-MB-231 de cáncer de mama y HaCat que es una línea no cancerígena. Para obtener las diferentes

concentraciones de proteína SLP, se consideró el valor obtenido por el método de Bradford como concentración de proteína total 1.8 µg/µl. A partir de ese valor, se hicieron las adecuaciones necesarias para obtener concentraciones de 0.25, 0.5 y 1 µg/ml, empleando medio de cultivo para las diluciones.

VI.3.2. Efecto de la proteína SLP en MDA-MB-231

Para la línea celular MDA-MB-231, después de agregar las diferentes concentraciones de proteína SLP y pasado el tiempo de incubación, se detectó de forma visual con el microscopio, que hubo un efecto citotóxico. La figura 23, muestra el efecto en las células MDA-MB-231 con la exposición a la proteína SLP, previo a agregar el reactivo MTT. Como puede observarse en la figura, las células muertas o metabólicamente inactivas, presentaron una morfología circular o con lisis celular (control positivo), a diferencia de las células vivas que se presentaron refringentes, ovaladas y diferenciadas (control negativo). De esta manera se pudo determinar de forma cualitativa, que las células expuestas a la proteína SLP presentaron mucha semejanza al control positivo, el cual fue expuesto a un porcentaje de DMSO que garantizaba su muerte.

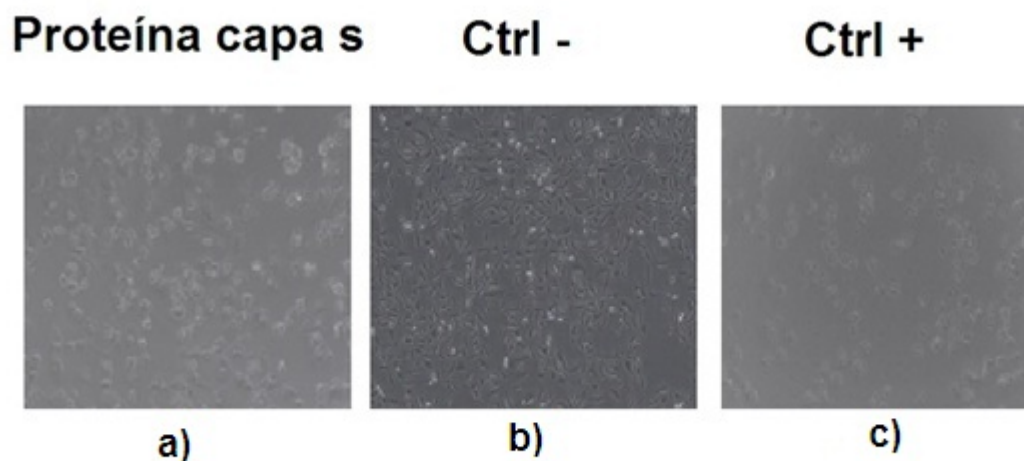


Figura 23. Microfotografías del ensayo de viabilidad celular de MDA-MB-231. a) Exposición de 24 h a la proteína SLP b) Ctrl - Control negativo y c) Ctrl + Control positivo observados a 10X en contraste de fases.

Sin embargo, lo anterior también se evaluó de forma cuantitativa, determinando la absorbancia del producto formado con la reacción de MTT. El resultado obtenido indicó que la concentración de $0.25 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ fue la dosis letal media DL_{50} , ya que como se puede observar en la figura 24 que hay un 50% de la población total con efecto citotóxico. Este porcentaje fué en aumento de acuerdo a la curva de dosis-respuesta, que en este caso se representa en forma de gráfica de barras (Fig. 24).

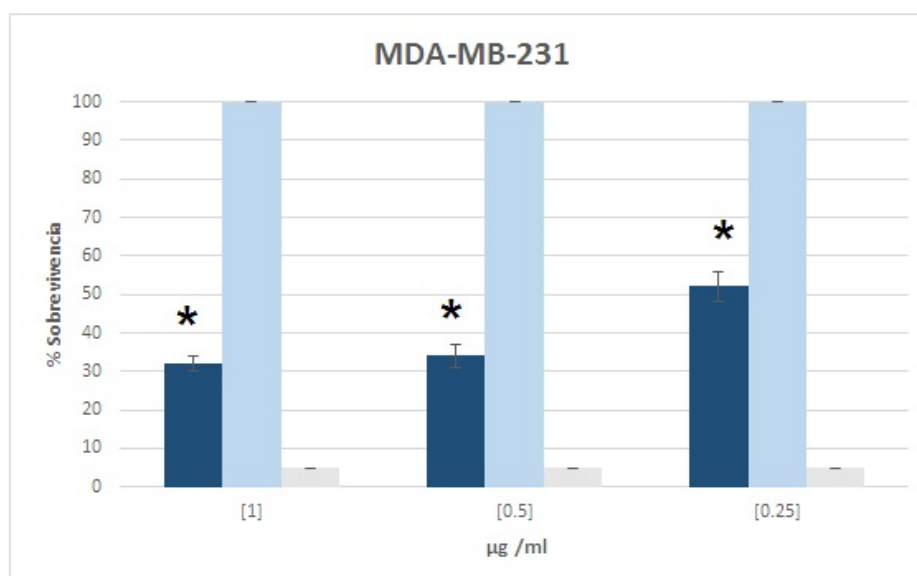


Figura 24. Efecto citotóxico de forma cuantitativa en la línea celular MDA-MB-231. Las concentraciones empleadas fueron 1, 0.5, 0.25 µg/ml de proteína SLP. Se muestra en color azul oscuro el efecto citotóxico de la línea celular MDA-MB-231, en color azul claro el control negativo que son células sin tratamiento y en color gris el control positivo DMSO. $P > 0.05$ (*) diferencia significativa.

VI.3.3. Efecto de la proteína SLP en células HaCat

La línea celular HaCat también fue evaluada con la proteína SLP de la cepa Bt AP11, de la misma forma que MDA-MB-231. Las células se trataron con las mismas concentraciones usadas en el ensayo de MDA-MB-231. La figura 25, muestra las células HaCat después del periodo de incubación con la proteína SLP, así como sus controles negativo y positivo. Los resultados visuales

muestran que no hubo efecto citotóxico aparente en las células, ni cambios morfológicos en las 24 h de exposición a la proteína.

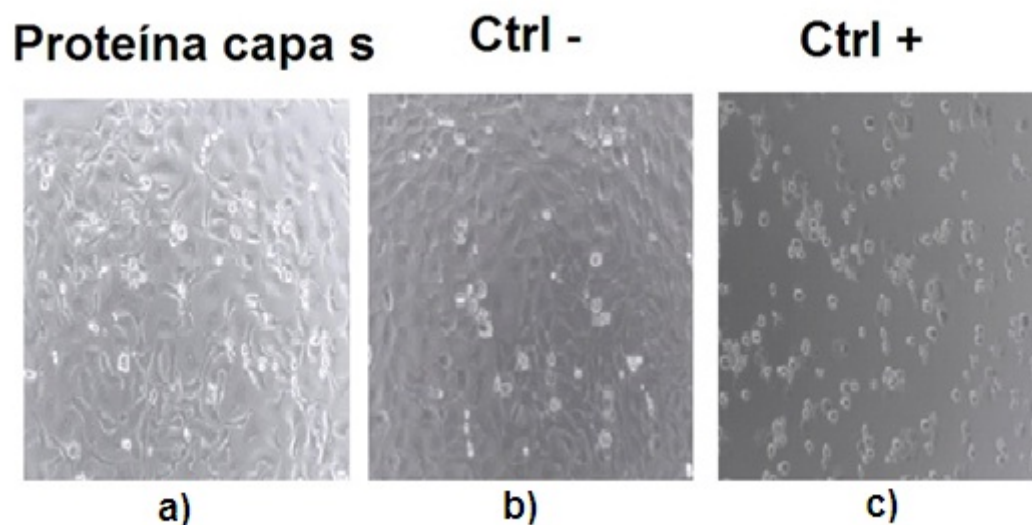


Figura 25. Microfotografías del ensayo de viabilidad celular de la proteína SLP sobre HaCat. Ensayo de viabilidad celular de HaCat. a) Exposición a la proteína SLP por 24 h, b) Ctrl - (control negativo) c) Ctrl + (control positivo) observados a 10X y contraste de fases.

Al igual que las células MDA-MB-231, las células HaCat también se evaluaron cuantitativamente usando el reactivo MTT. La figura 26 muestra la gráfica de barras con el efecto citotóxico en HaCat, así como sus controles positivo y negativo. En este caso, se puede observar que hubo un 90% de sobrevivencia con respecto al control negativo y la concentración de 0.25 $\mu\text{g/ml}$. Para las concentraciones de 0.5 y 1 $\mu\text{g/ml}$ el porcentaje fue ligeramente menor.

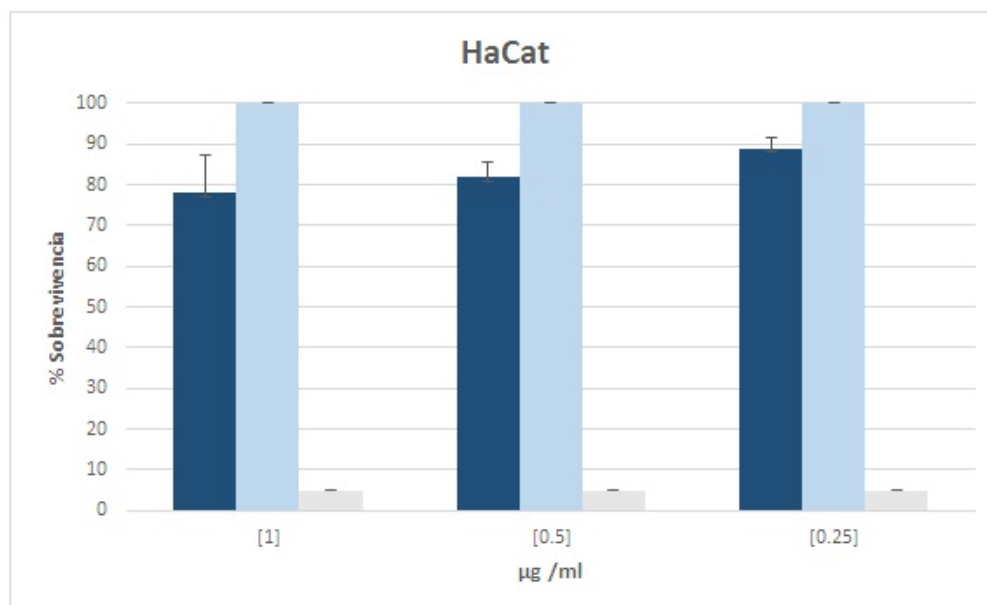


Figura 26. Efecto citotóxico de forma cuantitativa en la línea celular HaCat. Se muestra en color azul oscuro el efecto citotóxico de la proteína SLP sobre la línea celular HaCat, en color azul claro el control negativo células sin tratamiento y en color gris el control positivo DMSO. $P > 0.05$

VI.3.4. Ensayos comparativos de citotoxicidad *in vitro*.

Con el fin de tener un resultado más claro y contundente, se realizó una comparativa con otras toxinas, que por resultados preliminares del laboratorio de Microbiología Molecular de CICESE, se tenía conocimiento de su efecto citotóxico sobre la línea celular MDA-MB-231.

El resultado obtenido con la proteína SLP de la cepa Bt AP11 fue muy similar al de la proteína Cry 1Ab, que hasta el momento es la más potente de todas las proteínas evaluadas como citotóxica en el laboratorio (Hernández, 2014).

VII. DISCUSIÓN

VII.1. Aislamiento y caracterización de la cepa Bt AP11

Una manera de distinguir la importancia de un microorganismo, puede encontrarse en el grado de respuesta que produce a nivel celular. En otras palabras, se sabe que un microorganismo patógeno actúa diferente de un probiótico o comensal. Por lo tanto, la magnitud de la respuesta puede definirse como fuerte, intermedia u homeostática según sea el caso (Leeber et al., 2010). En este sentido, identificar moléculas bacterianas que produzcan este tipo de respuestas es clave para dilucidar mecanismos moleculares implicados en la regulación de las células. Identificar moléculas de esta naturaleza, podría inducir al desarrollo de terapias más seguras para los tratamientos de enfermedades específicas como el cáncer (Taverniti y Guglielmetti, 2011).

Bt puede aislarse de cualquier ecosistema, en este caso, se utilizaron muestras del cepario del laboratorio y de las cuales se tenía conocimiento que provenían del suelo (Mendoza, 2010). Distinguir entre las especies de *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis* y *Bacillus thuringiensis* es complicado ya que presenta alta similitud filogenética (Mesnage et al., 2001), por lo que diferenciar molecularmente a través de las secuencias rADN 16S no es suficiente (Peña et al., 2006). Sin embargo, existe una característica muy propia de Bt, que es la producción de cristales al final de la esporulación (Mendoza et al., 2012),

característica que se hizo presente en el caso de la cepa Bt AP11 seleccionada. Por lo que se puede inferir que la cepa AP11, produce proteínas CRY.

Con el fin de demostrar que la cepa AP11 producía la proteína SLP, fue necesario realizar curvas de crecimiento para recolectar muestras al final de la fase exponencial e inicio de la fase estacionaria, que es el tiempo idóneo para producir el mayor número de proteína SLP. Debido a que en este tiempo no se presenta la producción de esporas ni de cristales. Actualmente, no hay reportes de las proteínas SLP presentando actividad citotóxica contra células de cáncer, lo que hace novedoso este proyecto. Las proteínas SLP están presentes en todas las etapas celulares por lo que a mayor crecimiento de células bacterianas, se tendría mayor producción de proteína SLP (Luckevich y Beveridge, 1989).

Por otra parte, se analizaron dos condiciones de cultivo particularmente dirigidas al nivel de oxígeno. Los resultados arrojaron que había una disminución en el tiempo para alcanzar la fase estacionaria, esto en el cultivo que correspondía a nivel alto de oxígeno y que además había un aumento en su densidad óptica con respecto al cultivo de baja oxigenación. Para el caso de *Bacillus thuringiensis* es importante el oxígeno ya que la asimilación de los nutrientes depende de este, por ende se tendrá un mejor crecimiento y desarrollo de la cepa Bt AP11 a mayor concentración de oxígeno. En este sentido, como el objetivo era tener una mayor concentración de proteínas SLP

se concluye que es mejor un cultivo con nivel alto de aireación, para que la producción de proteína SLP sea mayor. Por lo tanto, la cantidad de oxígeno si afecta en el crecimiento de la cepa AP11.

VII.2. Genes *slp*

Existe una variación en la expresión de las proteínas SLP entre diferentes especies bacterianas y esto puede atribuirse a que más de un gen puede codificar estas proteínas (Pollman et al., 2005). Muchos genes *slp* han sido clonados y sus secuencias revelan una baja homología entre ellos, (Mesnage et al., 2001; Sleytr et al. 2014). Sin embargo, estas si muestran un orden en su conformación (Mesnage et al., 2001). Por otra parte, el dominio SLP que se une a la pared celular y está involucrado en el anclaje de las proteínas al peptidoglicano se mantiene conservado (Sarà et al., 2000). Para el caso de *B. thuringiensis subsp galleria* se ha encontrado un gen *slpA* similar al gen *Sap* de *B. anthracis* que muestra alta similitud con la proteína SLP del gen *EA1* de *B. anthracis* (Peña et al., 2006).

En este trabajo, se analizó la presencia del gen *slp* en la cepa Bt AP11 usando los oligonucleótidos específicos diseñados de regiones conservadas de diferentes especies de *Bacillus*. A pesar de que no fueron muchos genes los que se utilizaron del banco de datos, todos mostraron una alta conservación en la región donde se diseñaron los oligonucleótidos. Es importante mencionar que estos oligonucleótidos que provienen de varias especies del género

Bacillus, son los primeros en poder detectar de manera fácil, precisa y rápida genes *slp* de especies de *Bacillus thuringiensis*

El resultado arrojado por la PCR de la cepa Bt AP11, confirmó la presencia del gen *slp*, ya que pudo amplificar el fragmento esperado de 540 pb. Esto indica que hay una proteína SLP presente al final de la fase exponencial e inicio de la fase estacionaria. Los oligonucleótidos son específicos ya que *Bacillus subtilis* W168 utilizado como control negativo no amplificó, lo que corrobora lo reportado para esta especie (Engelhardt, 2007).

En algunas especies bacterianas, se ha reportado la expresión de genes que codifican diferentes proteínas SLP, pero no necesariamente lo hacen de forma simultánea, demostrando que la expresión responde a factores de estrés, estadios o cambios ambientales (Kalheghi y Kermanshahi, 2011; Mignot *et al.*, 2002; Pollman, 2005). Por ejemplo, *B. anthracis* produce dos tipos de proteínas SLP, Sap y EA1, pero una aparece en su fase exponencial y la otra en su fase estacionaria (Mesnage *et al.* 2001; Peña *et al.* 2006; Sleytr *et al.* 2014). Por otra parte, *Lactobacillus acidophilus* posee dos genes que codifican proteína SLP, *slpA* y *slpB*, los cuales dependen de las condiciones de crecimiento, ya que mientras *slpA* se encuentra activo *slpB* se mantiene apagado (Kalheghi y Kermanshahi, 2012).

Para determinar que se trata de una proteína SLP en la cepa AP11, se secuenció el producto de PCR, el cual permitió establecer un 87% de similitud con un gen de *Bacillus thuringiensis* (HM626296.1). Este mismo gen codifica una proteína SLP ADQ08580.1 (Soufiane et al., 2011).

Considerando los argumentos anteriores no se debe descartar la posibilidad de tener otro gen *slp* en otro estadio celular o con otras condiciones de cultivo. Y por ende, esto genera la posibilidad de tener otra proteína SLP codificada por un gen diferente, que pueda tener otra actividad, pero esto solo queda como una perspectiva a futuro.

VII.3. Producción, extracción y purificación de proteína SLP

Las proteínas SLP tienen un papel importante en el crecimiento, sobrevivencia y mantenimiento de la integridad celular, además de la interacción que tienen con el huésped y su sistema inmune. También se han reportado trabajos que demuestran sus actividades antibacteriales y antivirales (Fagan y Fairweather, 2014; Li et al., 2011; Martínez et al., 2012; Sleytr et al., 2014).

Aunque la mayoría de trabajos reportan la diálisis como método ideal para purificar a la proteína SLP (Allievi et al., 2011; Sleytr et al., 2014; Martínez et al., 2012), en el laboratorio se buscó un método eficiente y rentable que garantizara obtener a la proteína SLP. Inicialmente, se le dio un tratamiento con una solución buffer de Tris HCl 20 mM, para así eliminar alguna otra proteína que

podría estar presente y posteriormente se trató con LiCl. La proteína SLP producida por la cepa Bt AP11 fue extraída al final de su fase exponencial, que en este caso fue a las 6 horas. Hacerlo en este tiempo evitó que las células llegaran a una etapa de lisis y la proteína quedará liberada en el medio junto con esporas y cristales, de esta manera al continuar ensamblada en la pared facilitó su purificación. Para extraer a la proteína después del tratamiento con Tris HCl, se empleó LiCl como agente desagregante, el cual ha sido reportado en la mayoría de trabajos como el más apropiado para su extracción, dado que si se usan solventes estos rompen las células bacterianas lo cual no es apropiado (Lortal et al., 1992; Konstantinov et al., 2008; Allievi, 2012; Taverniti et al., 2013). Esta extracción es mucho más fácil, ya que las proteínas SLP se unen de forma no covalente a través de su dominio N-terminal a otras moléculas accesorias, como lipopolisacáridos o polisacáridos que se encuentran en la pared celular o peptidoglicano (Engelhardt, 2007; Khaleghi y Kermanshahi, 2012; Prado et al., 2008). Estas asociaciones de la proteínas SLP con peptidoglicano, es mediado por unos dominios denominados SLH, por lo que es más sencillo disociar ese tipo de unión con el LiCl (Engelhardt et al., 2007; Kalegui, y Kermanshahi, 2012; Sánchez, 2008).

Para tener más certeza de obtener a la proteína SLP, se empleó al LiCl 1M como pre-tratamiento, para eliminar cualquier otra proteína o impureza (Taverniti et al., 2013), lo que se puede corroborar con la figura 21, donde se

pueden observar varias bandas que indican la presencia de otras proteínas, además de la proteína SLP. El tratamiento principal fue el LiCl 5M, que solamente extrae a la proteína SLP de interés con un peso molecular entre 80 y 90 kDa. Este resultado corrobora la masa molecular de 86,575.4 Da obtenida de la espectrometría de masas.

La identificación de la proteína por medio de LC MS/MS se determinó con su secuencia parcial, confirmando que se trataba de una proteína SLP. Esta identificación presentó más del 50% de similitud con respecto a la proteína ADU04485.1 reportada para Bt (Zhou et al., 2011). Es importante mencionar que la secuencia proteica identificada presentaba alrededor del 50% de aminoácidos hidrófobos, una característica muy particular de las proteínas SLP en *Bacillus*.

En este sentido, ADU04485.1 y ADQ08580.1 obtenidos de la secuencia de proteína y la secuencia de DNA, respectivamente, presentaron un 98% de similitud entre ellos, corroborando el origen de una proteína SLP de *Bacillus thuringiensis*, con un tamaño de 86 kDa. Sin embargo, la relación filogenética de las proteínas SLP entre las especies *Bacillus cereus*, *Bacillus sphaericus*, *B. anthracis*, *B. licheniformis* y *B. thuringiensis*, indican que esta proteína puede pertenecer a un grupo multiespecie con origen similar (WP_001140751.1).

VII.4. Actividad citotóxica de la proteína SLP en células MDA MB 231

Según estadísticas, el cáncer de mama es de las principales causas de muerte a nivel mundial (INEGI; OMS). La búsqueda de compuestos bioactivos contra el cáncer de mama es algo que hasta el día de hoy se sigue realizando (Olmos et al., 2015; Priya y Jayachandran, 2011). Actualmente, se han reportado al menos 6 proteínas PS producidas por cepas de *Bacillus thuringiensis*, que han mostrado tener efectos citotóxicos contra líneas celulares de cáncer humano (Adang et al., 2014; Jung et al., 2006; Mizuki et al., 2000; Ohba et al., 2009).

Previamente se reportó esta actividad citotóxica con las proteínas Cry (Olmos et al., 2011), las cuales se caracterizan más por su actividad insecticida al interactuar específicamente con el receptor celular de insectos (Bt-R1) sin afectar células de vertebrados, plantas o animales (Bravo et al., 2012; Griko et al., 2007; Peña et al., 2006). Sin embargo, de todas las proteínas que produce *Bacillus thuringiensis*, a la fecha no existe un reporte publicado de los efectos de proteínas SLP contra células de cáncer.

No obstante, los trabajos disponibles sobre la proteína SLP están enfocados a otras aplicaciones, por ejemplo, en cepas de *Bacillus anthracis* y *Bacillus cereus*, se han reportado que estas proteínas interaccionan con leucocitos humanos para contribuir de forma directa en la patogénesis (Kotiranta et al., 1998, Mesnage et al., 2001). Contrario a las anteriores, están las bacterias probióticas como *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 y *Lactobacillus*

helveticus, donde proteínas SLP interactúan con receptores de superficie celular como DC SIGN y Toll, pero presentando efectos benéficos; como la inhibición de la virulencia del patógeno o estimulando el sistema inmune, respectivamente (Martínez et al., 2012; Taverniti et al., 2013).

La proteína SLP aislada de la cepa Bt AP11 fue evaluada en MDA-MB-231, una línea celular de cáncer de mama y en HaCat, que es una línea no cancerosa usada como control. Los resultados obtenidos mostraron que la proteína SLP de 86 kDa, presentó un efecto citotóxico en MDA-MB-231 con todas las concentraciones evaluadas en el ensayo *in vitro*, siendo la dosis letal media (DL₅₀) la concentración de 0.25 µg/ml. En el caso de HaCat solo se presentó 10% de mortalidad. Estos resultados reflejan una nueva actividad para las proteínas SLP que a la fecha no había sido reportada, aunque todavía se desconoce el mecanismo de acción para que esto suceda.

Lo que sí es claro, es que la proteína SLP aislada de la cepa Bt AP11 puede causar alteraciones en la morfología de las células de cáncer de mama utilizadas, lo que se puede ver en las imágenes tomadas del microscopio. Probablemente esto se deba a un aumento de permeabilidad de la membrana como sucede con las proteínas PS o Cry (Mizuki et al., 2000). Esto puede estar relacionado con el reconocimiento de algún receptor presente en MDA-MB-231 por parte de la proteína SLP, que aparentemente no está presente en HaCat, ya que en esta no se presenta el mismo efecto.

Por otra parte, al analizar la comparativa del efecto de la proteína SLP con la proteína Cry 1Ab (Hernández, 2014), la cual se tomó como antecedente por ser de las proteínas más potentes en el laboratorio, se pudo demostrar que ambas presentan efecto citotóxico similar. Sin embargo, falta por analizar con pruebas específicas el posible mecanismo de acción, quizás SLP reconoce al mismo receptor que la proteína Cry1Ab la cual pudiera estar activando una vía de señalización que induzca a una muerte celular programada, como lo reportó Mendoza (2012). Además, otras proteínas como Cry1Ac interactúan específicamente con el receptor del insecto, denominado Bt-R1 (Griko et al., 2007; Bravo et al., 2012).

Considerando lo anterior y haciendo una comparativa de las secuencias de los diferentes receptores BtR1_{Msexta}, BtR1_{Hvirescens}, CDH11_{MDAMB231}, DC-SIGN_{CTL} y CDH1_{HaCat} se muestra una gran similitud a excepción de CDH1 (Fig. 27). La región analizada representa uno de los sitios más importantes para que se lleve a cabo la interacción proteína-receptor entre Cry1Ab-BtR1_{Ms} / Cry1Ac-BtR1_{Hv}. Esta región está localizada adyacente al dominio extracelular de las caderinas que pueden actuar como receptores (Griko et al., 200; Berx et al., 200)

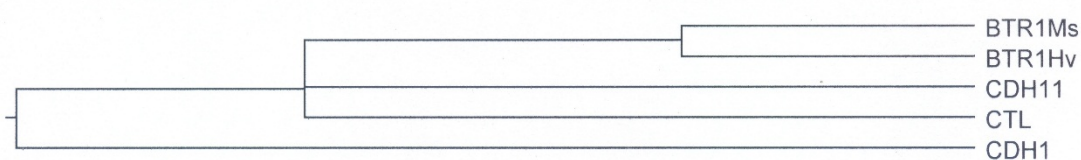


Figura 27. Árbol filogenético de diferentes receptores que interactúan con las proteínas CRY y SLP.

Como puede verse en la figura 28, la ausencia de la conservación del aminoácido Valina (V) en CDH1 puede explicar porque la proteína SLP de 86 KDa no interactúa con las células de HaCat pero si con MDA-MB-231.

BTR1Ms	DVTVYVVSS
BTR1Hv	EKVYLI SD
CDH11	KVPVAI RVL
CTL	GVLVAI LVQ
CDH1	GTL LLI LSD

Figura 28. Alineamiento de secuencias de aminoácidos de diferentes receptores que interactúan con proteínas CRY y SLP.

Por lo tanto, se puede sugerir como una futura hipótesis que si el comportamiento de las proteínas CRY y SLP es similar, el receptor involucrado puede estar presente en MDA-MB-231 mas no en HaCat, como se reporta en este trabajo. A este respecto, MDA-MB-231 se caracteriza por presentar a la caderina CDH11, mientras que HaCat expresa a la caderina CDH1. CDH1 se sabe que es una proteína supresora de tumores mientras que CDH11 incrementa la migración de células cancerosas (Feltz et al., 2002; Sarrio et al., 2009). Por lo que la interacción de la proteína SLP con el receptor CDH11 podría activar la vía de señalización que induce una muerte celular programada en las células de cáncer de mama. Esto solo queda como una hipótesis que

tendría que ser explorada a futuro. Lo anterior puede apoyarse con trabajos que demuestran el efecto de la proteína SLP, como es la inhibición del virus JUNV donde se sugiere que existe un receptor en las células que reconoce a la proteína SLP, denominado DC-Sign y al darse la interacción entre ambos, se impide el reconocimiento de los glicanos de superficies virales, bloqueando de esta manera la entrada del virus al huésped (Martínez et al., 2012). Así los trabajos reportados demuestran que los receptores DC SIGN y Toll interactúan directamente con la proteína SLP en *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus helveticus* inhibiendo la virulencia del patógeno y estimulando el sistema inmune (Taverniti et al., 2013; Martínez et al., 2012).

Lo que se ha demostrado con este trabajo, es que la proteína SLP de 86 kDa aislada de la cepa Bt AP11, tiene efecto citotóxico sobre la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231, y podría estar reprimiendo alguna vía de señalización vinculada a la proliferación celular. Esto lleva a que posteriormente se determine que vía de señalización es la afectada y convierte a esta proteína en una molécula prometedora para desarrollar algún compuesto contra el cáncer.

VIII. CONCLUSIÓN

1. Los cultivos de *Bacillus thuringiensis* con un nivel alto de oxígeno, producen mayor cantidad de proteína SLP.
2. De las 12 cepas de *Bacillus thuringiensis* pertenecientes al laboratorio de Microbiología Molecular de CICESE, se demostró que todas presentan el gen que codifica a la proteína SLP.
3. La morfología microscópica de las células vegetativas, la producción de cristales y la secuenciación de 16S ADNr, determinan que la cepa AP11 corresponde a *Bacillus thuringiensis*.
4. La secuenciación del producto de PCR y la secuenciación de la proteína por espectrometría de masas de alta resolución, demostró la presencia de una proteína SLP de *Bacillus thuringiensis*.
5. El método de extracción con LiCl, utilizando filtro Centricon y HPLC resultó ser efectivo para la obtención de proteínas SLP.
6. La proteína SLP de 86 kDa aislada de la cepa AP11, tiene actividad citotóxica específica sobre la línea celular de cáncer de mama humano, MDA-MB-231.
7. La proteína SLP de 86 kDa de la cepa AP11, no tiene actividad citotóxica específica sobre la línea celular HaCat no cancerosa.
8. *In vitro* la dosis letal media de 0.25 µg/ml de proteína SLP es la dosis ideal de trabajo para un efecto citotóxico en la línea celular MDA-MB-231, sin representar un daño a células no cancerosas, como HaCat

IX. PERSPECTIVAS

1. Realizar cultivos con diferentes medios para analizar la posibilidad de encontrar una nueva proteína SLP
2. Realizar ensayos *in vitro* con otras líneas celulares de cáncer que contengan CDH11 y CDH1 para identificar al receptor.
3. Identificar la vía de señalización sobre la que actúa la proteína SLP de 86 kDa de la cepa AP11.
4. Evaluar actividad *in vivo* con la proteína SLP de 86 kDa de la cepa AP11.

X. REFERENCIAS

Adang, M.J., Crickmore, N., Jurat-Fuentes, J.L. 2014. Diversity of *Bacillus thuringiensis* Crystal Toxins and Mechanism of Action. IN: Advances in Insect Physiology. Tarlochan S, Dhadialla and Sarjeet S.G. (eds) in Oxford Academic Press. pp.39-87.

Aguilar Cordero, M.J. 2005. Lactancia Materna. Elsevier, España. pp 31-37.

Allievi, M.C. 2010. S layer de *Bacillus sphaericus*: caracterización, regulación, análisis funcional y aplicaciones. Tesis Doctoral. Universidad de Buenos Aires. pp. 76.

Allievi, M.C., Sabbione, F., Prado-Acosta, M., Palomino, M.M., Ruzal, S.M., Sánchez-Rivas, C. 2011. Metal Biosorption by Surface –Layer Proteins from *Bacillus* Species. J Microbiol Biotechnol 21:147-153.

Allievi, M.C., Palomino, M.M., Prado-Acosta, M., Lanati, L., Ruzal, S.M. and Sánchez- Rivas, C. 2014. Contribution of S-Layer Proteins to the Mosquitocidal Activity of *Lysinabacillus sphaericus*. PLOS ONE 29:1-8.

Allred, D. C. 2010. Ductal Carcionoma *in situ*: Terminology, Classification and Natural History. J Natl Cancer I 41:134-138.

Amaro, H., Barros, R., Guedes, C., Sousa Pinto, I. y Malcata, X. 2013. Microalgal Compounds Modulate Carcinogenesis in the Gastrointestinal Tract. *Trends Biotechnol* 31:92–98.

American Cancer Society ACS. Breast Cancer Facts and Figures 2015-2016. Atlanta: American Cancer Society, Inc. 2015.

Berx, G., Van Roy, F. 2009. Involvement of Members Of the Cadherin Superfamily in Cancer IN: Perspectives in Biology. Nelson, W.J., and Fuchs, E. (eds.), in *Cold Spring Harb Perspect Biol* pp.1–27.

Beveridge, T.J., Pouwels, P., Sará, M., Kotiranta, A., Loutnamma, K., Kari, K., Kerosuo, E., Haapasalo, M., Egelsser, E., Schocher, I., Sleytr, UB., Morelli, L., Callegari, M., Nomellini, J., Bingle, W., Smit, J., Leibovitz, E., Lemaire, M., Miras, J., Salamitou, S., Beguín, P., Ohayon, H., Gounon, M., Matuschek, M., Samhm, K., Bahl, H., Grogono-Thomas, R., Dworkin, J., Blaser, M. J., Woodland, R., Newell D, Kessel M, Koval S. 1997. Function of S-layers. *FEMS Microbiol Rev* 20:99-149.

Bhalla,R., Dalal, M., Panguluri, S., Jagadish, B., Mandaokar, D., Singh, A.K. y Kumar P.A. 2005. Isolation, characterization and expression of a novel vegetative insecticidal protein gene of *Bacillus thuringiensis*. *FEMS Microbiol Lett* 243:467-472.

Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of micrograms quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254.

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

Bravo, A., Likitvivatanavong, S., Gill, S., Soberón, M. 2011. *Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide. *Insect Biochem Molec.* 41:423-431.

Bravo, A., Gómez, I., Porta, H., García-Gómez, B., Rodríguez-Almazán, C., Pardo, L., Soberón, M. 2012. Evolution of *Bacillus thuringiensis* Cry toxins insecticidal activity. *Microb Biotech* 6:17-26.

Charles, J.F. Nielsen, LeRoux, C y Délecluse, A. 1996. *Bacillus sphaericus* toxins: Molecular biology and mode of action *Annu Rev Entomol* 41:451-472.

Chu, WL. Y Radhakrishnan, A.K. 2008. Research on bioactive molecules: achievements and the way forward. *JSME Suppl* 1:S21-S24.

Chu, W.L., Lim, Y., Radhakrishnan, A.K. y Lim, P. 2010. Protective effect of aqueous extract from *Spirulina platensis* against cell death induced by free radicals. *ISCMR* 10:53.

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

Deblaere, R., Desomer, J. y Daese, P.1999. Expression of surface layer proteins.US 5, 874, 267.

De Maagd, R., Bravo, A., Berry, C., Crickmore, N. y Schnepf, H. 2003. Structure, diversity, and evolution of proteins toxins from spore forming entomophatogenic bacteria. *Annu Rev Genet* 37:409-433.

Dieci, M., Orvieto, E., Dominicci, M., Conte, P. y Guarnieri, V. 2014. Rare breast cáncer subtypes: histological, molecular and clinical peculiarities. *The Oncologist* 19:805-813.

Donovan, W., Engleman, J., Donovan, J., Baum, J., Bunkers, G., Chi, D. Clinton, W., English, L., Heck, G., Ilagan, M. 2006. Discovery and characterization of Sip1A: a novel secreted protein from *Bacillus thuringiensis* with activity against coleopteran larvae. *Appl Microbiol Biotechnol* 72:713–719.

Engelhardt, H. 2007. Are S-layers exoskeletons? The basic function of protein surface layers revisited. *J Struct Biol* 160:115-124.

Estruch, J., Warren, G., Mullins, M., Nye, G., Craig, J. y Koziel, M.1996. Vip 3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects *Proc Natl Acad Sci USA* 5389-5394.

Fagan, R.P. y Fairweather, N.F. 2014. Biogenesis and functions of Bacterial S-layers. *Nat Rev Microbiol* 12:211-220.

Feltes, C.M., Kudo, A., Blaschuk, O., Byers, S.W. 2002. An alternatively spliced cadherin-11 enhances human breast cancer cell invasion. *Cancer Res.* 62:6688–6697.

Frankenhuyzen, K. 2009. Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins. *J Invertebr Pathol* 101:1-16.

Garbe, J., Holst, C., Basset, E., Tisty, T., Stampfer, M. 2000. Inactivation of p53 function cultured human mammary epithelial cells turns the telomere length dependent senescence barrier from agonescence into crisis. *Cell cycle* 6:1927-1936.

George, Z. y Crickmore N. 2012. *Bacillus thuringiensis* Application in Agriculture. IN: *Bacillus thuringiensis* Biotechnology. E. Sansinenea ed). pp.19-30.

Gordon, R. Haynes, W., Hor Nay P. 1973. The genus *Bacillus*. IN: United States Department of Agriculture USDA (ed) 427 de Agriculture Handbook, Washington, D.C. pp.283.

Griko, N.B., Rose-Young, L., Zhang, X., Carpenter, L., Candas, M., Ibrahim, M., Junker, M., Bulla, JrL. 2007. Univalent Binding of the Cry1Ab Toxin of *Bacillus thuringiensis* to a Conserved Structural Motif in the Cadherin Receptor BT-R1. *Biochemistry.* 46:10001–10007.

Guo, G., Zhang, L., Zhou, Z., Ma, Q., Liu, J., Zhu, Ch., Zhu, L., Yu, Z., Sun, M. 2008. A new group of parasporal inclusions encoded by the S-layer gene of *Bacillus thuringiensis*. FEMS Microbiol Lett. 282:1-7.

Güereca, L., Bravo, A. 1998. The oligomeric state of *Bacillus thuringiensis* Cry toxins in solution. Biochim Biophys Acta. 1429:342-350.

Harwood, C. 1989. Introduction to the Biotechnology of *Bacillus* IN: *Bacillus*. Harwood, C. (ed). IN: Springer Science + Bussines Media. Plenum Press, NY. pp.1-5

Hernández, C. 2014. Optimización de las condiciones de cultivo para mejorar el rendimiento y purificación de las proteínas Cry en *Bacillus thuringiensis*. Tesis de maestría, CICESE.

Ilk, N., Egelseer E.M. y Sleytr, U.B. 2011. S-Layer fusion proteins- construction principles and applications Curr Opin Biotech. 22:824-831.

Jemal, A., Bray, F., Center, MM., Ferlay, J., Ward, E., Forman, D. 2011. Global Cancer statistics. CA-Cancer J. Clin. 61:69-90.

Jung, Y.C., Mizuki, E., Akao, T., Cote, J.C. 2006. Isolation and characterization of a novel *Bacillus thuringiensis* strain expressing a novel crystal protein with cytotoxic activity against human cancer cells. J Appl Microbiol 103:65-79.

Khaleghi, M., Kermanshahi, R.K. 2012. Effect of Enviromental Stresses on S-Layer Production in *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 IN: Advances in applied Biotechnology. Petre, M. (eds), Romania: InTech. pp.209-224.

Konstantinov, S., Smidt, H., M de Vos, W., Bruijns, S., Singh, S.K., Valence, F., Molle, D., Lortal, S., Altermann, E., Klaenhammer, T.M., Van Koyk, Y. 2008. S-layer protein A of *Lactobacillus acidophilus* NCFM regulates immature dendritic cell and T cell functions. PNAS. 105:19475-19479.

Kitada, S., Abe, Y., Shimada, H., Kusaka, Y., Matsuo, Y., Katayama, H., Okumura, S., Akao, T., Mizuki, E., Kuge, O., Sasaguri, Y., Ohba, M. e Ito, A. 2006. A cytocidal actions of parasporin-2, an anti-tumor crystal toxin from *Bacillus thuringiensis*. J. Biol Chem 281:26350-26360.

Kotiranta, A., Haapasalo, K., Kari, E., Kerosuo, I., Olsen, T., Sorsa, J., Muerman, H., Loutnatmaa, K. 1998. Surface structure, hidrophobicity, phagocytosis and adherence to matrix protein of *Bacillus cereus* cells with and without the crystalline surface protein layer. Infect Immunol. 66:4895-4902.

Latarjet, M. y Ruiz Liard, A. 2006. Anatomía Humana. 4ta edición. Tomo I. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires.

Lebeer, S., Vanderleyden, J., De Keersmaecker, S.C. 2010. Host interactions of probiotic bacterial surface molecules: comparison with commensals and pathogens. Nat Rev Microbiol. 8:171-184.

Lee, M.K., Walters, F.S., Hart, H., Palekar, N. y Chen, J.S. 2003. The mode of action of the *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal proteins Vip3A differs from that of Cry1Ab delta toxin. *Appl Environ Microbiol* 69:4648-4657

Li, P., Yin, Y., Yu, Q., Yang, Q. 2011. *Lactobacillus acidophilus* S-layer protein mediated inhibition of *Salmonella*-induced apoptosis in Caco-2 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 409:142-147.

Luckevich, M. and Beveridge, T.J. 1989. Characterization of Dynamic S Layer on *Bacillus thuringiensis*. *J Bacteriol* 171:6656-6667.

Lodish H., Berk A., Matsudaira P., Kaiser A. C., Krieger M., Scott P. M., Zipursky L. S. y Darnell J. 2005. *Biología Celular y Molecular*. 5ta Edición. Editorial Médica Panamericana 7:245-300.

Lortal S, Vanheijenoort J, Gruber K, Sleytr UB. 1992. S-Layer of *Lactobacillus helveticus* ATCC 12046: isolation chemical characterization and re-formation after extraction with lithium chloride. *J. Gen Microbiol* 138:611-618.

Luckevich, M. y Beveridge, T.J. 1989. Characterization of Dynamic S Layer on *Bacillus thuringiensis*. *J Bacteriol* 171:6656-6667.

Martínez, M.G., Prado Acosta, M., Candurra, N.A., Ruzal, S.M. 2012. S-layers proteins of *Lactobacillus acidophilus* inhibits JUNV infection. *Biochem Biophys Res Commun* 422:590-595.

Malumbres, M. and Barbacid, M. 2009. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nat Rev Cancer* 9(3):153-166.

Mendoza, G. 2011. Aislamiento y caracterización de toxinas Cry de *Bacillus thuringiensis* con actividad citócidica sobre células de cáncer cervicouterino in vitro e in vivo. Tesis. CICESE

Mendoza, G., Portillo, A., Arias, E., Ribas, R.M., Olmos, S.J. 2012. New combinations of cry genes from *Bacillus thuringiensis* strains isolated from northwestern Mexico. *Int Microbiol.* 15:209-216.

Mesnager, S., Haustant, M., Fouet, A. 2001. A general strategy for identification of S-layer genes in the *Bacillus cereus* group: molecular characterization of such a gene in *Bacillus thuringiensis subsp. Galleria* NRRL 4045. *Microbiol* 147:1343-1351.

Messner, P., Allmaier, G., Schaffer, C., Wugeditsh, T., Lortal, S., Kong, H., Niemetz, R. and Dorner, M. III. 1997. Biochemistry of S-layers. *FEMS Microbiol Rev* 20:25-46.

Mignot, T., Mesnager, S., Couture y Tosi, E, Mock, M y Fouet, A. 2002. Developmental switch of s layer protein synthesis in *Bacillus anthracis*. *Mol microbiol.* 43:1615-1627.

Mizuki, E., Park, Y.S., Saitoh, H., Yamashita, S., Akao, T., Higuchi, K., Ohba, M. 2000. Parasporin, a Human Leukemic Cell Recognizing Parasporal Protein of *Bacillus thuringiensis*. *Clin Diagn Lab Immun* 7:625-634.

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* 455:552-556.

Ohba, M., Mizuki, E. y Uemori, A. 2009. Parasporin, a new Anticancer Protein Group from *Bacillus thuringiensis*. *Anticancer Res* 29:427-434.

Ohnishi, T. 2005. The role of the p53 molecule in cancer therapies with radiation and/or hyperthermia. *J. Cancer Res Ther* 1:147-150.

Okassov, A., Nersesyian, A., Kitada, S. e Illin A. 2015. Parasporins as new natural anticancer agents; a review. *JB UON* 20:5-16.

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

Olmos, S.J., Arias, E. y Mendoza, G. 2011. Insecticide CRY proteins of *Bacillus thuringiensis* with anti-cancer activity. US 2014/0073582A1.

Olmos-Soto, J., Gómez, R. y P.Rubio, V. 2015. Apoptosis comparison effects between synthetic and natural B-Carotene from *Dunalliella salina* on MDA-MB-231 breast cancer cells. *J Microb Biochem Technol* 7:051-056.

Opota, O., Gauthier, N., Doye, N, Berry, C., Gounon, P., Lemichez, E. y Pauron, D. 2011. *Bacillus sphaericus* Binary Toxin elicits host cell autophagy as a response to intoxication PLoS ONE 6:2 e14682.

Palma, L., Muñoz, D., Berry, C., Murillo, J., Caballero, P. 2014. *Bacillus thuringiensis* toxins: An Overview of their biocidal activity. *Toxins* 6:3296-3325.

Paniagua-Michel, J., Olmos, S.J., Morales-Guerrero, E. 2015. Drugs and leads from the ocean through Biotechnology. IN: Handbook of Marine Biotechnology. Kim, S., (eds) Springer Berlin Heidelberg. pp.711-729..

Pardo López, L., Soberón, M., y Bravo, A. 2012. *Bacillus thuringiensis* insecticidal three domain cry toxins : mode of action, insect resistance and consequences for crop protection *FEMS Microbiol Rev* 37:3-22

Parise, C. y Caggiano, V. 2014. Breast Cancer survival defined by ER/PR/HER2 subtypes and a surrogate classification according to tumor grade and immunohistochemical biomarkes. *J Canc Epidem* 2014:1-11.

Park, H.W., Bideshi, D. y Federici, B. 2010. Properties and applied use of the mosquitocidal bacterium, *Bacillus sphaericus*. *J Asia Pacific Entomol* 13:159-168.

Pauchet, Y., Luton, F., Castella, C., Charles, JF, Romey, G. y Pauron D. 2005. Effects of a mosquitocidal toxin on a mammalian epithelial cell line expressing its target receptor. *Cell microbiol* 7:1335-1344.

Peña, G., Miranda-Rios, J., De la Riva, G., Pardo-López, L., Soberón, M., Bravo, A. 2006. A *Bacillus thuringiensis* S-Layer Protein Involved in Toxicity

against *Epilachna varivestis* (Coleoptera: Coccinellidae). Appl Environ Microb 72:353-360.

Perou, Ch. y Borresen Dale, A. 2011. Systems Biology and Genomics of Breast Cancer IN Cold Springs Harb Perspect Biol, Bisell, M., Polyak, K. y Rosen, J. ed) pp.3:003293.

Phonnok, S., Tanechpongamb, W.U. y Wongsatayanon, B.T. 2010. Anticancer and apoptosis of microbial metabolites. Electron J Biotechn 13.

Pollmann, K., Raff, M., Scnorpfeil, G., Radeva y S., Selenska, P. 2005 Novel surface layer protein genes in *Bacillus sphaericus* associated with unusual insertion. Microbiol 151:2961-2973.

Poopathi, S. y Abhida, S. 2010. Mosquitocidal bacterial toxins *Bacillus sphaericus* and *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis*: Mode of action, cytopathological effects and mechanism of resistance. J Physiol and Pathophysiol 1:22-38.

Prado Acosta, M., Palomino, M.M., Allievi, M.C., Sánchez Rivas, C., Ruzal, S.M. 2008. Murein Hydrolase Activity in the Surface Layer of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356. Appl Environ Microb. 74:7824-7827.

Priya, A.M. y Jayachandran, S. 2011. Induction of apoptosis and cell cycle arrest by Bis (2-ethylhexyl) phthalate produced by marine *Bacillus pumilis* MB 40. Chem-Biol Interact. 195:133-143.

Rahman, A., Khan, S., Sultan, T. e Islam, R. 2012.Characterization of *Bacillus sphaericus* binary proteins for biological control of *Culex quinquefasciatus* mosquitoes: a review. *Int J Biosci* 2:1-13.

Ristl, R., Steiner, K., Zarschler, K., Zayni, S., Messner, P y Schäffer, C. 2011. The slayer glycome adding to the sugar coat of bacteria. *Intern J Microbiol* 2011:1-16

Rosas-García, N. 2009. Biopesticide production from *Bacillus thuringiensis*: an enviromentally friendly alternative. *Recent Pat Biotech* 3:28-36.

Rukmini, V., Reddy, C. y Venkateswerlu, G. 2000. *Bacillus thuringiensis* cristal - endotoxin: Role of proteases in the conversion of protoxin to toxin. *Biochimie* 82:109-116.

Sambrook KT, Frisch EF, Maniatis T. 1989. Molecular cloning. A laboratory Manual, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

Sará, M y Sleytr, U.B. 2000. S-layer proteins. *J Bacteriol* 182:859-868.

Sarrió, D., Palacios, J., Hergueta-Redondo, M., Gómez-López, G., Cano, A., Moreno-Bueno, G. 2009. Functional characterization of E- and P-cadherin in invasive breast cancer cells. *BMC Cancer* 9:74.

Sauka, D. y Benintende, G. 2008. *Bacillus thuringiensis*: generalidades. Un acercamiento a su empleo en el biocontrol de insectos lepidópteros que son plagas agrícolas. *Revista argentina de Microbiología* 40:124-140.

Schuster, B. y Sleytr, U.B. 2015. Relevance of glycosilation of S layer proteins for cell surface properties. *Acta Biomater* 19:149-157.

Schnepf, E., Crickmore, N., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Feitelson, J., Zeigler, D.R., y Dean, D.H. 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol mol Biol rev* 62:775-806.

Scully, R. 2000. Role of BRCA gene dysfunction in breast and ovarian cancer predisposition. *Breast Cancer Res* 2:324-330.

Scully, R. y Livingston, D. 2000. In search of the tumor suppressor functions of BRCA1 and BRCA2. *Nature* 408:429-432.

Sleytr, U.B. 1997. Basic and applied s-layer research: an overview. *FEMS Microbiol Rev* 20:5-12.

Sleytr, U.B. y Beveridge, T.J. 1999. Bacterial s-layers. *Trends Microbiol* 7:253-260.

Sleytr, U.B., Sára, M., Pum, D., Schuster, B. 2000. Characterization and use of crystalline bacterial cell surface layers. *Prog Surf Sci* 68:231-278.

Sleytr, B., Ilk, N. y Egelseer, E. M. 2011. S-layer fusion proteins-construction principles and applications. *Curr Opin Biotech* 22:824-831.

Sleytr UB, Schuster B, Egelseer EM, Dietmar P. 2014. S-layers: principles and applications. *FEMS Microbiol Rev* 1-42.

Soberón, M., Bravo, A., Likitvivatanavong, S. Y Gill, S. 2011. *Bacillus thuringiensis*: a story of a succesful bioinsecticide. *Insect Biochem Molec* 41:423-431.

Soberón, M. López Díaz, J. y Bravo, A. 2012. Cyt toxins produced for *Bacillus thuringiensis*: a protein fold conserved in several pathogenic microoorganisms. *Peptides* 41:87-93.

Soufiane, B., Sirois, M., Coté, J.C. 2011. Mutually exclusive distribution of the sap and eag S-layer genes and the lytB/lytA cell wall hydrolase genes in *Bacillus thuringiensis*. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 3:349-364.

Sun Z, Kong J, Hu S, Kong W, Lu W, Liu W. 2013. Characterization of a S-layer protein from *Lactobacillus crispatus* K313 and the domains responsible for binding to cell wall and adherence to collagen. *Appl Microbiol Biot* 97:1941-1952.

Taverniti, V., Guglielmetti, S. 2011. The immunomodulatory properties of probiotic microorganisms beyond their viability (ghost probiotics: proposal of paraprobiotic concept). *Genes Nutr*. 6:261-274.

Taverniti, V., Stuknyte, M., Minuzzo, M., Ariolu, S., De Noni, I., Scabiosi, C., Martínez Córdova, Z., Junttila, I., Hämäläinen, S., Turpeinen, H., Mora, D., Karp, M., Pesu, M., Guglielmetti, S. 2013. S-layer protein Mediates the Stimulatory

Effect of *Lactobacillus helveticus* MIMLh5 on Innate Immunity. *Appl Environ Microb.* 79:1221-1

Whelcsh, P. y King, M. 2001. BRCA1 and BRCA2 and the genetics of breast and ovarian cancer. *Hum Mol Genet* 10:705-713.

Whibley, C., Pharoah, P. y Hollstein, M. 2009. p53 polymorphisms: cancer implications. *Nat Rev Cancer* 9: 95-107.

Whirt, M., Berry, C., Walton, W., y Federici Brian. 2013. Mtx toxins from *Lysinibacillus sphaericus* enhance mosquitocidal cry toxin activity and suppress cry resistance in *Culex quinquefasciatus*. *J Invertebr Pathol* 115:62-67.

Whitfield, M.L., George, L.K., Grant, G.D., and Perou, C.M. 2006. Common markers of proliferation. *Nat Rev Cancer* 6:99-106.

Wu, Y., Gao, M., Dai, S., Yi, D. y Fan, H. 2008. Investigation of the cyt gene in *Bacillus thuringiensis* and the biological activities of Bt isolates from the soil of China. *Biol Control* 47:335-339.

Xu, C., Wang, B., Yu, Z y Sun, M. 2014. Structural Insights into *Bacillus thuringiensis* Cry, Cyt and Parasporins toxins. *Toxins* 6:2732-2770.

Yamashita, S., Katayama, H., Saitoh, H., Akao, T. Park, Y., Mizuki, E., Ohba, M. e Ito, A. 2005. Typical three domain cry proteins of *Bacillus thuringiensis* Strain A1462 exhibit cytotoxic activity on limited human cancer cell. *J Biochem* 138:663-672.

Zhou, Z., Peng, D., Zheng, J., Guo, G., Tian, L., Yu, Z., Sun, M. 2011. Two groups of S-layer proteins, SLP1s and SLP2s, in *Bacillus thuringiensis* co-exist in the S-layer and in parasporal inclusions. *BMB Rep.* 44:323-328.

Páginas electrónicas:

<http://www.who.int>

<http://www3.inegi.org.mx>

<http://www.attc.org>

<http://www.gob.mx/salud>

<http://www.cancer.org>

<https://www.cancer.gov>

ANEXOS

Abreviaturas

Abs Absorbancia
ACS American Cancer Society
ADN Ácido desoxirribonucleico
ATCC American Type Culture Collection, por sus siglas en inglés
ATP Adenosin trifosfato
CDH1 Caderina 1
CDH11 Caderina 11
CO₂ Dióxido de carbono
CTL Receptor celular tipo lectina
DL₅₀ Dosis Letal media
DC-SIGN Células dendríticas específicas a proteína no integrina ICAM-3
DMSO Dimetil sulfóxido
DO Densidad óptica
EDTA Ácido etilen diamino tetra acético
g gramos
h horas
HPLC Cromatografía Líquida de Alta Resolución
INC Institute National Cancer
INEGI Instituto Nacional de Estadísticas, Geografía e Informática
kDa Kilodatonos
L litro
LB Luria Bertani
LC MS/MS Espectrometría de masas de alta resolución
M Molar
MEB Microscopio electrónico de barrido
min minutos
mA miliamperes
ml mililitros
mM milimolar
mV milivolts
ng nanogramos
OMS Organización Mundial de la Salud
pb pares de bases
ppm partes/millón
rpm revoluciones por minuto
SDS PAGE Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
SWCP Polímero secundario de pared celular

TBE Tris Borato EDTA
TFA Ácido Trifluoroacético
Toll Receptores tipo toll o TLR's
α Alfa
β Beta
δ Delta
Λ Longitud de onda
μl Microlitros
μg Microgramos
μM Micromolar
® Marca registrada

Medio Luria Bertani (LB) (Manual práctico del Laboratorio de Microbiología Molecular, 1999, CICESE)

Triptona	10g
Extracto de levadura	5 g
Cloruro de sodio NaCl	0.5g
Para medio sólido Agar	1.5 %
Agregar 1L de agua destilada	

Buffer TBE 5X

Tris base	54 g
Ácido bórico	28 g
EDTA 0.5 M	20 ml
Ajustar pH a 8 y c.b.p. 1L de agua destilada	

De esta solución, hacer una solución de trabajo 1X

Composición gel SDS PAGE

	Gel separador 10%	Gel concentrador 5%
Acrilamida 30/0.8%	3.33 ml	830 μl
Tris 1.5 M pH 8.8	2.5ml	-
Tris 1M pH 6.8	-	630 μl
SDS 10	100 μl	50 μl
PSA	100 μl	50 μl
TEMED	4 μl	5 μl

Buffer para corrida de proteínas 5X

Tris base	15.1 g
Glicina	72 g
SDS	5 g
c.b.p 1 L de agua destilada	

De esta solución, hacer una solución de trabajo 1X

Tinción Coomassie

Azul coomassie brillante	0.25 g
Metanol	225 ml
Ácido acético	46 ml
Agua desionizada	230 ml

Solución desteñidora de Coomassie

Metanol	200 ml
Etanol	100 ml
Ácido acético	50 ml
Agua desionizada	650 ml

Tinción de Nitrato de plata (Manual práctico de técnicas selectas en Biología Molecular, 2013, UABC)

Solución A

Etanol 10%
Ácido acético 0.5%
Agua desionizada

Solución B

Nitrato de plata al 0.25%
Agua desionizada

Solución C

Hidróxido de sodio al 1.5%
Formaldehido al 0.15%
Agua desionizada

Solución D

Carbonato de sodio al 7.5%
Agua desionizada

PCR Mezcla de reacción por muestra

Buffer 10X	5 μ l
MgCl₂	1.5 μ l
dNTPS	1 μ l
H₂O	38.5 μ l
Taq polimerasa	1 μ l
Oligonucleotido sentido	1 μ l
Oligonucleotido antisentido	1 μ l
ADN muestra	1 μ l