



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA  
BIOMEDICINA

Caracterización de los efectos de activación de MAPK's e identificación de proteínas de unión de las proteínas Cry1Ac, toxina y protoxina de *Bacillus thuringiensis* en células epiteliales intestinales humanas HCT116.

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**BAUTISTA JACOBO ITZEL SARAI**

**TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: Dra. Leticia Moreno Fierros**  
**Facultad de Estudios Superiores Iztacala UNAM**  
**COMITÉ TUTOR: Dra. Ana Lilia García Hernández**  
**Facultad de Estudios Superiores Iztacala UNAM**  
**COMITÉ TUTOR: Dr. Enrique Othon Hernández González**  
**Departamento de Biología Celular Centro de**  
**Investigación y de Estudios Avanzados IPN**

**CD. MX. Enero ,2018**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Lic. Ivonne Ramírez Wence  
Directora General de Administración Escolar, UNAM  
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 14 de agosto de 2017, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** de la alumna **BAUTISTA JACOBO ITZEL SARAI**, con número de cuenta 308176096, con la tesis titulada "**Caracterización de los efectos de activación de MAPK's e identificación de proteínas de unión de las proteínas Cry1Ac toxina y protoxina de *Bacillus thuringiensis* en células epiteliales intestinales humanas HCT116**", realizada bajo la dirección de la **DRA. LETICIA MORENO FIERROS**:

Presidente: DR. LUIS ARTURO BAIZA GUTMAN  
Vocal: DR. JUAN PABLO REYES GRAJEDA  
Secretario: DR. ENRIQUE OTHON HERNANDEZ GONZALEZ  
Suplente: DRA. ROMINA MA. DE LA PAZ RODRÍGUEZ SANOJA  
Suplente: DR. ENRIQUE ORTEGA SOTO

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

**ATENTAMENTE**  
**"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"**  
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 15 de noviembre de 2017.

  
**DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA**  
**COORDINADOR DEL PROGRAMA**



c.c.p. Expediente del (la) interesado (a)

# AGRADECIMIENTOS

Primeramente al Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM por permitirme realizar mis estudios de maestría y de esta manera formarme como profesionista dentro de un posgrado de calidad.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por aceptarme dentro del programa de becas nacionales para la realización de estudios de posgrado. Con el numero de CVU 659434

Este Proyecto se realizó gracias a los siguientes apoyos recibidos:

SEP CONACYT proyecto CB117612

UNAM PAPIT proyecto IN219416

Proyecto PAPCA 2016-28 de la UNAM

Dra.Leticia Moreno Fierro por dirigir mi trabajo de tesis y guiar mi desarrollo académico y profesional.

Dra.Ana Lilia García Hernandez y Dr. Enrique Othon Hernandez Gonzales, quienes participaron como miembros de mi comité tutorial. Muchas gracias por el apoyo , tiempo y todas las contribuciones para el enriquecimiento y correcto desarrollo de este proyecto de investigación, fueron pilares importantes para mi formación académica.

# Indice

<b>Introducción</b> .....	<b>2</b>
Cry1Ac- mecanismo de acción.....	2
Usos de las proteínas Cry1Ac .....	3
Cry1Ac en plantas transgénicas: .....	3
Sistema inmune de mucosas.....	3
Células epiteliales de intestino: .....	4
<b>Antecedentes:</b> .....	<b>4</b>
<b>Objetivo General:</b> .....	<b>8</b>
<b>Estrategia Experimental.</b> .....	<b>9</b>
.....	10
<b>Materiales y Método</b> .....	<b>10</b>
<b>Cultivo celular</b> .....	<b>10</b>
<b>Purificación de proteínas Cry1Ac.</b> .....	<b>10</b>
Conjugación de las proteínas Cry1Ac a perlas de sefarosa. ....	11
Biotinilación de proteínas Cry1Ac. ....	12
Activación de MAPK Análisis por Western Blot.....	12
(modificado de Torres Martínez 2016) .....	12
Proteínas de unión a Cry1Ac .....	13
Identificación de proteínas precipitadas. ....	14
Espectrometría de MASAS para identificación de proteínas.....	15
Microscopía Confocal .....	15
Pruebas de citotoxicidad .....	16
MTT.....	16
Alamar Blue .....	16
Ensayo de cierre de herida .....	17
<b>Resultados.</b> .....	<b>18</b>
<b>Análisis de Resultados y Discusión :</b> .....	<b>37</b>
<b>Conclusión:</b> .....	<b>43</b>

## Abreviaturas

<b>B7-1</b>	<b>molécula coestimuladora de células presentadoras de antígeno CD80</b>
<b>B7-2</b>	<b>molécula coestimuladora CD86</b>
<b>Bt</b>	<b>Bacillus thuringiensis</b>
<b>CD</b>	<b>Cluster of differentiation cúmulo de diferenciación</b>
<b>g</b>	<b>gramos</b>
<b>h</b>	<b>Horas</b>
<b>IL</b>	<b>Interleucina</b>
<b>kDa</b>	<b>KiloDaltones</b>
<b>kg</b>	<b>kilogramo</b>
<b>L</b>	<b>Litro</b>
<b>mg</b>	<b>miligramos</b>
<b>mL</b>	<b>mililitro.</b>
<b>MTT</b>	<b>3-4,5-Dimethylthiazol-2-Diphenyltetrazolium Bromide</b>
<b>NaCl</b>	<b>Cloruro de Sodio</b>
<b>°C</b>	<b>Grados centígrados</b>
<b>rpm</b>	<b>Revoluciones por minuto</b>
<b>t</b>	<b>Tiempo</b>
<b>v</b>	<b>volumen</b>
<b>µg</b>	<b>microgramos</b>
<b>µL</b>	<b>Microlitro</b>
<b>GALT</b>	<b>Gut-Associated Lymphoid Tissue</b>
<b>HSP70</b>	<b>Heat shock proteín 70</b>
<b>ERK</b>	<b>ERKmitogen-activated protein kinases</b>
<b>JNK</b>	<b>JNK mitogen-activated protein kinases</b>
<b>P38</b>	<b>P38 mitogen-activated protein kinases</b>
<b>MCP1</b>	<b>Monocyte chemotactic protein 1</b>
<b>EII</b>	<b>Enfermedad inflamatoria intestinal</b>
<b>TBS</b>	<b>Buffer salino Tris- tween. / tris-buffered saline tween (polosorbate 20)</b>
<b>PBS</b>	<b>Buffer de fosfatos</b>

## Resumen

Las proteínas Cry1Ac, toxina y protoxina, producidas por la bacteria gram positiva *Bacillus thuringiensis*, se caracterizan por ser delta endotoxinas específicas hacia diferentes grupos de insectos, principalmente lepidópteros. Las proteínas Cry1Ac se han considerado inocuas para vertebrados, sin embargo se ha demostrado que son inmunogénicas, y la protoxina tiene actividad adyuvante. La protoxina y toxina Cry1Ac tienen la capacidad de activar macrófagos e inducir la activación de vías de MAPKs, además se han identificado algunas proteínas de unión y se ha relacionado a la HSP70 de superficie con algunos de los efectos responsables de la activación de macrófagos. Los efectos de estas proteínas no se han estudiado en otros tipos celulares de mamífero como las epiteliales intestinales que podrían ser relevantes por la creciente exposición a estas proteínas. En la actualidad existen cultivos de organismos genéticamente transformados para consumo humano que expresan a las proteínas Cry1Ac, por lo que los seres humanos estamos expuestos a las Cry1Ac debido a la ingesta de dichos cultivos. Las proteínas Cry1Ac podrían tener diversos efectos en intestino. En este sentido también se ha demostrado, en un trabajo de Tesis Doctoral, que la administración intragástrica de la toxina Cry1Ac genera hiperplasia linfoide en intestino grueso. Por lo tanto consideramos importante caracterizar si las células epiteliales de colon de la línea celular HCT116 presentan alguna respuesta ante el estímulo de las proteínas Cry1Ac, toxina y protoxina. En este trabajo nos enfocamos a evaluar la activación de vías de señalización MAPK's y las posibles proteínas de unión presentes en las células epiteliales que reconozcan a las proteínas Cry1Ac.

Para realizarlo, se determinó la activación de ERK1/2, JNK y p38 por western-blot, en una cinética donde se estimuló con Cry1Ac a diferentes tiempos; También se determinaron las posibles proteínas de unión que reconocen a las proteínas Cry1Ac en colon mediante una precipitación por afinidad con perlas de sefarosa, por último se determinó si las proteínas Cry1Ac inducen efectos tóxicos o favorecen la transformación epitelio mesénquima. Los resultados obtenidos fueron que las proteínas Cry1Ac inducen la activación de ERK ½ y p38, sin embargo no inducen cambio en la fosforilación de JNK. Y se demostró que la activación de las MAPK's, inducida por las proteínas Cry1Ac, no está ligada a efectos tóxicos ni a la

transformación celular en células normales. Finalmente, en los resultados obtenidos por precipitaciones por afinidad y microscopía confocal, se encontró que existen proteínas de unión a las proteínas Cry1Ac en las células epiteliales de intestino HCT116, entre las cuales están vimentina, alfa enolasa, actina y la proteína de choque térmico 70 (HSP70). En conclusión las proteínas Cry1Ac, toxina y protoxina, no son inocuas para las células de vertebrados, pues en células de epitelio humano de la línea HCT116 existen proteínas de unión específicas que se encargan de su reconocimiento como HSP70, para posteriormente ser internalizadas . Dentro de los efectos que tiene la estimulación con proteínas Cry1Ac en este tipo celular esta la activación de MAPK's como ERK1/2 y JNK sin embargo esta administración no induce daño celular, o cambios en el fenotipo celular, pues no hay disminución en la viabilidad celular ni incremento en la migración de las células.



## ABSTRACT

The Cry1Ac proteins, toxin and protoxin, are produced by *Bacillus turingiensis*. Cry1Ac proteins are characterized as specific delta endotoxins for different groups of insects, such as Lepidoptera. Now a days we can find genetically transformed crops, that are used for human consumption and express Cry1Ac proteins. Because of these transgenic crops, humans are exposed to Cry1Ac proteins by the ingestion of these crops. In this sense, it has also been demonstrated in a PhD thesis that the intragastric administration of Cry1Ac generate lymphoid hyperplasia in large intestine. However, the responses generated by the colon epithelial cells, HCT116 cell line, to Cry1Ac, toxin and protoxin proteins have not been characterized yet. So, the aim of this study was evaluate the activation of MAPK signaling pathways and the possible binding proteins in epithelial cells that recognize Cry1Ac proteins. In order to do this, we evaluate the activation of ERK1 / 2, JNK and p38 by western blot, stimulating colon cells with Cry1Ac at different times, 2.5,5,15 , 30 and 60 minutes; we also determined possible binding proteins that recognize Cry1Ac proteins in colon using sepharose beads, finally determined whether Cry1Ac proteins induce toxic effects or promote mesenchymal epithelial transformation. The results obtained in this study were that the Cry1Ac proteins induce the activation of ERK ½ and p38, but not induce change in the phosphorylation of JNK. Also, the activation of MAPKs, induced by Cry1Ac proteins, is not linked to toxic effects or to cell transformation in non-cancerous cells. Finally, the results obtained by sepharose beads affinity precipitation and confocal microscopy, shown that there are proteins binding to Cry1Ac proteins in intestinal epithelial cells HCT116, which are vimentin, alpha enolase, actin and heat shock protein 70 (HSP70). In conclusion, Cry1Ac, toxin and protoxin proteins are not inocuous for vertebrate cells, because in human epithelial cells,HCT116 cell line, are specific binding proteins that are responsible for their recognition like HSP70, and later Cry1Ac proteins are internalized. The effects of stimulation with Cry1Ac proteins colon is the activation of MAPKs such as ERK1 / 2 and JNK, however, this administration does not induce cellular damage or changes in the cellular phenotype, as there is no decrease in cellular viability or increase cell migration.

# Caracterización de los efectos de activación de MAPK's e identificación de proteínas de unión de las proteínas Cry1Ac, toxina y protoxina de *Bacillus thuringiensis* en células epiteliales intestinales humanas HCT116.

## Introducción

*Bacillus thuringiensis* es una bacteria Gram positiva la cual se caracteriza por la producción de cristales proteínicos en cuerpos de inclusión durante su fase de esporulación, los cuales contienen delta endotoxinas específicas para diferentes grupos de insectos, principalmente lepidópteros, coleópteros y dípteros. (Benítez,2005). A las proteínas contenidas en los cuerpos de inclusión se les denominan proteínas Cry y se encuentran clasificadas en 50 grupos dependiendo de la especificidad hacia el insecto blanco (Soberon y Bravo 2013).

### **Cry1Ac- mecanismo de acción.**

Existen estudios sobre la susceptibilidad y el mecanismo de acción de diferentes toxinas de Bt, en el presente estudio nos enfocamos en una proteína perteneciente a la familia Cry, esta es la proteína Cry1Ac de la cual se puede obtener la protoxina Cry1Ac (pCry1Ac) y la toxina Cry1Ac (tCry1Ac) de un peso aproximado de 130 y 65 kDa respectivamente. El mecanismo de acción de estas proteínas, sobre células de insecto se encuentra ampliamente descrito. Éste inicia cuando el insecto ingiere la espora que contiene los cristales de protoxina esta debe ser procesada para generar las toxinas, lo cual ocurre cuando el cristal es solubilizado y la protoxina es procesada proteolíticamente en el intestino medio del organismo blanco, por proteasas y el pH básico de este órgano (Schneph et al. 1998). La toxina como monómero se une a la cadherina, un receptor específico para las proteínas Cry1Ac en el insecto, esta unión facilita el rompimiento mediado por proteasas del extremo N- terminal de la toxina, mientras que las formas oligoméricas de la toxina se unen a receptores secundarios como aminopeptidasas N y fosfatasas alcalinas, creando poros en el intestino medio que causan desequilibrio osmótico y muerte del organismo. (Soberon et al., 2007, Jin et al. 2016)

## **Usos de las proteínas Cry1Ac.**

Debido a sus propiedades insecticidas desde finales de 1980 las proteínas Cry se han utilizado como bio-insecticidas, asperjando preparaciones de bacterias y endoesporas sobre los cultivos de interés humano. Sin embargo, a finales de 1990 (Estruch et al. 1997) se buscó obtener variedades vegetales que ya presentaran resistencia a los agentes entomológicos causantes de pérdidas en las cosechas. Por lo que desde 1990 hasta la actualidad podemos encontrar organismos transgénicos que tienen y expresan genes codificantes para toxinas contra insectos, como lo es la toxina Cry1Ac, generando de esta forma cultivos resistentes a las plagas. Durante el año 2014 se estima que una superficie de 78.8 millones de hectáreas fueron plantadas con cultivos genéticamente modificados con toxina Cry1Ac en 28 países. (James 2012)

## **Cry1Ac en plantas transgénicas:**

En el caso particular de la toxina Cry1Ac, existen cultivos genéticamente transformados de consumo humano que expresan esta proteína, entre los cuales destacan: el chícharo (Teressa-Negawo A. et al.), coliflor (Tetreau et al.), berenjena (Hautea et al. 2016), arroz (Qiu-Li et al. 2005) y maíz (Jiang et al. 2016). De esta forma los seres humanos estamos expuestos a las proteínas Cry1Ac como antígenos de la dieta.

## **Sistema inmune de mucosas:**

Dentro de los mecanismos de defensa contra patógenos se encuentran los compartimentos mucosos, los cuales actúan como barrera mecánica que separa el medio interno del hospedero del ambiente externo, además de que constituye la superficie de contacto primaria y más extensa con el ambiente externo. (Svanborg et al. 1996)

Los compartimentos mucosos son: los tractos gastro-intestinal, el genitourinario y el respiratorio. Dentro de éstos, el sistema gastro-intestinal constituye la parte más extensa y compleja del sistema inmunitario, además de que recibe diariamente una enorme carga antigénica y es capaz de distinguir entre patógenos invasivos y antígenos inocuos procedentes de los alimentos y de bacterias comensales. (Mowat et al. 1999, 2003).

El intestino es la barrera mecánica más extensa que limita el acceso de sustancias nocivas al organismo, trabaja en conjunto con enzimas digestivas pancreáticas, bacterias que constituyen la

flora intestinal, así como con el tejido linfoide asociado a intestino (GALT, Gut-Associated Lymphoid Tissue) que tiene como función la interconexión entre la respuesta y regulación de los antígenos del intestino.

### **Células epiteliales de intestino:**

Las células epiteliales del intestino, son los componentes del sistema inmune mucoso pues son la primera barrera de contacto y reconocimiento hacia un antígeno, por lo que proveen señales tempranas para la respuesta inflamatoria en la mucosa mediada por citocinas y mediadores inflamatorios (Eckmann et al. 1993). Dentro de las citocinas inflamatorias que producen las células epiteliales se encuentran la IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL8 y TNF- $\alpha$  (McCormick et al. 1993) y no parecen expresar citocinas como IL-12, IL-4, IL-5, IL-12, o INF- $\gamma$  y las cuales son comunes en la respuesta inmune antígeno específicas. De tal forma que los productos secretados por las células epiteliales tienen un papel importante en la regulación de la respuesta inflamatoria en intestino. (Yang et al. 1997)

### **Antecedentes:**

A diferencia de los reportes donde se menciona que las proteínas Cry1Ac son inocuas, estudios previos del laboratorio han demostrado que incrementan la inmunidad antitumoral en un modelo de cáncer de mama por otra parte, ambas proteínas Cry1Ac, toxina y protoxina, tienen efectos inmuno-estimulantes. Por ejemplo, la toxina Cry1Ac presenta propiedades inmunogénicas, mientras que la protoxina Cry1Ac induce respuestas inmunogénicas y adyuvantes, La inmunogenicidad mucosa y sistémica de la protoxina y toxina ha sido ampliamente probada. El potente efecto adyuvante de la pCry1Ac, se demostró inicialmente al observar que al ser administrada por vía intraperitoneal o intragástrica induce respuesta de anticuerpos sistémicos similar a la obtenida con toxina de cólera (Vázquez-Padrón et al. 1999). El efecto adyuvante de pCry1Ac se demostró hacia diversos antígenos en modelos murinos, por ejemplo, ante la vacunación con polisacáridos de *Streptococcus pneumoniae* y péptidos de HIV-1 (Moreno-Fierros et al. 2003).

Además se encontró que el efecto adyuvante de pCry1Ac incrementa la protección contra infecciones parasitarias como *Naegleria fowleri* (Rojas- Hernández et al. 2003) *Taenia crassiceps* (Ibarra-Moreno et al. 2014) e infecciones bacterianas como *Brucella abortus* (González-González et al. 2015). Estos

estudios apoyan la utilidad de la proteína pCry1Ac de *Bacillus thuringiensis* como un eficiente adyuvante vacunal capaz de incrementar la protección en diversos modelos de infección.

Para comprender las bases celulares de la actividad inmunopotenciadora de la protoxina Cry1Ac hemos caracterizado algunos de los efectos in vivo e in vitro de la estimulación con esta proteína, especialmente en macrófagos.(Torres-Martinez et al. 2016).

Nuestros resultados sugieren que la protoxina y toxina tienen la capacidad de activar macrófagos induciendo la sobreexpresión de moléculas coestimuladoras como CD80 y CD86, la producción de citocinas pro-inflamatorias TNF $\alpha$ , IL-6 y MCP-1, (Moreno-Fierros et al. 2013). Así mismo, de manera importante logramos identificar a las MAPKs ERK1/2 y p38 entre las vías de señalización que se activan por la estimulación de macrófagos con protoxina (Rubio-Infante et al. 2017) y toxina (Torres-Martínez M. et al 2016) Cry1Ac. Debido a que la activación de MAPKs es mediada a través de la activación de receptores nos enfocamos también a la identificación de proteínas de unión así como a la caracterización de la unión e internalización de Cry1Ac en macrófagos.

La internalización de Cry1Ac es mediada por endocitosis mediada por clatrina ya que es inhibida por monodansilcadaverina y además Cry1Ac colocaliza con Rab5 y Rab7. Por ensayos de blot ligando se encontró que la protoxina y toxina se unen a varias proteínas. Para identificar a los posibles receptores realizaron diversos tipos de inmunoprecipitación debido a que son numerosas las proteínas precipitadas Cry1Ac en macrófagos. Se identificaron algunas de las proteínas por MALDI-TOF-TOF, para elegir candidatos a receptor. De los resultados obtenidos, nos enfocamos en aquellas proteínas que además de ser precipitadas eran reconocidas en ensayos de blot ligando por Cry1Ac y estaban en membrana plasmática.

Se han logrado identificar a algunas proteínas de unión a la protoxina y toxina en macrófagos, entre las que destacan HSP70 de superficie para la protoxina y vimentina en el caso de la toxina (Rubio-Infante et al.2017) .

Se ha iniciado la identificación de receptores responsables de los efectos inmunopotenciadores, entre los que destaca HSP70 de superficie con algunos de los efectos observados in vitro e in vivo.

Particularmente activación de ERK1, producción de MCP1 y reclutamiento de macrófagos. La activación de macrófagos inducida por protoxina Cry1Ac es parcialmente mediada por HSP70 de superficie ya que el pretratamiento con anticuerpos anti HSP70 inhibe la fosforilación de ERK1/2 y la producción de MCP1 inducida por Cry1Ac en macrófagos. Además, la participación *in vivo* de HSP70 de superficie en los efectos de Cry1Ac en macrófagos se evaluó en ratones tratados con un inhibidor de HSP70, los resultados apoyan la función de HSP70 ya que el inhibidor disminuyó la migración de macrófagos inflamatorios inducida por Cry1Ac en la cavidad peritoneal (Rubio-Infante, et al. 2017)

Además se ha observado que tanto tCry1Ac como la pCry1Ac inducen la activación de linfocitos B, medido por la expresión de CD69. Esta activación se presenta de forma gradual con respecto al tiempo y la activación inducida por tCry1Ac es mayor que la producida con pCry1Ac.

Tomando en cuenta que actualmente los cultivos genéticamente transformados de consumo humano expresan proteínas Cry1Ac, se consideró importante estudiar los efectos que pudieran inducir las proteínas Cry1Ac a nivel del epitelio intestinal debido a la ingesta de estos alimentos. Por lo tanto se estudió el efecto de la aplicación de la toxina por vía oral en ratones BALB/C. Los avances logrados muestran que aunque no tiene efectos tóxicos, sin embargo si provocan algunos cambios que podrían asociarse con su inmunogenicidad y con un ligero efecto alergénico, ya que la aplicación de Cry1Ac provocó incrementos en la proporción de granulocitos IgE+ así como de linfocitos B IgE+ en la mucosa intestinal. Además la administración oral de Cry1Ac indujo hiperplasia linfoide intestinal, un efecto que si bien pudiera relacionarse con su alta inmunogenicidad, es un efecto que amerita mayor estudio por el posible riesgo asociado a las hiperplasias, de derivar en procesos neoplásicos.

Los estudios para conocer las bases celulares del mecanismo adyuvante de la protoxina Cry1Ac se han enfocado a los efectos en macrófagos; los resultados de estos ensayos, en conjunto indican que las proteínas Cry1Ac, no son inocuas para vertebrados, por lo que es importante estudiar los potenciales efectos que pudieran tener esas proteínas en otros tipos celulares como las epiteliales intestinales, ya que estas podrían estar expuestas a las proteínas Cry1Ac por medio de la ingesta de cultivos transgénicos.

En un estudio previo, se demostró que pCry1Ac se puede unir *in situ* al epitelio de intestino delgado de ratones BALB/c (Vázquez-Padrón 2000). Tomando en cuenta este antecedente se decidió investigar si esta unión se observaba también en células humanas. Por lo tanto, para evaluar si las proteínas Cry1Ac

son reconocidas en intestino humano se utilizó la línea celular HCT116 de colon. En datos preliminares se observó la unión de tCry1Ac y pCry1Ac en la superficie celular de ésta línea celular, además, posterior a la unión, las proteínas Cry1Ac fueron internalizadas vía clatrina (datos no publicados). Como esta vía de internalización es activada por la unión ligando-receptor, estos resultados apoyan la hipótesis de que las proteínas Cry1Ac son reconocidas por proteínas específicas en la superficie celular. Por lo esto, es importante identificar las proteínas de superficie celular a las que se unen las proteínas Cry1Ac en epitelio intestinal y que pudieran estar participando en la internalización de la proteína.

Por otra parte, en las células en mamíferos las MAPK's (ER 1/2, JNK y p38) son algunas de las vías de señalización activadas por estímulos extracelulares (Chen et al. 2001, Tanue et al. 2002, Dent et al. 2003). La activación de esta vía de señalización está involucrada en varios procesos celulares incluyendo proliferación celular, diferenciación y migración. Dado que en macrófagos murinos se ha descrito que la estimulación con Cry1Ac activa las vías MAPK's consideramos importante evaluar si en células epiteliales también se activan estas vías por la estimulación con proteínas Cry1Ac.

Dentro de los efectos producidos por la activación de MAPK's en la línea celular HCT116, se encuentran ampliamente descritos los efectos en el ciclo celular, por ejemplo la activación de JNK y p38 activan las cascadas asociadas a la inducción de la apoptosis mientras que ERK 1/2 se asocia mayormente a la protección y división celular (Yang et al. 2003). Ya que las MAPK's están relacionadas con procesos de división o muerte celular, sería importante determinar si las proteínas Cry1Ac provocan efectos tóxicos en las células HCT116.

Así mismo, dentro de los procesos de diferenciación celular asociados a la activación de MAPKs, se encuentra la transformación epitelial-mesénquimal (TEM) de las células asociada a procesos oncogénicos, dentro de esta transformación las vías asociadas son ERK y JNK. La TEM es el resultado de la activación de factores de transcripción que alteran la expresión génica, promoviendo la pérdida de adhesión célula-célula y un remodelamiento de cito esqueleto, cambiando la morfología y fisiología de una célula epitelial a una mesénquimal.

El presente trabajo tiene como objetivo estudiar los efectos inducidos por las proteínas Cry1Ac en células epiteliales de intestino humano. Determinando si las proteínas Cry1Ac son capaces de activar MAPK's, conocer las proteínas celulares de unión hacia las proteínas Cry1Ac, determinar si estas inducen citotoxicidad celular o favorecen la transformación y migración celular.

## O bjetivo General:

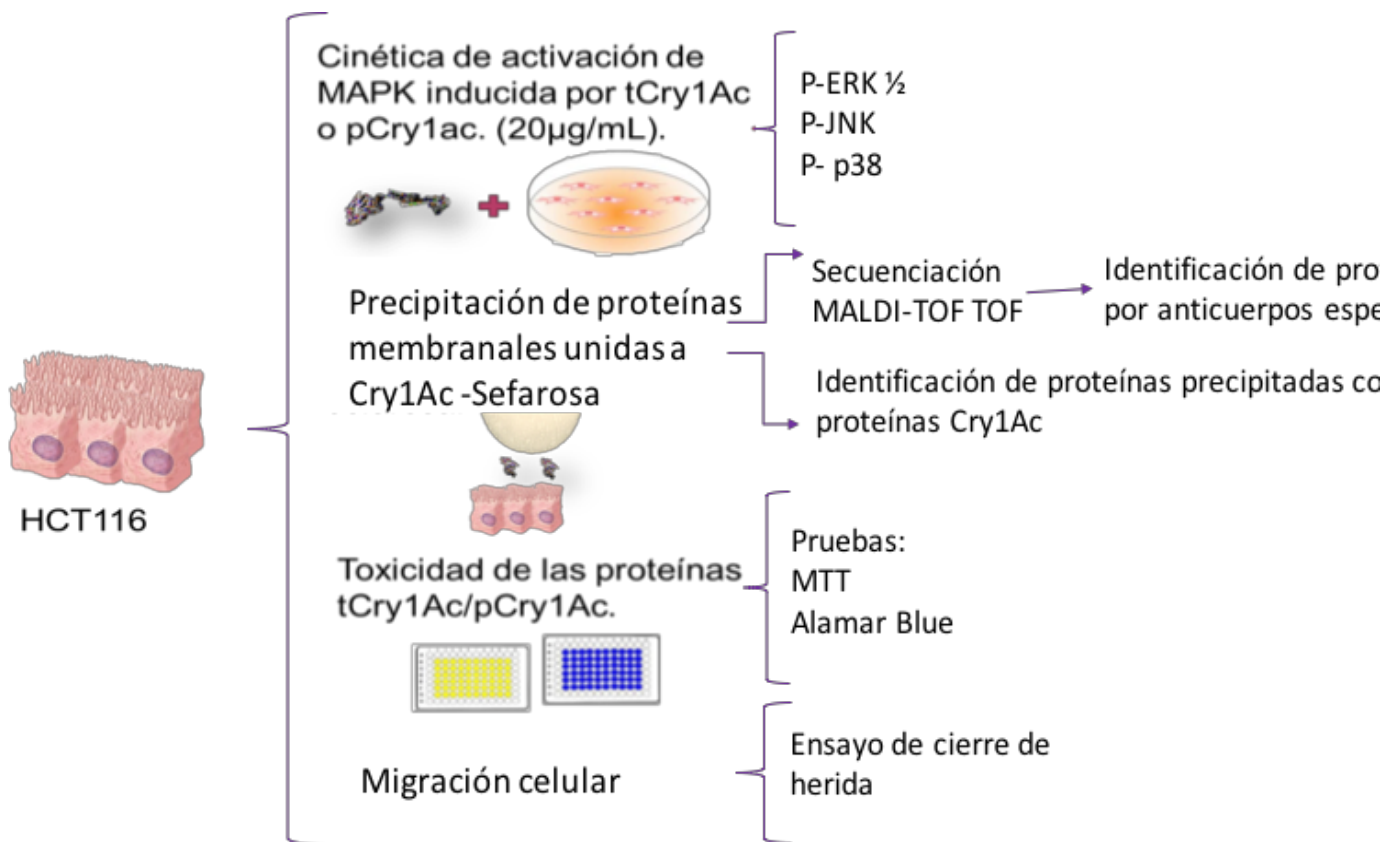
- Evaluar si las proteínas Cry1Ac toxina y protoxina inducen vías de señalización que induzcan efectos en la activación de vías de señalización sobre la línea celular epitelial de colon humano HCT116.

## O bjetivos Particulares:

- Determinar si las vías de activación de MAPK son activadas al estimular con las proteínas Cry1Ac en la línea celular de epitelio de colon humano HCT116.
- Identificar las proteínas de unión a las proteínas Cry1Ac, toxina y protoxina, presentes en la línea celular de epitelio de colon humano HCT116.
- Analizar si existen efectos tóxicos inducidos por las proteínas Cry1Ac en la línea celular HCT116.
- Determinar si se favorece la migración y diferenciación celular por el estímulo de las proteínas Cry1Ac en la línea celular HCT116.



# Estrategia Experimental.



# Materiales y Método

## Cultivo celular.

Se utilizó la línea celular HCT116,( ATCC® CCL-247™) derivada de cáncer de colon humano, Las células fueron cultivadas con medio RPMI, de acuerdo a las indicaciones del proveedor ATCC®, suplementado con L-glutamina 1% v/v, antibac 1% v/v, aminoácidos esenciales 1% v/v, 2-mercaptanol 0.1%, piruvato 1% y 10% de suero fetal bovino (SFB) en condiciones de 5% de humedad y CO2 95% a 37°C.

Para el ensayo de cierre de herida se utilizó la línea celular CRL-1790, CCD 841 CoN (ATCC® CCL-1790)™), la cual es una línea normal derivada de colon fetal humano, las cuales se cultivaron en medio RPMI-12,de acuerdo a las indicaciones del proveedor ATCC®, sin suplementar con 10% de SFB en condiciones de 5% de humedad y CO2 95% a 37°C.

## Purificación de proteínas Cry1Ac.

Las proteínas Cry1Ac se obtuvieron con el protocolo de purificación descrito por Vazquez-Padron et al. 1999.

Para la realización de los ensayos primero se purificaron las proteínas Cry1Ac. Para el caso de la Protoxina Cry1Ac se obtuvo de una bacteria recombinante de Escherichia coli (E. coli), la cual se cultivó en medio Luria-Broth con Ampicilina 100 µg/ml, como antibiótico; fueron incubados por 36 horas, en agitación constante de 250-300 rpm y a una temperatura de 37 °C. Las bacterias se cosecharon centrifugando a 10000 rpm durante 15 minutos a una temperatura de 4 °C.

Para la lisis bacteriana se utilizó sacarosa, lisozima y Tris-EDTA, posteriormente se centrifugó 10 min a 10000rpm y la pastilla fue lavada en un sonicador con una solución de NaCl en ciclos de 5 minutos a 100 de amplitud, centrifugando entre cada ciclo y cambiando el NaCl para obtener los cristales que contienen la Protoxina, que se solubilizaron en amortiguador de carbonatos 0.1 M a un pH de 9.6 y más de 10mM de DTT por 2 horas a 37 °C, se recuperó el

sobrenadante donde se encuentra la protoxina ya soluble, se le determinó la concentración por el método de Bradford, posteriormente la pureza de pCry1Ac fue determinada mediante un gel de electroforesis. Para la obtención de la tCry1Ac, se llevó a cabo una digestión con tripsina (por cada 20 mg de protoxina 1 mg de tripsina) durante una hora y media a 37 °C, y una vez que la digestión estuvo completa se eliminaron los restos de LPS con una columna de polomixina para posteriormente filtrarla por un filtro de .22nm, se realizó un la cuantificación por el método de Bradford para conocer la concentración final de la Toxina Cry1A.

### **Conjugación de las proteínas Cry1Ac a perlas de sefarosa.**

Para obtener a las proteínas de membrana celular a las que se unían las proteínas Cry1Ac se realizaron precipitaciones con las proteínas Cry1Ac toxina o protoxina, conjugadas a perlas de sefarosa 4B.

Para la conjugación de las proteínas, se siguió el protocolo de conjugación descrito por el proveedor, utilizado la sefarosa CNBr-activated Sepharose™ 4B (SIGMA). Para la conjugación, se utilizaron 0.50 µg de sefarosa (peso seco) y 5 mg de pCry1A o 5mg de tCry1Ac

Previo a la conjugación y posterior a ésta, se midió la absorbancia de la proteína a conjugar, pCry1Ac o tCry1Ac (Tabla 1), ya que si la absorbancia post conjugación disminuía con respecto a la absorbancia inicial, era indicativo de que la proteína se encontraba unida a la sefarosa. Esto también se corroboró mediante un gel de electroforesis 10% (SDS PAGE) donde se corrieron las disociaciones por calentamiento, entre la sefarosa y las proteínas Cry1Ac (Fig 1) obteniendo las bandas de los pesos esperados para las proteínas Cry1Ac.

La cantidad de proteína conjugada a 2mL de sefarosa ( 0.75g de sefarosa pesos seco) fué de 4.95 mg para pCry1Ac y de 4.45 mg para tCry1Ac. Las cuales se almacenaron a 4°C en 10 alícuotas de 200 µL de Sefarosa cada una. Para cada ensayo de precipitación se utilizó una alícuota, las cuales tenían una concentración de 440- 490 µg de proteína Cry1Ac.

Tabla 1 Conjugación de Cry1Ac a perlas de Sefarosa.

Proteína 5mg	Absorbancia Inicial	Absorbancia final
pCry1Ac	3.3	0.015
tCry1Ac	3.2	0.34

Absorbancias obtenidas de 5mg de proteína Cry1Ac pre y post conjugación a las perlas de sefarosa, teniendo un porcentaje de unión del 98% para pCry1Ac y de 89% para tCry1Ac.

Posterior al SDS page, se realizó in western-blot, en el cual se validaron las proteínas disociadas. por desnaturalización a 100°C. Para su identificación se utilizaron anticuerpos anti-pCry1Ac o anti- tCry1Ac, hechos en conejo, seguidos de un anticuerpo secundario, anti-conejo IRDye 800CW Li- Cor infrarrojo (Odyssey Licor).

### **Biotinilación de proteínas Cry1Ac.**

Para marcar las proteínas Cry1Ac con biotina, se utilizó el kit de biotinilación: Immuno Probe™ biotinylation kit de Sigma-Aldrich. La biotinilación de ambas proteínas pCry1Ac y tCry1Ac se realizó de acuerdo con lo descrito por el proveedor. Una vez conjugadas las proteínas Cry1Ac, se corrieron en un ensayo de SDS-PAGE 10% seguido de un blot, donde se validaron las proteínas Cry1Ac biotiniladas con streptavidina IRDye 800CW Li-Cor por infrarrojo (Odyssey Licor)(Fig 2).

Una vez confirmada la biotinilación correcta de las proteínas Cry1Ac estas se almacenaron en tubos eppendorf ámbar a 4°C. Estas proteínas Cry1Ac biotiniladas, fueron utilizadas para determinar si las proteínas Cry1Ac seguían siendo capaces de reconocer a las proteínas de unión a células HCT116 en su forma desnaturalizada, por lo que se utilizaron en los blots obtenidos de las columnas de afinidad.

### **Activación de MAPK Análisis por Western Blot.**

#### **(modificado de Torres Martínez 2016)**

Se sembraron  $1 \times 10^6$  células HCT116 en placas de 6 pozos y se estimularon con pCry1Ac o tCry1Ac 10µg/mL mientras que para el control positivo de activación se utilizó 3 µg/mL de LPS.

Se realizó un curso temporal con los estímulos, dejándolos por 2.5, 5, 15, 30 o 60 minutos a 37°C. Transcurrido el tiempo las células se fueron lavadas inmediatamente con PBS frío 3 veces. Las proteínas totales se extrajeron de las células HCT116 utilizando un buffer de lisis

constituido por: 50 mM HEPES, 250 mM de NaCl, 5 mM de EDTA, 0.1 % de Nonidex, 0.1 mM de PMSF, 0.5 mM DTT, 5mM de Fluoruro de Sodio, 0.5 mM Ortovanadato, 5 µg/mL de Aprotinina y 5µg/mL de Leupeptina. De los lisados celulares se corrió un gel al 10% de poliacrilamida y se transfirió a una membrana Millipore de nitrocelulosa. Los blots se bloquearon por 1h a temperatura ambiente con buffer de bloqueo ( 4% leche en tris-buffer salino tween (TBST )

Los anticuerpos anti-fosfo p44/42 MAPK (ERK 1/2), anti-fosfo P38 MAPK y anti fosfo JNK, se diluyeron 1:2000 en TBST y fueron incubados con los blots toda la noche a 4°C posteriormente se realizaron lavados con TBST para finalmente agregar el anticuerpo secundario para este experimento( anti-conejo DYE 800), dilución 1:1000. Las bandas reconocidas fueron reveladas con ayuda del ODDYSEY de Licor. Las proteínas no fosforiladas se midieron en los mismos blots, después de haber sido sometidos a stripping por 15 minutos a temperatura ambiente, la membrana nuevamente fue bloqueada y se le agregó anti-ERK 1/2, anti-P38, anti-JNK .

### **Proteínas de unión a Cry1Ac**

Para determinar las posibles proteínas receptoras a Cry1Ac, se realizaron ensayos de columna de afinidad para identificar las proteínas de membrana con unión a tCry o pCry1Ac Cry1Ac de la línea celular HCT116.

Para estos ensayos, se obtuvieron  $10 \times 10^7$  células de la línea celular HCT116, las cuales fueron lavadas 4 veces con PBS frío para eliminar los rastros de medio, se dividió el paquete celular en 2 fracciones iguales, ya que la mitad de las células obtenidas se incubarán junto con perlas de sefarosa CNBr-4B unida a pCry1Ac y la otra mitad se incubarán con perlas de sefarosa CNBr-4B unida a tCry1Ac.

Una vez separado el paquete celular, se centrifugó a 1500rpm por 10 min para obtener las pastillas celulares y descartar el sobrenadante; obtenidos los paquetes celulares, se les agregó 800 µL de PBS y 200µL de sefarosa CNBr-4B conjugada a pCry1Ac o tCry1Ac, se homogenizaron las muestras y se dejó en incubación con agitación por 2H a 4°C. Transcurrido el tiempo de

incubación se agregó mini complete 1X a las muestras de sefarosa y células HCT116 para posteriormente realizar la lisis celular.

Para el buffer de lisis celular se utilizó Complete-mini ROCHE, se agregó 1% de Tritón. Con esta solución se realizaron tres pulsos de 1 segundo con un sonicador, los pulsos se realizaron cada 10 minutos a 40 de amplitud por media hora. La lisis celular fue corroborada observando la muestra en un microscopio óptico a un aumento 20X y observando que no existieran células integra. Una vez lisadas las células se centrifugó el lisado a 1500rpm durante 5 minutos, la pastilla obtenida contenía las perlas de sefarosa unidas a las proteínas Cry1Ac que a su vez estaban unidas con las proteínas celulares específicas de la línea celular HCT116, en el sobrenadante contenía las proteínas no unidas a las proteínas Cry1Ac.

Las proteínas no unidas a las proteínas Cry1Ac se almacenaron a -20°C y el pellet que contenía las perlas de sefarosa CNBr-4B unidas a las proteínas de unión a tCry1Ac o pCry1Ac se lavó aproximadamente 8-10 veces con 9mL de Buffer salino de fosfatos (PBS) + fenil metano sulfonil fluoridro (PMSF) al 0.05%M, centrifugando 2 min a 1500rpm entre cada lavado. La absorbancia del sobrenadante de cada lavado se midió a 270nm y se lavó hasta que el sobrenadante mostrara una absorbancia de 0. Finalmente se le retiró todo el sobrenadante a la pastilla y se le agregó 30 µL de buffer de carga 6x más 100 µL de buffer de lisis Tris-SDS-triton (RIPA), se hirvió durante 10 min y se alícuoto el precipitado, para posteriormente correr en un gel de poliacrilamida al 10% seguido de un western- blot. Las alícuotas no utilizadas inmediatamente, se almacenaron a -70°C.

### **Identificación de proteínas precipitadas.**

Una vez realizada la precipitación por afinidad con pCry1Ac o tCry1Ac, se corrió un gel de poliacrilamida 10% con las siguientes muestras: Lisado celular total (sin tratamiento), proteínas obtenidas de la precipitación por afinidad y como control negativo se pusieron a interaccionar las células HCT116 con perlas de sefarosa no acoplada a ninguna proteína, pero bloqueadas previamente con aminos primarios; esto para corroborar que no existiera unión inespecífica de las perlas de sefarosa a proteínas celulares. Una vez realizado el SDS-PAGE, se transfirieron las proteínas a una membrana de nitrocelulosa MILLIPORE y ésta fue revelada con Rojo Ponceau.

Posteriormente la membrana de nitrocelulosa fue bloqueada con albumina al 3% por 1h a temperatura ambiente, posteriormente se agregó pCry1Ac o tCry1Ac conjugadas con biotina durante toda la noche. Esto para determinar si existían epítopes reconocidos por las proteínas Cry1Ac aun en su forma desnaturalizada. Para el revelado, se agregó streptavidina IRDye 800CW Li-Cor para validar las bandas reconocidas, y finalmente la obtención de la imagen por infrarrojo (Odyssey Licor).

### **Espectrometría de MASAS para identificación de proteínas.**

La identificación de las proteínas presipitados se realizaron en el Instituto de Medicina Genómica utilizando la siguiente metodología: Las bandas fueron cortadas manualmente y de ellas provienen los resultados aquí presentados. Las bandas fueron reducidas con DTT 10 mM, alquiladas con Iodoacetamida 100mM y desteñidas con ACN: NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 50mM (50:50 v/v).

La digestión proteica se llevó a cabo durante 18 horas a 37°C con tripsina grado masas (Promega V528A). Se extrajeron los péptidos obtenidos de la digestión (ACN:H<sub>2</sub>O:ácido fórmico 50:45:5 v/v), se disminuyó el volumen de la muestra en un concentrador (Eppendorf 5301) y se desaló la muestra utilizando columna C18 (ZipTipC18).

La muestra se colocó por sextuplicado en la placa utilizando como matriz  $\alpha$ -ciano, y se analizaron en un MALDI TOF/TOF 4800.

Con los espectros MS/MS obtenidos se realizó una búsqueda con el algoritmo de búsqueda Paragon del software ProteinPilot, con un porcentaje de confianza del 66%. Los resultados de la identificación se muestran en el anexo 1.

### **Microscopía Confocal**

Para determinar si existía reconocimiento entre HSP 70 con las proteínas Cry1Ac toxina o protoxina, se obtuvieron células epiteliales de colon de ratones BALB/c, las cuales inmediatamente después de ser obtenidas se almacenaron durante 1h a 4°, posteriormente fueron estimuladas durante 1h con 10µg de toxina o protoxina Cry1Ac, se lavaron 3 veces con

1ml de buffer de fosfato salino (PBS) frío y se fijaron 15m con paraformaldehido (PFA) 1%, posteriormente se dio un lavado con 1ml de PBS y se permeabilizaron con 50  $\mu$ L de Cytotfix-Cytoperm (Bioscience) por 15 min, (todos los lavados siguientes se realizaron con perm wash), se dio un lavado con perm wash, se descartó el sobrenadante y se bloqueó con 25 $\mu$ L de cluster de diferenciación 16/32 (CD16/32) en buffer de fosfatos al 4% de albumina (PBA 4%) por 30min, posteriormente se puso a incubar con 25 $\mu$ L del anticuerpo primario Anti HSP70 hecho en chivo 1:50 por 1 h a 4°C, se lavó el exceso de anticuerpo anti HSP70 y se adicionó 25 $\mu$ L del anticuerpo secundario anti-chivo 1:100 por 1h 4°C. Se lavaron las muestras 5 veces con 1ml de perm wash y se montaron en laminillas utilizando vecta-shield. Posteriormente se analizaron las muestras en un microscopio confocal. Las imagines mostradas son la proyección máxima de 18 cortes

## **Pruebas de citotoxicidad**

### **MTT**

La prueba de MTT se realizó para estimar el potencial cito-tóxico de las proteínas Cry1Ac. El reactivo de MTT la que se trabajó, se encontraba a una concentración de 5mg/mL. Primero, se sembraron  $5 \times 10^4$  células HCT116 en placas de 96 pozos, las cuales se dividieron en 8 grupos: células sin tratamiento, como control negativo, y células tratadas con concentraciones crecientes de las proteínas Cry1Ac, toxina o pro toxina, por 24 horas. Las concentraciones utilizadas fueron: 2.5, 5, 10, 25, 50, 100 o 250  $\mu$ g.

Pasadas 24 h de estímulo con las proteínas Cry1Ac, se eliminó el medio de cultivo que contenía el estímulo de las proteínas Cry1Ac y se agregó medio nuevo con 10% de MTT. El reactivo se dejó en los pozos por 4 horas. Después de este tratamiento el sobrenadante de los pozos fue retirado cuidadosamente sin dañar los cristales de formazan producidos por las células viables. Los cristales fueron solubilizados utilizando 30  $\mu$ L de isopropanol por pozo, Las lecturas colorimétricas se realizaron utilizando un espectrofotómetro Ex800 a 560nm. La absorbancia obtenida de las células sin tratamiento se utilizó como referencia del 100% de viabilidad.

### **Alamar Blue**

Con este ensayo de viabilidad celular se evaluó el efecto crónico de las proteínas Cry1Ac sobre las células HCT116, para esto se monitoreó la viabilidad celular ante un estímulo crónico de 96 horas con las proteínas Cry1Ac toxina o protoxina.



Se sembraron 48 pozos con un total de  $5 \times 10^4$  células HCT116 con 200 $\mu$ l de medio RPMI, en una placa de 96 pozos, los pozos se dividieron en 4 grupos: estimulados durante 24, 48, 72 o 96 horas, estos grupos a su vez contenían los siguientes tratamientos: grupo control (sin tratamiento con proteínas Cry1Ac) y 3 grupos estimuladas con dosis crecientes de las proteínas Cry1Ac, 10, 25 o 50  $\mu$ g de toxina o pro toxina Cry1Ac (figura 5). Cada 24 horas se les adicionó medio y estímulo nuevo a los grupos de 48-96 horas.

La viabilidad celular fue medida cada 24 horas (24, 48, 72 y 96 h), el reactivo Alamarblue se adicionó 4 horas antes de realizar la lectura a una concentración de 10% v/v (20 $\mu$ L). La fluorescencia de cada pozo fue medida con ayuda de un fluorometro a excitación a 530 y emisión a 590 se determinó la viabilidad celular diaria. Para este ensayo se tomó como 100% de viabilidad celular la fluorescencia emitida por las células sin tratamiento.

### **Ensayo de cierre de herida**

Para evaluar si las proteínas Cry1Ac inducían TEM, se midió la capacidad de migración celular. Por el ensayo de cierre de herida células HCT116. Se realizó el ensayo por 48 horas sembrando  $1 \times 10^5$  células al 3%SFB, en una placa de 24 pozos con 500 $\mu$ L de medio, se dejaron adherir y con una punta de 200 $\mu$ L se realizaron 2 heridas perpendiculares en el fondo de cada pozo como se muestra en la fig 9. Se añadieron los siguientes tratamientos: 30 $\mu$ g de pCry1Ac o tCry1Ac y células sin tratamiento. Las fotografías muestran imágenes representativas obtenidas con un microscopio óptico a un aumento 10X. Este experimento se realizó con 3 ensayos independientes.

Cierre de herida células CTR-1790. Se realizó el ensayo por 48 horas sembrando  $1 \times 10^5$  células al 3%SFB, en una placa de 24 pozos con 500 $\mu$ L de medio, se dejaron adherir y con una punta de 200 $\mu$ L se realizaron 2 heridas perpendiculares en el fondo de cada pozo como se muestra en la fig 10. Siguiendo los siguientes tratamientos: 30 $\mu$ g de pCry1Ac o tCry1Ac y células sin tratamiento. Las fotografías muestran imágenes representativas obtenidas con un microscopio óptico a un aumento 10X. Este experimento se realizó con 3 ensayos independientes.

# R

esultados.

## **Obtención y conjugación de las proteínas Cry1Ac.**

Se realizó la producción y purificación de las proteínas a partir de *E.Coli* recombinante que expresa Cry1Ac

Cry1Ac protoxina y toxina con pesos de 130kDa y 65 kDa respectivamente, se corrieron en un SDS-Page de poliacrilamida al 10% para corroborar su pureza y peso molecular (Fig.1A).

Posteriormente el stock de éstas proteínas se dividió para su conjugación con perlas de sefarosa o bien para realizar la conjugación a biotina. Se corroboró la correcta conjugación de las proteínas Cry1Ac tanto a la sefarosa como a la biotina (Fig. 1B y C) ya que se obtuvieron las bandas proteicas de los pesos esperados. Este resultado es parte importante para la realización de los ensayos posteriores, teniendo ambas conjugaciones exitosas se procedió a realizar los ensayos correspondientes para la investigación.

La figura 1B muestra las proteínas Cry1Ac protoxina y toxina obtenidas de la disociación por calor de las proteínas unidas a las perlas de sefarosa. Las proteínas disociadas por calor, se corrieron en un gel de poliacrilamida al 10%, revelando las bandas esperadas, para la pCry1A 130kDa y para la tCry1Ac 65kDa Las proteínas conjugadas a la sefarosa se utilizaron para realizar los ensayos de afinidad. En la figura 1 se muestran las bandas de las proteínas Cry1Ac biotiniladas. Las cuales se validaron utilizando estreptavidina DYE-800 sobre un inmuno-blot. Estas proteínas biotiniladas fueron utilizadas para validar las proteínas obtenidas por la columna de afinidad y que seguían siendo reconocidas por las proteínasCry1Ac.

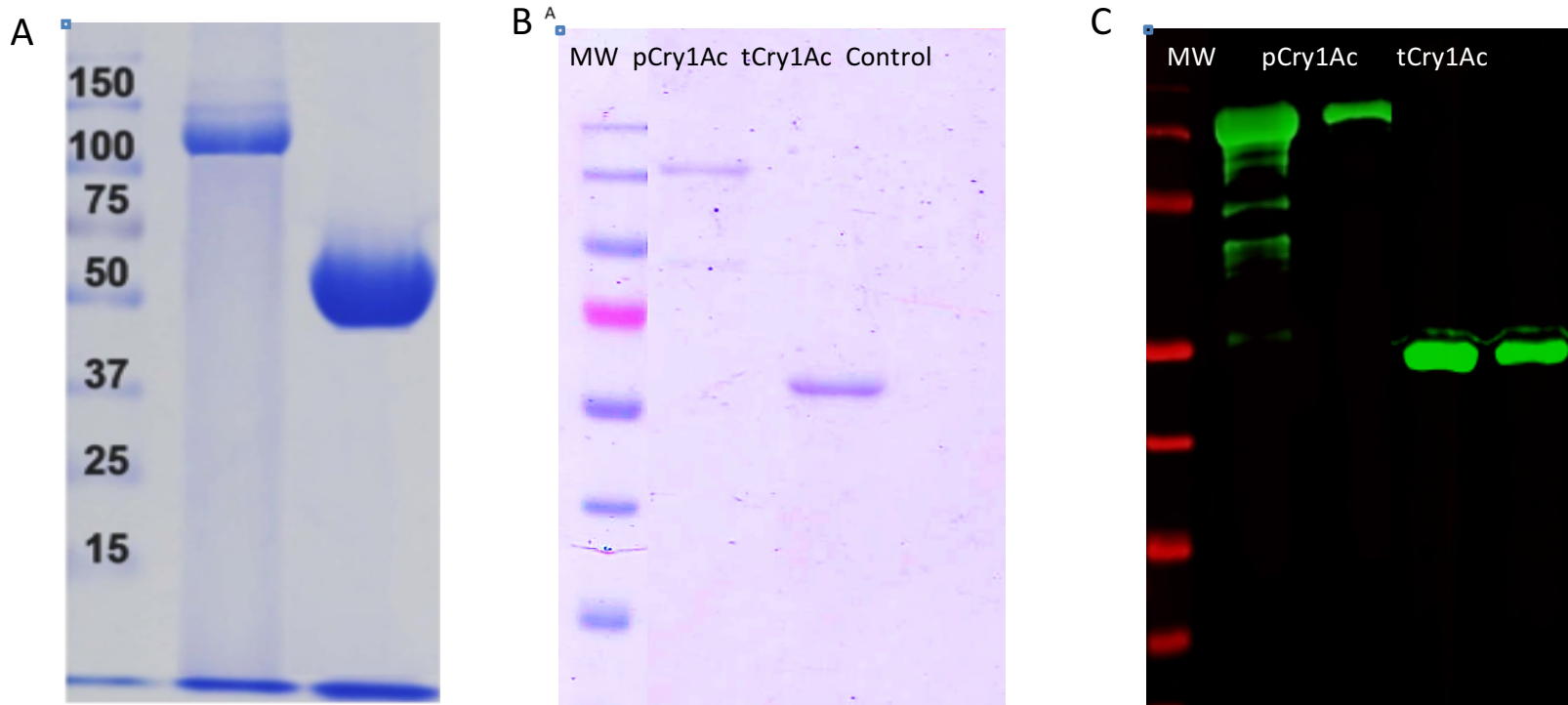
## **Activación de MAPK's inducida por las proteínas Cry1Ac.**

Para nuestro primer objetivo del trabajo se determinó si las proteínas Cry1Ac eran capaces de activar vías MAPK, ERK 1/2, JNK y p38 ya que estas vías son activadas por estímulos extracelulares. Para determinar si la unión de las proteínas Cry1 Ac en la superficie de las células HCT116 actúa como un estímulo extracelular que desencadene vías de señalización se realizaron cursos temporales de activación; estimulando con la protoxina o toxina Cry1Ac a las células epiteliales de intestino HCT116.

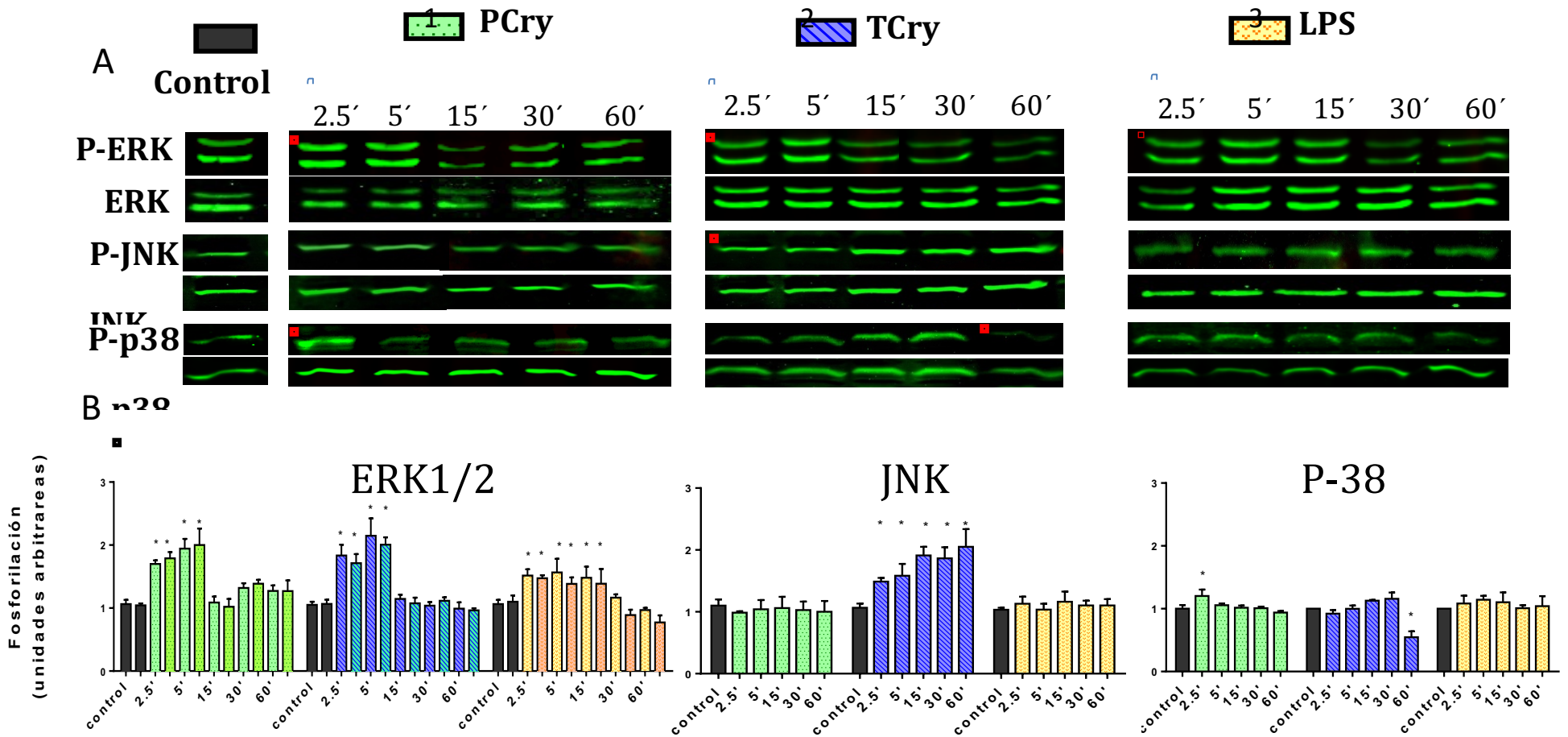
Los resultados obtenidos de la estimulación con pCry1Ac muestran que la protoxina Cry1Ac indujo la activación de la vía ERK 1/2 a los 2.5' y 5'; en el caso de JNK no se observaron cambios y para p38 mostró activación a los 2.5' y 5' (Fig.2 A. resultados de 4 ensayos independientes.)

La activación inducida por tCry1Ac sobre las células epiteliales de intestino se observa en la Fig. 2 B. La activación de ERK1/2 se observó a los 2.5' y 5', la vía JNK no se ve afectada por la estimulación con tCry1Ac en las células epiteliales HCT116, mientras que la vía de p38 se ve una fosforilación a tiempos tempranos 2.5' y 5'. Estos son resultados de 4 ensayos independientes. Como control positivo de activación se utilizó 3µg de LPS. La activación inducida por ambas proteínas Cry1Ac, observada en la línea celular de células epiteliales de colon es específica, ya que el curso temporal de activación es distinto entre las proteínas Cry1Ac y el LPS, por lo tanto podemos decir que las proteínas Cry1Ac están modulando la activación de las MAPK ERK 1/2 y p38.

La fosforilación diferencial que se observó en estos ensayos es indicativa de que la unión de Cry1Ac sobre el epitelio es un evento que desencadena vías de señalización, la modulación de estas vías así como los efectos directos que se inducen son interrogantes que se pretenden resolver en estudios posteriores.



**Figura 1. Proteínas Cry1Ac.** A) En la figura se observan las bandas esperadas para las proteínas Cry1Ac en el carril 2 se observa pCry1Ac y tCry1Ac en el carril 3. B) **Proteínas Cry1Ac disociadas de perlas de sefrosa**, En la figura se muestran las bandas de las obtenidas al disociar las proteínas conjugadas a las perlas de sefrosa, en el carril 2 se observa pCry1Ac y tCry1Ac en el carril 3. En el caso del 4<sup>to</sup> carril no se observa ninguna banda ya que se bloquearon las aminas primarias evitando así la unión de proteínas a estas perlas y con el fin de utilizarlas como control negativo. C) **Proteínas Cry1Ac biotiniladas**, En la figura se observan las bandas de las proteínas Cry1Ac biotiniladas, se validaron con streptavidina DYE800, en el carril 2 y 3 se observa pCry1Ac y tCry1Ac en el carril 4 y 5.



**Fig 2. Las proteínas Cry1Ac, toxina y protoxina activan MAPKs ERK1/2 y JNK.** La figura muestra una cinética de activación por la fosforilación de MAPKs ERK1/2, JNK y p38 en las células HCT116 al estimularlas con 20µg/ml de protoxina Cry1Ac o toxina Cry1Ac, para el control positivo de activación se estimuló con 3µg/ml de LPS. Como control de carga se utilizó la forma no fosforilada de las MAPKs **A) Fosforilaciones obtenidas de ERK1/2, JNK y p38.** **A1 Activación por protoxina Cry1Ac (pCry1Ac)** se observa la fosforilación de ERK1/2 a los 2.5 y 5 minutos comparados contra el control, en el caso de JNK no hay activación significativa con el estímulo de la protoxina Cry1Ac, mientras que para p38 se observa una activación discreta a las 2.5 minutos. **A2 Activación por toxina Cry1Ac (tCry1Ac),** se observa fosforilación de ERK1/2 y p38 a 2.5 y 5 minutos, en el caso de JNK la activación se observa de manera creciente durante los 60 minutos alcanzando su pico de fosforilación a los 60 minutos, mientras que para p38 se observa una regulación a la baja hasta los 60 minutos con el estímulo, no parece estar siendo activada con los estímulos de las proteínas Cry1Ac. **A3 Control positivo con LPS** muestra una activación diferente en la vía de ERK1/2 ya que la vía se activó durante más tiempo, hasta los 15 minutos, en comparación con las proteínas Cry1Ac mientras que tuvieron activación únicamente de 2.5 a 5 minutos, para las cinasas JNK y p38 estas no mostraron activación comparadas contra las células control. **B) Densitometrías** se muestra en color negro la fosforilación basal de las 3 cinasas estudiadas, de ahí observamos fosforilaciones estadísticamente significativas para ERK 1/2 (pCry1Ac, tCry1Ac y LPS) JNK (tCry1Ac). Las bandas muestran el promedio de 3 repeticiones por ensayo, con  $p < 0.05$ .

## **Identificación de proteínas de unión**

Una vez demostrado que las proteínas Cry1Ac actuaban como estímulos extracelulares capaces de activar vías de señalización, se inició la búsqueda de las proteínas de unión que participaban en el reconocimiento de las proteínas Cry1Ac en la superficie de las células de colon. Para este ensayo se utilizaron perlas de sefarosa conjugada con las proteínas Cry1Ac toxina o protoxina, como control negativo se utilizaron perlas de sefarosa con los sitios de unión a proteínas bloqueados previamente y se procedió a la realización de las precipitaciones por afinidad.

Las proteínas precipitadas se validaron mediante un blot-ligando utilizando las proteínas Cry1Ac conjugadas a biotina, y se encontró que las proteínas Cry1Ac toxina y protoxina seguían reconociendo proteínas en su forma desnaturalizada Fig. 3.

Así mismo las bandas obtenidas por las precipitaciones por afinidad se mandaron a identificar por MALDI-TOF-TOF Fig.4. Los peptidos obtenidos por la digestión con tripsina, se compararon contra la base de datos de peptidos humanos y peptidos murinos. Dentro de las proteínas reportadas dentro del genoma humano obtuvimos: la proteína luminal de epididimo la cual es una proteína tipo vimentina, histonas, ribonucleoproteínas, y lamina, los cuales se muestran en la tabla 2, para pCry1Ac y tabla 3 en el caso de tCry1Ac.

Por otra parte comparando los peptidos identificados en MASAS, contra secuencia del genoma murino obtuvimos correspondencia de secuencias para vimentina, actina y galectina, proteínas que comparten más del 90% de homología con la secuencia de humano, dada esta elevada correspondencia entre proteínas estudiadas, se decidió buscarlas en las precipitaciones por afinidad y así mismo se decidió comparar la homología de las proteínas HSP70 y alfa-enolasa, proteínas murinas reportadas como posibles receptores de pCry1Ac en macrófagos murinos RAW264, si estas presentaban una homología mayor al 90% se decidió que también se tratarían de identificar en las precipitaciones por afinidad. Este análisis se muestran en la tabla 4.

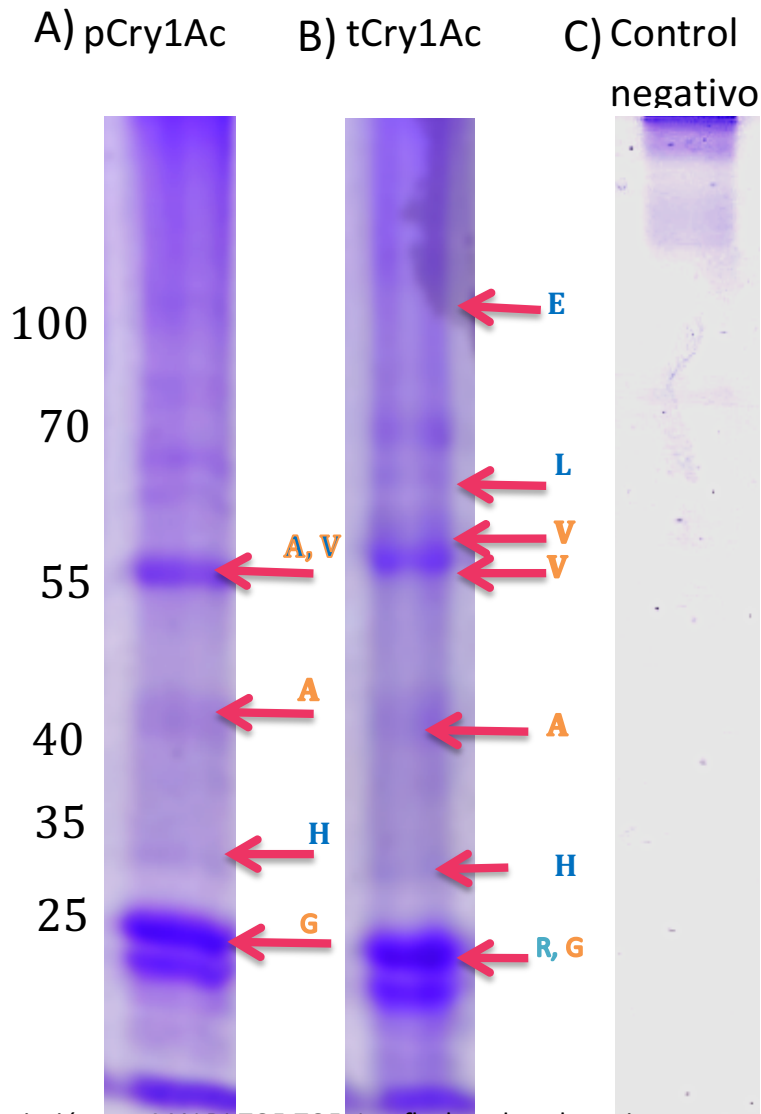


Figura 3. Bandas enviadas a secuenciación por MALDI TOF-TOF. Las flechas de color rojo muestran las bandas identificadas por MASAS, para ambas precipitaciones, las letras de color azul muestran los resultados de proteínas humanas, mientras que las letras de color verde muestran la identificación de proteínas en genoma murino que tienen una homología de más del 95% para la proteína humana. Para el caso de la protoxina Cry1Ac se reconocieron proteínas como histona, ribonucleoproteína, lamina y proteína luminal de epidídimo (vimentina) humanas, además, actina, galectina murina y vimentina. Para el caso de la toxina Cry1Ac, se obtuvieron más bandas identificadas, entre las que se comparten la proteína luminal de epidídimo, lamina y la ribonucleoproteína humana, junto galectina, actina y vimentina reconocidas en genoma murino. Así mismo se muestra el carril de una precipitación realizada con perlas de sefrosa sin proteínas unidas, donde no se observaron bandas.

Tabla 2 Proteínas humanas identificadas en las precipitaciones por afinidad pCry1A

ID Investigador	Total	% Cov	Accession #	Name	Species	Peptidos Ma
L	6.57	29	tr W8QEH3 W8QEH3_HU	Lamin A/C OS=Homo sa GN=LMNA PE=3 SV=	HUMAN	2
V	33.73	67.2	tr V9HWE1 V9HWE1_HU	Epididymis luminal protei OS=Homo sapiens GN=H PE=2 SV=1	HUMAN	17
R	11.47	26.6	tr A0A024RA61 A0A024RA6 N	Heterogeneous nucle ribonucleoprotein A2/B1, is CRA_c OS=Homo sapi GN=HNRPA2B1 PE=4 S	HUMAN	5

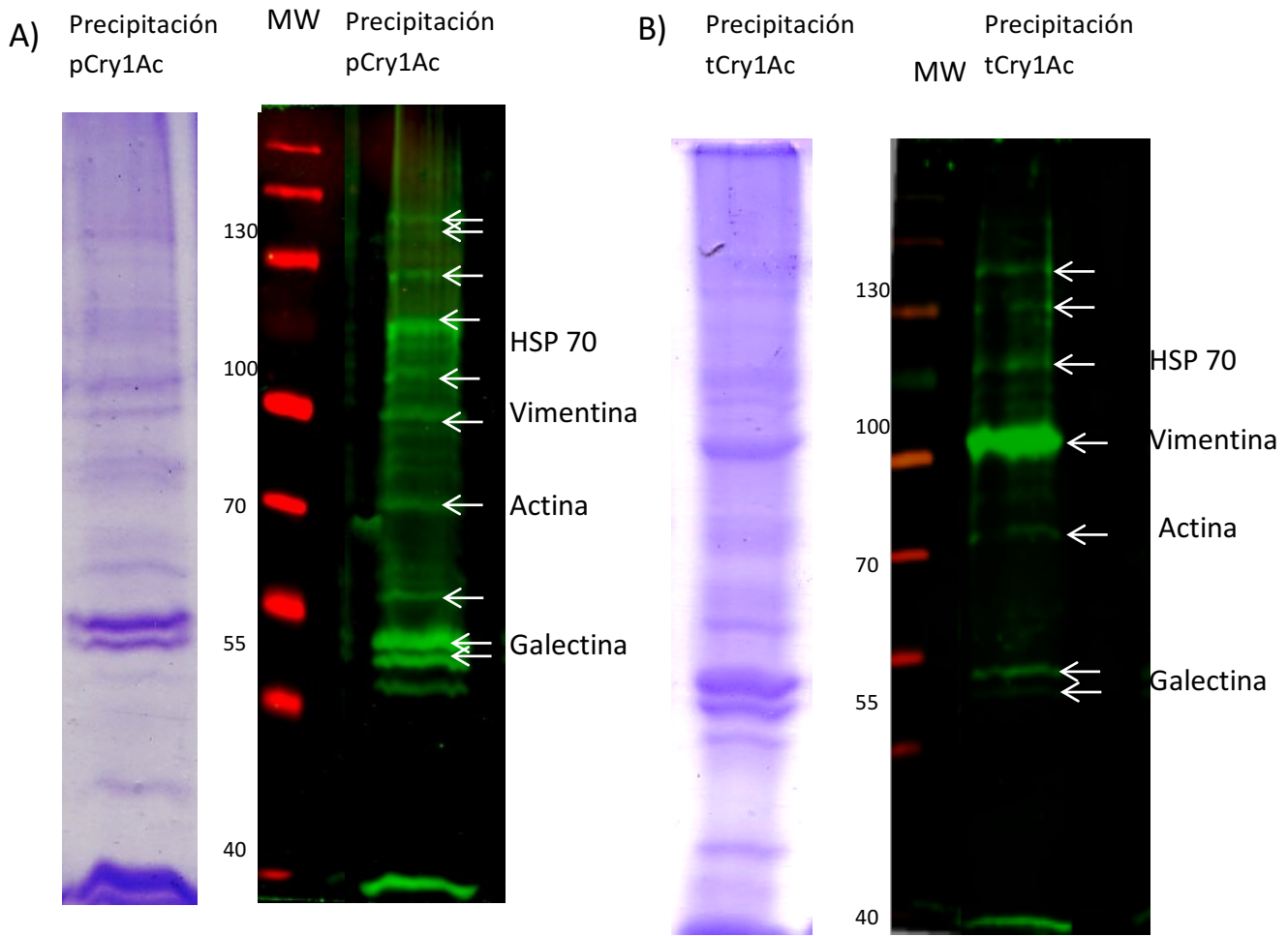
Tabla 3 Proteínas humanas identificadas en las precipitaciones por afinidad tCry1Ac

ID Investigador	Unused	Total	% Cd	Accession #	Name	Species	Peptidos Ma
L.	2.93	2.93	10.3	tr W8QEH3 W8QEH3_#	Lamin A/C OS=Homo sapiens G PE=3 SV=1	HUMA	1
9.	10.91	10.91	27.8	tr Q8WVW5 Q8WVW5_#	Putative uncharacterized pro (Fragment) OS=Homo sapiens SV=1	HUMA	4
V	25.57	25.57	46.6	tr V9HWE1 V9HWE1_#	Epididymis luminal protein 113 O sapiens GN=HEL113 PE=2 S	HUMA	13
R	16	16	28.3	tr A0A024RA61 A0A024 UMAN	Heterogeneous nuclear ribonucle A2/B1, isoform CRA_c OS=H sapiens GN=HNRPA2B1 PE=4	HUMA	8
H.	2	2	31.5	sp P16104 H2AX_HU	Histone H2AX OS=Homo sa GN=H2AFX PE=1 SV=2	HUMA	1



Tabla 4 Homología entre péptidos murinos y humanos

NOMBRE	HUMAN SEQUENCE	MOUSE SEQUENCE	IDENTITY %
<b>VIMENTIN</b>	Protein homology	97.4 %	
	SLYASSPPGGYTR	SLYSSSPGGAYVTR	85.7 %
	LLQDSVDFSLADAINTEFK	LLQDSVDFSLADAINTEFK	100 %
	VELQELNDR	VELQELNDR	100 %
	ILLAELEQLK	ILLAELEQLK	100 %
	EEAENTLQSF	EEAENTLQSF	100 %
	KVESLQEEIAFLK	KVESLQEEIAFLK	100 %
	NLQEAEEWYK	NLQEAEEWYK	100 %
	EMEENFAEAANYQDTIGR	EMEENFAEAANYQDTIGR	94.7 %
	EYQDLLNVK	EYQDLLNVK	100 %
	ISLPLPFSSLNLR	ISLPLPTFSSLNLR	92.8 %
	ETNLDSLPLVDTHSK	ETNLDSLPLVDTHSK	100 %
<b>GALECTIN 3</b>	Protein homology	79.7 %	
	LPGGVMPR	LPGGVPR	87.5 %
	RGNDVAFHFNPR	RGNDVAFHFNPR	100 %
	IQVLVEPDHFK	IQVLVEPDHFK	100 %
<b>ACTIN 1-β</b>	Protein homology	100 % / Peptides homology	100 %
<b>PRE-LAMINA A/C</b>	Protein homology	97 % / Peptides homology	100 %
<b>HSP-70</b>	Protein homology	95.3 %	
<b>ENOLASA ALPHA</b>	Protein homology	94.7 %	



**Figura 4. Proteínas obtenidas por columna de afinidad y reveladas con Cry1Ac biotinilada,** se realizaron las precipitaciones de afinidad para ambas proteínas pCry1Ac A) o tCry1Ac B), los cuales se corrieron junto con lisado celular total, para después ser transferidos a una membrana de nitrocelulosa donde se realizó un Bolot-ligando con las proteínas Cry1Ac biotiniladas para obtener las bandas de las proteínas que eran reconocidas aun en forma desnaturalizada por las proteínas Cry1Ac; Se validaron las proteínas Cry1Ac biotiniladas con estreptavidina Dye-800. En ambas imágenes A.2 y B.2 se muestran las bandas reveladas, y se observan a la izquierda A.1 y B.1 que muestran las mágenes de los geles teñidos con coomassie siguiendo en ambas imágenes el siguiente orden de muestras en los carriles: 1-lisado total, 2-Precipitación por afinidad con pCry1Ac o tCry1Ac, carril 3 precipitación por afinidad con perlas control negativo.

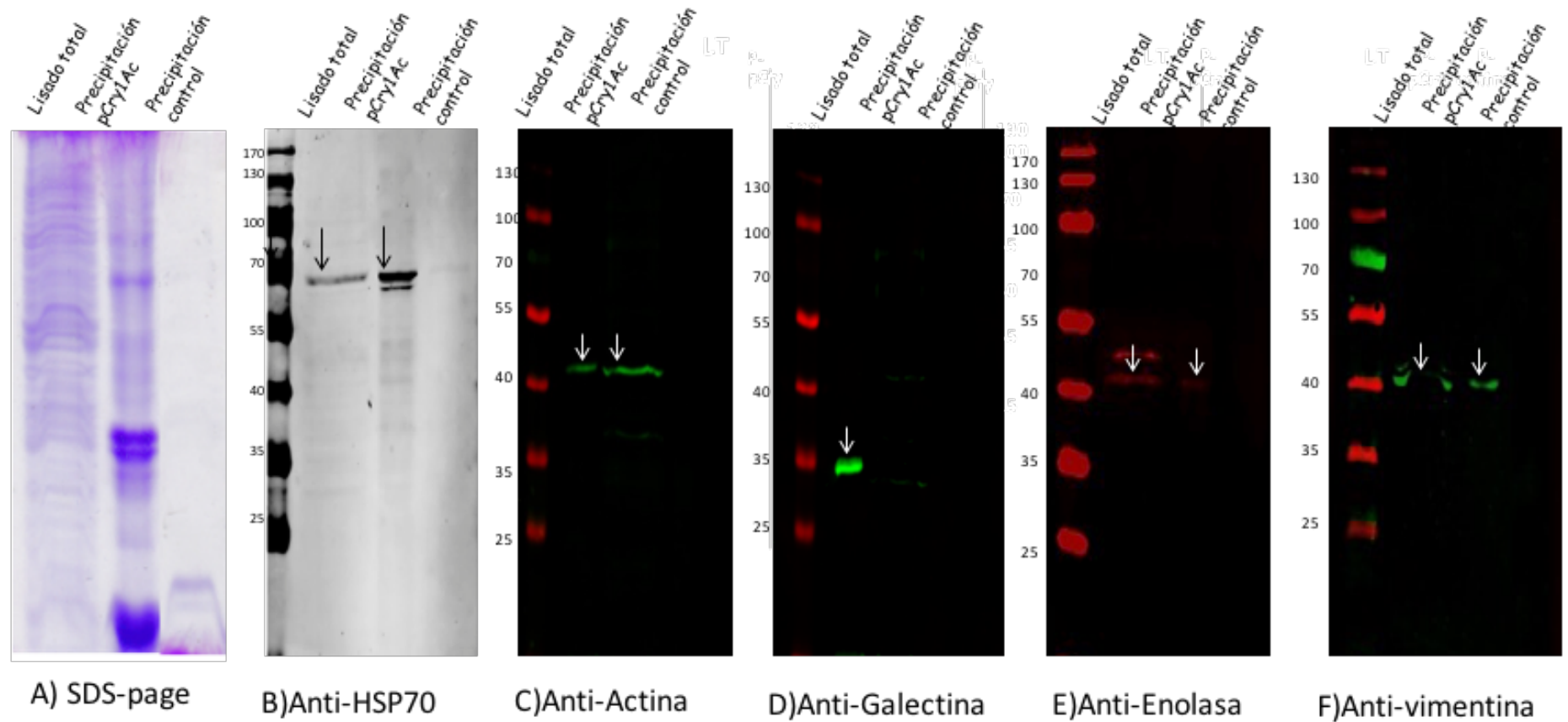
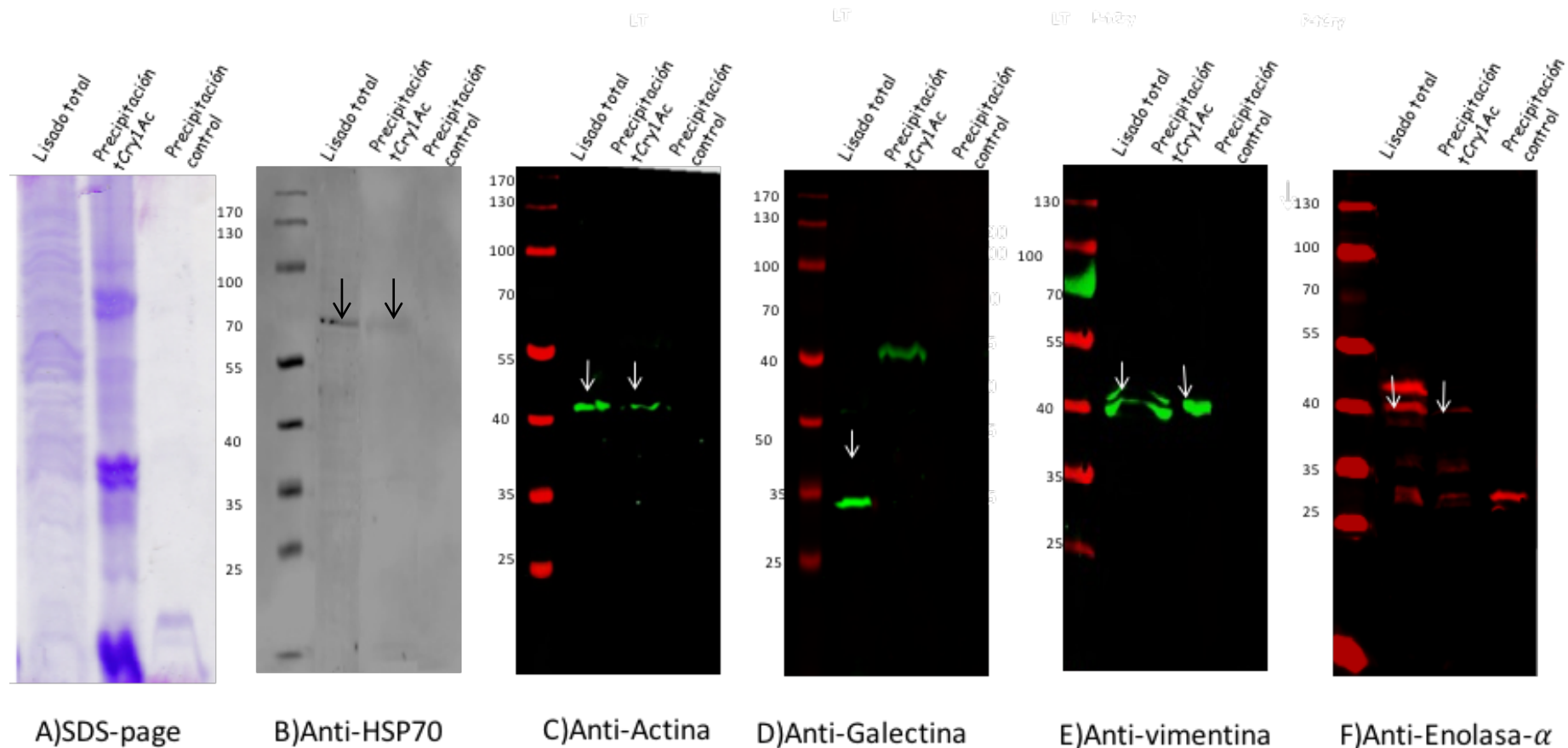


Figura 5. La protoxina Cry1Ac es reconocida por proteínas específicas en células epiteliales HCT116. A) La figura muestra en los carriles de izquierda a derecha, lisado total de las células HCT116 (LT), precipitaciones realizadas con la toxina Cry1Ac acoplada a sefarosa (P-pCry), y precipitación con perlas de sefarosa sin proteínas Cry1Ac unidas (P- Control) teñido con azul de comassie. B) Se revela la banda de 70kDa correspondiente a HSP70 en el carril de LT y P-pCry1Ac. C) Se observa la banda de 45kDa correspondiente a actina en el carril de LT y P-pCry1Ac. D) Banda obtenida al validar contra galectina, se observa una banda de 27kDa que corresponde a galectina 3 en el carril de LT únicamente. E) Se observa la banda correspondiente a la alfa enolasa con peso de 43 kDa en los carriles LT y muy tenue en P-pCry1Ac. F) Bandas reveladas con anti-vimentina, se observan bandas de 40kDa tanto en LT como en P-pCry1Ac.



**Figura 6. La Toxina Cry1Ac son reconocidas por proteínas específicas en las células epiteliales HCT116. A)** Se muestra el gel de las transferencias teñido con azul de comassie, los carriles de izquierda a derecha son, lisado total de células HCT116 (LT), precipitaciones por afinidad realizadas con la toxina Cry1Ac acoplada a sefarosa (P- tCry), y precipitación por afinidad con perlas de sefarosa sin proteínas Cry1Ac unidas (P-Control). **B)** se observa una banda de 70kDa correspondiente a HSP70 en el carril de LT y en el carril de P-tCry1Ac. **C)** Se observa la banda de 45kDa correspondiente a actina en el carril de LT y P-tCry1Ac. **D)** Bandas obtenidas al identificar contra galectina, se observa una banda de 27kDa que corresponde a galectina 3 en el carril de LT únicamente. **E)** Bandas reveladas con anti-vimentina, se observan bandas de 40kDa tanto en LT como en P-tCry1Ac. **F)** Se observa una banda de 43 kDa correspondiente a la alfa enolasa en los carriles LT y en P-tCry1Ac. , todas las bandas se marcan con una flecha.

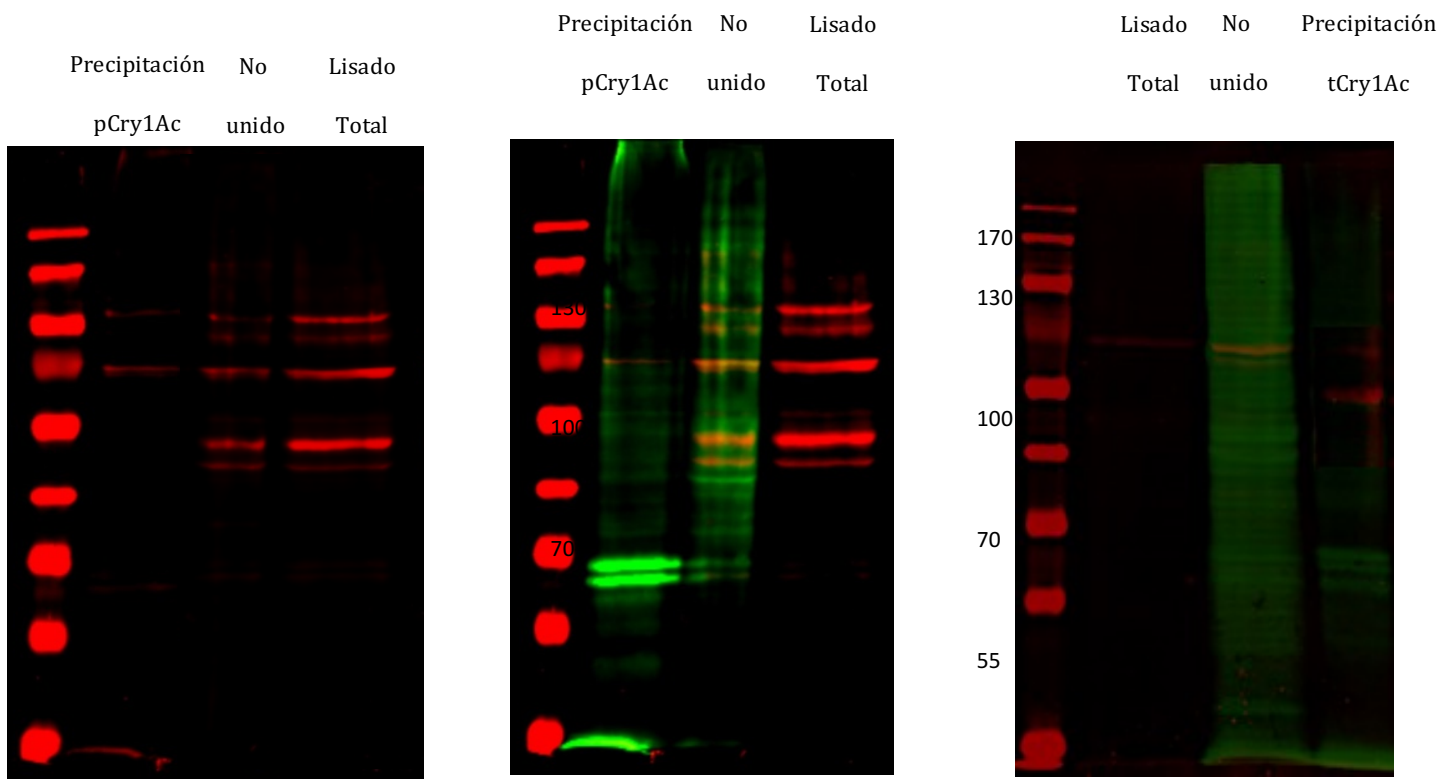


Figura 7. **HSP70 es reconocida en precipitaciones por afinidad realizadas con proteínas de membrana de la línea celular HCT116.** A) Se reconoce HSP70 en el carril 1, precipitación por afinidad con pCry1Ac, carril 2 proteínas no unidas a la protoxina Cry1Ac durante la precipitación por afinidad y carril 3 lisado total de células HCT116. B) co-proteínas de membrana marcadas con biotina (verde) y HSP70 (rojo) en las muestras analizadas, se observa que la banda de HSP70 presente en la precipitación por afinidad (carril 1) se marca también con fluorescencia verde, propia de las proteínas de membrana, mostrada como tonalidad amarilla. C) Precipitación por afinidad de HSP70 con tCry1Ac, en el carril uno se muestra la banda de HSP70 obtenida de un lisado celular total de la línea HCT116, carril dos se muestra en verde la fluorescencia dada por proteínas de membrana y en rojo HSP70, en el tercer carril se muestran

Como se mencionó anteriormente, entre las proteínas identificadas en las precipitaciones por afinidad, se encuentran proteínas intracelulares como: ribonucleoproteínas, vimentina, actina y galectina, las cuales son proteínas intracelulares. Los resultados no arrojaron evidencia de presencia de proteínas membranales, sin embargo no se descarta que no las hubiera, debido a que no se obtuvieron datos de todas las bandas que se mandaron a identificar. Debido a esto, se decidió identificar dentro de las precipitaciones a la proteína de membrana HSP70, la cual fue identificada previamente como proteínas de unión en macrófagos y la cual posee 95% de homología con HSP70 humana (Rubio-Infante et. al. 2017).

La presencia de todas las proteínas antes mencionadas se corroboraron utilizando anticuerpos específicos hacia éstas en inmuno-blots de las precipitaciones de afinidad, las cuales se muestran para el caso de protoxina Fig. 4. y toxina Fig. 5, en ambas figuras se muestran precipitados con perlas control negativo en el tercer carril (perlas sin proteínas unidas y previamente bloqueadas). Para estos ensayos se utilizaron anticuerpos anti-HSP70 panel B, anti-actina panel C, anti-galectina panel D, vimentina panel E y anti- $\alpha$ -enolasa panel F. Dentro de las proteínas reveladas, dos de ellas se han propuesto como posibles proteínas de unión en macrófagos, HSP70 y  $\alpha$ -enolasa.

Las bandas reveladas demuestran que la proteína de choque térmico 70, alfa enolasa, actina y vimentina son reconocidas en las precipitaciones por afinidad de la protoxina Cry1Ac. Mientras que para la toxina se observó HSP70, actina,  $\alpha$ -enolasa, y vimentina.

Debido a que las proteínas precipitadas corresponden principalmente a proteínas intracelulares, se procedió a realizar precipitaciones marcando previamente con biotina la superficie celular. Se realizó el revelado para HSP70 únicamente, ya que es una proteína que puede encontrarse en la membrana celular y previamente se demostró que en macrófagos juega un papel fundamental para la activación de ERK1/2 (Rubio-Infante et al. 2017). Los resultados de esta precipitación corroboraron que entre las proteínas de superficie celular precipitadas con pCry1Ac se encuentra HSP70. (Fig.6-B y C).

Por otra parte dentro de las proteínas reconocidas en las precipitaciones por afinidad se encuentran HSP70, enolasa alfa, vimentina y actina, proteínas que igualmente fueron identificadas en las

precipitaciones de macrófagos. La identificación de las mismas proteínas candidatas a receptor en macrófagos sobre células epiteliales de intestino es un indicador confiable de que estas proteínas puedan estar participando en el proceso de reconocimiento de las proteínas Cry1Ac aunque no se descarta que sean parte de un complejo proteico compuesto por las proteínas reconocidas en las precipitaciones por afinidad.

Dentro de las proteínas reconocidas en la precipitación por afinidad destaca HSP70 pues se ha descrito que también en macrófagos es una proteína de unión a las proteínas Cry1Ac (Rubio-Infante 2017). La HSP70 es una proteína chaperona que se encuentra de manera constitutiva en el citoplasma celular o bien puede expresarse en membrana en condiciones de estrés además cumple con múltiples funciones dentro de la célula (Daugaard M. et al. 2007), dentro de las cuales se ha reportado que participa en la fosforilación de ERK 1/2 (Keller et al 2008).

Debido a que las células con las que trabajamos HCT116 son una línea celular cancerosa, se decidió realizar ensayos de unión en células no inmortalizadas de colon murino, las cuales fueron tratadas con pCry1Ac o tCry1Ac conjugadas a FIT-c, y posteriormente se identificó HSP70, las imágenes se obtuvieron por microscopía confocal. Los resultados obtenidos muestran que HSP70 y las proteínas Cry1Ac tCry1Ac y pCry1Ac se encuentran en la zona basal de las células epiteliales murinas. (Fig.8) para el caso de pCry1Ac se observa una mayor colocalización con HSP70 en la zona lateral de las células de colon.

Se corroboró de esta forma la presencia de HSP70 en superficie y como candidato a proteína de unión hacia las proteínas Cry1Ac en la superficie de las células epiteliales humanas. Además sabiendo que esta proteína, HSP70, es sobre expresada debido a señales de daño y se encontró aumentada la fosforilación en JNK, la cual es una vía involucrada en apoptosis celular, se realizaron ensayos de citotoxicidad, para probar la bioseguridad de las proteínas Cry1Ac, toxina y protoxina. Para esto se realizaron pruebas de Alamar Blue y MTT, ante un estímulo crónico o agudo de las proteínas Cry1Ac.

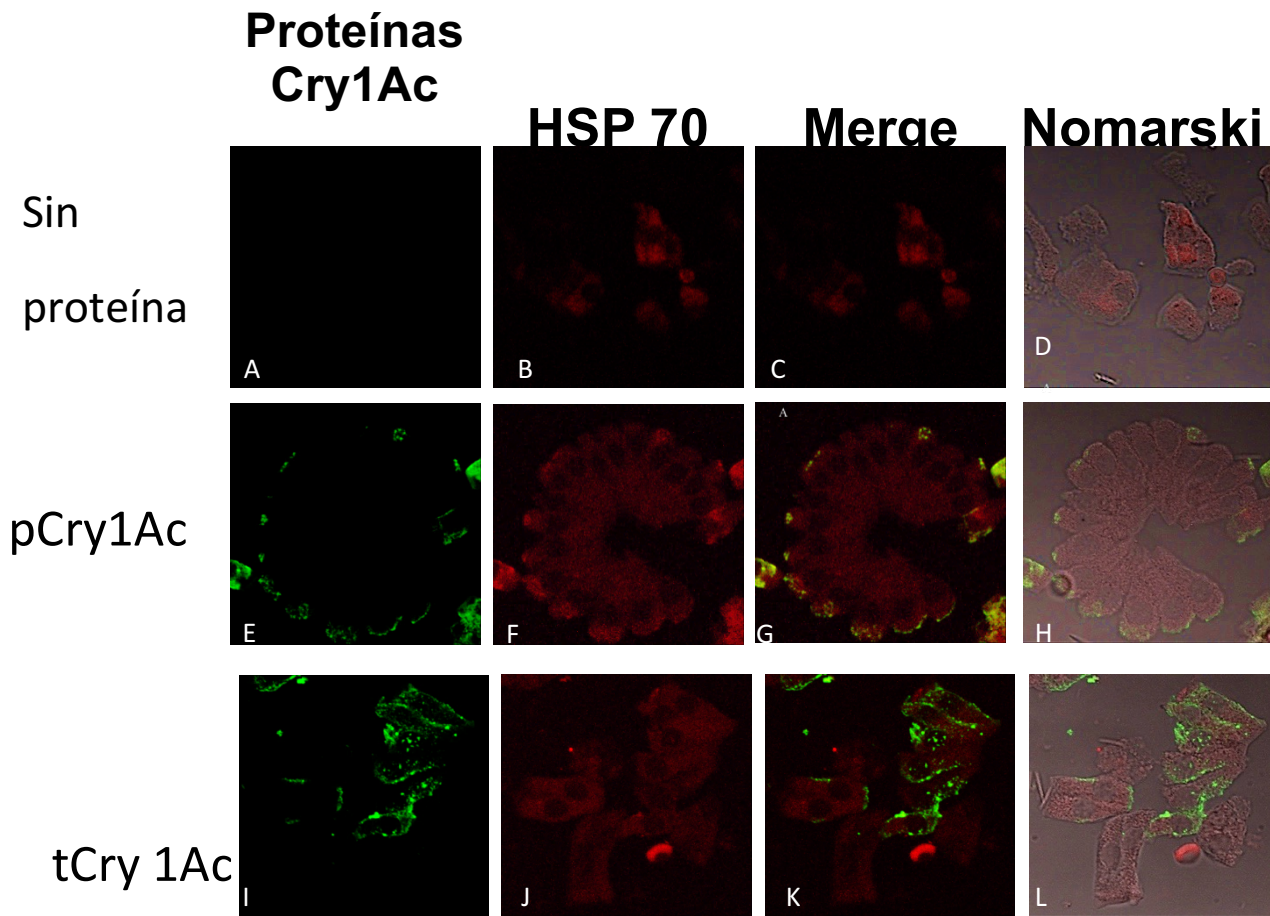


Fig.8. Células epiteliales obtenidas de colon de ratón BALB-c. Se realizó el ensayo por 1 hora con células de intestino de ratón las cuales fueron sembradas, en una placa de 24 pozos con 500 $\mu$ L de medio, se dejaron adherir y posteriormente se agregaron los tratamientos de 20 $\mu$ g de pCry1Ac o tCry1Ac, además de tener un grupo de células sin tratamiento. Las fotografías muestran imágenes representativas obtenidas con un microscopio confocal a un aumento 60X. La localización de HSP70 en las células sin tratar( B y C); en color verde se observa pCry1Ac panel E y G mientras que la toxina se observa , también marcada en verde en el panel I y K.



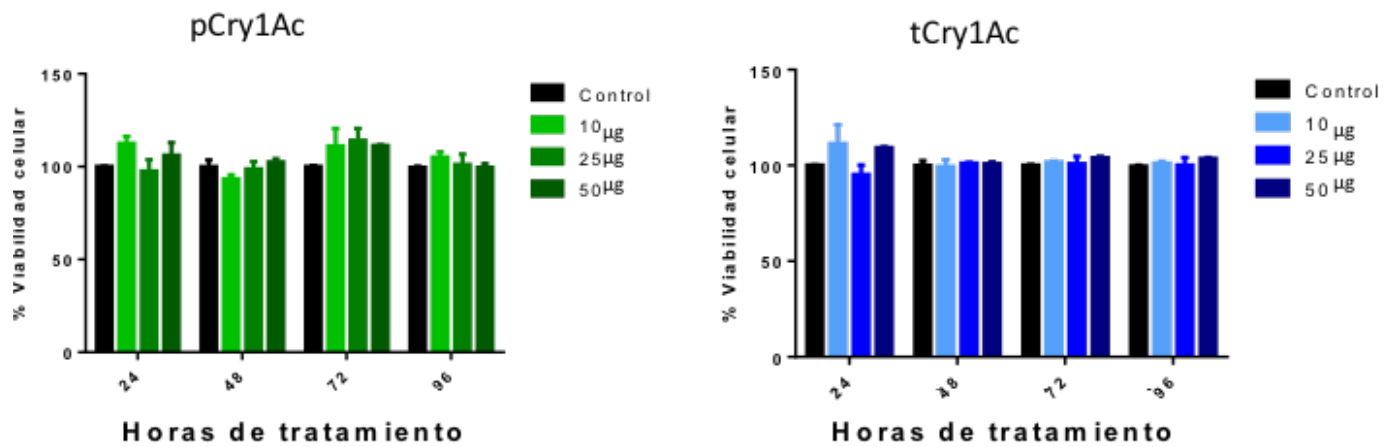
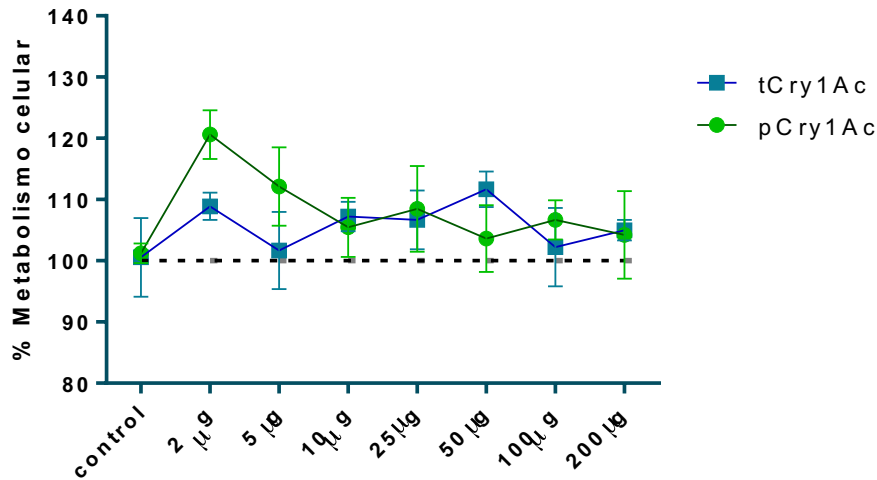


Fig.9 Viabilidad celular después de tratamientos crónicos o agudos con las proteínas Cry1Ac, toxina y protoxina. A) Viabilidad celular de las células HCT116 después de ser estimuladas durante 24h con concentraciones crecientes de las proteínas Cry1Ac, observando que no se ve afectada la viabilidad celular con los tratamientos. B) viabilidad celular obtenida cada 24 horas durante 4 días con el estímulo constante de B) pCry1Ac C)tCry1Ac donde se observa que no se inducen efectos tóxicos.

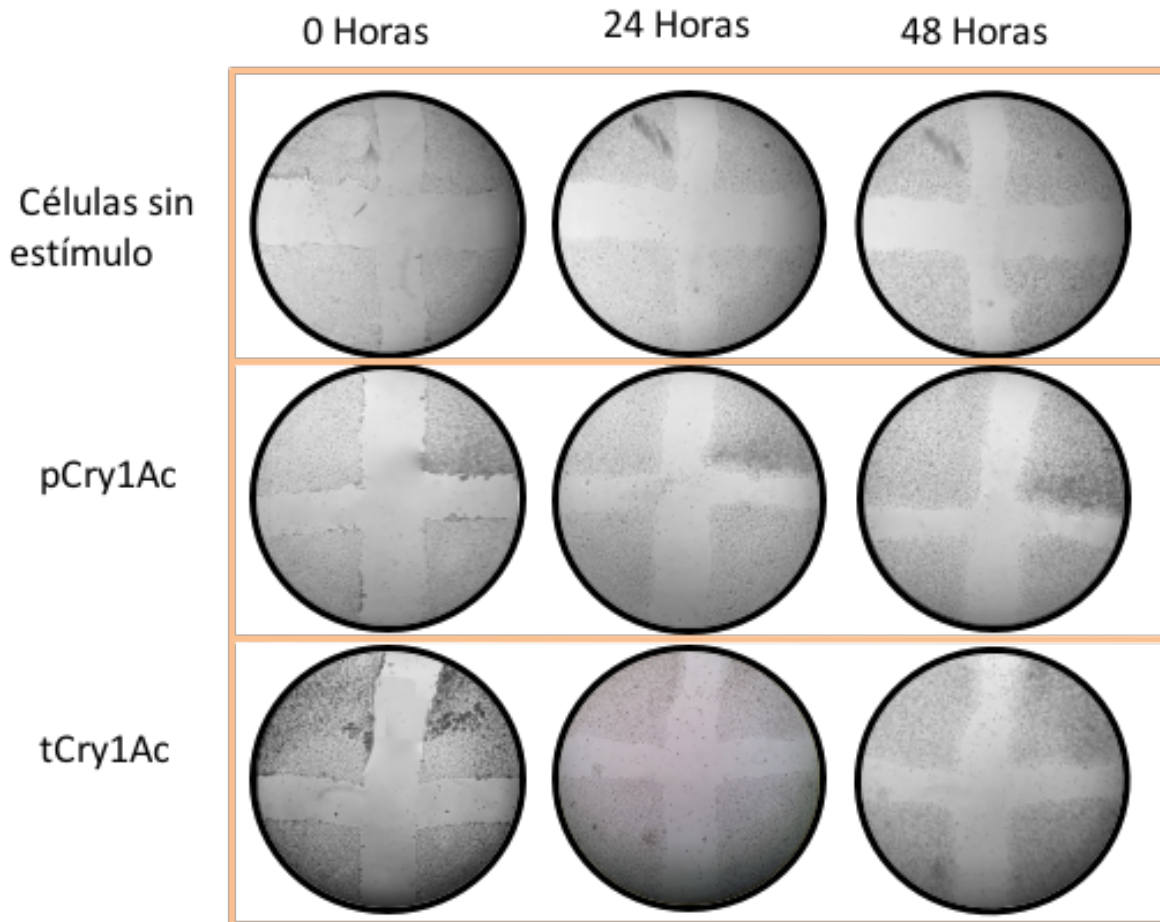


fig. 10 Cierre de herida células 1790. Se realizó el ensayo por 48 horas sembrando  $1 \times 10^5$  células al 2% SFB, en una placa de 24 pozos con 500  $\mu$ L de medio, se dejaron adherir y con una punta de 200  $\mu$ L se realizaron 2 heridas perpendiculares en el fondo de cada pozo como se muestra en las imágenes. Siguiendo los tratamientos de 30  $\mu$ g de pCry1Ac o tCry1Ac y células sin tratamiento. Las fotografías muestran imágenes representativas obtenidas con un microscopio óptico a un aumento 10X. Este experimento se realizó con 3 ensayos independientes.

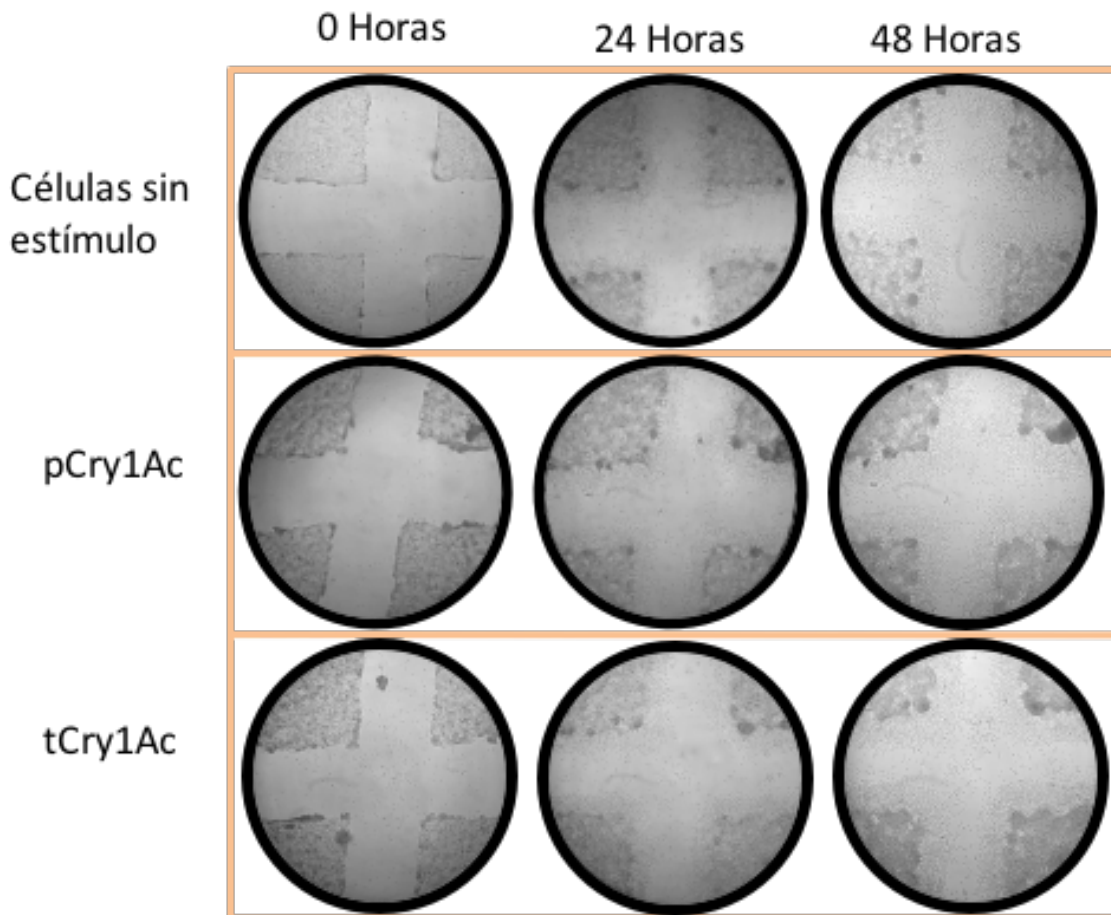


Fig. 11. Cierre de herida células HCT116. Se realizó el ensayo por 48 horas sembrando  $1 \times 10^5$  células al 2%SFB , en una placa de 24 pozos con  $500 \mu\text{L}$  de medio, se dejaron adherir y con una punta de  $200 \mu\text{L}$  se realizaron 2 heridas perpendiculares en el fondo de cada pozo como se muestra en las imágenes. Siguiendo los tratamientos de  $30 \mu\text{g}$  de pCry1Ac o tCry1Ac y células sin tratamiento. Las fotografías muestran imágenes representativas obtenidas con un microscopio óptico a un aumento 10X. Este experimento se realizó con 3 ensayos independientes.

Los resultados de estos ensayos muestran que las proteínas Cry1Ac, toxina y protoxina, no provocan efectos citotóxicos sobre células epiteliales de la línea celular HCT116 Fig. 9, ya que la viabilidad celular no se vio disminuida al menos hasta 72 horas con el estímulo de las proteínas Cry1Ac.

Sin embargo aunque no hubo daños celulares otra vía activada por el estímulo de las proteínas Cry1Ac fue la vía de ERK 1/2 la cual además de estar involucrada en procesos de división celular, es activada en el proceso de transición epitelio mesénquima junto con JNK. Por lo que se realizaron ensayos de migración celular para evaluar si las proteínas Cry1Ac favorecían la TEM. Fig 10 y 11.

Los ensayos de cierre de herida se realizaron con las células HCT116 y la línea no cancerosa CRC-1790 para descartar que la migración se viera favorecida por el fenotipo canceroso de la línea HCT116. Los resultados obtenidos de este ensayo arrojaron que en ninguna de las 2 líneas celulares se favoreció la TEM, al estimularlas con las proteínas Cry1Ac, como control negativo de migración se utilizaron células sin tratamiento.

## Análisis de Resultados y Discusión :

Los hallazgos más relevantes obtenidos en este trabajo fueron, el demostrar que las proteínas Cry1Ac activan MAPK's cinasas activadas por estímulos extracelulares, los cuales pueden estar mediados por la existencia de proteínas de unión hacia las proteínas Cry1Ac en células epiteliales humanas, dentro de las cuales podemos destacar a la proteína de choque térmico 70 (HSP70), esto corrobora a HSP70 como proteína de reconocimiento a las proteínas Cry1Ac en células de mamíferos, como se describió previamente en el artículo de Rubio- Infante 2017. Lo anterior se basa en los siguientes resultados: I) se demostró la capacidad de pCry1Ac y tCry1Ac para inducir la fosforilación de MAPK's ERK1/2 y JNK en células epiteliales de colon humano; II) se demostró que ambas proteínas Cry1Ac se unen a la superficie de células epiteliales de colon humano y se observó colocalización de pCry1Ac con HPS70 de superficie en colon murino, III) se demostró que la activación de estas cinasas no inducen efectos tóxicos ni de cambios en el fenotipo celular en las líneas HCT116 y CRL-1790. IV) se detectaron diversas proteínas de unión a pCry1Ac y tCry1Ac en células humanas de colon mediante ensayos de blot ligando y precipitación por afinidad; las cuales se identificaron mediante MALDI-TOF-TOF: HSP70,  $\alpha$ -enolasa, actina y vimentina, y su presencia se confirmó mediante ensayos de Western blot.

Estos resultados son relevantes, debido a que los estudios previos sobre las proteínas Cry1Ac se han enfocado principalmente en el mecanismo de acción bioinsecticida ya que se utilizan para controlar las plagas que atacan cultivos de interés humano (Siebert et al. 2008), y se sostenía que las proteínas Cry1Ac eran inocuas para vertebrados.

Dentro de los resultados obtenidos en este trabajo se destaca que las proteínas Cry1Ac no son inocuas para células humanas, ya que, al igual que en macrófagos murinos, se observó la activación de MAPK's, al estimular las células epiteliales con las proteínas Cry1Ac. Se decidió estudiar la activación de estas cinasas debido a que son activadas principalmente por estímulos extracelulares, los cuales en este trabajo serían las proteínas Cry1Ac.

La activación de MAPK's en epitelio humano, es diferente a la activación reportada para macrófagos, ya que en los macrófagos se demostró la activación de las tres vías estudiadas, ERK1/2, JNK y p38, mientras que en las células epiteliales solo observamos activación de JNK y ERK1/2. El incremento de la fosforilación de estas MAPK's, en las células epiteliales, se relaciona con procesos fundamentales, como

la división celular, transición epitelio mesénquima (TEM) y enfermedad inflamatoria intestinal (IBD), mientras que con LPS no observamos activación.

Por otra parte, un resultado interesante dentro del curso temporal de activación para ERK1/2, es que la fosforilación de esta vía se da a tiempos cortos, entre 2.5 y 5 minutos y después de estos tiempos la fosforilación decae, es decir existe una regulación de esta activación. En comparación con la cinética reportada para macrófagos, observamos similitudes ya que se encontró que para este linaje celular la fosforilación de ERK 1/2 también fué a tiempos tempranos.

La regulación en la activación de las cinasas es un medida de control fundamental de las células, que les sirve para responder correctamente a los estímulos ambientales, de tal forma que la fosforilación de ERK1/2 inducida por Cry1Ac en epitelio es regulada a los 5 minutos después del estímulo. La inactivación de las MAPK's está dado por las MAP quinasas fosfatasas (MKP), estas fosfatasas son el grupo de proteínas capaces de de-fosforilar las MAPK's, estableciendo de esta forma el termino de la función que se había activado (Keyse, 1995; Watanabe et al. 2001).

Aunque se observó la activación de MAPK's hace falta realizar más estudios para determinar los mecanismos por los que la activación de ERK1/2 es regulada de forma diferencial, es decir cuales son los mecanismos que regulan la activación de la vía. En contraparte JNK se mantuvo activa durante todo el curso temporal al estimular con tCry1Ac. La capacidad de regulación de las vías MAPK's esta dada por los niveles de fosfatasas específicas para la vía por lo cual sería importante determinar la actividad de estas fosfatasas y como se regulan para encender y apagar estas vías (Zarubin y Han, 2005).

Retomando los resultados sobre la fosforilación de estas cinasas en las células epiteliales, donde encontramos activación de ERK 1/2 y JNK, pero no en p38, se comparó este resultado con los resultados donde evaluaron las fosforilaciones de ERK 1/2, JNK y p38 obtenidas de un estudio de biopsias de pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal (IBD). Donde, se demostró que la fosforilación de estas cinasas, era aproximadamente 2 veces mayor a la encontrada en pacientes sanos (Waetzig et. al. 2002), siendo p-38 quien presentó una activación mayor en mucosas inflamadas.

Los resultados obtenidos de la fosforilación en las células epiteliales humanas estimuladas con las proteínas Cry1Ac son similares a los obtenidos por pacientes sanos. ya que encontramos que la fosforilación en ERK1/2 y JNK inducida por las proteínas Cry1Ac es equiparablemente menor a la

fosforilación obtenida en biopsias de pacientes con colitis ulcerativa. Mientras que en el caso de p38, la cinasa mas activada en colitis ulcerosa, no se obtuvo una activación importante inducida por las proteínas Cry1Ac. Por lo tanto se descarta la posibilidad de que las proteínas Cry1Ac estén activando el epitelio como sucede en las enfermedades inflamatorias intestinales.

Por otra parte, se ha observado la inducción de hiperplasia linfoide en intestino grueso de ratones inducida por tCry1Ac (Datos no publicados), teniendo en cuenta que las hiperplasias son resultado de la acumulación de células linfocitarias, era importante identificar si la activación de MAPK's en intestinales puede deberse a algún daño toxico inducido por las proteínas Cry1Ac o bien si su administración favorecía la TEM, proceso indicoado principalmente en afecciones cancerosas.

En relación con lo anterior, se realizaron ensayos de viabilidad celular y TEM. Los resultados obtenidos de los ensayos citotóxicos y de migración, demuestran que la activación de las MAPK's, estimulada por la administración de las proteínas Cry1Ac, no esta ligada a efectos tóxicos ni a la transformación celular, ya que la migración celular, evaluada por el ensayo de cierre de herida, no se vio afectada por la administración de las proteínas Cry1Ac.

En cuanto a los ensayos citotóxicos, no se observó disminución en el metabolismo celular, a ninguna de las dosis empleadas ni administrándolas por varios días consecutivos.

Finalmente, en los resultados obtenidos por precipitaciones por afinidad y microscopía confocal, se encontró que existen proteínas de unión a las proteínas Cry1Ac en las células epiteliales de intestino HCT116, entre las cuales están vimentina, alfa enolasa, actina y la proteína de choque térmico 70 (HSP70), de todas estas proteínas HSP70 es la unica reportada como proteína de membrana, por lo que la identificación de las otras proteínas intracelulares no se descarta que sea por la presipitación de un complejo multiprotéico o bien que al momento de lisar las células queden sitios de proteínas Cry1Ac no unidos a proteínas de superficie y se esten uniendo a proteínas intra celulares.

Igualmente estos resultados son solo una aproximación hacia las proteínas de unión que pueden tener las células epiteliales humanas hacia las proteínas Cry1Ac, y es necesario corroborar la interacción protéica entre HSP70 y las demás proteínas reportadas hacia Cry1Ac, por ejemplo: realizar presipitaciones cruzadas, utilizando HSP70 unida a sefarosa y presipitar Cry1Ac toxina o protoxina o bien bloquear las proteínas de unión y ver si disminuye la fosforilación de MAPK's. Ensayos que ya se tienen estandarizados en macrófagos. De esta manera podríamos demostrar el papel de estas proteínas en el reconocimiento de Cry1Ac.

La proteína HSP70, ya se había reportado como posible receptor para la protoxina Cry1Ac en macrófagos murinos, en este trabajo se confirma la participación de HSP70 como partícipe en el reconocimiento a las proteínas Cry1Ac, destacando que la protoxina Cry1Ac tiene más afinidad a HSP70 que la toxina Cry1Ac ya que la banda reconocida en la precipitaciones por afinidad con pCry1Ac es más notable que la obtenida en la precipitación con tCry1Ac.

La proteína HSP70 se ha descrito como una proteína de citosol, que actúa como chaperona y se encuentra altamente conservada en todos los organismos vivientes. En su función como chaperona asiste en el plegamiento y transporte de proteínas, además de ayudar en el reconocimiento y presentación de antígeno. (Garrido et.al. 1999 , Jaana et. al. 199; Barretto, et al.) En estudios recientes se ha descrito que la proteína HSP70 también puede ser secretada al medio externo o bien estar expresada en la membrana celular, proponiendo que si la proteína HSP70 se encuentra en la membrana celular esta actúa como señal de peligro que induce la activación de la respuesta inmune, innata o adaptativa, (Multhoff et. al. 1995),(Shin et al. 2003).

Dentro de su papel inmunológico, HSP70 también actúa como acarreador de péptidos, inductor de citocinas o provee de sitios de reconocimiento para células NK (Arispe et. al. 2004). Además, se ha reportado que HSP70 puede actuar como proteína receptora de antígenos, por ejemplo: en un estudio donde se estimuló con LPS a células se observó que el LPS era reconocido por la asociación de HSP70 con receptores de quimosinas y TLR4 en un complejo formado en balsas lipídicas. (Triantafilou et. al 2001, 2002) lo cual indica que HSP70 es parte de un complejo de reconocimiento de antígenos.

Así mismo hay que recordar que se ha identificado que en macrófagos la unión de la protoxina Cry1Ac media la activación de MAPK's, por lo cual es muy probable que en las células de colon, HSP70 sea una de las proteínas que estén interactuando para el reconocimiento de Cry1Ac.

En el presente estudio se identificó a HSP70 en la superficie celular y como una posible proteína de unión para ambas proteínas Cry1Ac, toxina y protoxina, aunque hacen falta ensayos posteriores que demuestren la interacción de Cry1Ac con HSP70 así como inhibir la interacción de estas proteínas y ver efectos sobre la activación sobre las MAPK's.



Otro punto importante que debemos resaltar es que las demás proteínas reconocidas en las precipitaciones por afinidad actina, galectina y vimetnina, no se ha encontrado que tengan algún papel en el reconocimiento de antígenos, por ejemplo:

La galectina es una proteína con reconocimiento a carbohidrato que se le ha relacionado función de inmunomodulación, adhesión celular y regulación del crecimiento (Rabinovich GA.1999). Sin embargo esta proteína no se pudo corroborar por los ensayos de precipitación por afinidad. Mientras que la vimentina es una proteína de filamentos intermedios que favorece flexibilidad celular, y está implicada en mantener la estructura celular, la integridad del citoplasma, y la estabilización de las interacciones del cito-esqueleto. Si bien son proteínas intracelulares no se descarta que puedan ser parte de un complejo multiprotéico que se este precipitando junto con las proteínas receptoras de Cry1Ac.

En contraste a lo encontrado en este trabajo, se encuentra bien caracterizados los receptores presentes en los insectos blanco que intervienen en el proceso de la formación del poro las cuales son: amino-peptidasas, e-cadherina y fosfatasa alcalina, proteínas también presentes en mamíferos y conservadas con un 80 % de homología. Sin embargo, en los estudios con células de mamíferos, macrófagos murinos y células epiteliales de intestino, indican que ninguno de estos receptores de insecto participa en el reconocimiento en células de mamíferos.

Así mismo se ha demostrado por estudios de bioseguridad que no existen efectos letales producidos por las proteínas Cry1Ac en humanos, pues no hay formación de poros en las células. Esta característica se comprobó en el presente estudio, ya que la administración crónica de las proteínas Cry1Ac sobre las células de colon no provocó efectos letales sobre las células HCT116, al menos hasta la dosis máxima utilizada en este trabajo que fue de 200µg/mL.

Debido a los estudios de bioseguridad antes mencionados, las proteínas Cry1Ac se consideran inocuas para vertebrados, sin embargo la unión e internalización de las proteínas Cry1Ac en células epiteliales de intestino humano de la línea celular HCT116 seguidas de la activación de ERK1/2 y JNK evidencian que no son inocuas pues existen proteínas de unión y activación de vías de señalización en células humanas inducidas por las proteínas Cry1Ac.

Dentro de las perspectivas de este trabajo, se propone investigar sobre las posibles relaciones que

tuvieran la activación de MAPK's con la liberación de citocinas, caracterizar si HSP70 participa en la endocitosis de las proteínas Cry1Ac para definir el papel que juega en los efectos biológicos observados en este estudio y en el trabajo con macrófagos murinos, de esta forma determinar si existen implicaciones en el consumo de esas proteínas.

## Conclusión:

En conclusión las proteínas Cry1Ac no son inocuas para las células de vertebrados, ya que en células de epitelio humano de la línea HCT116 existen proteínas de unión específicas que se encargan de su reconocimiento como HSP70, para posteriormente ser internalizadas.

Dentro de los efectos que tiene la estimulación con proteínas Cry1Ac en este tipo celular esta la activación de MAPK's como ERK1/2 y JNK. Y esta administración no induce daño celular, o cambios en el fenotipo celular, pues no hay disminución en la viabilidad celular ni incremento en la migración de las células.

Aun falta determinar si se induce la producción de citocinas de perfil pro- inflamatorio por la administración con las proteínas Cry1Ac, ya que es uno de los mecanismos por los cuales HSP70 induce la respuesta inmune innata.

Anexo 1.

		<b>REPORTE DE RESULTADOS</b>													
		Folio del servicio:		MS 2015 003 009											
		No. Cotización:		UPMI201515											
		Referencia de pago:		UPM-I-2015-15-2											
		Investigador:		Dr Juan Pablo Reyes Grageda Damaris Alvarado											
3.	MS-2015-003-128	2	2	8.7	sp P00761 TRYP_PIG	Trypsin OS=Sus scrofa PE=1 SV=1	PIG	1							
5.	MS-2015-003-130	2	2	8.7	sp P00761 TRYP_PIG	Trypsin OS=Sus scrofa PE=1 SV=1	PIG								
6.	MS-2015-003-131	1.22	1.22	13	sp P00761 TRYP_PIG	Trypsin OS=Sus scrofa PE=1 SV=1	PIG	0							
		0.6	0.6	3.3	sp Q2IWB8 PYRG_RHOP2	CTP synthase OS=Rhodospseudomonas palustris (strain HaA2) GN=pyrG PE=3 SV=1	RHOP2	0							
7.	MS-2015-003-132	4.19	4.19	12.3	sp P0A369 CR1AA_BACTS	Pesticidal crystal protein cry1Aa (Fragment) OS=Bacillus thuringiensis subsp. sotto GN=cry1Aa PE=2 SV=1	BACTS	2							
		2.14	2.14	13.2	sp P48678 LMNA_MOUSE	Lamin-A/C OS=Mus musculus GN=Lmna PE=1 SV=2	MOUSE	0							
9.	MS-2015-003-134	10.27	10.27	23.1	sp Q964E3 ACTC_BIOAL	Actin, cytoplasmic OS=Biomphalaria alexandrina PE=3 SV=1	BIOAL	5							
11	MS-2015-003-136	23.24	23.24	45.5	sp P20152 VIME_MOUSE	Vimentin OS=Mus musculus GN=Vim PE=1 SV=3	MOUSE	11							
		21.33	21.33	22.7	sp P0A369 CR1AA_BACTS	Pesticidal crystal protein cry1Aa (Fragment) OS=Bacillus thuringiensis subsp. sotto GN=cry1Aa PE=2 SV=1	BACTS	10							
		1.52	1.52	9.5	sp P07828 ACT18_DICDI	Actin-18 OS=Dictyostelium discoideum GN=act18 PE=3 SV=3	DICDI	1							
		0.96	0.96	6.6	sp P14611 THIL_RALEH	Acetyl-CoA acetyltransferase OS=Ralstonia eutropha (strain ATCC 17699 / H16 / DSM 428 / Starier 337) GN=phbA PE=3 SV=1	RALEH	0							
		0.82	0.82	6.7	sp Q9LUU4 FB149_ARATH	Putative F-box protein At3g17270 OS=Arabidopsis thaliana GN=At3g17270 PE=4 SV=1	ARATH	0							
		0.8	0.8	7.8	sp P06121 NIFD_BRAJA	Nitrogenase molybdenum-iron protein alpha chain OS=Bradyrhizobium japonicum GN=nifD PE=3 SV=2	BRAJA	0							
		0.7	0.7	6.2	sp Q9UZO8 LEU11_PYRAB	2-isopropylmalate synthase 1 OS=Pyrococcus abyssii GN=leuA1 PE=3 SV=1	PYRAB	0							
0.55	0.55	5.6	sp A6NNM8 TTL13_HUMAN	Tubulin polyglutamylase TTL13 OS=Homo sapiens GN=TTL13 PE=1 SV=2	HUMAN	0									
13	MS-2015-003-138	16	16	27.9	sp Q2HJ60 ROA2_BOVIN	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1 OS=Bos taurus GN=HNRNPA2B1 PE=2 SV=1	BOVIN	8							
		2	8.03	20.8	sp P51989 RO21_XENLA	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2 homolog 1 OS=Xenopus laevis PE=2 SV=1	XENLA	4							
		2	2	27.7	sp Q84MP7 H2AV3_ORYSJ	Probable histone H2A variant 3 OS=Oryza sativa subsp. japonica GN=Os03g0743400 PE=2 SV=1	ORYSJ	1							
A.	MS-2015-003-139	2.12	2.12	16.5	sp P00761 TRYP_PIG	Trypsin OS=Sus scrofa PE=1 SV=1	PIG	1							
C.	MS-2015-003-141	2	2	12.1	sp P00761 TRYP_PIG	Trypsin OS=Sus scrofa PE=1 SV=1	PIG	1							
		0.92	0.92	5.9	sp Q3SL58 HISZ_THIDA	ATP phosphoribosyltransferase regulatory subunit OS=Thiobacillus denitrificans (strain ATCC 25259) GN=hisZ PE=3 SV=1	THIDA	0							
G.	MS-2015-003-145	2	2	8.7	sp P00761 TRYP_PIG	Trypsin OS=Sus scrofa PE=1 SV=1	PIG	1							
		0.85	0.85	3.2	sp Q9S515 CR1AG_BACTU	Pesticidal crystal protein cry1Ag OS=Bacillus thuringiensis GN=cry1Ag PE=2 SV=1	BACTU	0							
H.	MS-2015-003-146	5.32	5.32	22.1	sp P48678 LMNA_MOUSE	Lamin-A/C OS=Mus musculus GN=Lmna PE=1 SV=2	MOUSE	1							
		2	2	14.2	sp P20152 VIME_MOUSE	Vimentin OS=Mus musculus GN=Vim PE=1 SV=3	MOUSE	1							
J.	MS-2015-003-147	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND							
K.	MS-2015-003-148	31.11	31.11	64.2	sp P31000 VIME_RAT	Vimentin OS=Rattus norvegicus GN=Vim PE=1 SV=2	RAT	16							
		1.4	31.11	64.2	sp P20152 VIME_MOUSE	Vimentin OS=Mus musculus GN=Vim PE=1 SV=3	MOUSE	15							
		0.72	0.72	9	sp P06121 NIFD_BRAJA	Nitrogenase molybdenum-iron protein alpha chain OS=Bradyrhizobium japonicum GN=nifD PE=3 SV=2	BRAJA	0							
M.	MS-2015-003-149	6.86	6.86	23.7	sp Q9UVW9 ACTG_CEPAC	Actin, gamma OS=Cephalosporium acremonium GN=ACT PE=3 SV=1	CEPAC	3							
		0.77	2.87	22.6	sp P99371 ACT5_TOBAC	Actin-93 (Fragment) OS=Nicotiana tabacum PE=3 SV=1	TOBAC	1							
		0.6	6.08	23.6	sp O65316 ACT_MESVI	Actin OS=Mesostigma viride PE=3 SV=1	MESVI	2							
N.	MS-2015-003-150	2	2	4.2	sp P07828 ACT18_DICDI	Actin-18 OS=Dictyostelium discoideum GN=act18 PE=3 SV=3	DICDI	1							
		0.72	0.72	14.4	sp Q5RBU8 ROA2_PONAB	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1 OS=Pongo abelii GN=HNRNPA2B1 PE=2 SV=1	PONAB	0							
O.	MS-2015-003-151	11.04	11.04	27.6	sp Q2HJ60 ROA2_BOVIN	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1 OS=Bos taurus GN=HNRNPA2B1 PE=2 SV=1	BOVIN	5							

## Anexo 2.

### Vimentina

97.4% identity in 466 residues overlap; Score: 2255.0; Gap frequency: 0.0%

```
humano      1 MSTRSVSSSSYRRMFGGPGTASRPSSRSYVTTSTRTYSLGSALRPSTSRSLYASSPGG
Ratón      1 MSTRSVSSSSYRRMFGGSGTSSRPSSNRSYVTTSTRTYSLGSALRPSTSRSLYSSSPGGA
*****

Humano     61 YTRSSAVRLRSSVPGVRLQDSVDFSLADAINTEFKNTRTNEKVELQELNDRFANYIDK
Ratón     61 YVTRSSAVRLRSSVPGVRLQDSVDFSLADAINTEFKNTRTNEKVELQELNDRFANYIDK
*****

Humano    121 VRFLEQQNKILLAELEQLKGQKSRGLDLYEEMRELRRQVDQLTNDKARVEVERDNLAE
Ratón    121 VRFLEQQNKILLAELEQLKGQKSRGLDLYEEMRELRRQVDQLTNDKARVEVERDNLAE
*****

Humano    181 DIMRLREKLQEEMLQREEAENTLQSFQDVDNASLARLDLERKVESLQEEIAFLKKLHDE
Ratón    181 DIMRLREKLQEEMLQREEAESTLQSFQDVDNASLARLDLERKVESLQEEIAFLKKLHDE
*****

Humano    241 EIQLQQAQIQEQHVQIDVDVSKPDLTAALRDVRRQYQESVAAKNLQEAEEWYKSKFADLSE
Ratón    241 EIQLQQAQIQEQHVQIDVDVSKPDLTAALRDVRRQYQESVAAKNLQEAEEWYKSKFADLSE
*****

Humano    301 AANRNDALRQAKQESTEYRRQVQSLTCEVDALKGTNESLERQMRMEENFAEAANYQD
Ratón    301 AANRNDALRQAKQESNEYRRQVQSLTCEVDALKGTNESLERQMRMEENFAEAANYQD
*****

Humano    361 TIGRLQDEIQNMKEEMARHLREYQDLLNVKMALDIEIATYRKLEGEESRISLPLPFSS
Ratón    361 TIGRLQDEIQNMKEEMARHLREYQDLLNVKMALDIEIATYRKLEGEESRISLPLPTFSS
*****

Humano    421 LNLRETNLDSLPLVDTHSKRTLTIKTVETRDGQVINETSQHDDLE
Ratón    421 LNLRETNLDSLPLVDTHSKRTLTIKTVETRDGQVINETSQHDDLE
*****
```

### Galectina 3

79.7% identity in 266 residues overlap; Score: 1059.0; Gap frequency: 6.8%

```
Humano     1 MADNFSLDALSGSGNPNPQGWPGAWGNQPGAGGYPGASYPGAYPGQAPPAYPGQAPP
Ratón     1 MADSFSLNDALAGSGNPNPQGYPGAWGNQP-GAGGYPGAAYPGAYPGQAPPAYPGQAPP
***

Humano     61 GAYPGA--PGAYPGAPAGVYPPGSGPGAYPSS-----GQPSATGAYP-----AT
Ratón     60 GAYPGQAPPSAYPGTAPGAYPGP-TAPGAYPGQPAPGAFPGQPGAPGAYPQCSGGYPAA
*****

Humano    105 GPYGAPAGPLIVPYNLPLPGGVPRMLITILGTVKPNANRIALDFQRGNDVAFHFNPRFN
Ratón    119 GPYGVPAAGPLTVPYDLPPLPGGVMPRMLITIMGTVKPNANRIVLDFR RGNDVAFHFNPRFN
*****

Humano    165 ENNRRVIVCNTKLDNNWGREERQSVFPFESGKPFKIQVLVEPDHFKVAVNDAHLLQYNHR
Ratón    179 ENNRRVIVCNTKQDNNWKEERQSAPFPFESGKPFKIQVLVEADHFKVAVNDAHLLQYNHR
*****

Humano    225 VKKLNEISKLGISGDIDLTSASYTMI
Ratón    239 MKNLREISQLGISGDITLTSANHAMI
*****
```

## Actina 1-Beta

100.0% identity in 375 residues overlap; Score: 1960.0; Gap frequency: 0.0%

```
Humano      1  MDDDIAALVVDNGSGMCKAGFAGDDAPRAVFPSIVGRPRHQGVMVGMGQKDSYVGDEAQS
Ratón      1  MDDDIAALVVDNGSGMCKAGFAGDDAPRAVFPSIVGRPRHQGVMVGMGQKDSYVGDEAQS
          *****

Humano     61  KRGILTLKYPIEHGIVTNWDDMEKIWHHTFYNELRVAPEEHPVLLTEAPLNPKANREKMT
Ratón     61  KRGILTLKYPIEHGIVTNWDDMEKIWHHTFYNELRVAPEEHPVLLTEAPLNPKANREKMT
          *****

Humano    121  QIMFETFNTPAMYVAIQAVLSLYASGRTTGIVMDSGDGVTHTVPIYEGYALPHAILRLDL
Ratón    121  QIMFETFNTPAMYVAIQAVLSLYASGRTTGIVMDSGDGVTHTVPIYEGYALPHAILRLDL
          *****

Humano    181  AGRDLTDYLMKILTERGYSFTTAEREIVRDIKEKLCYVALDFEQEMATAASSSSLEKSY
Ratón    181  AGRDLTDYLMKILTERGYSFTTAEREIVRDIKEKLCYVALDFEQEMATAASSSSLEKSY
          *****

Humano    241  ELPDGQVITIGNERFRCPEALFQPSFLGMESCGIHETTFNSIMKCDVDIRKDLANTVLS
Ratón    241  ELPDGQVITIGNERFRCPEALFQPSFLGMESCGIHETTFNSIMKCDVDIRKDLANTVLS
          *****

Humano    301  GGTTMYPGIADRMQKEITALAPSTMKIKI IAPPERKYSVWIGGSILASLSTFQQMWISKQ
Ratón    301  GGTTMYPGIADRMQKEITALAPSTMKIKI IAPPERKYSVWIGGSILASLSTFQQMWISKQ
          *****

Humano    361  EYDESGPSIVHRKCF
Ratón    361  EYDESGPSIVHRKCF
          *****
```

## HSP70

95.3% identity in 641 residues overlap; Score: 3136.0; Gap frequency: 0.0%

```
Humano      1  MAKAAAIGIDLGTYSVGVFQHGKVEI IANDQGNRTTPSYVAFTDTERLIGDAAKNQVA
Ratón      1  MAKNTAIGIDLGTYSVGVFQHGKVEI IANDQGNRTTPSYVAFTDTERLIGDAAKNQVA
          *** *****

Humano     61  LNPQNTVFDKRLIGRKFGDPVVQSDMKHWPFPVINDGDKPKVQVSYKGETKAFYPEEIS
Ratón     61  LNPQNTVFDKRLIGRKFGDAVVQSDMKHWPFPVINDGDKPKVQVNYKGESRSFFPEEIS
          *****

Humano    121  SMVLTKMKEIAEAYLGYPVTVNAVITVPAYFNDSQRQATKDAGVIAGLNLVRIINEPTAAA
Ratón    121  SMVLTKMKEIAEAYLGHPVTVNAVITVPAYFNDSQRQATKDAGVIAGLNLVRIINEPTAAA
          *****

Humano    181  IAYGLDRTGKGERNVLIFDLGGGTFDVSILTIDDGIFEVKATAGDTHLGGEDFDNRLVNH
Ratón    181  IAYGLDRTGKGERNVLIFDLGGGTFDVSILTIDDGIFEVKATAGDTHLGGEDFDNRLVSH
          *****

Humano    241  FVEEFKRKHKKDISQNKRAVRLRTACERAKRTLSSSTQASLEIDSLFEGIDFYTSITRA
Ratón    241  FVEEFKRKHKKDISQNKRAVRLRTACERAKRTLSSSTQASLEIDSLFEGIDFYTSITRA
          *****

Humano    301  RFEELCSDLFRSTLEPVEKALRDAKLDKAQI HDLVLVGGSTRIPKVQKLLQDFFNDRDLN
Ratón    301  RFEELCSDLFRGTLEPVEKALRDAKMDKAQI HDLVLVGGSTRIPKVQKLLQDFFNDRDLN
          *****
```

PRE LAMINA

97.0% identity in 570 residues overlap; Score: 2737.0; Gap frequency: 0.4%

```
Humano      1  METPSQRRATRSGAQASSTPLSPTRITR LQEKEDLQELNDR LAVYIDRVR SLETENAGLR
Ratón       1  METPSQRRATRSGAQASSTPLSPTRITR LQEKEDLQELNDR LAVYIDRVR SLETENAGLR
*****

Humano      61  LRITSEEVVSREVS GIK AAYEAE LGDAR KTLDSVAKERARLQLELSKVREEFKELKARN
Ratón       61  LRITSEEVVSREVS GIK AAYEAE LGDAR KTLDSVAKERARLQLELSKVREEFKELKARN
*****

Humano     121  TKKEGDLIAAQARLKDLEALLNSKEAALSTALSEKR TLEGELHDLRGQVAKLEAALGEAK
Ratón     121  TKKEGDLIAAQARLKDLEALLNSKEAALSTALSEKR TLEGELHDLRGQVAKLEAALGEAK
*****

Humano     181  KQLQDEMLRRVDAENRLQTMKEELDFQK NIYSEELRETKRRHETRLVEIDNGKQREFESR
Ratón     181  KQLQDEMLRRVDAENRLQTMKEELDFQK NIYSEELRETKRRHETRLVEIDNGKQREFESR
*****

Humano     241  LADALQELRAQHEDQVEQYKKELEKTYSAKLDNARQSAERNSNLVGAAHEELQQSRIRID
Ratón     241  LADALQELRAQHEDQVEQYKKELEKTYSAKLDNARQSAERNSNLVGAAHEELQQSRIRID
*****

Humano     301  SLSAQLSQLQKQLAAKEAKLRDLED SLARERDTSRRL LAEKEREMAEMRARMQQQLDEYQ
Ratón     301  SLSAQLSQLQKQLAAKEAKLRDLED SLARERDTSRRL LAEKEREMAEMRARMQQQLDEYQ
*****

Humano     361  ELLDIKLALDMEIHAYRKLLEGE EERLRLSPSP TSQRSRGRASSHSSQTQGGGSVTKKRK
Ratón     361  ELLDIKLALDMEIHAYRKLLEGE EERLRLSPSP TSQRSRGRASSHSSQS QGGGSVTKKRK
*****

Humano     421  LESTESRSSFSQHARTSGRVAVEEVDEEGKFVRLRNKSNEDQSMGNWQIKRQNGDDPLLT
Ratón     421  LESSESRSSFSQHARTSGRVAVEEVDEEGKFVRLRNKSNEDQSMGNWQIRRQNGDDPLMT
***

Humano     481  YRFPPKFTLKAGQVVTIWAAGAGATHSPPTDLVWKAQNTWCGNSLRTALINSTGEEVAM
Ratón     481  YRFPPKFTLKAGQVVTIWASGAGATHSPPTDLVWKAQNTWCGSSLRTALINSTGEEVAM
*****

Humano     541  RKLVRSVTVVED--DEDEDGDDLH HHHHGS
Ratón     541  RKLVRSLTMVEDNEDDDEGEELLH HHRVS
***** * * * * * * * * * * * * * * *
```

## Enolasa alpha

94.7% identity in 434 residues overlap; Score: 2135.0; Gap frequency: 0.0%

```
HUMANO      1  MSILKIHAREIFDSRGNPTVEVDLFTSKGLFRAAVPSGASTGIYEALELRDNDKTRYMGK
RATON       1  MSILRIHAREIFDSRGNPTVEVDLYTAKGLFRAAVPSGASTGIYEALELRDNDKTRFMGK
          **** *
          **** *

HUMANO     61  GVS KAVEHINKTIAPALVSKKLNVTQE KIDKLM IEMDGTENKSKFGANAILGVSLAVCK
RATON     61  GVS QAVEHINKTIAPALVSKKVNVEQE KIDKLM IEMDGTENKSKFGANAILGVSLAVCK
          **** *

HUMANO    121  AGAVEKGVPLYRHIADLAGNSEVILPVP AFNVINGGSHAGNKLAMQEFMILPVG AANFRE
RATON    121  AGAVEKGVPLYRHIADLAGNPEVILPVP AFNVINGGSHAGNKLAMQEFMILPVG ASSFRE
          **** *

HUMANO    181  AMRIGAEVYHNLKNVIKEKYGKDATNVGDEGGFAPNILENKEGLELLKTAIGKAGYTDKV
RATON    181  AMRIGAEVYHNLKNVIKEKYGKDATNVGDEGGFAPNILENKEALELLKTAIAKAGYTDQV
          **** *

HUMANO    241  VIGMDVAASEFFRSGKYDLDFKSPDDPSRYISP DQLADLYKSFYKDYPPVVSIEDPFDQDD
RATON    241  VIGMDVAASEFYRSGKYDLDFKSPDDPSRYITPDQLADLYKSFVQNYPPVVSIEDPFDQDD
          **** *

HUMANO    301  WGAWQKFTASAGIQVVGDDLTVTNPKRIAKAVNEKSCNCLLLKVNQIGSVTESLQACKLA
RATON    301  WGAWQKFTASAGIQVVGDDLTVTNPKRIAKAASEKSCNCLLLKVNQIGSVTESLQACKLA
          **** *

HUMANO    361  QANGWGVMSHRSGETEDTFIADLVVGLCTGQIKTGAPCRSERLAKYNQLLRIEEELGSK
RATON    361  QSNWGVMSHRSGETEDTFIADLVVGLCTGQIKTGAPCRSERLAKYNQILRIEEELGSK
          * **** *

HUMANO    421  AKFAGRNFRNPLAK
RATON    421  AKFAGRSFRNPLAK
          *****
```



## Literatura citada:

- Shin B.K., Wang H., Yim A.M., Brichory F., Jang J.H., Zhao R., Puravs E., Tra J., Michael C.W., Misek D.E., Hanash S.M., *J. Biol. Chem.* 278 ,2003 7607–7616.
- Benítez, A. *Avances Recientes en Biotecnología Vegetal e Ingeniería Genética de Plantas.* Ed. Reverté. Barcelona, España. 2005. p. 23.
- Betz, F.; Hammond, B. & Fuchs, R. Safety and advantages of *Bacillus thuringiensis*- protected plants to control insect pests. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 2000. 32: 156– 173.
- Bravo, A. et al. Oligomerization triggers differential binding of a pore-forming toxin to a different receptor leading to efficient interaction to membrane microdomains. *Biochimica Biophysica Acta*, 1667. 2004.
- Byrne, P.; Ward, S. y Harrington, J. *Transgenic crops: An introduction and resource Guide.* History of plant breeding. Colorado State University. 2004. Sitio en línea: [http://cls.casa.colostate.edu/CultivosTransgenicos/sp\\_history.html](http://cls.casa.colostate.edu/CultivosTransgenicos/sp_history.html).
- Garrido C., Fromentin A., Bonnotte B., Favre N., Moutet M., Arrigo A.P., Mehlen P., Solary E. , *Cancer Res.* 58, 1998, 5495–5499.
- Hedlund C., M., H. Connell, W. Agace, R.D. Duan, A. Nilsson, and B. Wullt. 1996. Bacterial adherence and mucosal cytokine responses. Receptors and transmembrane signaling CD86 and by inducing IL-6, MCP-1 and TNF-alpha cytokines. UNAM FESI. *International immunopharmacology*,2013. 17 1051–1066.
- Center for Environmental Risk Assessment, ILSI Research Foundation. Revisión de la seguridad ambiental de la proteína Cry1Ac , 1156 Fifteenth Street N.W., Washington D.C. 20005-1743 EE. UU. 26 de mayo de 2010.
- Corine, V.; Coiffard, C.; Coiffard, L.J.M.; Rivalland, P.; De Roeck-Holtzhauer, Y. In vitro correlation between two colorimetric assays and the pyruvic acid consumption by fibroblasts cultured to determine the sodium laurylsulfate cytotoxicity. *Journal of Pharmacology and Toxicology* ,1998. 39:143-146.

Chak, K. F.; Tseng, M. Y.; Yamamoto, T. Expression of the crystal protein gene under the control of the R-amylase promoter in *Bacillus thuringiensis* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 1994, 60, 2304-2310.

Chen Z, Gibson TB, Robinson F, Silvestro L, Pearson G, Xu B, Wright A, Vanderbilt C, Cobb MH. MAP kinases. *Chem Rev.* 2001;101:2449–2476.

Chi-Yea, Y; Jen-Chieh, P; Suey-Sheng, K; Hau-Yang, T. Enterotoxigenicity and Cytotoxicity of *Bacillus thuringiensis* Strains and Development of a Process for Cry1Ac. Production Department of Food Science, National Chung-Hsing University, Taichung, Taiwan. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2003. 51, 100-105.

Dent P, Yacoub A, Fisher PB, Hagan MP, Grant S. MAPK pathways in radiation responses. *Oncogene.* 2003;22:5885–5896.

Desiree M. Hautea, Lourdes D. Taylo, Anna Pauleen L. Masanga,1 Maria Luz J. Sison, Josefina O. Narciso, Reynaldo B. Quillooy, Randy A. Hautea, Frank A. Shotkoski,. Field Performance of Bt Eggplants (*Solanum melongena* L.) in the Philippines: Cry1Ac Expression and Control of the Eggplant Fruit and Shoot Borer (*Leucinodes orbonalis* Guenée) 2016.

Eckmann, L., H.C. Jung, C. Schurer-Maly, A. Panja, E. Morzycka-Wroblewska, and M.F. Kagnoff. Differential cytokine expression by human intestinal epithelial cell lines: regulated expression of interleukin 8. *Gastroenterology.* 1993. 105:1689–1697.

Escobar I., Rivera A. & Aristizábal F. Estudio Comparativo de los Métodos de Resazurina y MTT en Estudios de Citotoxicidad en Líneas Celulares TumORAles Humanas. 2010. *Vitae.* 17: 67-74pp.

Eskes R, Antonsson B, Osen-Sand A, et al. Bax-induced cytochrome C release from mitochondria is independent of the permeability transition pore but highly dependent on Mg<sup>2+</sup> ions. *J Cell Biol.* 1998;143: 217–224.

Esquivel R and Moreno-Fierros L The Mucosal and systemic adjuvant effects of cholera toxin and Cry1Ac protoxin, on the specific antibody response to HIV-1 C4/V3 peptides, are different and depend on the antigen coadministered. *Viral Immunol* 2005. Volume 18 Issue 4 pags 695-708.

- Fernández, F. Vegetales transgénicos: Mitos y realidades desde una perspectiva técnica. Rev. Fitotec. Mex. 2006. 29(2): 95-102.
- Fisher, R. & Rosner, L. Toxicology of the microbial insecticide, Thuricide. Agric. Food Chem 1959. 7, 686–688.
- G. Multhoff, C. Botzler, M. Wiesnet, E. Muller, T. Meier, W. Wilmanns, R.D. Issels, Int. J. Cancer 61 (1995) 272–279.
- González-González E.; García-Hernández AL.; Flores-Mejía R.; López-Santiago R.; Moreno- Fierros L. The protoxin Cry1Ac of *Bacillus thuringiensis* improves the protection conferred by intranasal immunization with *Brucella abortus* RB51 in a mouse model. Vet Microbiol. 2015 Feb 25;175 (2-4):382-8.
- Hellmich R. L. Siegfried B. D., Sears M. K., Stanley-Horn D. E., Daniels M. J., Mattila H. R., Spencer T., Bidne K. G. y Lewis L. C. (2001). Monarch larvae sensitivity to *Bacillus thuringiensis*-purified proteins and pollen. Actas de las Academias Nacionales de Ciencias de los EE. UU. 98(21):11925-11930.
- Hofer T, Gerner I, Gundert-Remy U, Liebsch M, Schulte A, Spielmann H, Vogel R, Wettig K. Animal testing and alternative approaches for the human health risk assessment under the proposed new European chemicals regulation. Arch Toxicol. 2004;11: 549–564.
- Ibarra-Moreno, S.; García-Hernández AL.; Moreno-Fierros L. Co-administration of protoxin Cry1Ac from *Bacillus thuringiensis* with metacystode extract confers protective immunity to murine cisticercosis. Parasite Immunol. 2014 Jun;36(6):266-70. doi:10.1111/pim.12103.
- James C. Global Status of commercialized biotech/GM crops. Ithaca, NY: International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications; 2014. Genetically engineered vegetables expressing proteins from *Bacillus thuringiensis* for insect resistance: successes, disappointments, challenges and ways to move forward. Shelton AM GM Crops Food. 2012 Jul-Sep; 3(3):175-83.) predominando los cultivos con maíz, soja y algodón
- James, C. Situación mundial de la comercialización de cultivos biotecnológicos MG en 2010, International service for the acquisition of agri-biotech applications 2010.
- Jiang , Zhang , Bai , Wang , He . Corn with Pyr amided Genes on Efficacy and Insect

## Resistance Management for the Asian Corn Borer in China.

Jung, H.C., L. Eckmann, S.K. Yang, A. Panja, J. Fierer, E. MorzyckaWroblewska, and M.F.

Kagnoff A distinct array of proinflammatory cytokines is expressed in human colon epithelial cells in response to bacterial invasion. *J. Clin. Invest.* 1995. 95:55–65.

Triantafilou K., Triantafilou M., Ladha S., Mackie A., Dedrick R.L., Fernandez N., Cherry R., *Cell Science.* 114 (2001) 2535–2545.

Legorreta-Herrera M.; Meza RO.; Moreno-Fierros L. Pretreatment with Cry1Ac protoxin modulates the immune response, and increases the survival of Plasmodium-infected CBA/Ca mice. *J Biomed Biotechnol.* 2010; 2010: 198921.

Li YL.; Du J.; Fang ZX.; You J. Dissipation of insecticidal Cry1Ac protein and its toxicity to nontarget aquatic organisms. *J Agric Food Chem.* 2013 Nov 20; 61(46):10864-71.

Liu, H. X., Huang, G. R., Zhang, H. M., Wu, J. R., and Yao, Z. J. Annonaceous acetogenin mimics bearing a terminal lactam and their cytotoxicity against cancer cells, 2007 *Bioorg Med Chem Lett* 17, 3426-3430.

Liu, Y., and Nair, M. G. An efficient and economical MTT assay for determining the antioxidant activity of plant natural product extracts and pure compounds, *J Nat Prod* 2010. 73, 1193-1195.

Luo, X., Budihardjo, I., Zou, H., Slaughter, C., and Wang, X. Bid, a Bcl-2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* 94: 481-490 (1998).

M. Triantafilou, K. Triantafilou, *Trends Immunol.* 23 (2002) 301–2335 McCormick, B.A., S.P. Colgan, C. Delp-Archer, S.I. Miller, and J.L. Madara. 1993.

Mentaberry, A. Curso de Agrobiotecnología (resistencia a insectos y nematodos). Depto. Fisiología, Biología Molecular y Celular. Universidad de Buenos Aires. En línea: [http://www.fbmc.fcen.uba.ar/~23-1-2007/Clase12\\_Resistencia\\_a\\_insectos.pdf](http://www.fbmc.fcen.uba.ar/~23-1-2007/Clase12_Resistencia_a_insectos.pdf). Mesnage, R;

Clair, E.; Gress, S.; Then, C.; Székács, A.; Seralini, G.-E. Cytotoxicity on human cells of Cry1Ab and Cry1Ac Bt insecticidal toxins alone or with a glyphosate-based herbicide. *Journal of Applied Toxicology; JAT* 2011. 2712, 101112.

- Mezzomo, B.P. ; Miranda-Vilela, A.L; de Sousa F. I.; Prereira B.L.;Arruda P.F.;Guerrero.M.L.;Koope. G.C. Hematotoxicity of Bacillus thuringiensis as Spore- crystal Strains Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac or Cry2Aa in Swiss Albino Mice. Department of Genetics and Morphology, Institute of Biological Sciences, University of Brasilia, Brasilia/DF, Brazil 2013. 1:1.
- Moreno-Fierros L, Ruiz Medina J, Esquivel R, López-Revilla R Piña Cruz Saúl. Cry1Ac protoxin as carrier and adjuvant for the induction of mucosal and systemic antibody immune responses to polysaccharides of *S. pneumoniae* by intranasal immunization in mice. *Scand J Immunol* 2003. (57): 45-55.
- Moreno-Fierros L. Intranasal coadministration of the Cry1Ac protoxin with amoebal lysates increases protection against *Naegleria fowleri* meningoencephalitis. *Infect Immun.* 2004 Aug; 72(8):4368-75.
- Moreno-Fierros, L. García N, Gutiérrez R, López-Revilla R, Vázquez-Padrón RI. Intranasal, rectal and intraperitoneal immunization with protoxin Cry1Ac from *Bacillus thuringiensis* induces compartmentalized serum, intestinal, vaginal and pulmonary immune responses in Balb/c mice. *Microbes Infect* 2000. 2(8): 885-90pp.
- Moreno-Fierros, L., García-Hernández A., Ilhuicatzí-Alvarado, D. Rivera-Santiago, L., Torres- Martínez, M., Rubio-Infante ,N., Legorreta-Herrera,M. Cry1Ac protoxin from *Bacillus thuringiensis* promotes macrophageactivation by upregulating CD80 and
- Mowat, A. Mcl. & Weiner, H. L. in *Mucosal Immunology*, 2nd edition (eds Ogra, P. L. et al.) 587–617 (Academic Press, San Diego, 1999).
- N. Arispe, M. Doh, O. Simakova, B. Kurganov, A. DeMaio, FASEB
- Narita, M., Shimizu, S., Ito, T., Chittenden, T., Lutz, R. J., Matsuda, H., and Tsujimoto
- O’Brien J.,Wilson, I., Orton, T.,Pognan, F. Investigation of the alamar Blue (rezarsurin) fluorescence dye fir the assessment of mammalian cell cytotoxicity.*Eur J.Biochem* 2000. 267,5421-5426.
- Rudin, C.M.; Thompson, C.B. Apoptosis and disease: regulation and clinical relevance of programmed cell death. *Annu Rev Med* 1997 48: 267–281.
- Salmonella typhimurium* attachment to human intestinal epithelial monolayers: transcellular signalling to subepithelial neutrophils. *J. Cell Biol.* 123:895–907.
- Schnepf, E.; Crickmore, N.; Van Rie, J.; Lereclus, D.; Baum, J.; Feitelson, J.; Zeigler, D. & Dean, D. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol Mol.* 1998. *Biol. Ver.* 62 (3) 775:806.

- Siegel, J. Minireview The Mammalian Safety of Bacillus thuringiensis-Based Insecticides. Horticultural Crops Reach Center, 2021, Journal of Invertebrate Pathology 2001.77,13-21.
- Smiley, S. T., Reers, M., Mottola-Hartshorn, C., Lin, M., Chen, A., Smith, T. W., Steele, G.D., and Chen, L. B. Intracellular heterogeneity in mitochondrial membrane potentials revealed by a J-aggregate forming lipophilic cation JC-1. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1991. 88: 3671-3675 .
- Smith, J. Biotecnología. Ed. Acribia S. A. Zaragoza, España. 2004. p. 237.
- Soberón, M.; Pardo-Lopez, L.; López, I.; Gómez, I.; Tabashnik, B. & Bravo, A. Engineering Modified Bt Toxins to Counter Insect Resistance. Science 2007. 318: 1640-1642.
- Székács, A., Lauber, É., Juracsek, J., Darvas, B. Cry1Ab toxin production of MON 810 transgenic maize. Environmental Toxicology and Chemistry. 2010. 29 (1): 182–190.
- Tanoue T, Nishida E. Docking interactions in the mitogen-activated protein kinase cascades. Pharmacol Ther. 2002;93:193–202. [PubMed]
- Teixeira Corre<sup>^</sup>a RF, Ardisson-Araújo DMP, Monnerat RG, Ribeiro BM Cytotoxicity Analysis of Three Bacillus thuringiensis Subsp. israelensis d- Endotoxins towards Insect and Mammalian Cells. 2012 PLOS ONE 7(9): e46121. doi:10.1371/journal.pone.0046121.
- Vazquez-Padron RI, Moreno-Fierros L, Neri-Bazan L, de la Riva GA, Lopez-Revilla R. Intragastric and intraperitoneal administration of Cry1Ac protoxin from Bacillus thuringiensis induces systemic and mucosal antibody responses in mice. Life Sci 1999;64:1897–912
- Vázquez–Padron R. I, Moreno-Fierros L, Neri-Bazán L, de la Riva GA, López-Revilla R. Bacillus thuringensis Cri1Ac protoxin is a Potent Systemic and Mucosal Adjuvant. Scand.J.Inmunol 1999 49, 578-584pp.
- Walzl , A.; Unger, C.;Kramer, N.;Unterleuther D. The Resazurin Reduction Assay Can Distinguish Cytotoxic from Cytostatic Compounds in Spheroid Screening Assays . Journal of Biomol Screen published online 23 April 2014.
- Y. Bax interacts with the permeability transition pore to induce permeability transition and cytochrome c release in isolated mitochondria. Proc. Natl. Acad. Sci. 1998. USA 95: 14681-14686.
- Yang SH, Sharrocks AD, Whitmarsh AJ. Transcriptional regulation by the MAP kinase signaling cascades. Gene. 2003;320:3–21. [PubMed]

Yang, S.-K., L. Eckmann, A. Panja, and M.F. Kagnoff. 1997. Differential and regulated expression of C-X-C, C-C and C-chemokines by human colon epithelial cells.

Tingting Jin, Xiaoli Duan, Alejandra Bravo, Mario Soberón, Zhenying Wang, Kanglai He Identification of an alkaline phosphatase as a putative Cry1Ac binding protein in *Ostrinia furnacalis* (Guenée). *Pesticide Biochemistry and Physiology*. Elsevier. July 2016.

Juan J. Estruch, Nadine B. Carozzi, Nalini Desai, Nicholas B. Duck, Gregory W. Warren & Michael G. Koziel Transgenic plants: An emerging approach to pest control Research Review *Nature Biotechnology* 15, 137 - 141 (1997)