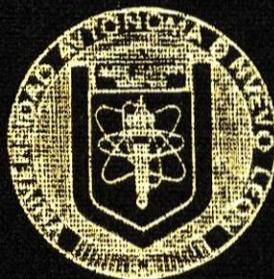


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



EFFECTO DE UNA PROTEINA DE 20 kDa DENOMINADA
ONCOTOXINA SOBRE EL CRECIMIENTO DE UN
LINFOMA MURINO SUBCUTANEO L-5178Y.

T E S I S

PRESENTADO COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE
QUIMICO BACTERIOLOGO PARASITOLOGO

POR

LAURA SILVIA HERNANDEZ LOPEZ

MONTERREY, N. L.

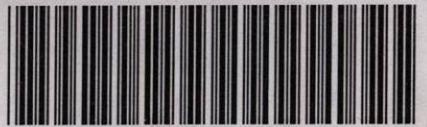
DICIEMBRE 1998

TL

RC267

.H4

c.1



1080112986

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



EFFECTO DE UNA PROTEINA DE 20 kDa DENOMINADA
ONCOTOXINA SOBRE EL CRECIMIENTO DE UN
LINFOMA MURINO SUBCUTANEO L-5178Y

TESIS

PRESENTADO COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE
QUIMICO BACTERIOLOGO PARASITOLOGO

LAURA SILVIA HERNANDEZ LOPEZ

FOR

LAURA SILVIA HERNANDEZ LOPEZ

MONTERREY, N. L.

DICIEMBRE 1998

MONTERREY, N. L.

DICIEMBRE DE 1998

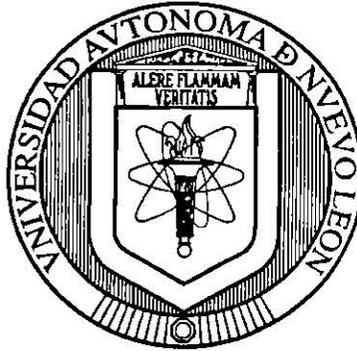


RC 267

HA



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**EFFECTO DE UNA PROTEÍNA DE 20 kDa DENOMINADA
ONCOTOXINA SOBRE EL CRECIMIENTO DE UN LINFOMA MURINO
SUBCUTÁNEO L-5178Y**

TESIS

**PRESENTADO COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE
QUÍMICO BACTERIÓLOGO PARASITÓLOGO**

POR

LAURA SILVIA HERNÁNDEZ LÓPEZ

MONTERREY, N. L.

DICIEMBRE DE 1998

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



EFFECTO DE UNA PROTEÍNA DE 20 kDa DENOMINADA
ONCOTOXINA SOBRE EL CRECIMIENTO DE UN LINFOMA MURINO
SUBCUTÁNEO L-5178Y

COMISION DE EXAMEN

DRA. CRISTINA RODRÍGUEZ PADILLA

PRESIDENTE

DR. REYES S. TAMEZ GUERRA

SECRETARIO

Q.B.P. LEONARDO CASTILLO LEÓN

VOCAL

Cristina Rodríguez Padilla
Reyes S. Tamez Guerra
Leonardo Castillo León

MONTERREY, N. L.

DICIEMBRE DE 1998

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la Dirección de la Dra. María Cristina Rodríguez Padilla.

DEDICATORIA

A Dios

Padre, por mostrarme tu infinito amor, y tu inmensa sabiduría

Jesús, por ser luz para mi vida, mi roca y mi fortaleza,

Espíritu Santo, por mostrarme continuamente el amor de Dios, por tu sabia dirección e infinita ternura e impulsarme constantemente a vivir en Dios.

A María, por tu intercesión constante en favor mío.

A mis Padres,

Carlos, por tu amor, por tu apoyo constante y tu preocupación por mi bienestar.

Consuelo, por todo tu amor, por tu apoyo, por ser mi amiga y compañera en todo momento.

A mis hermanos,

Lily y Fer y al pequeño José Juan de Jesús, por todo su amor y apoyo incondicional,

Kary y Alex, por todo su amor, su paciencia, y comprensión

P. Jorge, por tu sabia dirección, tu paciencia; por tu amor, amistad y ayuda incondicional.

De comunidad por su constante apoyo, preocupación y Oración.

A mis amigos,

Juany, Leo, Martha, Janet, Moy, Ileana, Linda, Paco, Edgar y Victor por su apoyo constante así como por su colaboración en la realización de este trabajo.

AGRADECIMIENTOS

A **Dios** por permitirme concluir con esta etapa de mi vida, por todo tu amor, enseñanza y fortaleza. A ti a quien debo todo lo que tengo y lo que soy, Todo mi Amor. Gracias por Enseñarme a Vivir.

A **mis Padres**, por todo su esfuerzo, su aliento y dedicación; por su ejemplo constante de lucha para vivir con Honradez, Veracidad y Fortaleza. Muchas Gracias.

A **mis hermanos y hermanas**, por su constante animo, apoyo y oración. Gracias.

Al **P. Héctor Juan y P. Jorge** por mostrarme a Dios, por guiarme con toda su sabiduría, y por infundirme esperanza y animo en los días difíciles. Mi eterno amor y agradecimiento para Ustedes, tío y hermano en el Señor.

Dra. **Cristina Rodríguez Padilla**, y al Dr. **Reyes S. Tamez**, por permitirme participar en esta investigación, por su asesoría y todo el apoyo recibido en la realización del mismo. Los amo mucho en Jesús.

A la M. C. **Juana María Reyna Reyes**, al M.C. **Eugenio Roman Calderón**, a la Biol. **Esther Treviño**, al Dr. **Edgar Mendoza Gamboa** y al M. C. **Francisco Javier Ponce**, por proporcionarme el material necesario para esta investigación y por compartir conmigo sus conocimientos.

Al M. C. **Roberto Mercado Hernández** por su asesoría en la estadística de este trabajo.

A todos mis **amigos y compañeros** del laboratorio de Inmunología, y a todas las personas que de una u otra manera hicieron posible la finalización del presente estudio. Gracias por su interés, ánimo y enseñanza brindada.

Para todos Ustedes, mi eterno amor, gratitud y oración.
Con todo el Amor en Cristo Jesús, el Señor.

INDICE

	Página
ABREVIATURAS	vii
INDICE DE FIGURAS	viii
INDICE DE TABLAS	ix
RESUMEN	1
IMPORTANCIA	3
INTRODUCCIÓN	4
ANTECEDENTES	5
I. Características y Mecanismos de Acción del Cristal de <i>B. thuringiensis</i>	6
II. Clasificación de <i>Bacillus thuringiensis</i>	10
III. Actividad Bioinsecticida	11
IV. Actividad Adyuvante	12
V. Actividad Antitumoral	17
HIPÓTESIS	20
OBJETIVOS	20
MATERIAL Y MÉTODO	
I. Línea celular tumoral	22
II. Animales de experimentación	22
III. Oncotoxina de <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>thuringiensis</i> de 20 kDa.	22
IV. Producción de la proteína del cristal de <i>Bacillus thuringiensis</i> 01001 var. <i>thuringiensis</i> .	22
V. Obtención de los cristales.	23
VI. Purificación de los Cristales	23
a) Preparación del Sistema bifásico	23

	INDICE
	Página
VII.Solubilización de los cristales de <i>B.t.f.</i>	24
VIII.Obtención de la proteína de 20 kDa en Una columna de DEAE-Sepharosa.	24
IX . Determinación de la concentración de la proteína.	25
X. Transplante y mantenimiento del Linfoma L-5178Y.	27
XI. Determinación de la mortalidad de ratones BALB/c inoculados a diferentes dosis con células del Linfoma L- 5178Y.	27
XII. Determinación de la Dosis Óptima de Regresión de la Oncotoxina de <i>B.t.f.</i>	28
 RESULTADOS	
I. Determinación de la Dosis Letal al 100% del Linfoma Subcutáneo Murino en Ratones BALB/c	30
II. Actividad Antitumoral de la Oncotoxina de 20kDa.	30
 DISCUSIÓN	 38
CONCLUSIONES	40
PERSPECTIVAS	41
BIBLIOGRAFÍA	42

ABREVIATURAS

α	Alfa	ml	Mililitros
β	Beta	NaCl	Cloruro de Sodio
δ	Delta	M	Molaridad
B.t.	<i>Bacillus thuringiensis</i>	r.p.m.	Revoluciones por minuto
B.t.i.	<i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i>	min	Minutos
B.t.t.	<i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>thuringiensis</i>	gr.	Gramos
Cry	Proteínas del Cristal	PG	Fosfatidilglicerol
Cyt	Proteínas citotóxicas	NaOH	Hidróxido de Sodio
RNA	Acido Ribonucléico	mg/ml	Miligramos por mililitro
DNA	Ac. Desoxirribonucleico	DEAE	Dietildiaminoetil
IgG	Inmonoglobulina G	HCl	Acido clorhídrico
IgM	Inmonoglobulina M	mg	Miligramos
α -Otp	Anticuerpos anti-polipéptido sintético	vol.	Volumen
mg/kg.	Miligramo por kilogramo	BSA	Albúmina sérica bovina
%	Por ciento	H ₂ O	Agua
nm	Nanómetro	Na ₂ CO ₃	Bicarbonato de Sodio
mW	Microvoltios	CuSO ₄	Sulfato de Cobre
var.	Variedad	Na	Sodio
kDa	Kilodaltones	K	Potasio
pH	Logaritmo negativo de la concentración de Hidrógeno	N	Normal
cm	Centímetros	μ g	Microgramo
hr	Horas	μ g/ Kg	Microgramo por Kilogramo
°C	Grados centígrados	PBS	Buffer Salino de Fosfatos
DE	Dosis efectiva	Dil.	Dilución
		células/ml.	Células por mililitro
		mm	Milímetros

INDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Ampliación de una célula vegetativa de <i>Bacillus thuringiensis</i> .	5
2	Ciclo de vida de <i>Bacillus thuringiensis</i>	8
3	Estructura de la toxina Cry 3A	9
4	Diagrama de flujo	21
5	Gráfica de mortalidad de grupos en ratones BALB/c de ambos sexos inoculados con el linfoma murino L-5178Y sobre ratones BALB/c.	32
6	Efecto de la oncotoxina de 20 kDa de <i>B.t.t.</i> sobre el volumen tumoral del linfoma murino subcutáneo L-5178 en ratones BALB/c.	33
7	Efecto de la oncotoxina de 20 kDa de <i>B.t.t.</i> sobre el peso tumoral del linfoma murino subcutáneo L-5178Y en ratones BALB/c.	34
8	Efecto de diferentes dosis de oncotoxina de <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>thuringiensis</i> , sobre la sobrevivencia de ratones BALB/c portadores del linfoma L-5178.	35
9	Efecto de diferentes dosis de la oncotoxina de 20 kDa, sobre grupos de ratones portadores del linfoma L-5178.	36
10	Efecto de diferentes dosis de la oncotoxina de 20 kDa, sobre ratones portadores del linfoma L-5178. Ejemplares representativos de los grupos.	40

INDICE DE TABLAS

Tabla		Página
1	Nomenclatura de las toxinas de <i>Bacillus thuringiensis</i>	13
2	Actividad antitumoral y citotóxica de las proteínas purificadas <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>thuringiensis</i> y var. <i>israelensis</i>	19
3	Protocolo para la determinación cuantitativa de las proteínas por el método de Lowry	26

RESUMEN

El objetivo de la investigación se ha enfocado en la importancia que tienen algunas proteínas de origen bacteriano con actividad antitumoral, específicamente una proteína de *Bacillus thuringiensis var. thuringiensis* cuyo peso molecular es de 20 kDa, la cual ha sido denominada Oncotoxina. En estudios previos con diferentes líneas celulares tumorales se demostró el efecto citotóxico de esta proteína, cuya actividad se presenta como una alternativa para el tratamiento del cáncer.

Lo primero que se hizo fue determinar la actividad de esta proteína sobre el crecimiento del linfoma murino L-5178Y (H-2^d), de origen subcutáneo y de estirpe tímica. Para tal efecto, se desarrolló un modelo experimental en ratones BALB/c, para determinar el porcentaje de mortalidad. El linfoma se inoculó de manera subcutánea a diferentes dosis 2×10^4 , 1×10^6 , 2.5×10^6 , 5×10^6 , 10×10^6 , 20×10^6 células. Estos experimentos fueron realizados por triplicado, los resultados que se obtuvieron fueron 0, 10, 25, 30, 60 y 100% de mortalidad respectivamente, a los 30-40 días después de la inoculación del tumor. (Fig. 5). En la dosis de 20×10^6 células que fue donde se obtuvo el 100% de mortalidad se formó un tumor con crecimiento progresivo que finalmente se diseminó a otros tejidos causando la muerte de los ratones a los 30 - 40 días, por lo que utilizamos esta dosis para inocular tres grupos de ratones (5 en cada grupo), 7 días después se les administró intratumoralmente diferentes dosis (50 μ g, 1000 μ g y 1500 μ g / Kg. de peso) de la proteína de 20 kDa de *Bacillus thuringiensis var. thuringiensis*.

En los resultados se observó que con las tres dosis utilizadas hay una sobrevivencia del 100% en los tres grupos tratados, con la dosis mas alta se vió que la eliminación total del tumor fue en 25 días, mientras que en las demás dosis fue de 29-31 días. Esto se reflejó en el crecimiento del tumor, que con dosis bajas comenzó a desarrollarse hasta llegar a un volumen aproximado de 7.03 a 9.76 cm³. Con las dosis elevadas el crecimiento del tumor fue menor (5.0 cm³), a los 15 días de la inoculación del tumor, lo que probablemente indica que a dosis bajas es mas el tiempo que se necesita para la eliminación del tumor. (Fig. 6)

El experimento se repitió 3 veces en las mismas condiciones mencionadas y los resultados fueron similares. Los ratones fueron dejados un año más, después de haberse tratado con la oncotoxina. Encontrándose todos ellos en condiciones aparentemente sanas, además en el sitio de inoculación no se observó ni se apreció al tacto tumoración alguna.

Se corrieron por triplicado controles negativos con tumor y tratados con albúmina (1500 $\mu\text{g}/\text{Kg}$. de peso). Estos se comportaron como el control, se desarrolló el tumor y los ratones murieron 30-40 días igual que los controles inoculados solamente con las células tumorales.

IMPORTANCIA

Los estudios realizados acerca de la δ -endotoxina de *Bacillus thuringiensis* por mucho tiempo se han abocado principalmente a su actividad bioinsecticida. Recientemente, han surgido nuevas líneas de interés sobre a la actividad de esta proteína, basadas en su actividad antitumoral. Esta ha surgido como una respuesta al incremento estadístico de casos de cáncer en años recientes.

Varios grupos de investigación, han mostrado el efecto antiproliferativo de la proteína de 25 kDa de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* contra una amplia variedad de células tumorales *in vivo* e *in vitro*.

Últimamente en estudios realizados en nuestro laboratorio, hemos observado que la Oncotoxina de 20 kDa de *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis*, presenta actividad sobre una variedad de líneas tumorales humanas *in vitro*. La importancia del presente trabajo, radica principalmente en determinar la actividad *in vivo* de esta proteína.

INTRODUCCIÓN

Bacillus thuringiensis (*B.t.*) es un bacilo aerobio, gram-positivo con flagelos peritricos⁷⁸, excepto un biotipo²⁶. Es una bacteria de suelo que se halla ampliamente distribuida en todo el mundo, aunque se le ha encontrado en mayor proporción en Asia^{60, 80, 87}. Una de sus características es la de ser esporulada, fase durante la cual la bacteria forma un cuerpo parasporal cristalino de naturaleza proteica de forma variable (bipiramidal, redonda, triangular, ovoide, cuadrada, rectangular o amorfa)^{40, 80}, aunque su morfología no se haya correlacionada con su toxicidad^{32, 73, 79}.

Este microorganismo, sintetiza diferentes tipos de toxinas, la α -exotoxina, la β -exotoxina y la δ -endotoxina, esta última llamada proteína del cristal insecticida (PCI), la naturaleza bioquímica de cada tipo de toxina varía de cepa a cepa. Las dos primeras son tóxicas para una variedad de ordenes de insectos entre los que se hallan los artrópodos, mientras que la δ -endotoxina actúa sobre diferentes ordenes de insectos Lepidóptera, Díptera y Coleóptera^{42, 91}, en reportes mas recientes se ha mencionado su actividad sobre otros ordenes Himenoptera, Homoptera, Orthoptera y Malofaga, Nematoda⁶², Aracnida, Acari, Protozoa, así como en células tumorales^{72, 74, 77}.

Los genes de la δ -endotoxina, han sido aislados y secuenciados. Actualmente mas de 50 genes han sido clonados y se les ha dividido en dos familias: Cry y Cyt, nomenclatura basada en su actividad. Las proteínas Cry constituyen un grupo de proteínas del cristal de *B.t.* que presentan algún efecto tóxico verificable experimentalmente sobre organismos blanco o cualquier proteína que tenga una secuencia similar a la proteína Cry conocida.

Por otra parte, las proteínas Cyt tienen actividad hemolítica, o bien, que tengan una secuencia similar a la proteína Cyt conocida¹⁸. Estos genes son codificados por dos megaplásmidos, y de acuerdo a su espectro tóxico se clasifican como específicos de: Lepidópteros (Cry I), Lepidoptero-Diptero (CryII), Coleóptero (CryIII), Díptero (CryIV) y Nemátodos (Cry V y VI)^{31, 46, 75}. Una misma cepa puede contener mas de un tipo de toxina de cristal, con un rango de toxicidad para más de un orden de insectos⁹⁰, además se ha demostrado que es inocua para el hombre⁸¹ y para animales superiores y que no presenta residualidad, por todo ello se considera su importancia en la Industria y en la ciencia biomédica^{21, 31, 35, 75, 80}.

Bacillus thuringiensis (B.t.) es un bacilo flagelado aerobio, gram-positivo, que se caracteriza por su capacidad para producir un cuerpo parasporal cristalino de naturaleza proteica durante la fase de esporulación (δ -endotoxina)^{2, 4, 6, 22, 40, 52, 79}. Fig. 1.

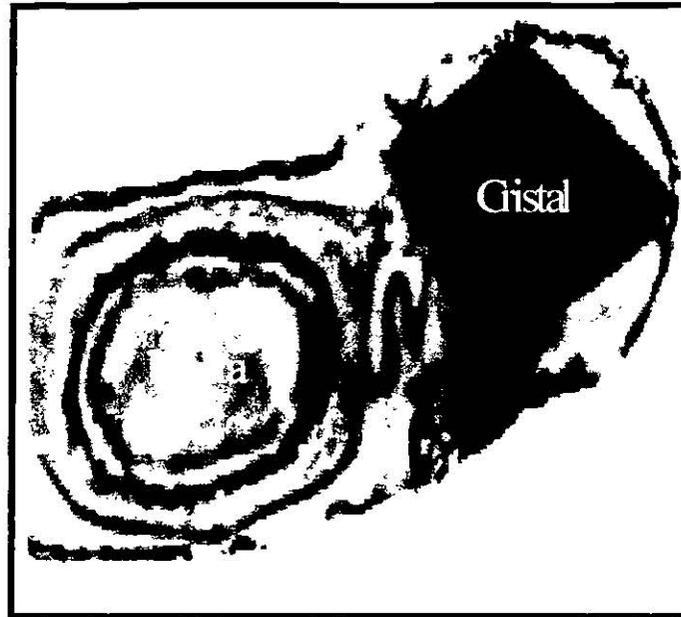


Fig.1. Ampliación de una célula vegetativa de *Bacillus thuringiensis*; espora y cristal de la δ -endotoxina (estructura en forma bipiramidal)¹⁶.

Esta bacteria produce además, otras dos proteínas, la α -exotoxina, (fosfolipasa C) una lecitinasa tipo C termolábil, que hidroliza lecitina y esfingomiolina y que es sintetizada durante la fase de crecimiento exponencial. La β -exotoxina, es una toxina sintetizada durante la fase de crecimiento⁷² que es termoestable, altamente tóxica para una amplia variedad de ordenes de insectos^{5, 51, 86}, denominada thuringiensina. Se ha encontrado que interfiere con la RNA polimerasa DNA dependiente y que inhibe la mitosis en meristemas de raíz, simulando el efecto de la colchicina y la vinblastina⁵⁹. La δ -endotoxina, llamada proteína del cristal, tienen una actividad insecticida altamente específica contra larvas de diversos ordenes Lepidóptera⁴⁴⁻⁴⁶, Coleoptera⁴², Diptera^{25,67}, Nematoda^{8,9,61,62}, Himenoptera, Homoptera, Orthoptera y Malofaga, Aracnida, Acari, Protozoa, así como en células tumorales^{71, 74, 76, 77, 82}, por lo que es conocida y utilizada como una bacteria entomopatógena.^{24, 68}

Este organismo fue aislado por vez primera por su descubridor, el investigador japonés Ishiwata, a partir de larvas enfermas del gusano de la seda *Bombix mori*³³ en 1901 y la denominó *Bacillus sotto*^{57, 68, 68}. Posteriormente, en 1911 Berliner aisló la bacteria de larvas enfermas de la palomilla de la flor del mediterráneo *Anagasta kuhniella*, y de otras larvas de insectos encontradas en graneros en la ciudad de Thüringen, Alemania. Esta bacteria era similar a la descrita por Ishiwata, y la llamó *Bacillus thuringiensis* en 1915⁴⁰. Doce años mas tarde, Mattes confirmó las observaciones de Berliner y añadió que el crecimiento del cuerpo de desecho cambia el alineamiento de las esporas⁴⁶. En 1946, Smith y col. describieron a *Bacillus thuringiensis* como una variedad de *Bacillus cereus*, por su similitud, aunque este organismo presentaba patogenicidad para ciertos insectos así como una inclusión parasporal³⁹.

En 1953 Hannay, estudiando la esporulación de esta bacteria, redescubrieron el "Restkörper" o cuerpo de desecho, reportando que las esporas siempre se presentaban acompañadas de cristales en forma de diamante³⁹. Angus en 1954, demostró que el cristal del bacilo estaba asociado con la toxicidad hacia los insectos y que requería para ser activado, un tratamiento con soluciones alcalinas o con el jugo intestinal del insecto mismo^{4,9}.

Posteriormente, Hannay y Fitz-James en 1955, reportaron que la inclusión cristalina era de naturaleza proteica y que su forma era bipiramidal y su estructura superficial estaba formada por estrías en dirección paralela a la base plana del cristal^{7, 40}. *Bacillus thuringiensis* había sido clasificada, por Toumanoff y Vago en 1951, como una variedad de *Bacillus cereus*, debido a su similitud en cuanto a sus propiedades bioquímicas las cuales fueron utilizadas para su clasificación taxonómica²⁷, sin embargo, en 1958 Heimpel y Angus señalaron como características diferenciales entre ambas, la presencia de la inclusión parasporal (cristal) y su patogenicidad hacia larvas de Lepidópteros por lo que proponen que *Bacillus thuringiensis* se clasifique aparte de *Bacillus cereus*⁴¹.

I. Características Y Mecanismo de Acción del Cristal de *B. t.*

La proteína del cristal (δ -endotoxina), puede estar constituida por más de una proteína y ser de diferentes tipos^{38, 47}, se presenta como una protoxina, la cual debe ser solubilizada, y pasar por un proceso de proteólisis³⁶ para liberar del el extremo N-terminal una proteína activa de 60 kDa. La porción amino-terminal de esta proteína es rica en regiones hidrofóbicas, mientras que el extremo C-terminal en regiones hidrofílicas con

sitios altamente conservados, localizados en la parte central de la toxina³⁷. Una vez que la toxina ha sido activada, se une e inserta dentro de la membrana de las células epiteliales del intestino de la larva^{84, 85, 89}. Su alta especificidad depende de receptores específicos presentes en dicha membrana^{29, 83} cuya afinidad en la unión está relacionada con su toxicidad^{12,14,15, 43,48,49, 54}.

La proteína Cry activada tiene dos funciones : 1.- Unirse a un Receptor Específico expuesto hacia la superficie de la membrana celular, 2.- Insertarse dentro de la membrana permitiendo la formación del poro, haciendo a la célula permeable a cationes monovalentes y solutos neutros, causando lisis celular y la muerte del insecto⁸⁸. (Fig 2)

Ellar y col. han identificado a estos receptores como glicoproteínas transmembranales que exponen una parte de la proteína hacia el exterior de la célula^{28,55}.

En reportes recientes⁶⁴, en donde se estudió el Mecanismo de Acción de la Oncotoxina de *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* (*B.t.t.*), observaron mediante ensayos de unión por competencia, que la oncotoxina marcada con ¹²⁵I, interactúa específicamente con receptores de las células del linfoma histiocítico humano (U-937). Mendoza Gamboa y col. mencionan, que el mecanismo molecular de la actividad citotóxica es mediante apoptosis, entre ellos la producción del factor de transcripción NF-κB, inductor del TNF (Factor necrótico Tumoral), que además controla, una gran cantidad de genes involucrados en la respuesta inmune.

Por otra parte, mediante ensayos con western blot e hibridación del DNA, encontraron que el gen que codifica para la oncotoxina no solo esta presente en *B.t.t.* sino también en otros serotipos de *Bacillus thuringiensis*.

En estudios realizados por cristalografía de rayos X, se ha mostrado que la estructura de la toxina (Cry) está compuesta por tres dominios, aparentemente independientes⁵⁵. El Dominio I formado por siete α-hélices, anfipáticas que rodean a otra central de carácter hidrofóbico³⁷, se ha sugerido que este dominio es el responsable de la formación del poro en la membrana intestinal de las larvas, además, se haya involucrado en la unión reversible o irreversible a la membrana celular ya que la unión irreversible está exclusivamente asociada a la inserción de este dominio⁷⁷. El Dominio II formado por tres láminas β-plegadas antiparalelas, unidas en una topología típica, que termina en tres asas, formando un β-prisma. Su función es la de reconocer el receptor en la membrana de las células epiteliales del intestino larval. El Dominio III consiste de una estructura, de dos láminas β-plegadas antiparalelas, entrelazadas, formando un β-sandwich, cuya función es la de mantener la integridad de la estructura de la toxina^{12, 13, 14, 77}. (Fig. 3)

Modo de Acción de *Bacillus thuringiensis*

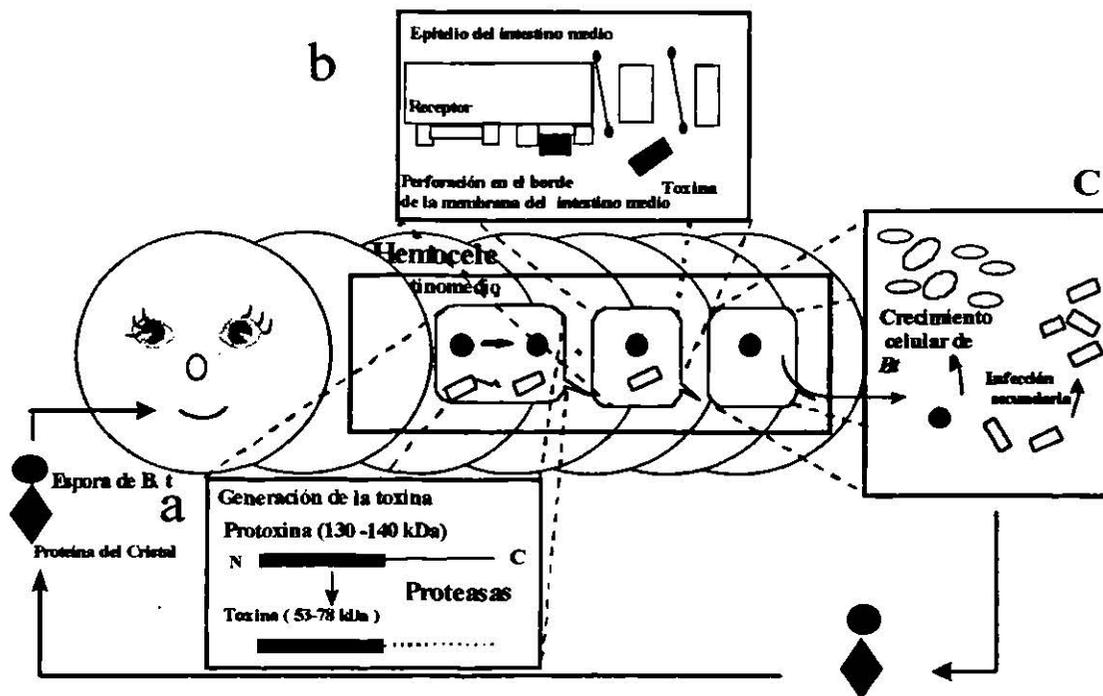


Fig. 2 En condiciones naturales, durante su alimentación, las larvas ingieren esporas y cristales. a).- Estos últimos, presentes como una protoxina, son disueltos en el intestino medio, y activado en condiciones alcalinas mediante proteasas. b).-La porción tóxica activada, se une a receptores específicos localizados en la membrana de las células epiteliales del intestino formando poros haciendo permeable a la célula a cationes monovalentes y solutos neutros, causando lisis celular. Por otra parte, c).- las esporas dan origen a una proliferación celular de *Bacillus thuringiensis* que causan una infección secundaria y la muerte del insecto⁸⁸.

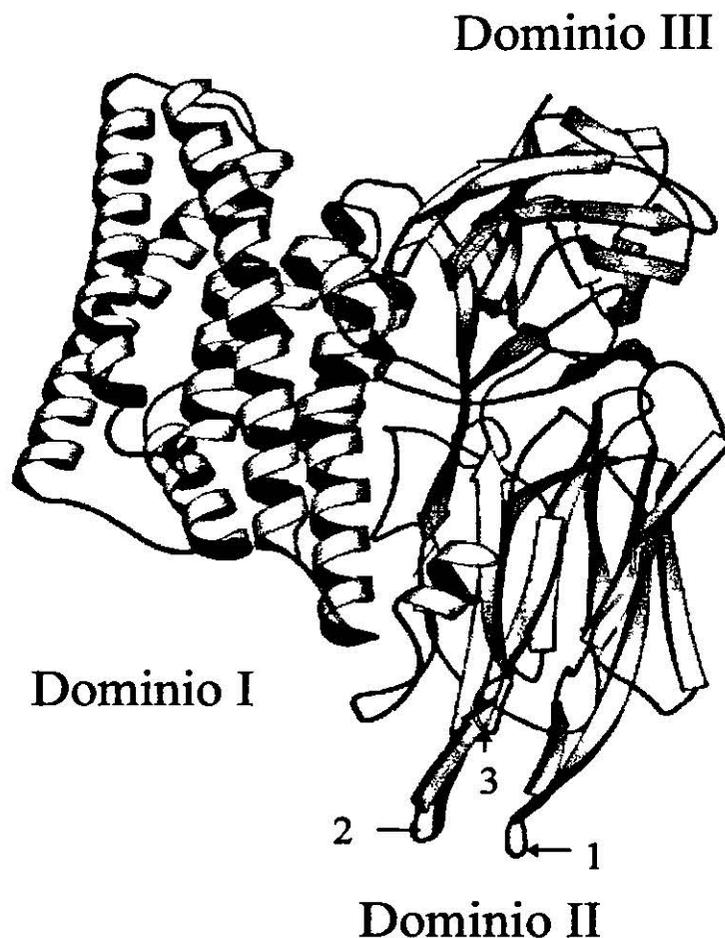


Fig.3 Esquema de la estructura de la Toxina Cry 3A, constituida por tres Dominios. El Dominio I, formado por siete α -hélices, anfipáticas que rodean a otra central de carácter hidrofóbico, El Dominio II formado por tres laminas β -plegadas antiparalelas, unidas en una topología típica, que termina en tres asas (señaladas con números), formando un β -prisma. El Dominio III consiste en una estructura, de dos láminas β -plegadas antiparalelas, entrelazadas, formando un β -sandwich, cuya función es la de mantener la integridad de la estructura de la toxina.^{53, 55.}

II. Clasificación De *B. t.*

En 1959 y 1967 Heimpel y Angus en base a criterios morfológicos y bioquímicos, sugirieron que el microorganismo aislado por Berliner fuera el cultivo tipo para la especie, y que las otras bacterias formadoras del cristal fueran variedades de éste ^{7, 41}, además propusieron el nombre de dóendotoxina, para la proteína del cristal ⁸⁸.

En 1962 de Barjac y Boneffoi describieron un método de clasificación para diferentes especies de bacilos entomopatógenos productores de cristal, para tal efecto, realizaron pruebas bioquímicas y serológicas, con 24 cepas. En este estudio las pruebas básicas para la clasificación eran la producción de lecitinasa así como la utilización de azúcares diferentes. Mediante estas pruebas se describieron 6 grupos serológicos pertenecientes a la especie de *B. t.*, y su identificación se basó en reacciones específicas contra el antígeno flagelar (H), presente en las células vegetativas móviles de estas especies¹⁹. En 1964, Norris realizó un trabajo similar al anterior ⁶⁵. El estudió 46 cepas de bacterias productoras de cristal, donde todas las cepas fueron sometidas a métodos de clasificación en base a pruebas bioquímicas, serológicas y a un análisis posterior en geles de almidón para identificación de esterases. Los resultados que se obtuvieron de este estudio indicaron que las pruebas bioquímicas fueron muy amplias y no permitieron establecer una clasificación, debido a que solo proporcionaron información de las reacciones bioquímicas que realizan las bacterias, y no de la naturaleza de las enzimas involucradas en dichas reacciones. Observó también que las reacciones antígeno-anticuerpo, eran de suma importancia para la clasificación taxonómica, debido a que la técnica era de alta especificidad y con afinidad que proporcionaba información sobre la estructura molecular de los antígenos flagelares. Por otra parte, la utilización del análisis electroforético de la esterasa resultó muy conveniente ya que era más rápido que los métodos anteriores, sin embargo, no pudieron diferenciar los grupos serológicos *galleriae* y *aizawai* mediante este método ⁶⁶.

Otra técnica propuesta para agrupar especies de *Bacillus thuringiensis* diferentes del antígeno flagelar ("H"), fue la descrita en 1982 por Sekijima y Ono, donde se utilizaron antígenos somáticos termoestables ("O"), mediante la técnica de aglutinación en tubo de células vegetativas. Con esta técnica no pudieron establecer diferencia entre las variedades *kurstaki*, *galleriae* y *aizawai*, así como *alesti* y *darmstadiensis*, que pertenecen a serotipos diferentes "H", aunque este sistema resultó ser confuso⁵⁰.

En 1989, Hofte y Whiteley⁴⁶ propusieron un esquema de clasificación diferente a todos los que se habían descrito hasta ese momento, este sistema de clasificación de la proteína del cristal se basaba en la secuencia de aminoácidos y en su especificidad de insectos, ellos identificaron 14 genes de toxinas diferentes, 13 de los cuales se hallaron relacionados entre sí (Cry) y menos uno, el cual fue colocado en un lugar aparte (Cyt), estos genes se dividieron en 5 clases. Con el tiempo se fueron descubriendo más genes de toxinas y este sistema comenzó a ser poco entendible, ya que genes con secuencias similares presentaban una diferencia significativa en la especificidad insecticida ^{10, 19, 20}.

Neil Crickmore, en 1996, propuso un nuevo sistema de clasificación el cual se basó únicamente en la identidad de aminoácidos. Recientemente se ha revisado esta nomenclatura, y se ha organizado una gran cantidad de datos proporcionados por la secuencia genómica, para ello se ha propuesto un modelo de acuerdo a bases conceptuales y un formato de nomenclaturas. Este tipo de sistema se basa en la asignación de nombres a los miembros de los genes de las superfamilias de acuerdo a su grado de divergencia evolucionaria, estimado por el árbol de algoritmos filogenéticos. El formato de Nomenclatura, es un sistema diseñado para convertir la información contenida acerca de estas interrelaciones, se basa en anexar a la raíz mnemónica una serie de números y letras asignados en orden jerárquico para indicar los grados de divergencia filogenética,¹⁷ de acuerdo a esta nueva nomenclatura, muchos de los nombres originales se han mantenido, aunque un número de ellos ha sido reclasificado. (tabla 1)

III. Actividad Bioinsecticida

La alta especificidad de las proteínas del cristal de *B.t.* con actividad insecticida ha incrementado el interés de los científicos y de la Industria, debido a que las PCI pueden ser producidas rápidamente por fermentación, desarrollando así bioinsecticidas relativamente baratos. Desde principios de siglo *B.t.* ha sido considerada como una bacteria patógena a insectos, pero fue hasta 1961 cuando se registró originalmente para su uso como insecticida y ha sido utilizada por décadas como control biológico. Otro punto de interés de los científicos sobre esta proteína es que no es tóxica para humanos ni para animales superiores ³⁰.

Desde 1983, diversos genes Cry han sido introducidos en plantas como el tabaco, algodón y maíz creando así plantas transgénicas para la protección de los cultivos contra insectos plaga^{11, 77}.

IV. Actividad Adyuvante

En 1976, Prasad y Shethna demostraron que la proteína del cristal de *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* incrementaba la respuesta inmune⁷⁰ humoral en ratas y cobayos inmunizados con glóbulos rojos de carnero. Este incremento se observó en los anticuerpos IgG e IgM ⁷². Román Calderón, en 1997, midió el efecto de los cristales de *Bacillus thuringiensis* (GM-1) y de sus proteínas sobre la respuesta inmune humoral y celular en ratones BALB/c. Él observó que las proteínas del cristal eran reconocidas por los anticuerpos CryIA(a) y la CryIA(b), pero no por los anticuerpos CryIIIA, CryIIIC y α -Otp, lo que indicó que la proteína compartía los genes que codificaban para las proteínas CryIA(a) y CryIA(b), en el cristal con el serotipo *aizawai* ⁴⁶. Debido a que parte de su composición proteica pertenece serológicamente a este grupo. Por otra parte, encontró que las proteínas digeridas con tripsina, producían una respuesta inmune primaria de anticuerpos *in vivo*, así mismo vió que la reacción de hipersensibilidad retardada, tenía una respuesta máxima a las 3hr. y que se encontraba mediada por linfocitos polimorfonucleares⁷⁵. Otros estudios realizados por Gómez Flores y col. demostraron que la proteína de 20 kDa de *B.t.t.* activó la actividad fagocítica de macrófagos³⁴.

Nomenclatura de las Toxinas de *Bacillus thuringiensis*
Tabla 1. Lista actualizada de los genes de las delta-endotoxinas

Nombre	Clave de Acceso al Banco de Genes	Referencia.	Año	Revista	Código
cry1Aa1	M11250	Schnepf et al	1985	JBC 260 6264-6272	527-4054
cry1Aa2	M10917	Shibano et al	1985	Gene 34 243-251	153->2955
cry1Aa3	D00348	Shimizu et al	1988	ABC 52 1565-1573	73-3603
cry1Aa4	X13535	Masson et al	1989	NAR 17 446-446	1-3528
cry1Aa5	D17518	Udayasuriyan et al	1994	BBB 58 830-835	81-3611
cry1Aa6	U43605	Masson et al	1994	Mol Micro 14 851-860	1->1860
cry1Ab1	M13898	Wabiko et al	1986	DNA 5 305-314	142-3606
cry1Ab2	M12661	Thorne et al	1986	J Bact 166 801-811	155-3625
cry1Ab3	M15271	Geiser et al	1986	Gene 48 109-118	156-3623
cry1Ab4	D00117	Kondo et al	1987	ABC 51 455-463	163-3630
cry1Ab5	X04698	Hofte et al	1986	EJB 161 273-280	141-3605
cry1Ab6	M37263	Hefford et al	1987	J Biotech 6 307-322	73-3540
cry1Ab7	X13233	Haider & Ellar	1988	NAR 16 10927-10927	1-3465
cry1Ab8	M16463	Oeda et al	1987	Gene 53 113-119	157-3624
cry1Ab9	X54939	Chak & Jen	1993	PNSCRC 17 7-14	73-3540
cry1Ab10	A29125	Fischhoff et al	1987	Bio/technology	5 807-813 sec. peptido
cry1Ac1	M11068	Adang et al	1985	Gene 36 289-300	388-3921
cry1Ac2	M35524	Von Tersch et al	1991	AEM 57 349-358239-3772	
cry1Ac3	X54159	Dardenne et al	1990	NAR 18 5546-5546	339->2192
cry1Ac4	M73249	Payne et al	1991	USP 4990332	1-3537
cry1Ac5	M73248	Payne et al	1992	USP 5135867	1-3534
cry1Ac6	U43606	Masson et al	1994	Mol Micro 14 851-860	1->1821
cry1Ac7	U87793	Herrera et al	1994	AEM 60 682-690976-4512	
cry1Ac8	U87397	Omolo et al	1997	Curr Micro 34 118-121	153-3686
cry1Ac9	U89872	Gleave et al	1992	NZJCHS 20 27-36	388-3921
cry1Ac10	AJ002514	Sun and Yu	1997	no publicado	388-3921
cry1Ad1	M73250	Payne & Sick	1993	USP 5246852	1-3537
cry1Ae1	M65252	Lee & Aronson	1991	J Bact 173 6635-6638	81-3623
cry1Af1	U82003	Kang et al	1997	no publicado	172->2905
cry1Ba1	X06711	Brizzard & Whiteley	1988	NAR 16 2723-2724	1-3684
cry1Ba2	X95704	Soetaert	1996	no publicado	186-3869
cry1Bb1	L32020	Donovan et al	1994	USP 5322687	67-3753
cry1Bc1	Z46442	Bishop et al	1994	no publicado	141-3839
cry1Bd1	U70726	Chak	1996	no publicado	
cry1Be1		Payne et al	1998	USP 5723758	1-3681
cry1Ca1	X07518	Honee et al	1988	NAR 16 6240-6240	47-3613
cry1Ca2	X13620	Sanchis et al	1989	Mol Micro 3 229-238	241->2711
cry1Ca3	M73251	Payne & Sick	1993	USP 5246852	1-3570
cry1Ca4	A27642	Van Mellaert et al	1990	EP 0400246	234-3800
cry1Ca5	X96682	Strizhov	1996	no publicado	1->2268
cry1Ca6	X96683	Strizhov	1996	no publicado	1->2268

Nomenclatura de las Toxinas de *Bacillus thuringiensis*
 Continuación Tabla.1 Lista actualizada de los genes de las delta-endotoxinas

Nombre	Clave de Acceso al Banco de Genes	Referencia.	Año	Revista	Código
cry1Ca7	X96684	Strizhov	1996	no publicado	1->2286
cry1Cb1	M97880	Kalman et al	1993	AEM 59 1131-1137	296-3823
cry1Da1	X54160	Hofte et al	1990	NAR 18 5545-5545	264-3758
cry1Db1	Z22511	Lambert	1993	no publicado	241-3720
cry1Ea1	X53985	Visser et al	1990	J Bact 172 6783-6788	130-3642
cry1Ea2	X56144	Bosse et al	1990	NAR 18 7443-7443	1-3516
cry1Ea3	M73252	Payne & Sick	1991	USP 5039523	1-3516
cry1Ea4	U94323	Ibarra et al	1997	no publicado	388-3900
cry1Eb1	M73253	Payne & Sick	1993	USP 5206166	1-3522
cry1Fa1	M63897	Chambers et al	1991	J Bact 173 3966-3976	478-3999
cry1Fa2	M73254	Payne & Sick	1993	USP 5188960	1-3525
cry1Fb1	Z22512	Lambert	1993	no publicado	483-4004
cry1Fb2	AB012288	Masuda & Asano	1998	no publicado	84-3587
cry1Ga1	Z22510	Lambert	1993	no publicado	67-3564
cry1Ga2	Y09326	Shevelev et al	1997	Febs Lett 404 148-152	692-4210
cry1Gb1	U70725	Chak	1996	no publicado	
cry1Ha1	Z22513	Lambert	1993	no publicado	530-4045
cry1Hb1	U35780	Koo et al	1995	no publicado	728-4195
cry1Ia1	X62821	Tailor et al	1992	Mol Micro 6 1211-1217	355-2511
cry1Ia2	M98544	Gleave et al	1993	AEM 59 1683-1687	1-2160
cry1Ia3	L36338	Shin et al	1995	AEM 61 2402-2407	279-2438
cry1Ia4	L49391	Kostichka et al	1996	J Bact 178 2141-2144	61-2217
cry1Ia5	Y08920	Selvapandiyan	1996	no publicado	524-2680
cry1Ia6	AF076953	Zhong et al	1998	no publicado	1-2157
cry1Ib1	U07642	Shin et al	1995	AEM 61 2402-2407	237-2393
cry1Ja1	L32019	Donovan et al	1994	USP 5322687	99-3519
cry1Jb1	U31527	Von Tersch & Gonzalez	1994	USP 5356623	177-3686
cry1Ka1	U28801	Koo et al	1995	FEMS 134 159-164	451-4098
cry2Aa1	M31738	Donovan et al	1989	JBC 264 4740-4740	156-2054
cry2Aa2	M23723	Widner & Whiteley	1989	J Bact 171 965-974	1840-3741
cry2Aa3	D86064	Sasaki et al	1997	Curr Micro 35 1-8	2007-3911
cry2Aa4	AF047038	Misra et al	1998	no publicado	10-1908
cry2Ab1	M23724	Widner & Whiteley	1989	J Bact 171 965-974	1-1899
cry2Ab2	X55416	Dankocsik et al	1990	Mol Micro 4 2087-2094	874-2775
cry2Ac1	X57252	Wu et al	1991	FEMS 81 31-36	2125-3990
cry3Aa1	M22472	Herrnstadt et al	1987	Gene 57 37-46	25-1956
cry3Aa2	02978	Sekar et al	1987	PNAS 84 7036-7040	241-2175
cry3Aa3	Y00420	Hofte et al	1987	NAR 15 7183-7183	566-2497
cry3Aa4	M30503	McPherson et al	1988	Bio/technology 6 61-66	201-2135
cry3Aa5	M37207	Donovan et al	1988	MGG 214 365-372	569-2503
cry3Aa6	U10985	Adams et al	1994	Mol Micro 14 381-389	569-2503
cry3Ba1	X17123	Sick et al	1990	NAR 18 1305-1305	25->1977
cry3Ba2	A07234	Peferoen et al	1990	EP 0382990	342-2297
cry3Bb1	M89794	Donovan et al	1992	AEM 58 3921-3927	202-2157
cry3Bb2	U31633	Donovan et al	1995	USP 5378625	144-2099

Nomenclatura de las Toxinas de *Bacillus thuringiensis*
 Continuación Tabla.1 Lista actualizada de los genes de las delta-endotoxinas

Nombre	Clave de Acceso al Banco de Genes	Referencia.	Año	Revista	Código
cry3Ca1	X59797	Lambert et al	1992	Gene 110 131-132	232-2178
cry4Aa1	Y00423	Ward & Ellar	1987	NAR 15 7195-7195	1-3540
cry4Aa2	D00248	Sen et al	1988	ABC 52 873-878	393-3935
cry4Ba1	X07423	Chungjatpornchai et al	1988	EJB 173 9-16	157-3564
cry4Ba2	X07082	Tungpradubkul et al	1988	NAR 16 1637-1638	151-3558
cry4Ba3	M20242	Yamamoto et al	1988	Gene 66 107-120	526-3933
cry4Ba4	D00247	Sen et al	1988	ABC 52 873-878	461-3868
cry5Aa1	L07025	Sick et al	1994	USP 5281530	1->4155
cry5Ab1	L07026	Narva et al	1991	EP 0462721	1->3867
cry5Ac1	I34543	Payne et al	1997	USP 5596071	1->3660
cry5Ba1	U19725	Payne et al	1997	USP 5596071	1->3735
cry6Aa1	L07022	Narva et al	1993	USP 5236843	1->1425
cry6Ba1	L07024	Narva et al	1991	EP 0462721	1->1185
cry7Aa1	M64478	Lambert et al	1992	AEM 58 2536-2542	184-3597
cry7Ab1	U04367	Payne & Fu	1994	USP 5286486	1->3414
cry7Ab2	U04368	Payne & Fu	1994	USP 5286486	1->3414
cry8Aa1	U04364	Foncerrada et al	1992	EP 0498537	1->3471
cry8Ba1	U04365	Michaels et al	1993	WO 93/15206	1->3507
cry8Ca1	U04366	Ogiwara et al.	1995	Curr Micro 30 227-235	1-3447
cry9Aa1	X58120	Smulevitch et al	1991	FEBS 293 25-28	5807-9274
cry9Aa2	X58534	Gleave et al	1992	JGM 138 55-62	385->3837
cry9Ba1	X75019	Shevelev et al	1993	FEBS 336 79-82	26-3488
cry9Ca1	Z37527	Lambert et al	1996	AEM 62 80-86	2096-5569
cry9Da1	D85560	Asano et al	1997	AEM 63 1054-1057	47-3553
cry9Da2	AF042733	Wasano & Ohba	1998	no publicado	<1->1937
cry10Aa1	M12662	Thorne et al	1986	J Bact 166 801-811	941-2965
cry11Aa1	M31737	Donovan et al	1988	J Bact 170 4732-4738	41-1969
cry11Aa2	M22860	Adams et al	1989	J Bact 171 521-530	<1-235
cry11Ba1	X86902	Delecluse	1995	AEM 61 4230-4235	64-2238
cry12Aa1	L07027	Narva et al	1991	EP 0462721	1->3771
cry13Aa1	L07023	Narva et al	1992	WO 92/19739	1-2409
cry14Aa1	U13955	Narva et al	1994	WO 94/16079	1-3558
cry15Aa1	M76442	Brown & Whiteley	1992	J Bact 174 549-557	1036-2055
cry16Aa1	X94146	Barloy et al	1996	J Bact 178 3099-3105	158-1996
cry17Aa1	X99478	Barloy et al	1998	Gene 211 293-299	12-1865
cry18Aa1	X99049	Zhang et al	1997	J Bact 179 4336-4341	743-2860
cry19Aa1	Y07603	Rosso and Delecluse	1996	AEM 63 4449-4455	719-2662
cry19Ba1	D88381	Hwang et al	1998	SAB 21 179-184	626-2671
cry20Aa1	U82518	Lee & Gill	1997	AEM 63 4664-4670	60-2318
cry21Aa1	I32932	Payne et al	1996	USP 5589382	1-3501
cry22Aa1	I34547	Payne et al	1997	USP 5596071	1-2169
cyt1Aa1	X03182	Waalwijk et al	1985	NAR 13 8207-8217	140-886
cyt1Aa2	X04338	Ward & Ellar	1986	JMB 191 1-11	509-1255
cyt1Aa3	Y00135	Earp & Ellar	1987	NAR 15 3619-3619	36-782
cyt1Aa4	M35968	Galjart et al	1987	Curr Micro 16 171-177	67-816
cyt1Ab1	X98793	Thiery et al	1997	AEM 63 468-47328-777	
cyt1Ba1	U37196	Payne et al	1995	USP 5436002	1-795

Nomenclatura de las Toxinas de *Bacillus thuringiensis*
 Continuación Tabla.1 Lista actualizada de los genes de las delta-endotoxinas

Nombre	Clave de Acceso al Banco de Genes	Referencia.	Año	Revista	Código
cyt2Ba1	U52043	Guerchicoff et al	1997	AEM 63 2716-2721	287-655
cyt2Aa1	Z14147	Koni & Ellar	1993	JMB 229 319-327	270-1046
cyt2Ba2	AF020789	Guerchicoff et al	1997	AEM 63 2716-2721	<1->469
cyt2Ba3	AF022884	Guerchicoff et al	1997	AEM 63 2716-2721	<1->469
cyt2Ba4	AF022885	Guerchicoff et al	1997	AEM 63 2716-2721	<1->469
cyt2Ba5	AF022886	Guerchicoff et al	1997	AEM 63 2716-2721	<1->471
cyt2Ba6	AF034926	Guerchicoff et al	1997	AEM 63 2716-2721	<1->472
cyt2Bb1	U82519	Cheong & Gill	1997	AEM 63 3254-3260	416-1204

*Tabla tomada de Revisión of the Nomenclatura for the *Bacillus thuringiensis* Pesticidal Crystal Proteins¹⁷.

Nota : Las siguientes toxinas o proteínas parecidas a toxinas no han sido incluidas en la nomenclatura debido a que no se encuentran dentro del cristal o porque no han presentado criterios satisfactorios para su inclusión.

Nombre	Acceso	Referencia	Año	Revista	Código
40kDa	M76442	Brown and Whiteley	1992	J Bact 174 549-557	45-971
cryC35	X92691	Juarez-Perez et al1995	no publicado	1-981	
cryTDK	D86346	Hashimoto	1996	no publicado	177-2645
cryC53	X98616	Juarez-Perez et al1996	no publicado	1-1005	
vip3A(a)	L48811	Estruch et al	1996	PNAS 93 5389-5394	739-3105
vip3A(b)	L48812	Estruch et al	1996	PNAS 93 5389-5394	118-2484
p21med	X98794	Thiery et al	1997	AEM 63 468-4731-552	

V. Actividad Antitumoral

A mediados de la década de los 70' s Prasad y Shethna descubrieron, tanto *in vivo* como *in vitro*, que el cristal completo de *B.t.t.* era capaz de inhibir el crecimiento del sarcoma ascítico de Yoshida. Ellos administraron 0.1 mg/kg. de proteína por vía intraperitoneal en ratas portadoras de sarcoma por un período de 5 días, resultando en una regresión completa del tumor y la inmunidad a futuros retos con células tumorales, la cual podría ser transferida a animales singénicos mediante suero inmune y linfocitos de ratas no portadoras del tumor pero tratadas con la δ -endotoxina *in vitro*. Otros de los aspectos que observaron fue que, a una dosis de 1 mg/kg. Esta proteína redujo la viabilidad de las células tumorales en un 60% ; además, limita la fuente de precursores necesarios para la síntesis de DNA, RNA y proteínas, debido al daño en la membrana celular. Todo esto sugiere que la actividad citotóxica de esta proteína actúa en la membrana celular ^{69,71}.

Posteriormente, en 1985 Zamola y col. observaron que al exponer cultivos de *B.t.t.* a radiación ultravioleta (250nm 60 mW) se incrementaba la actividad antitumoral de la proteína en ratones C57BL/ 6, los cuales eran portadores de carcinoma pulmonar ⁹⁶. En 1988, Yokoyama y col. trabajando con células de leucemia murina L-1210 y demostraron que la fracción de 25 kDa de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*, (*B.t.i.*) era capaz de inhibir en un 50 % el crecimiento de dichas células. Además observaron un efecto potenciador cuando se combinaba con fármacos anticancerígenos⁹² especialmente con Bleomicina. Esto fue corroborado en 1991, cuando realizaron una investigación similar a la anterior donde continuaron evaluando el sinergismo entre la proteína de 25 kDa de *B.t.i.* y la bleomicina ⁹³⁻⁹⁵, *in vivo* con ratones portadores de carcinoma de Erlich, melanoma B16 y fibrosarcoma methionina A. Los resultados obtenidos mostraron que la proteína fue a esas concentraciones inefectiva cuando se utilizaba por si sola, pero que al combinarse con la bleomicina se apreciaba la inhibición del crecimiento del tumor, lo que podría deberse a la posible interacción de la proteína con los fosfolípidos de la membrana celular que conducen a la formación de poros, a la lisis y así la muerte celular ⁹³.

Más recientemente en 1996, Rodríguez-Padilla observó que la proteína purificada de *B.t.t.* presentó actividad citotóxica contra células tumorales humanas de diferentes orígenes: mieloide, linfoide, eritroblastoide, hepatoma, carcinoma de mama, de ovario y de riñón, así mismo indicó que la única línea celular resistente fue glioblastoma. En este trabajo se determinó que el peso molecular de esta proteína, fue de 20 kDa, además se demostró que la acción citotóxica de la proteína fué dependiente de dosis ^{63,74}.

Todos estos reportes demuestran la capacidad que tienen las δ -endotoxinas para matar células tumorales de ratón y ratas, así como de humano y de modular la respuesta inmune ^{64, 71, 72, 74, 92, 94, 96}. Sin embargo a pesar de conocer los efectos de estas proteínas a nivel celular, se desconoce en su mayoría las características fisicoquímicas y su relación estructural y/o funcional con las toxinas insecticidas descritas para otras subespecies.

Tabla 2. Actividad antitumoral y citotóxica de las proteínas purificadas de *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* y var. *israelensis*

ACTIVIDAD ANTITUMORAL	
<i>B.t.t.</i>	<ul style="list-style-type: none"> * La proteína purificada del cristal completo de <i>B.t.t.</i> inhibe el crecimiento del sarcoma ascítico de Yoshida, causa regresión completa de este sarcoma y confiere inmunidad a futuros retos con células tumorales. Reduce la viabilidad de las células tumorales del sarcoma en un 60% (1 mg/kg.)⁷². * Cuando se exponen cultivos de <i>B.t.t.</i> a radiación ultravioleta (250nm 60 mW), se incrementa la actividad antitumoral de la proteína contra carcinoma pulmonar⁹⁶. * La fracción purificada de <i>B.t.t.</i> de 20 kDa (oncotoxina), tiene actividad <i>in vitro</i> hacia células tumorales humanas de diferentes orígenes (linfoide, mieloide, eritroblastoide, hepatoma, carcinoma de mama, de ovario y de riñón)⁷⁴. * La fracción purificada de 25 kDa tiene actividad <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>⁶⁴ * La fracción purificada de 25 kDa, tiene un efecto potenciador cuando se combina con fármacos anticancerígenos como la bleomicina e inhibe en un 50% el crecimiento de células de leucemia murina L-1210⁹²
<i>B.t.i.</i>	<ul style="list-style-type: none"> * La fracción purificada de 25 kDa Tiene actividad antitumoral <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>⁶⁴. * Inhibe en un 50 % el crecimiento de células de leucemia murina L-1210⁹². * La fracción purificada de 25 kDa, tiene un efecto potenciador cuando se combina con fármacos anticancerígenos como la bleomicina⁹².
MECANISMO DE ACCIÓN	
<i>B.t.t.</i>	<ul style="list-style-type: none"> * La oncotoxina interactúa específicamente con receptores de las células del linfoma histiocítico humano (U-937). Hay producción de NF-κB el cual induce al TNF (Factor necrótico tumoral)⁶⁴ * La oncotoxina causa fragmentación en el DNA de las células tumorales^{64,74}. * Se sugiere que el mecanismo molecular de la actividad citotóxica de la oncotoxina sea por apoptosis⁶⁴ * La reacción cruzada de la oncotoxina con otros serotipos de <i>Bacillus thuringiensis</i> , sugiere que el gen que codifica para esta proteína no solo esté presente en <i>B.t.t.</i> sino también en otros serotipos⁶⁴.
<i>B.t.i.</i>	<ul style="list-style-type: none"> * El cristal completo limita la fuente de precursores necesarios para la síntesis de DNA, RNA y proteínas.⁷¹

Hipótesis:

La proteína de 20 kDa de *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* presenta actividad antitumoral *in vivo* en ratones portadores del Linfoma subcutáneo Murino L-5178Y (H-2^d).

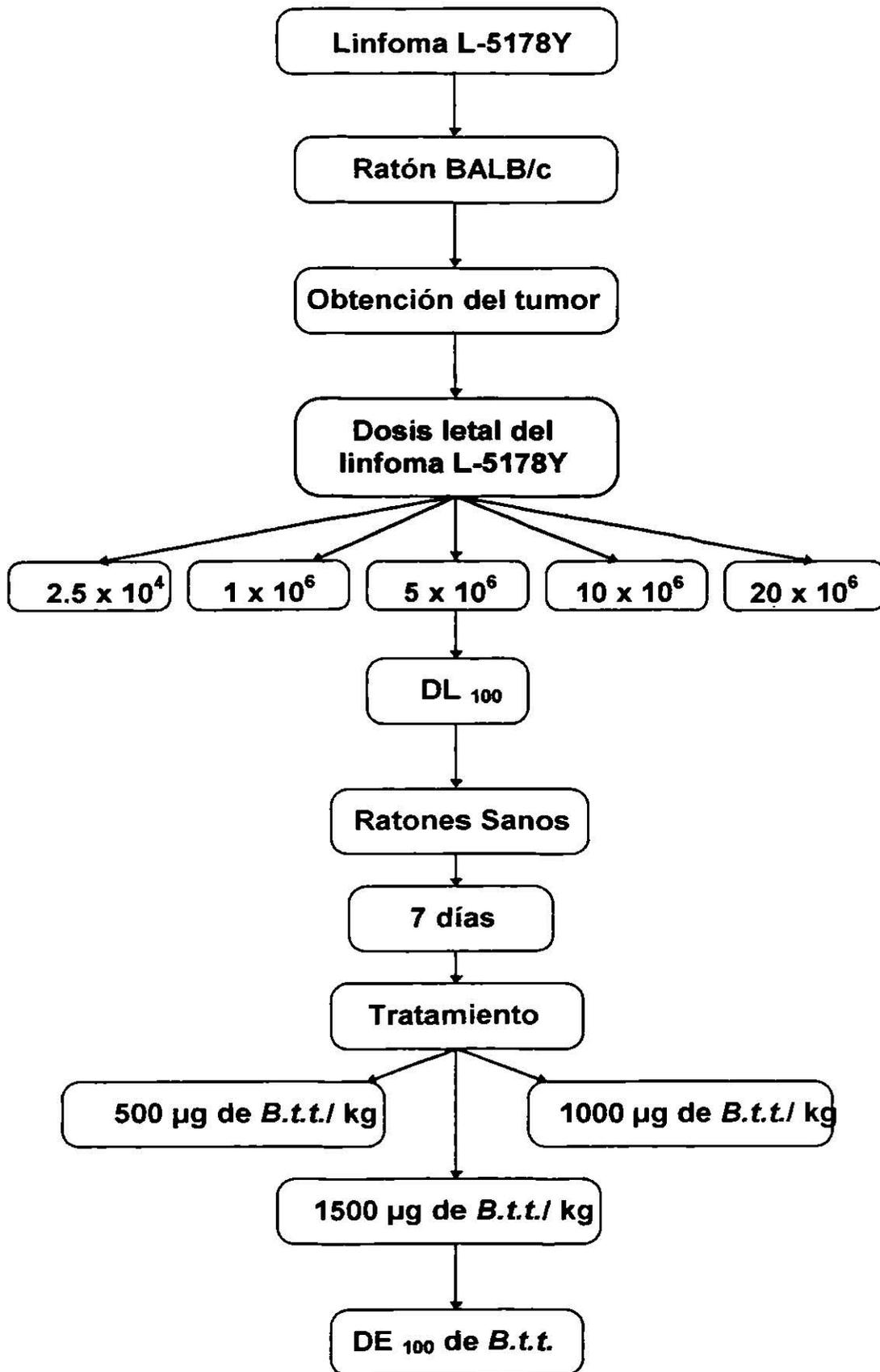
Objetivo General:

Evaluar la capacidad antitumoral de la oncotoxina de *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis*.

Objetivos Particulares:

1. Determinar la DL₁₀₀ para diferentes dosis de la línea celular Leucémica Murina L-5178Y.
2. Determinar la dosis óptima terapéutica de la Oncotoxina de *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis*.

Fig. 4 Diagrama de Flujo



I. Línea Celular Tumoral

La línea tumoral utilizada fue el linfoma murino denominado linfoma murino L-5178Y. Este linfoma, es una leucemia transplantable obtenida de un tumor ascítico inducido con 3-metilcolantreno en ratones hembras DBA/2 (H-2^d), es de origen espontáneo y de estirpe tímica, mantenido en fase ascítica por trasplantes periódicos en ratones BALB/c, proporcionado por el Laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas.

II. Animales de Experimentación

Se usaron ratones de ambos sexos de la cepa BALB/c (H-2^d) de 6-8 semanas de edad, proporcionados por el Bioterio de la Facultad de Ciencias Biológicas de la U. A. N .L., los cuales se alojaron en jaulas colectivas de acrílico con cama directa de aserrín y tapa de acero inoxidable, con alimento y agua de libre acceso.

III. Oncotoxina de *B. t. t.* de 20 kDa.

La proteína utilizada fue proporcionada por el cepario del Laboratorio de Inmunología y virología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la U.A.N.L.

IV. Producción de la Proteína del Cristal de *Bacillus thuringiensis* 01001 var. *thuringiensis*

1. Un cultivo de 24 hr que sirvió como inóculo se sembró en agar nutritivo a pH 7.2 a 7.6, en botellas que tienen una superficie de 22 por 23 cm. y se incubaron a 30 °C. por un período de 72 hr a 96 hr.
2. Después de este tiempo se determinó la presencia de esporas y cristales, así como de células vegetativas, mediante un frotis teñido con cristal violeta y se observó al microscopio óptico .

V. Obtención de los Cristales.

El complejo de esporas y cristales crecidos en el agar nutritivo, se cosechó de la siguiente manera:

3. El cultivo de cada botella se recuperó con 50 ml. de solución de lavado (NaCl 1M).*

Se puede dejar de 24 a 48 hr en esta solución de lavado para que lisen las células vegetativas que aún se encuentren presentes y se libere el cristal.

4. La muestra se lavó 2 veces con 100 ml. de una solución de lavado y se centrifugó a 6,000 r.p.m. /15 min. a 4°C. Tirar sobrenadante.
5. La pastilla se lavó nuevamente, ahora con 100 de una solución de lavado 2 (0.2M de NaCl) y se centrifugó a 6,000 r.p.m. /15 min. a 4°C. Tirar sobrenadante.
6. La pastilla se resuspendió en Tritón X-100 0.01% y se lavó por centrifugación a 6,000 r.p.m. /15 min. a 4°C. Tirar sobrenadante.

El tritón lisa las células vegetativas que pudieran estar presentes aún en la muestra y se libere el cristal.

7. La pastilla se resuspendió en agua destilada estéril pH 7 y se centrifugó a 6,000 r.p.m. /15 min. a 4°C.

Este paso se repitió 2 veces antes de guardar la muestra en refrigeración hasta la purificación de los cristales.

VI. Purificación de los Cristales.

Los cristales fueron purificados en un sistema acuoso bifásico adaptado en el laboratorio de Inmunología y virología de esta Facultad de la siguiente manera:

a) Preparación del Sistema bifásico

9. En un tubo Falcon (Corning) de 50 ml, se agregaron 11.18 gr. de Polietilenglicol 3350 (PG) y 34.1 ml. de solución de fosfatos 1M., se agitó vigorosamente para solubilizar el PG. Se formaron 2 fases.

10. A cada tubo con sistema bifásico se agregaron 5 ml. de la muestra del complejo espora-cristal, se agitó vigorosamente y se centrifugó a 2500 r. p. m. por 3 min.

11. Se formó una interfase blanquecina que contiene los cristales concentrados libres de esporas; se cosechó cuidadosamente esta interfase con una pipeta pasteur. Se hizo un frotis y se tiñó con cristal violeta y observó al microscopio óptico.

Si persiste la presencia de esporas, el proceso se repite las veces que sean necesarias hasta no observar esporas contaminantes en los frotis y confirmar su pureza.

12. Los cristales fueron lavados 2 veces con agua destilada pH7 estéril, y centrifugados a 10,000 r.p.m. por 15 min. a 4°C.

13. Finalmente los cristales fueron concentrados en un volúmen mínimo de agua destilada estéril, liofilizados y congelados a -20 °C hasta su uso^{3, 75}.

VII. Solubilización de los Cristales de *B.t.t*

14. Los cristales purificados en el sistema bifásico se solubilizaron en una solución de NaOH 0.1 M y Glycina 0.02 M. a pH12.

15. Se disuelven de 1 a 4mg/ml de cristales en la solución anterior. La suspensión se agita con una barra magnética por 5 hr.

16. Centrifugar a 10,000 r. p. m. /15 min. a 4°C. El sobrenadante contiene la proteína por lo que se desecha el precipitado.

17. Dializar el sobrenadante contra 80 volúmenes de agua destilada para eliminar las sales de la muestra.

18. Finalmente fueron colectadas en volúmenes de 1ml., liofilizadas y congeladas hasta su uso^{69,75}.

VIII. Obtención de la Proteína de 20kDa en una Columna de DEAE-Sepharosa.

Esta columna es de intercambio iónico que permite la separación de proteína en base a sus cargas eléctricas netas. Las matrices de intercambio iónico deben activarse con HCl o NaOH. La matriz tiene una resolución máxima de 10 gr. de hemoglobina por cada 100 ml de gel, y de 11.4 gr. de albúmina por cada 100 ml de gel.

19. Montar con la matriz, una columna de 6 cm de largo por 1.3 cm de diámetro. Esto da una cama de 7.9 ml, con una resolución máxima de 800 mg de proteína.

20. Pasar por la columna la muestra de proteínas solubilizadas, dejando salir libremente el fluido y desechándolo.

21. Lavar la columna con 10 ml. de Tris Cloro estéril pH8*. Inmediatamente después se pasa por la columna un gradiente lineal de NaCl con las siguientes concentraciones y volúmenes.

Concentración (Moles)	Vol./Columna (ml)
0.05	9
0.10	9
0.15	9
0.20	9

22. Colectar en frascos limpios cada fracción eluída, de cada concentración molar de la solución de NaCl.

23. Dializar en 80 vol. de agua con 3 cambios a 4°C. En membranas independientes cada fracción eluída contra agua destilada para eliminar las sales de NaCl ^{1, 75}

IX. Determinación de la Concentración de la Proteína

Se preparó una línea de regresión utilizando un estándar de BSA de 0.5 mg/ml de concentración inicial. Al mismo tiempo que se prepararon estándares, se prepararon las muestras problema, haciendo diluciones apropiadas de ambos, de tal manera que las lecturas de absorbancia de los problemas estén dentro de las lecturas de los estándares

para poder extrapolar en la línea de regresión, al momento de calcular la concentración de proteína desconocida para los problemas.

56

Determinación cuantitativa de las proteínas por el método de Lowry
Línea de regresión con un estándar de BSA de 0.5 mg/ml.*

Tubo	Estándar (ml)	H ₂ O (ml)	NaOH 1N (ml)	Concentración (mg/ml)
1	-	0.5	0.5	-
2	0.1	0.4	0.5	0.05
3	0.2	0.3	0.5	0.10
4	0.3	0.2	0.5	0.15
5	0.4	0.1	0.5	0.20
6	0.5	-	0.5	2.5
Problema 0.5 ml. dilución apropiada				?

*Tomado de Actividad adyuvante de los cristales y las proteínas de *Bacillus thuringiensis* GM-1 var. *aisawai*, efecto sobre la respuesta inmune humoral y celular. ; Roman-Calderon ⁽⁷⁵⁾.

24.Preparar el reactivo A* Na₂CO₃ al 5%.

25.Preparar el reactivo B*

a).- Preparar una solución de Tartrato al 1%

b).- Colocar 0.5gr de CuSO₄. 5 H₂O aforado a 100 ml con la solución de Tartrato de Na y K al 1%.

26.Preparar el reactivo C* (a 50 ml del reactivo A, agregar 2 ml del Reactivo B).

27.Reactivo D (Folin Ciocalteu 1N, dilución 1:2).

28.Colocar 0.5 ml de la muestra y agregue 0.5 ml de NaOH. Calentar todos los tubos a ebullición por 5 min. y dejar enfriar a temperatura ambiente.

29.Agregue 2.5 ml del reactivo C, agitar rápidamente y se deja reposar por 10 min.

30. Añadir 0.5 ml. del reactivo D. se agita rápidamente y dejar reposar por 30 min.

31. Un Blanco conteniendo 0.5 ml de agua destilada en vez de la muestra y una serie de soluciones de proteína estándar, son tratados de la misma forma incluyendo la etapa de calentamiento.

32. Después de reposar 30 min. para permitir que se desarrolle por completo el color medir la densidad óptica a 750 nm. en un espectrofotómetro Beckman DU 650. Todos los tubos se preparan por duplicado.

33. Trazar una curva estándar con la densidad óptica contra los mg de la proteína estándar y se use esta para leer las concentraciones de las muestras.

X. Transplante Y Mantenimiento Del Linfoma L-5178Y

1. Extraer el líquido de ascitis de la cavidad peritoneal de ratones Balb/c, sacrificados por dislocación cervical, 13 días después de haber sido inoculados con células del linfoma L-5178Y.

2. Colectar el líquido en un tubo cónico estéril con tapón de rosca (50 ml), conteniendo 10 ml de PBS a pH 7.2 (mantener en frío durante la colección del líquido peritoneal).

3. Lavar las células por centrifugación a 2000 r.p.m. por 10 min.

4. Tirar el sobrenadante y resuspender nuevamente en 10 ml de PBS.

5. Hacer una dilución de la muestra.

6. Realizar una cuenta celular y cuenta viable con Azul tripan (Sigma Chemical Co. #T8154) (Dil. 1:2).

7. Ajustar el volumen a 5×10^6 células/ml.

8. Inocular 0.2ml del volumen ajustado intraperitonealmente en ratones BALB /c de 6-8 semanas.

XI. Determinación de la Mortalidad de Ratones BALB/c Inoculados a Diferentes Dosis con Células del Linfoma L- 5178Y.

1. Se evaluó el porcentaje de Mortalidad del Linfoma a los 30-40 días. Para tal efecto se utilizaron las siguientes dosis :

- * 2×10^4 Células/ratón
- * 1×10^6 Células/ratón
- * 2.5×10^6 Células/ratón
- * 5×10^6 Células/ratón
- * 10×10^6 Células/ratón
- * 20×10^6 Células/ratón

2. Cada dosis se inoculó en grupos (lotes) de 10 ratones, todos se realizaron por Triplicado. La inoculación fue hecha sobre la extremidad posterior derecha iniciando por la concentración mayor.

XII. Determinación de la Dosis Óptima de Regresión de la Oncotoxina de B.t.t.

1. Evaluamos el Efecto de la Oncotoxina de B.t.t. sobre el Linfoma L-5178Y, para ello utilizamos las siguientes dosis :

- * 500µg por Kg de peso
- * 1000µg por Kg de peso
- * 1500µg por Kg de peso
- * Control (+) Sin tratamiento
- * Control (-) Con albúmina (1500µg por Kg de peso)

2. En grupos de 5 ratones por dosis, se administró vía intratumoral, una dosis única, en un volumen de 0.2 ml. a los 7 días después de haber sido inoculado el linfoma. Posteriormente se monitoreó el efecto de la oncotoxina, evaluamos el incremento del peso y del volumen de la masa tumoral, y la sobrevivencia de los grupos tratados en un periodo de 30-40 días.

Nota :La actividad del tumor fue evaluado por la diferencia de peso comparado con el control. El peso del tumor fue estimado por la medición calibrada del largo (A) y del ancho (B) del tumor usando la siguiente fórmula.

$$\text{Peso (mg)} = A \text{ (mm)} \times B^2 \text{ (mm)} / 2$$

Y el volumen tumoral fue calculado mediante la relación.

$$V = \frac{4 \pi (R1 + R2)^3}{3 \cdot 2}$$

Los datos fueron analizados por Anova

3. La evaluación de la actividad antitumoral se realizó en términos del incremento del porcentaje, comparado con el control^{58, 93}.

RESULTADOS

I. Determinación de la Dosis Letal al 100% del Linfoma Subcutáneo Murino en Ratones BALB/c

Con la finalidad de establecer un modelo experimental de Cáncer, se empleó el linfoma murino L-5178Y. Este linfoma, es una leucemia transplantable obtenida de un tumor ascítico inducido con 3-metilcolantreno en ratones hembras DBA/2 (H-2^d), es de origen espontáneo y de estirpe tímica, mantenido en fase ascítica por trasplante en ratones BALB/c.

Para tener parámetros medibles del desarrollo del tumor, se inocularon de manera subcutánea, sobre la extremidad posterior derecha, diferentes dosis de células del linfoma L-5178Y, necesarias para causar la muerte en un 100% de la población, en un tiempo estimado de 30 días. Para tal efecto, medimos la mortalidad en los grupos de ratones (10 ratones por grupo), inoculados a 2×10^4 , 1×10^6 , 2.5×10^6 , 5×10^6 , 10×10^6 , 20×10^6 , células del linfoma. Estos experimentos fueron realizados por triplicado, los resultados que se obtuvieron fueron 0,10,25,25,55,100% de mortalidad respectivamente, a los 30 días después de la inoculación del tumor (Fig.5). Con la dosis de 20×10^6 células se obtuvo el 100% de mortalidad, con ésta dosis se forma un tumor con crecimiento progresivo que finalmente se disemina a otros tejidos causando la muerte de los ratones entre los 30-40 días.

Observamos también el aspecto físico de estos ratones; todos ellos presentaron pérdida de apetito, abultamiento abdominal, diarrea sanguinolenta, pelo erizado, volumen tumoral medible y bien definido, en la zona de inoculación y subsecuentemente parálisis de ambas extremidades posteriores. Por lo que utilizamos, esta dosis para ver el efecto de la oncotoxina de 20 kDa de *B.t.t.* sobre el linfoma.

II. Actividad Antitumoral de la oncotoxina de 20kDa.

Utilizamos diferentes dosis (500µg, 1000µg y 1500µg por Kg. de peso) de la proteína de 20 kDa de *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis*. Con ellas se inocularon intratumoralmente tres grupos de ratones (5 ratones por grupo), 7 días después de la inducción del tumor.

Observamos que con las tres dosis utilizadas hay una supervivencia del 100% en los tres grupos tratados, y que la eliminación total del tumor se realizó en un término de 30 días en todos ellos. Esto se reflejó en el crecimiento del tumor, que con las dosis de 500, 1000 y 1500, el tumor se desarrolla hasta alcanzar un volumen aproximado de 7.5, 10.5 y 5 cm³ y un peso tumoral de 2.0, 3.3 y 1.2mg respectivamente a los 15 días de la inoculación del tumor. Posteriormente observamos una visible regresión del tumor hasta su desaparición a los días 27, 29 y 31 (1500, 1000 y 500) (Fig. 6)

Los ratones se dejaron un año más, después de haberse tratado con la oncotoxina, no encontrando crecimiento alguno del tumor.

Corrimos grupos controles por triplicado, control + (tumor) y control - (tumor y tratados con albúmina), en ambos casos se comportaron de manera muy similar; se desarrolló el tumor hasta alcanzar un volumen de 34 y 24cm³ y con un peso tumoral de 10.2 y 9.1mg respectivamente a los 15 días. (Fig. 6 - 8).

Durante la fase terminal del linfoma en estos grupos, no fue posible determinar el volumen, ya que en esta etapa, son completamente invadidos y se pierde la delimitación del tumor, por lo tanto no son medibles, sin embargo continuamos monitoreándolos hasta su muerte a los 30-40 días. (Fig. 10)

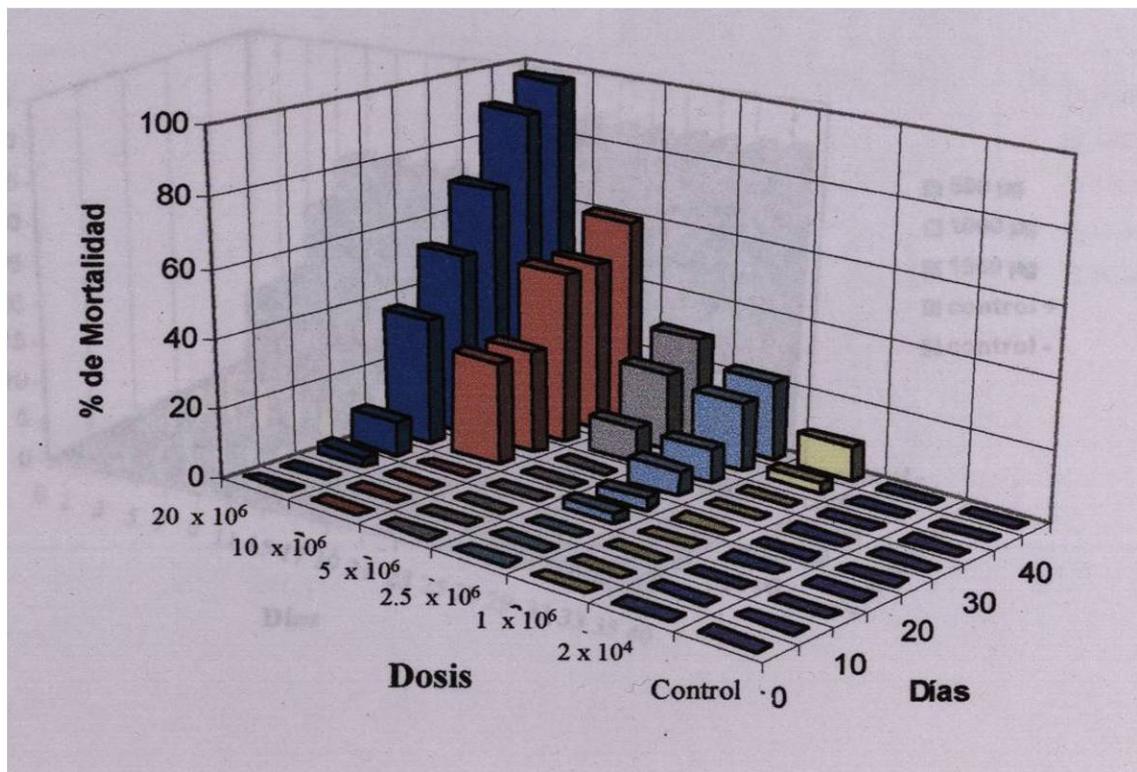


Fig. 5 Gráfica de mortalidad de grupos en ratones BALB/c de ambos sexos inoculados con el linfoma murino L-5178Y a diferentes dosis. 2×10^4 ; 1×10^6 ; 2.5×10^6 ; 5×10^6 ; 10×10^6 ; 20×10^6 ; control.

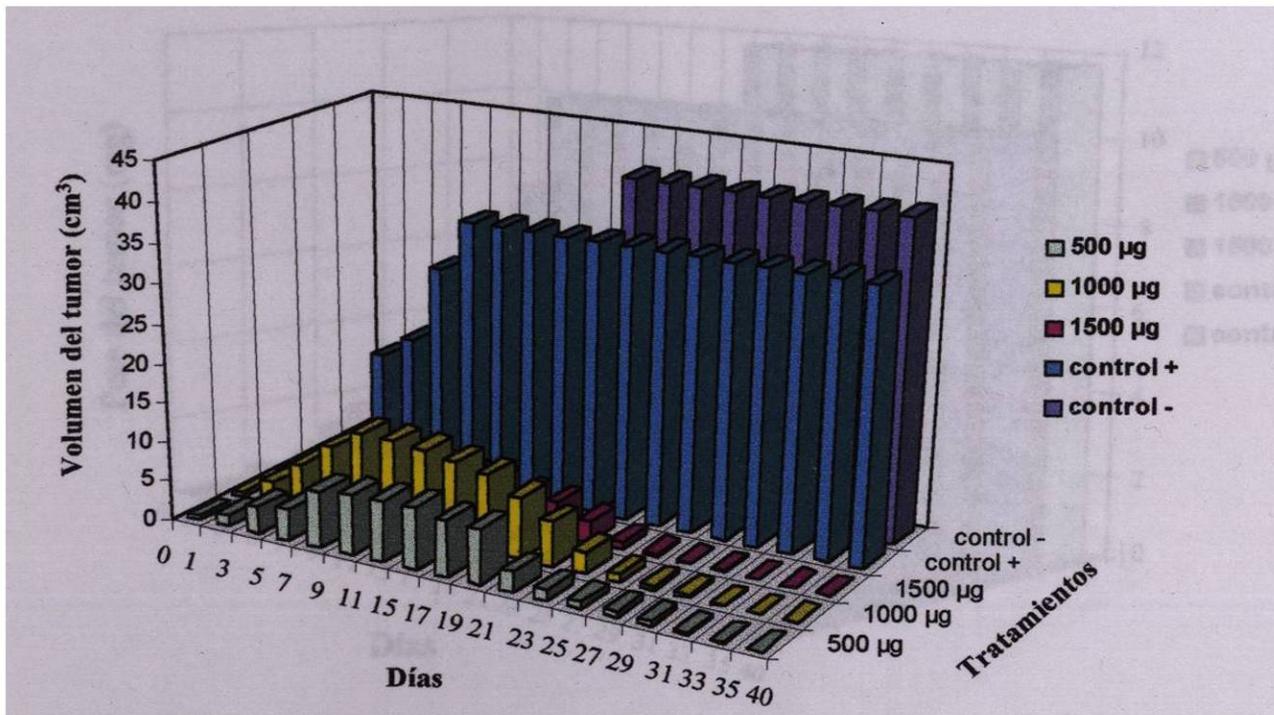


Fig. 6 Efecto de la oncotoxina de 20 kDa de *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis*, sobre el volumen (cm^3) del linfoma murino L-5178Y, administrada como dosis única vía intratumoral en diferentes tratamientos (500, 1000, y 1500µg/kg de peso), 7 días después de la inoculación subcutánea de 20×10^6 células tumorales. El control (+), célula tumorales, sin tratamiento y Control(-) células tumorales + albúmina.

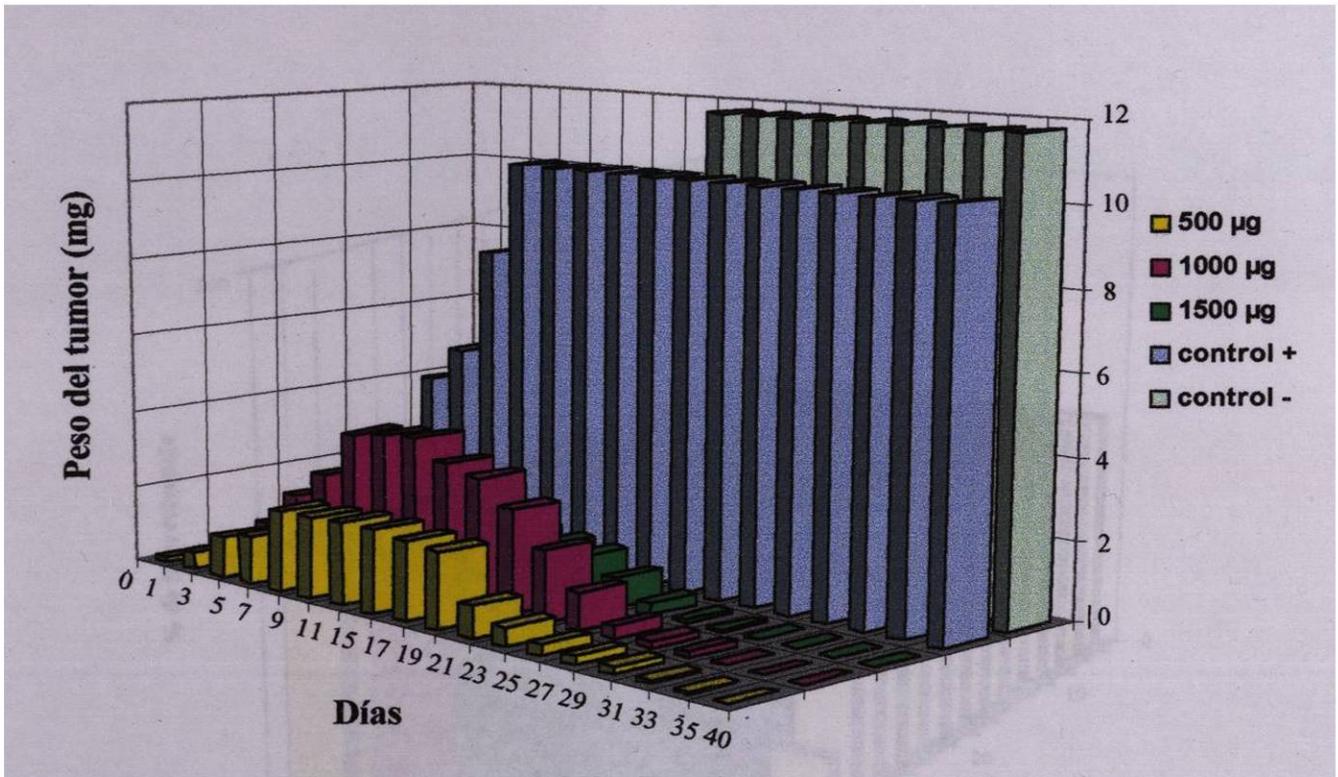


Fig. 7 Efecto de la oncotoxina de 20 kDa de *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis*, sobre el peso tumoral (gr) del Linfoma murino L-5178Y, administrada como dosis única vía intratumoral en diferentes tratamientos (500, 1000, y 1500µg/kg de peso), 7 días después de la inoculación subcutánea de 20×10^6 células tumorales. El control (+), célula tumorales, sin tratamiento y control (-) células tumorales + albúmina.

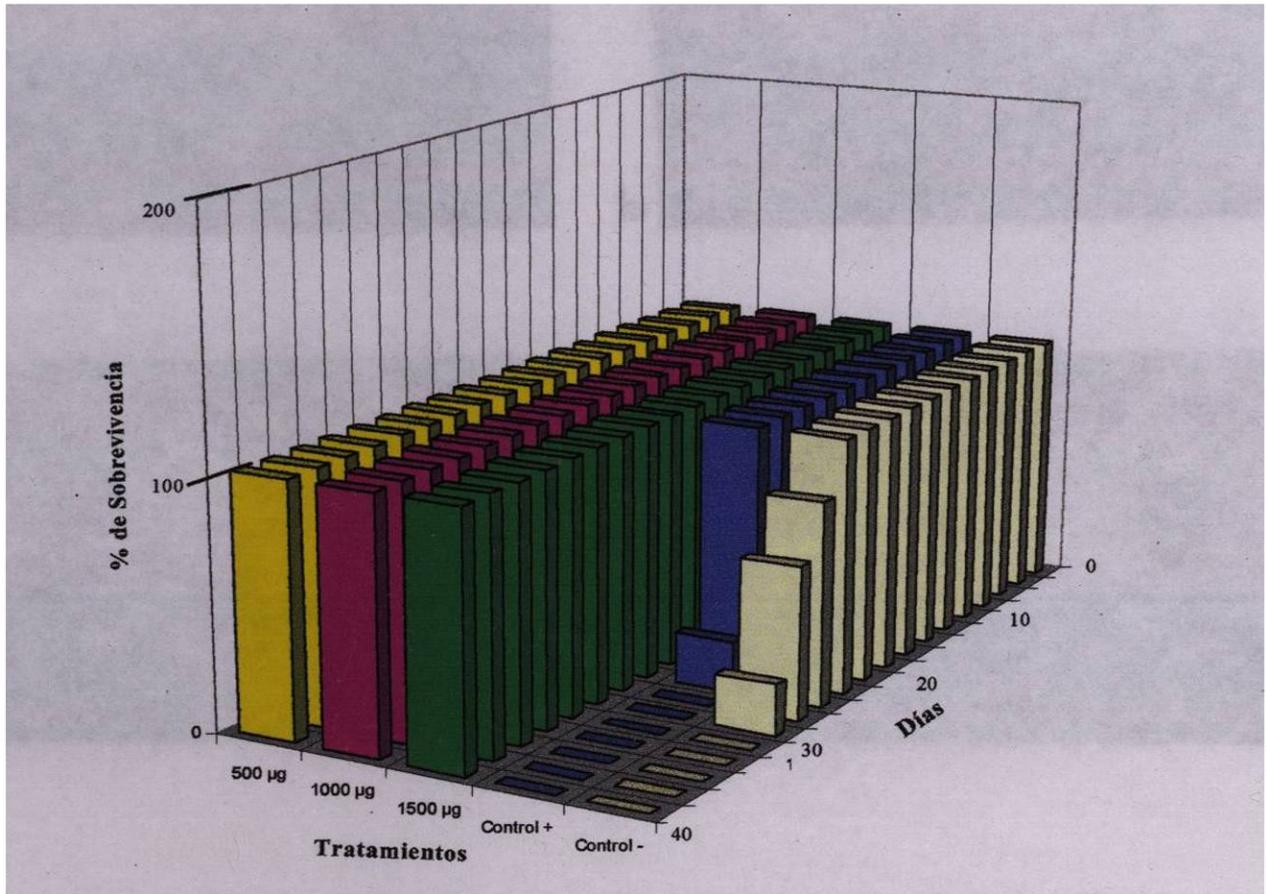


Fig. 8 Efecto de la oncotoxina de *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis*, en la supervivencia de grupos inoculados con diferentes tratamientos (500,1000 y 1500 µg/ kg de peso), como dosis única vía intratumoral, 7 días después de la inoculación subcutánea de 20×10^6 células del linfoma murino L- 5178Y. Control (+), células tumorales sin tratamiento y control (-) células tumorales + albúmina.

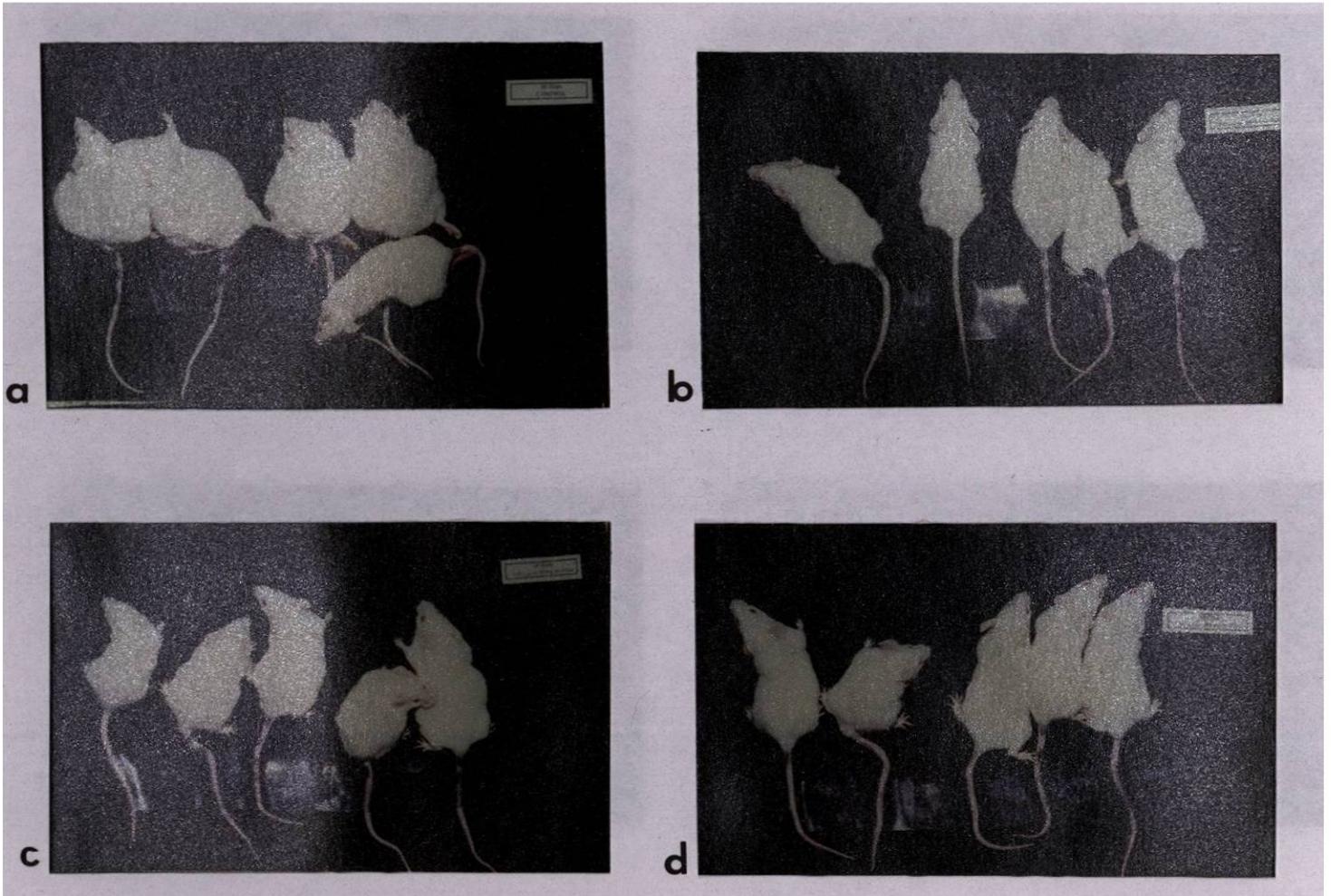


Fig.9 Efecto de la oncotoxina de 20kDa, sobre ratones BALB/c portadores del linfoma L-5178Y, administrada como dosis única vía intratumoral a). Vista superior del grupo de ratones sin tratamiento (Control); b), c), y d) vista superior de ratones tratados con las dosis de 500, 1000 y 1500µg/kg de peso. 30 días después de la administración del tratamiento.

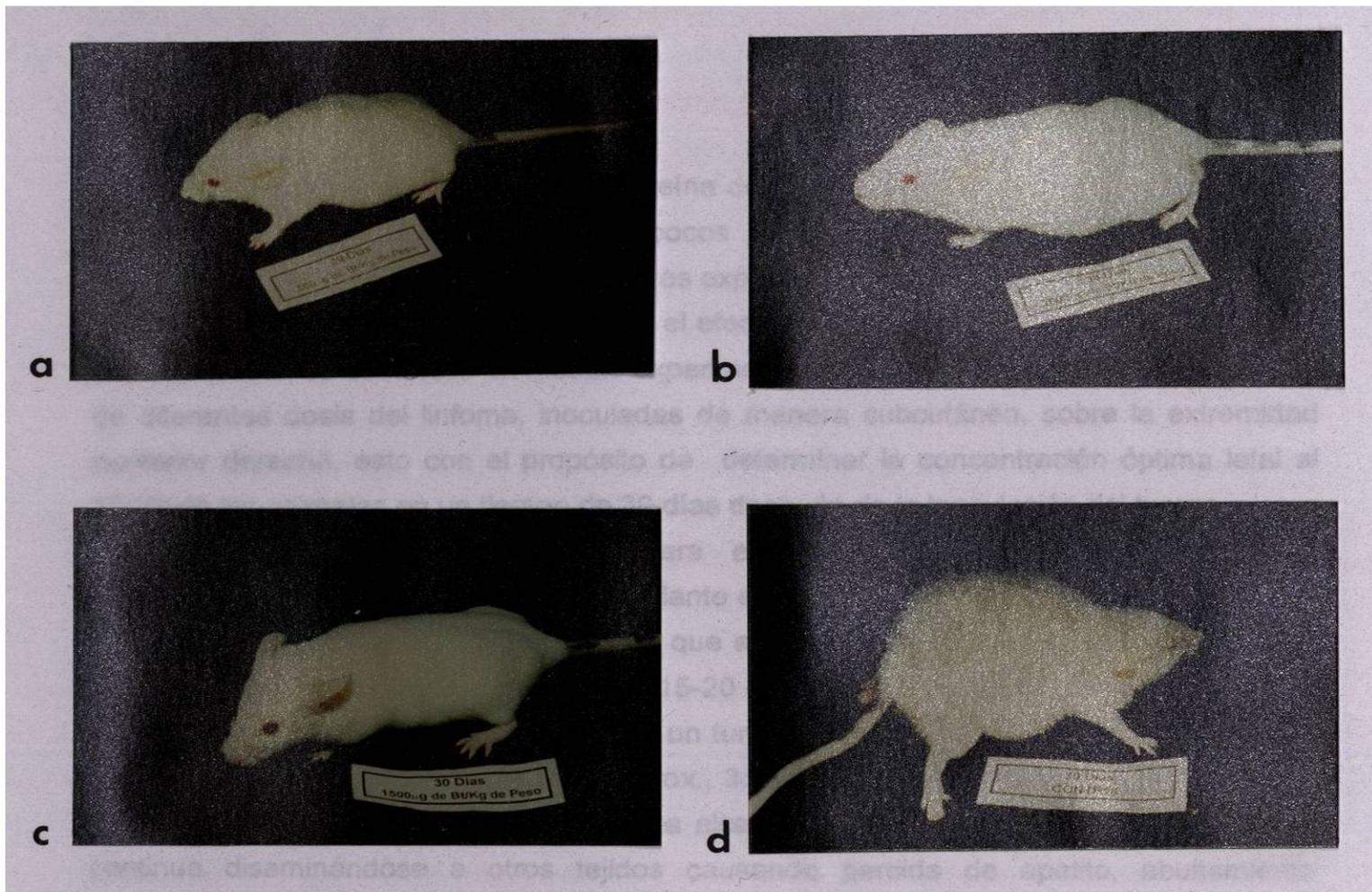


Fig. 10 Efecto de la oncotoxina de 20kDa, sobre ratones BALB/c portadores del linfoma L-5178Y, administrada como dosis única vía intratumoral. Acercamiento de ejemplares representativos de los grupos a) y b), vista superior de ratones tratados con las dosis de 500, 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$; c) vista lateral de ratones tratados con las dosis de 1500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso y d) Vista lateral de un ratón sin tratamiento (Control). 30 días después de la administración de la oncotoxina

DISCUSION

La actividad antitumoral de la proteína de 20kDa de *B.t.f.* en la actualidad, es una línea de investigación muy reciente, pocos han sido los estudios realizados para determinar su papel terapéutico en cánceres experimentales.

En el presente trabajo se estudió el efecto antitumoral *in vivo* de esta oncotoxina. Para tal efecto, se desarrolló un modelo experimental, el cual se estableció por la inyección de diferentes dosis del linfoma, inoculadas de manera subcutánea, sobre la extremidad posterior derecha, esto con el propósito de determinar la concentración óptima letal al 100% de los animales en un tiempo de 30 días después de la inoculación del tumor.

La línea tumoral que utilizamos para el modelo experimental, es una leucemia mantenida en fase ascítica por trasplante en ratones BALB/c con una dosis de 5×10^6 células. Existen reportes que indican que a esta dosis, inoculada vía intraperitoneal, causa la muerte de los ratones entre los 15-20 días¹⁸. Nosotros hemos observado que con la dosis de 20×10^6 células se forma un tumor sólido, bien delimitado y medible, que inicia teniendo un volumen de 0.5cm^3 aprox., 3 días después de haber sido inoculado; el tumor se desarrolla progresivamente hasta alcanzar un volumen de 30cm^3 aprox., que continua diseminándose a otros tejidos causando pérdida de apetito, abultamiento abdominal, diarrea sanguinolenta, pelo erizado, pérdida de la función de las extremidades posteriores y finalmente la muerte de los ratones. Por todo lo anterior hemos visto que esta dosis, es un buen modelo experimental, por su formación tumoral sólida y bien definida que nos permite observar claramente el efecto de la oncotoxina sobre el linfoma.

La oncotoxina administrada a diferentes dosis (500, 1000 y $1500\mu\text{g/Kg}$), intratumoralmente como dosis única, tiene un efecto antitumoral y permite la regresión total del tumor y la sobrevivencia de los ratones en un 100 % en todos los grupos portadores del linfoma, en un termino de 30 días.

En los primeros días, después de la inoculación del tumor, todos los grupos presentan volúmenes y pesos cercanos entre sí. Días posteriores a la fecha en que se administran los tratamientos (500, 1000 y $1500\mu\text{g/Kg}$), se observa un ligero incremento, que se ve reflejado en el peso del tumor (1.98, 3.21, 1.22 gr.) y en su volumen ($7.03, 9.76, 5.00\text{cm}^3$) respectivamente. Sin embargo los grupos controles presentan incrementos

marcados en sus pesos y volúmenes. Entre los días 9 al 19, todos los grupos tratados, entran en una fase estacionaria. Nosotros pudimos observar, que al inicio de esta fase, el tumor crece, sobre la extremidad posterior derecha, inmovilizándola casi completamente, posteriormente hay una disminución gradual en los tres grupos, hasta su completa desaparición en los días 31, 29 y 25, respectivamente. A diferencia de los grupos controles donde el tumor continúa desarrollándose hasta invadir completamente a los animales y causarles la muerte.

Las tres dosis utilizadas tienen el mismo efecto sobre el linfoma, ya que causan su regresión completa. Sin embargo, hemos observado que el grupo tratado con la dosis de 1500 μ g/Kg no permite el desarrollo del tumor, esto se ve reflejado en su volumen que se mantiene al rededor de 5.0 cm³ desde ahí disminuye hasta su eliminación total, a diferencia de las dosis de 500 y 1000 μ g/Kg que alcanzan un volumen de 7.03, 9.76 cm³ respectivamente. (Figs. 5, 6) Esto indica que la regresión del tumor es dependiente de dosis. En un estudio anterior al nuestro donde Rodríguez-Padilla⁷⁴ probó *in vitro* diferentes concentraciones de la oncotoxina (10-100 μ g/kg) sobre líneas celulares de diversos orígenes, ella observó que la actividad citotóxica es dependiente de dosis, con nuestros resultados confirmamos lo antes mencionado.

Poco se conoce del mecanismo de acción de la proteína de 20 kDa, sobre células tumorales. Yokoyama y col.⁹³ han mencionado que algunas drogas (bleomicina) incrementan su actividad tumoricida con la δ -endotoxina de 25kDa de *B.t.i.*, además induce la fragmentación del DNA. Rodríguez Padilla,⁷⁴ también reporta que la oncotoxina de 20kDa de *B.t.t.* induce fragmentación del DNA, *in vitro*. Estudios recientes realizados por Mendoza Gamboa⁶⁴, ha mencionado que la proteína de 20kDa de *B.t.t.*, interactúa específicamente con receptores celulares del linfoma histiocítico humano, además sugiere que el Mecanismo de Acción de la oncotoxina es por apoptosis, y que hay una producción de NF-kB que induce el TNF (Factor necrótico tumoral)⁶⁴. Esto podría explicar la visible regresión del tumor y la no recurrencia del mismo.

CONCLUSIONES

- La DL₁₀₀ para el linfoma subcutáneo murino L-5178Y, es de 20×10^6 células
- La oncotoxina de *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis*, tiene actividad antitumoral *in vivo* sobre el linfoma murino L-5178Y.
- La proteína de 20kDa de *B.t.t.* administrada como dosis única e intratumoralmente, causa una regresión completa del linfoma en un término de 30 días y su nula recurrencia hasta un año después.
- Las tres dosis de la oncotoxina utilizadas (500, 1000 y 1500 $\mu\text{g}/\text{kg}.$), presentan el mismo efecto sobre el linfoma, a diferentes tiempos.
- La actividad antitumoral de la proteína de 20 kDa es dependiente de dosis.

PERSPECTIVAS

- **Determinar la expresión de citoquinas Th1 y Th2 en el tejido tumoral de animales tratados con la dosis de 1500 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ de peso de la oncotoxina por RT-PCR.**
- **Analizar la respuesta inmune celular por histopatología.**
- **Estudiar, por citometría de flujo, si el mecanismo de muerte celular ocasionada por la oncotoxina en el linfoma L-5178Y, es mediante apoptosis.**

BIBLIOGRAFIA

1. Aggarwal, B.B. and Khon, W. J. 1985. Human Tumor Necrosis Factor. Methods of enzymology: Immunochemical techniques (G. DiSabato, eds), Academy Pres., New York, N. Y. J. Biol. Chem. 116: 448-456
2. Aggarwal, B.B., Henzel W. J., Moffat, B., Khor, W. J. and Harkins, R. N. 1985b. Primary structure of human lymphotoxin derived from 1788 lymphoblastoid cell line. The J. Biol. Chem. 260: 2334-2344.
3. Ang, B.J. and Nickerson, K. W. 1978. Purification of the protein crystal from *Bacillus thuringiensis* by zonal gradient centrifugation. Appl. Environ. Microbiol. 35:625-626.
4. Angus, T. A. 1954. A Bacterial toxin paralysing silkworm larvae. Nature. 173:345-346.
5. Arevalo Niño, Katiushka 1996. Toxinas de *Bacillus thuringiensis*. Avances Recientes en la Biotecnología en *Bacillus thuringiensis*. Editores :L.J. Galán-Wong, C. Rodríguez Padilla, H. A. Luna-Olvera, Universidad Autónoma de Nuevo León. 1a. De. México.pp. 210-218
6. Aronson, A. I. , W. Beckman and P. Dunn. 1986. *Bacillus thuringiensis* and related insect pathogens. Microbiol. Rev. 50: 1-4.
7. Bone, L. W. and Bottjer, K. P. 1988. Factors affecting the larvicidal activity of *Bacillus thuringiensis israelensis* toxin for *Trichostrongylus colubriformis* (nematoda). J. Invertebr. Pathol. 52:102-107.
8. Bone, L. W. 1989. Activity of commercial *Bacillus thuringiensis* preparations against *Trichostrongylus colubriformis* and *Nippostrongylus brasiliensis*. J. Invertebr. Pathol. 53: 276-277
9. Bottjer, K. P. and Bone, L. W. 1987. Changes in morphology of *Trichostrongylus colubriformis* eggs and juveniles caused by *Bacillus thuringiensis israelensis*. Journal of Nematology. 19: 282-286.
10. Byung-Sik Shin, Seung-Hwan Park, Soo-Keun Choi, Bon-Tag Koo, Sung-Taik Lee and Jeong-il Kim. 1995. Distribution of cry V-type insecticidal protein genes in *Bacillus thuringiensis* and cloning of cry V-Type genes from *Bacillus thuringiensis* subsp. *Kurstaki* and *Bacillus thuringiensis* subs. *entomocidus*. App. Environ. Microbiol. 61 :2402-2407.
11. Cauch, T.L. and Ross, D. A. 1980. Production and utilization of *Bacillus thuringiensis*, Biotechnology and Bioengineering. 22:1297-1304.
12. Convents D., M. Cherlet, J. Van Damme, Y. Lasters and M. Lauwereys. 1991. Two structural domains as a general fold of the toxic fragment of the *Bacillus thuringiensis* d-endotoxin. Eur. J. Biochem. 195:631-635.
13. Chestukhina, G. G. Kostina, L. I. Mikhailiva. A. L., Tyruin, S. A., Klepikova. F. S. and Stepanov, V. M. 1982. The main features of *Bacillus thuringiensis* d-endotoxin molecular structure. Archives of Microbiology. 132:159-162.

14. Choma, C. T. and Kaplan, H. 1990. Folding and unfolding of the protoxin from *Bacillus thuringiensis*: Evidence that the toxic moiety is present in an active conformation. *Biochemistry*. 29:10971-10977.
15. Choma, C. T., W. K., Surewicz, P. R. Carey, M. Pozsgay and H. Kaplan. 1990. Secondary structure of the entomocidal toxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-73. *J. Protein. Chem.* 9:87-94.
16. Crickmore, Neil. Lecturer in Molecular genetics [http://epunix.biols.susx.ac.uk/Home/ Neil.Crickmore/](http://epunix.biols.susx.ac.uk/Home/Neil.Crickmore/)
17. Crickmore, N. , D.R. Zeigler, J. Feiltelson, E. Schinepf , J. Van Rie, D. Leereclus, J. Baum, and D. H. Dean, Revision of the Nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* Pesticidal Crystal Proteins. *Microbiology And Molecular Biology Reviews*. Sept. 1998 P. 807-813
18. Daneri Navarro, A., Del Toro Arreola, A., García Velasco J. C., Fafutis Morris M., Islas Rodríguez A. E. Sinergismo Antitumoral de Linfocinas y Dosis única de Ciclofosfamida en Ratones con Linfoma Murino. *Cancerología Vol. 36 No.2 1990 p. 1039-1044.*
19. De Barjac, H. and Bonnefoi, A. 1962. Essai de classification biochemique et serologique de 24 souches de *Bacillus thuringiensis*. *Entomophaga*. 7:5-31.
20. De Barjac, H. and Bonnefoi, A. 1968. A classification of strains of *Bacillus thuringiensis* with a key their differentiation. *J. Invertebr. Pathol.* 11:335-347.
21. De Barjac, H. and E. Frachon. 1990. Classification of *Bacillus thuringiensis* strains. *Entomophaga*. 35:233-240.
22. De Barjac, H. 1994. International Entomopathogenic *Bacillus* Centre. Collection of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus sphaericus* (classified by H. serotypes). Catalogue No.1 Unite des Bacteries Entomopathogenes. Institut Pasteur, Paris, France
23. Delafield, F. P., H. J. Sommerville and S. C. Ritterberg. 1968. Immunological homology between crystal and spore protein of *Bacillus thuringiensis*. *J. of Bacteriol.* 96:713-720.
24. Dixon, B. 1994. Keeping an eye on *Bacillus thuringiensis*. *Bio/Technology*. 12:435.
25. Donovan, W. P., Danzkocsik, C y M. P. Gilbert . 1988. Molecular characterization of a gene encoding a 72-kilodalton mosquito-toxic Crystal protein from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *J. Bacteriol.* 170(10): 4732-4738
26. Dulmage, H.T. and H. De Barjac. 1973. HD-187, A New Isolate of *Bacillus thuringiensis* that produce high yields of d-endotoxin. *J. Invertebr. Pathol.* 22:273-277.
27. Dulmage, H. T. and Aizawa, K. 1982. Distribution of *Bacillus thuringiensis* in nature. *Microbial and viral pesticides*. Edouard kurstaki De. Marcel Dekker, Inc. New York, N. Y. 4:209-237.

28. Ellar DJ. Summary of research programs. 1982-1997. www.bio.cam.ac.uk/dept/biochem/UTOs/Ellar.html.
29. Fast PG ; Murphy DW ; Sohi SS. 1978 *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin :evidence that toxin acts at the surface of susceptible cells. 34(6) :762-763
30. Faust, R. M. and A. Lee. Jr. Bulla. 1982. Bacterial and their as insecticides in microbial and viral pesticides. De Edouard Kurstaki. Marcel Dekker, Inc. New York, N. Y , p.p. 75-206
31. Feitelson, J., S., J. Payne and L. Kim. 1992. *Bacillus thuringiensis*: Insects and beyond. *Bio/Technology*. 10:271-275.
32. Galan-Wong, L.J. y col. 1992. Caracterización bioquímica parcial de la d-endotoxina GM-2, una nueva subespecie de *Bacillus thuringiensis* (n.subsp. *coahuilensis*), Publicaciones Biológicas, F. C. B., U.A.N.L., Monterrey, N.L., México. 6:118-123.
33. Ge, A. Z., N. I. Shivarova and D. H. Dean. 1989. Location of the *Bombyx mori* specificity domain on a *Bacillus thuringiensis* d-endotoxin protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 86: 4037-4041.
34. Gómez Flores, Ricardo ; Cristina Rodríguez Padilla, Reeta T. Mehta, Luis Galán Wong, Edgar Mendoza Gamboa, and Reyes Tamez Guerra. 1997. Nitric Oxide and TNF- α Production by Murine peritoneal Macrophages Activated with a Novel 20-kDa Protein Isolated from *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* Paraesporal Bodies. *The Journal of Immunology*. 158 :3796-3799.
35. Green, M., Heumann, M., Sokolow, R., Foster, L. R. Bryant, R. and Skeels. M. 1990. Public health implications of the microbial pesticide *Bacillus thuringiensis*: An epidemiological study, Oregon, 1985-86. *American Journal of Public Health*. 80:848-852.
36. Haider, M. Z., B. H. Knowles and D. J., Ellar. 1986. Specificity of *Bacillus thuringiensis* var. *colmeri* insecticidal d-endotoxin is determined by differential processing of the protoxin by larval gut proteases. *Eur. J. Biochem*. 156:531-540.
37. Haider, M. Z., and D. J., Ellar. 1989. Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal delta-endotoxin : Interaction with phospholipid vesicles. 978(2) :216-222
38. Haider, M.Z. and S. Mahmood. 1990. *Bacillus thuringiensis* insecticidal d-endotoxin: Diversity of crystal proteins and its relatedness to the toxicity spectrum. *J. Basic. Microbiol.* 30 (4):251-258.
39. Hannay, C.L. 1953. Crystalline inclusions in aerobic spore-forming bacteria. *Nature*. 127:1004.

40. Hannay, C. L. and Fitz-James, P. 1955. The protein crystals of *Bacillus thuringiensis*. Canadian Journal of Microbiology. 1:694-710.
41. Heimpel, A. M. and Angus, T. A., 1966. A taxonomic key proposed for the species of the "crystalliferous bacteria". J. Invertebr. Pathol. 9:364-375
42. Herrstadt, C., T.E. Gilroy, D. A. Sovieski, B. D. Bennert and F. J., Gaerther. 1987. Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of a coleopteran-active delta-endotoxin gene from *Bacillus thuringiensis* subsp. *san diego*. Gene 57:37-468.
43. Hofmann, C. H., H Vanderbruggen, H. Hofte, J. Van Rie, S. Jansens and H. Van Mellaert. 1988. Specificity of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin is correlated with the presence of high-affinity binding sites in the brush border membrane of target insect midguts. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 85:7844-7848.
44. Höfte, H., de Greve, H., Seurimck, J., Jansens, J., Mahillon, J., Ampe, C., Vandkerkhove, J., Vanderbruggen, H., Van Montagu, M., Zabeau, M. Vaeck. 1986. Structural and functional analysis of a cloned delta-endotoxin of *Bacillus thuringiensis* berliner 1715. Eur. J. Biochem. 161:273-280.
45. Höfte, H., J. Van Rie, S. Jansens, A. Van Houtven, H. Vanderbruggen and M. Vaeck. 1988. Monoclonal antibody analysis and insecticidal spectrum of three types of lepidopteran-specific insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. Appl. Environ. Microbiol. 54:2010-2017.
46. Höfte, H. and Whiteley, 1989. Insecticidal Crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. Microbiol. Rev. 53(2):242-255.
47. Huber Hans E. and Peter Luthy. 1981. *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin: Composition and activation. Pathogenesis invertebrate Diseases. pp.212-234.
48. Jaquet, F., R. Huter and P. Luthy. 1987. Specificity of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin. Appl. Environ. Microbiol. 53:500-504
49. Knowles, B. H. and D. J. Ellar. 1987. Colloid-osmotic lysis is a general feature of the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin with different insect specificity. Biochem. Biophys. Acta. 924:509-518.
50. Krywienczyk, J. Dulmage, H. T. and Fast, P. G. 1978. Occurrence of two serologically distinct groups within *Bacillus thuringiensis* serotype 3ab var. *kurstaki*. J. Invertebr. Pathol. 31:372-375.
51. Lecadet, M.M. 1970. Microbial toxins Vol. II by T. C. Montie and S. Kadis, Academy Press Inc. New York, N. Y. p.p.434-471.
52. Lecadet, M.M., Cosmao Dumanoir, V., Frachon, E. and Ripouteau, H. 1994. Catalogue of Strain No.1. International Entomopathogenic Bacillus Centre. WHO Collaborating Centre. Inst. Pasteur. Paris, Francia.

53. Li, J., J. Carrol and D. J. Ellar. 1991. Crystal structure of insecticidal d-endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5 Å resolution. *Nature*. 353:815-821
54. Lorence Quiñonez, A y R. Quintero Ramirez, 1996. Mecanismo molecular de acción de las d-endotoxinas de *Bacillus thuringiensis*. Avances recientes en la biotecnología de *Bacillus thuringiensis*. Editores: L.J. Galan-Wong, C. Rodriguez-Padilla, H. A. Luna-Olvera, Universidad Autónoma de Nuevo León. 1a Ed. México pp.63-113
55. Lorence Quiñones, Argelia. Analisis de la Actividad de Formación de Poro de las Proteínas Cry de *Bacillus thuringiensis* en presencia de su Receptor Nativo. Tesis Doctoral. UNAM 1997, pp 1-92.
56. Lowry, O.H., N. J. Rosebrogh, A. L. Farr y R. J. Randall. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275.
57. Luthy, P. and Ebersold, H. R. 1981. The entomocidal toxins of *Bacillus thuringiensis*, Pharma ther Pergamon Press. Great Britain, 13:257-283.
58. Mainardi, José Virgilio ; Bello, José Luis ; Cao, Roberto ; Linares, Dolores ; María Olga Valdes. 1983. Cis-diaminodicloro platino(II) obtenido en Cuba. I. Su actividad citotóxica y antitumoral. *Rev Cub Farm* 17 :158-163.
59. Marec, F., Martha, V. and J. Weiser. 1989. Analysis of genotoxic activity of *Bacillus thuringiensis* B-exotoxin by means of the *Drosophyla* wing spot test. *J. Invertebr. Pathol.* 53:347-353.
60. Martin, P. A. W. and R. S. Travers, 1989. Worldwide abundance, and distribution of *Bacillus thuringiensis* isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* 55:2437-2442.
61. Meadows, J., Gill, S. S. and Bone, L.W. 1989. Factors influencing lethality of *Bacillus thuringiensis kurstaki* toxin for eggs and larvae of *Trichostrongylus colubriformis* (nematoda). *Journal of Parasitology.* 75:191-194,
62. Meadows J., S.S., Gill and L.W. Bone. 1990. *Bacillus thuringiensis* strains affect population growth of the free-living nematode *turbatrix acetii*. *Invertebr. Reprod. Dev.* 17:73-76.
63. Mendoza Gamboa, Edgar. 1995. Purificación y caracterización de una proteína antitumoral a partir de *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis*. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias Biológicas. U.A.N.L. Monterrey, N.L., México
64. Mendoza Gamboa, Edgar, 1998. Mecanismo de Acción de la Oncotoxina de *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis*. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Biológicas. U.A .N.L. Monterrey, N.L., México
65. Norris, J. R. 1964. The classification of *Bacillus thuringiensis*. *J. Appl. Bacteriol.* 27: 439-447.

66. Norris, J. R. 1971. The protein crystal of *Bacillus thuringiensis*: Biosynthesis and physical structure. In microbial control of insects and mites. H. D. Burges and N. Y. Hussey, Eds. Acad. Press. N. Y. p.p.229-246.
67. Orduz, S., William, R. Correa, M. M., Montoya, A. E. and H. De Barjac. 1992. A new serotype of *Bacillus thuringiensis* from Colombia toxic to larvae mosquito J. Invertebr. Pathol. 59:99-103.
68. Phyllis A. W. Martin. 1994. An Iconoclastic View of *Bacillus thuringiensis* Ecology. American Entomologist p.85-90
69. Prasad, S.S.S. V. and Shethna, Y.I. 1974. Purification, crystallization and partial characterization of the antitumor and insecticidal protein subunit from the d-endotoxin of *Bacillus thuringiensis* var *thuringiensis*. Biochemica et Biophysica Acta. 363:558-566.
70. Prasad, S.S.S.V. and Shethna, Y.I. 1975. Enhancement of immune response by the proteinaceous crystal of *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis*. Biochemical and Biophysical Research Communications. 62:517-523.
71. Prasad, S. S. S. V. and Shethna, Y. I. 1976. Biochemistry and biological activities of the proteinaceous crystal of *Bacillus thuringiensis*. Biochemical Reviews. 47:70-76.
70. Prasad, S. S. S. V. and Shethna, Y. I. 1976. Mode of action of a purified antitumor protein from the proteinaceous crystal of *Bacillus thuringiensis* subsp. *thuringiensis* on Yoshida ascites sarcoma cells. Antimicrob. Agents and Chemoth. 10:293-298
73. Rodriguez -Padilla ,C., Galan-Wong .L. J., De Barjac, H., Roman-Calderon,-M. E., Tamez-Guerra, R. S. and H. T. Dulmage. 1990. *Bacillus thuringiensis*, Subsp. *neolonensis* serotype H-24, a new subspecies which produces a triangular crystal. J. Invertebr. Pathol. 56:280-282.
74. Rodriguez-Padilla, Cristina. 1996. Una nueva proteína de *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* con actividad citotóxica contra células tumorales humanas. Tesis Doctoral. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. IPN. México. D. F.
75. Román Calderón, Maximo E. 1997. Actividad Adyuvante de los Cristales y las proteínas de *Bacillus thuringiensis* GM-1 var. *aizawai*, efecto sobre la respuesta inmune humoral y celular. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias Biológicas. UANL. Monterrey, N. L., México.
76. Schnept, H. E. Wong, H. G., and Whiteley, H. R. 1985. The amino acid sequence of a crystal protein from *Bacillus thuringiensis* deduced from the DNA base sequence. J. Biol. Chem. 260 :6264-6272.
77. Schnepf, E. , Crickmore, N., J. Ven Rie D. Lereclus, J. Baum, J. Felitelson, D. R. Zeigler and D. H. Dean. 1998. *Bacillus thuringiensis* and Its Pesticidal Crystal Proteins. Microbiology And Molecular Biology Reviews, Sept p. 775-806 vol.62, No.3.

78. Sneath Peter, H. A., 1986 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Williams & Wilkins Baltimore. 2:1104-1135.
79. Taylor, R., Tippett, J., Gibb, G., Pells, S., Pike, D., Jordan, L and S. Ely. 1992. Identification and Characterization of novel *Bacillus thuringiensis* d-endotoxin entomocidal to coleopteran and lepidopteran larvae. Molecular Microbiology. 65:1211-1217.
80. Tamez Guerra, Patricia 1996. Formulaciones granulares y microcapsulados de diferentes serovariedades de *Bacillus thuringiensis*. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Biológicas. UANL. Monterrey, México.
81. Thomas, W. E. and D. J. Ellar. 1983. *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* crystal d-endotoxin: Effects on insect and mammalian cells *in vitro* and *in vivo*. J. Cell. Sci. 60:181-197
82. Tomei, L. D., and F. O. Cope. 1991. Apoptosis: The molecular basis on cell death. Current Communications in cell & Molecular Biology 3. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 5-29.
83. Van Rie, J.; Jansens, S; Höfte, H ; Degheele, D.; Van Mellaert, H. 1989. Specificity of *Bacillus thuringiensis* d-endotoxins. Importance of specific receptors on the brush border membrane of the midgut at target insects. Eur. J. Biochem. 186(1-2):239-247.
84. Van Rie, J. ; Jansens, S ; Höfte, H ; Degheele, D.; Van Mellaert, H. 1990. Receptors on the brush border membrane of the insect midgut as determinants of the specificity of *Bacillus thuringiensis* d-endotoxins. Appl Environ. Microbiol. 56 (6) :1378-1385.
85. Van Rie, J. S; .1991. Insect control with transgenic plant: Resistance prof. Tibtech 9:34-35.
86. Wabiko, H., K. C. Raymond and L. A. Bulla. 1986. *Bacillus thuringiensis* entomocidal protoxin gene sequence and gene product analysis. DNA. 5:305-314.
87. Whiteley and H. R. Ernest Schnepf. 1986. The molecular biology of parasporal crystal body formation in *Bacillus thuringiensis*. Ann. Rev. Microbiol. 40: 549-76
88. Wu, D. and A. I. Aronson. 1992. Localized mutagenesis defines regions of the *Bacillus thuringiensis* d-endotoxin involved in toxicity and specificity. J. Biol. Chem. 267:2311-2317.
89. Yasuroni Nagamatsu, Yuichio Ital, Chitoshi Hatanaka, Gunki Funatsu and Katsuya Hayashi. 1984. A toxic fragment from the entomocidal crystal protein of *Bacillus thuringiensis*. Agric. Biol. Biochem. 48:611-619.
90. Yamamoto, T. and R.E. McLaughlin, 1981. Isolation of a Protein from the parasporal crystal of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*: Toxic to the mosquito larva, *Aedes taeniorhynchus*. Biochem. Biophys. Res. Comm. 103:414-421.
91. Yamamoto, T., Y. A. Watkinson, L. Kim. M.V. Sage, R. Stratton, N. Akanda, Y. Li, D. P. Ma and B. A. Roe. 1988. Nuclotide sequence of the gene coding for a 130 kd

- mosquitocidal protein of *Bacillus thuringiensis israelensis*. *Gene* 66:107-120.
92. Yokoyama, Y., Ohmori, I. Kohda, K. and Kawazoe, Y. 1988. Potentiation of the cytotoxic activity of anticancer drugs against cultured L-1210 cell by *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* toxin. *Chem. Pharm. Bull.* 36:4499-4504.
93. Yokoyama, Y., Ohmori, I. Kohda, K. and Kawazoe, Y. 1991. Potentiation of antitumor activity of bleomycin towards solid tumors in mice by *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* toxin. *Anticancer Res.* 11(4):1625-1628.
94. Yokoyama, Y., Ohmori I., Suzuli, H., Kohda K., Yutaka Kawazoe. 1992. Hyperthermic Potentiation Of Bleomycin Cytotoxicity in the presence of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* d-Endotoxin. *Anticancer Research* 12 :1079-1082.
95. Yokoyama, Y., and Kohda, K. 1994. Enhanced cytotoxicity caused by increased DNA strand breakage resulting from synergistic potentiation of bleomycin with *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* d-endotoxin. *Anticancer Research.* 14:838-840.
96. Zamola, B., Karminski, G. , Fuks, Z., Kubovic, M. and Wrischer, M. 1985. Enhancement of intrinsic antitumor activity in spore-endotoxin mixtures of *Bacillus thuringiensis* by exposure to ultraviolet radiation. *Photochemistry Photobiology.* 41(3):361-365.

