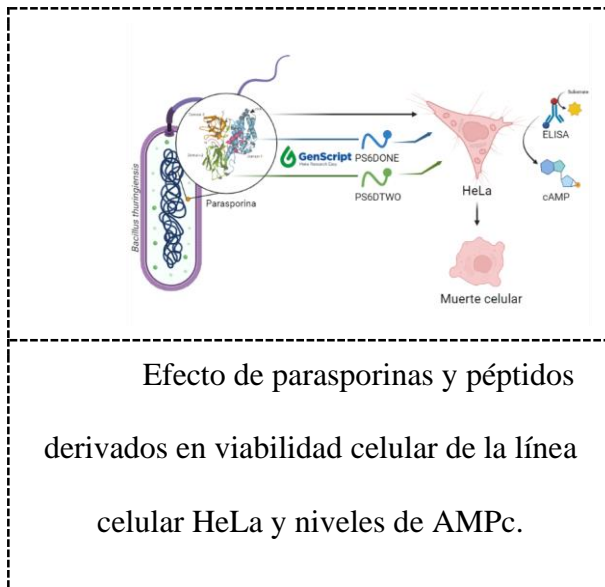


Muerte celular inducida por parasporinas y péptidos sintéticos de la parasporina-6 de *Bacillus thuringiensis* en células de cáncer de cuello uterino y su relación con la vía de adenilato ciclasa

Cell death induced by parasporins and synthetic peptides of parasporin-6 from *Bacillus thuringiensis* in cervical cancer cells and their relationship with the adenylate cyclase pathway

Graphical Abstract (GA)



Muerte celular inducida por parasporinas y péptidos sintéticos de la parasporina-6 de *Bacillus thuringiensis* en células de cáncer de cuello uterino y su relación con la vía de adenilato ciclasa

Cell death induced by parasporins and synthetic peptides of parasporin-6 from *Bacillus thuringiensis* in cervical cancer cells and their relationship with the adenylate cyclase pathway

César Julián Guevara Medina

Programa de Bioquímica. Facultad de Ciencias. Universidad Antonio Nariño.

Dirigido por: Dra. Mónica Losada Barragán

Resumen

El cáncer de cuello uterino es una de las principales enfermedades en mujeres a nivel mundial, se han utilizado múltiples terapias no específicas e invasivas como la quimioterapia e histerectomía, que afectan células de linaje no cancerígeno. Por ello se han estudiado terapias alternativas específicas como el tratamiento con parasporinas (PS) extraídas de *Bacillus thuringiensis* (Bt) y diferentes péptidos anticancerígenos (ACPs). En este trabajo, se evalúa el efecto citotóxico y los cambios morfológicos presentes en células HeLa por extractos de inclusiones parasporales de diferentes cepas de Bt y péptidos sintéticos derivados de PS6 denominados PS6DONE y PS6DTWO. Adicionalmente, se cuantifican los niveles de AMPc en células tratadas con el PS6DONE para determinar su relación con la vía de señalización del adenilato ciclasa (AC) por medio de un ELISA. Los resultados muestran un alto efecto citotóxico

presentado por los extractos de proteínas de inclusiones parasporales frente a la línea celular HeLa asociados a necrosis. Por otra parte, se evidenció un efecto citotóxico del péptido PS6DONE y aumento de los niveles de AMPc, que fueron acompañados por cambios morfológicos que sugieren un proceso de autofagia.

Palabras clave: Cáncer, cérvix, parasporinas, HeLa, *Bacillus thuringiensis*,

Abstract

Cervical cancer is one of the main diseases in women worldwide, multiple non-specific and invasive therapies have been used, such as chemotherapy and hysterectomy, which derive cells of non-cancerous lineage. For this reason, specific alternative therapies have been studied, such as treatment with parasporins (PS) extracted from *Bacillus thuringiensis* (Bt) and different anticancer peptides (ACPs). In this work, the cytotoxic effect, and morphological changes present in HeLa cells by pure protein extracts of different Bt strains and synthetic peptides derived from PS6 called PS6DONE and PS6DTWO were evaluated. Additionally, cAMP levels in HeLa cells treated with the two peptides were quantified to determine their relationship with the adenylate cyclase (AC) signaling pathway by means of a direct competitive ELISA assay. The results show a high cytotoxic effect presented by protein extracts from parasporal inclusions against the HeLa cell line associated with necrosis. On the other hand, a cytotoxic effect of the PS6DONE peptide and an increase in cAMP levels were observed, which were accompanied by morphological changes that suggested an autophagy process.

Keywords: Cancer, cervix, parasporin, HeLa, *Bacillus thuringiensis*

Introducción

El cáncer es un término que se asocia a un conjunto de enfermedades que se caracterizan por alteraciones anormales de las células, generalmente por mutaciones en el genoma, las cuales pueden producir efectos adversos a la homeostasis celular, alteraciones en el metabolismo y en el ciclo celular. Esta enfermedad ostenta una alta morbilidad y mortalidad en el mundo (Ministerio de salud y protección social-Instituto Nacional de cancerología., 2012). En particular, se sabe que el cáncer de cuello uterino es una de las principales causas de muerte por cáncer entre las mujeres. En el año 2020, se reportaron 607127 casos nuevos y 341831 muertes por cáncer de cuello uterino en todo el mundo (*Cervix Uteri Source: 2020, 2021*). Algunas regiones en vía de desarrollo de África, América Latina, Caribe y Asia son las más afectadas presentando un registro de muertes del 90% sobre el total mundial (Torre et al., 2015). En Colombia, se reportaron 4742 casos nuevos y 2490 muertes por cáncer de cuello uterino para ese mismo año, siendo el tercer tipo de cáncer con mayor registro luego del cáncer de pulmón y colorrectal (*Cervix Uteri Source: 2020, 2021*). Adicionalmente, fue estimado que para 2021 se presentarían alrededor de 14480 casos nuevos y alrededor de 4290 muertes por cáncer de cuello uterino en todo el mundo.

El cérvix uterino está ubicado en la parte inferior del útero, posee una forma cilíndrica, con una longitud de alrededor de 3 cm y un diámetro aproximado de 2 cm (Jordan et al., 2009). Está compuesto por tres zonas anatómicas principales con morfología diferente: el ectocérvix (tejido epitelial escamoso estratificado), endocérvix (tejido epitelial columnar) y la zona de transformación (tejido epitelial metaplásico) (Deng et al., 2019), siendo esta zona de transformación en la que se generan gran parte de los casos de cáncer de cuello uterino (Deng et al., 2019; Van hede., 2014).

Algunos de los factores de riesgo para el cáncer de cuello uterino es la exposición al

dietilestilbestrol (DES) (Herbst et al., 1971; Hoover et al., 2011), el tabaquismo (Su et al., 2018; Appleby et al., 2006) e infección por clamidia (Zhu et al., 2016). No obstante, la principal causa de riesgo es la infección por el Virus de Papiloma Humano (VPH) (Deng et al., 2018; Van hede et al., 2014), de los cuales se destacan los serotipos VPH-16 y VPH-18 al poseer mayor prevalencia (Schiffman et al., 2009).

Existen distintos tratamientos contra el cáncer de cuello uterino que se plantean según la estadificación del carcinoma, estos abarcan la cirugía (histerectomía), radioterapia y la quimioterapia (Bhatla et al., 2018). En el estadio I o microinvasivo los principales tratamientos son la conización cervical y linfadenectomía pélvica; en el estadio II la histerectomía radical la cual consiste en la extirpación total del útero con efectos directos en la fertilidad de la mujer, y para el estadio IV se recomienda una exenteración pélvica (Bhatla et al., 2018; Bhatla et al., 2019). Las náuseas y vómito producidos como respuesta al tratamiento con quimioterapia son uno de los efectos más comunes (Simino et al., 2020), sin embargo, utilizada en pacientes con cáncer ginecológico puede llegar a presentar efectos secundarios asociados a neuropatía periférica (CIPN) (Hiramoto et al., 2021). Adicionalmente, puede comprometer órganos como la médula ósea, la piel, el tracto gastrointestinal, el corazón y los riñones, interfiriendo con la proliferación normal de sus células y la actividad de angiogénesis (Schirmacher et al., 2019). Debido a lo anterior, surge la necesidad de evaluar alternativas terapéuticas para el cáncer de cuello uterino.

Bacillus thuringiensis (Bt) es una bacteria saprofita Grampositiva, reconocida por la producción de varias proteínas con propiedades citotóxicas (Velásquez et al., 2018). Un gran número de cepas de esta especie en la etapa de esporulación producen inclusiones parasporales denominadas Cry (Crystal), Cyt (Cytolytic), parasporinas (PS), y proteínas de capa S (SLP). En la fase de crecimiento induce otros dos tipos de proteínas insecticidas denominadas proteínas

insecticidas vegetativas (Vip) y proteínas insecticidas secretadas (Sip) (Mendoza et al., 2020; Velásquez et al., 2018).

Las proteínas Cry y Cyt han sido estudiadas por su actividad insecticida y hemolítica, siendo proteínas importantes para el control de plagas (Mizuki et al., 1999). Desde 1999, Mizuki et al. Estudiaron por primera vez la capacidad de proteínas producidas por aislamiento masivo de cepas nativas de Bt sin capacidad insecticida ni hemolítica en múltiples líneas celulares tales como HeLa, células T normales y células T de leucemia (Mizuki et al., 1999). Estas proteínas parasporales digeridas con proteasas presentan capacidad citocida contra células T de leucemia (Saitoh et al., 2006) y células de cáncer de cuello uterino HeLa *in vitro* (Nagamatsu et al., 2010). Adicionalmente, se ha reportado que presentan una capacidad para discriminar entre células normales y células cancerígenas (Mizuki et al., 2000).

Desde los años 2000, se han caracterizado y clasificado 19 PS en 6 familias con una nomenclatura designada convenientemente por su identidad de aminoácidos por parte del Comité de clasificación y Nomenclatura de Parasporinas en 2005 (Crickmore, 2021). Se ha observado que estas proteínas tienen un amplio espectro de citotoxicidad contra líneas celulares de diversos tipos como: HeLa (cáncer de cuello uterino), MOLT-4 (Leucemia de células T), HL60 (Leucemia mieloide), HepG2 (cáncer de hígado), Jurkat (leucemia de linfocitos T), y CACO-2 (cáncer de colon) (Xu et al., 2014).

Las PS, al igual que las proteínas Cry, se encuentran como protoxinas (Mizuki et al., 2000). Las proteínas Cry se solubilizan en un pH alcalino, se activan por proteasas intestinales de los insectos y se unen a receptores específicos como cadherinas, fosfatasas alcalinas o aminopeptidasas (Mendoza et al., 2020). Las PS se solubilizan en álcali y son activadas con proteinasa K o tripsina, generando un heterodímero estable (Mendoza et al., 2020).

Los mecanismos de acción de las distintas PS no están del todo esclarecidos. No obstante, la evidencia sugiere que puede compartir alguno de los mecanismos de muerte celular inducidos por proteínas Cry en insectos (Peraro et al., 2016). Las proteínas Cry pueden activar diferentes mecanismos de muerte celular, por ejemplo, la toxina Cry1Ab genera un efecto citotóxico en la línea celular High Five (H5) de insecto. Esta toxina induce la muerte celular por la activación de la vía de señalización Adenilil ciclasa (AC)/ proteína quinasa A (PKA). Cry1Ab se une a receptores específicos de cadherina (CADR) denominados BT-R1, activando la AC por medio de la subunidad G α s de la proteína G. La AC aumenta la concentración intracelular de AMPc, lo que activa a la PKA, desestabilizando el citoesqueleto, formando canales iónicos en la membrana, y finalmente, induciendo muerte celular (Zhang et al., 2006). Adicionalmente, se han observado otros mecanismos de muerte celular asociadas a CADR, denominado modelo de formación de poros, el cual consiste en la unión secuencial a CADR, glicosilfosfatidilinositol (GPI) y aminopeptidasa N anclada a membrana (APN), esto induce la formación de poros catiónicos específicos, causando lisis osmótica (Castella et al., 2019).

Se ha observado que la participación de iones divalentes como Ca⁺² y Mg⁺² es necesaria para causar efectos citotóxicos por medio de las proteínas Cry1Ca y Cry1Ab en distintos tipos de células como H5 y SF9, esto se ha evidenciado por medio del efecto protector de EDTA el cual quela estos iones divalentes, causando un efecto protector al inhibir la producción de AMPc (Castella et al., 2019; Zhang et al., 2006).

Asimismo, otras herramientas que han tenido potencial como agentes antimicrobianos son los denominados péptidos antimicrobianos catiónicos (CAMPs) (Barreto et al., 2019) de los cuales algunos de ellos han presentado efectos anticancerígenos denominándose péptidos anticancerígenos (ACPs) (Felício et al., 2017). Estos péptidos pueden tener una gran variabilidad

fisicoquímica, sin embargo, muchas de sus características se resumen a presentar una alta hidrofobicidad, ser anfipáticos, poseer estructuras secundarias estables como α -hélice y poseer una carga positiva (Barreto et al., 2019). Estas características le permiten asociarse a diferentes componentes que están presentes en la membrana celular de líneas cancerígenas como la fosfatidilserina (Epanand et al., 1999).

En consecuencia, las PS y péptidos derivados de regiones de interés de PS pueden ser tenidos en cuenta como posibles alternativas terapéuticas para el tratamiento del cáncer de cuello uterino. Por lo que este trabajo plantea como objetivo identificar el efecto de la muerte celular inducida por PS y péptidos sintéticos de la PS6 de Bt en células de cáncer de cuello uterino y dilucidar su relación con la vía de adenilato ciclasa.

1. Materiales y Reactivos

1.1 Cultivo celular

Se cultivaron células de adenocarcinoma de cérvix – HeLa y células no cancerígenas VERO en medio de cultivo celular DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 20% y al 10% respectivamente con penicilina/estreptomina en una concentración de 100 u/mL. Ambas líneas celulares fueron cultivadas en condiciones estándares de cultivo a 37 °C, 5% de CO₂ y atmósfera humidificada. Todos los ensayos fueron realizados a partir de células con una confluencia máxima de 70 a 80% y una viabilidad superior al 90%.

1.2 Extractos proteicos de las cepas de Bt

Se evaluaron los extractos proteicos de siete cepas diferentes de Bt: Bt *seouloensis*, Bt

dakota 1, Bt HD-2, Bt *oswaldocruzi*, Bt *seromalayensis*, Bt *neoleonensis* y Bt *israelensis*. Los extractos proteicos se filtraron por medio de filtros de polietersulfona con un tamaño de poro de 0.22 μm (NEST cat No. 380111), se trataron con 0.3 mg/ml de proteinasa K, y se incubaron por una hora a 37°C y 5% de CO₂, posteriormente la proteinasa K se desactivó con fluoruro de metilfenilsulfonilo (PMSF) a una concentración final de 0.1 mM.

1.3 Péptidos derivados de PS6

La PS6 es una proteína poco estudiada de 84 KDa con un mayor efecto citotóxico contra líneas celulares cancerígenas de cáncer de hígado humano Hep-G2 y cáncer de cuello uterino HeLa (Nagamatsu et al., 2010), por lo que se sintetizaron dos péptidos correspondientes a dos regiones diferentes de la PS6 por medio de la empresa GenScript (Tabla 1). El péptido uno, denominado PS6DONE, es un péptido mediano de 30 residuos de aminoácidos de la α -hélice del dominio I de la PS6, el cual posee carga neta positiva. El péptido dos, denominado PS6DTWO, es un péptido corto de 20 residuos de aminoácidos del loop 3 del dominio II de la PS6, el cual posee una carga neta neutra (0).

Tabla 1. Características de los péptidos sintéticos

| Péptido | Residuos de aminoácidos | Tamaño (aa) | Carga neta | Peso molecular (g/mol) |
|----------------|------------------------------------|--------------------|-------------------|-------------------------------|
| PS6DONE | GPIGTTIGGAISGPIANALF GLIPGMKPLT | 30 | +1 | 2835.41 |
| PS6DTWO | QNLTLTLDTIGPIFPGKYVIN | 20 | 0 | 2216.61 |

1.4 Ensayo de citotoxicidad

Con el propósito de evaluar los efectos citotóxicos de las PS y péptidos sintéticos se realizaron ensayos de MTT. Este es un ensayo colorimétrico basado en la reducción de Bromuro

de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) a formazan, generando un cambio colorimétrico de amarillo a púrpura dado por la actividad metabólica de enzimas mitocondriales oxidorreductasas dependientes de NAD(P)H en las células viables (Fotakis et al., 2005; Kumar et al., 2018).

Para este ensayo se utilizó una microplaca de 96 pocillos, y se sembraron 2.0×10^4 células por pozo en un volumen de 100 μl de medio DMEM sin suplementar. Posteriormente, las células se incubaron por 24 horas para asegurar su adhesión a la microplaca. Para los ensayos, se incubaron las células por 24 horas con los tratamientos de péptidos y extractos proteicos de inclusiones parasporales, se adicionó en cada pocillo 10 μl de MTT y se incubó durante 4 horas a 37 °C y 5% de CO₂. Luego, se retiró el sobrenadante, se adicionó 100 μl de DMSO por pozo y se incubó durante 30 minutos para solubilizar los cristales formados durante el ensayo (Kumar et al., 2018; Fotakis et al., 2005). La absorbancia se midió en un lector de microplaca a una longitud de onda de 570 nm (Kumar et al., 2018).

La citotoxicidad de los extractos proteicos de la inclusión parasporal de las diferentes cepas de Bt fue evaluada durante 24 horas a diferentes concentraciones: Bt *Seoulensis*, Bt HD-2 y Bt *Oswaldocruzi* se evaluaron a una concentración de 12 $\mu\text{g/mL}$, Bt *Dakota* se evaluó en dos concentraciones, una concentración máxima de 12 $\mu\text{g/mL}$ y una mínima de 0.73 $\mu\text{g/mL}$, Bt *Seromalayensis* a una concentración de 8.66 $\mu\text{g/mL}$, Bt *Israelensis* y Bt *Neoleonensis* se evaluaron a una concentración de 7.75 $\mu\text{g/mL}$ y 2.17 $\mu\text{g/mL}$ correspondientemente. Se ha evidenciado que el EC50 en células de cáncer de cuello uterino varía según el tipo de parasporina, por lo que en este estudio se evaluó una concentración máxima de 12 $\mu\text{g/mL}$ debido a que la PS3 presenta un EC50 mayor a 10 $\mu\text{g/mL}$ (Yamashita et al., 2005). Sin embargo, las otras concentraciones se tomaron como la máxima concentración a la que se produjo la extracción de proteínas de las inclusiones

parasporales, debido a que la extracción de la proteína es una limitante y la concentración a la que se obtienen los extractos varia.

La citotoxicidad de los péptidos PS6DONE y PS6DTWO se evaluó a partir de una dilución seriada desde una concentración de 250 $\mu\text{g/mL}$ hasta una concentración de 15.62 $\mu\text{g/mL}$ para cada péptido por 24 horas con el fin de determinar el IC₅₀ e IC₂₅. Como control positivo fue utilizado DMSO al 10% por los mismos periodos de incubación analizados. Adicionalmente, se realizó un ensayo de tiempo-respuesta durante periodos de tiempo de 0, 24, 48 y 72 horas con el péptido PS6DONE a la concentración seleccionada. El ensayo y las lecturas de absorbancia se realizaron como se mencionó anteriormente. Una vez establecido el tiempo y concentración de trabajo estas condiciones fueron evaluadas en la línea celular VERO de tipo no tumoral. Todos los ensayos descritos fueron realizados por triplicado.

1.4.1 Ensayo con IBMX y Forskolina

Con el propósito de evaluar la influencia de la vía del AMPc en el papel de los péptidos sintéticos en la viabilidad celular se realizaron ensayos de MTT como fue descrito previamente. Como control positivo fue utilizado forskolina a 50 μM , el cual es un activador de la Adenilil Ciclasa. Cada compuesto fue incubado en presencia del inhibidor 1-metil-3-isobutilxantina (IBMX) a una concentración de 500 μM el cual es un inhibidor de fosfodiesterasas, esto con el fin de evitar la degradación del AMPc.

1.4.2 Evaluación de la vía apoptótica dependiente de caspasas con tratamiento del péptido PS6DONE

Para evaluar los efectos del péptido sintético PS6DONE en la vía de muerte celular programada dependiente de caspasas, se realizaron ensayos de MTT como fue descrito anteriormente. Se incluyeron células HeLa sin tratamiento, con el tratamiento del péptido, el

inhibidor de caspasas Z-VAD-FMK (20 μ M) solo o en combinación con DMSO (10%) o el péptido PS6DONE durante 24 h.

1.5 Visualización de Péptidos

Para determinar la estructura tridimensional de los péptidos PS6DONE y PS6DTWO se utilizó la herramienta bioinformática I-TASSER (*Iterative Threading ASSEmbly Refinement*), la cual utiliza un enfoque compuesto de modelos de predicción de estructuras tales como threading, ab initio y estructura nivel-atómico (Roy et al., 2010). Se generaron cinco modelos para cada péptido de su posible configuración tridimensional los cuales se visualizaron por medio de Chimera versión 1.15 (Pettersen et al., 2004)., La α -hélice y el loop 3 de la PS6 se representan en modelos de cinta.

1.6 Cuantificación de AMPc por Inmunoensayo Enzimático (ELISA)

La cuantificación de AMPc se determinó por medio del inmunoensayo enzimático AMPc directo de Sigma-Aldrich (cat, No.: CA200). Se utilizaron células HeLa tratadas con IBMX (500 μ M) como control de AMPc basal y células tratadas con IBMX y forskolina (50 μ M) como control positivo. Las células (2.0x10⁴ células) se trataron durante 24h con el péptido PS6DONE a una concentración de 57.6 μ g/mL y posteriormente, fueron incubadas con 0.1 M HCL para lisar las células. Adicionalmente, se acetilaron con un reactivo de acetilación (trietilamina/anhidrido acético) para aumentar la sensibilidad del ensayo.

Para la preparación de los estándares se rotularon 5 tubos; en el primer tubo (estándar 1) se pipetearon 330 μ L de 0.1 HCL, 3.33 μ L de estándar (2000 pmol/mL) (cat, No.: C7601), y 16.5 μ L

de agente acetilador. En los tubos 2 al 5 (estándar 2 – estándar 5) se adicionaron 250 μL de 0.1 HCL y se pipetearon 83.3 μL del tubo 1 al tubo 2 y se realizó un vórtex por 10 s, y se continuo de la misma forma del tubo 3 al 5.

Las muestras fueron incubadas en placa por un periodo de tiempo de 2 horas en agitación a 500 rpm. Se retiró el exceso de sobrenadante por medio de una serie de lavados, y se añadió anticuerpo de conejo anti-AMPC y como sustrato p-nitrofenil fosfato. La reacción fue detenida y la absorbancia leída a una longitud de onda de 405 con corrección a una longitud de 570 nm (Tijssen P. in “Practice & Theory of Enz.Immunoassays). La intensidad del color amarillo es indirectamente proporcional a la concentración de AMPC. Para calcular la concentración de AMPC se usó la densidad óptica media y teniendo en cuenta la curva obtenida con los estándares (Tijssen P. in “Practice & Theory of Enz.Immunoassays).

1.7 Análisis de datos

Los análisis de datos se realizaron con el software GraphPad Prism versión 8.0 (GraphPad Software, Inc, EE. UU). Los datos de los ensayos de muerte celular a diferentes concentraciones de extractos de proteínas de las inclusiones parasporales y péptidos, se evaluaron por triplicado y se presentan como media \pm error estándar de la media (SEM). Se consideró como diferencia significativa un valor *p* menor a 0.005 por medio de dos pruebas estadísticas: *t*-Student no pareado utilizado para comparación de dos grupos y ANOVA a una vía y pos-test de Tukey para la comparación entre múltiples grupos.

Los datos de las absorbancias obtenidas en el ensayo dosis-respuesta con el tratamiento del péptido PS6DONE a diferentes concentraciones fueron normalizados y por medio del GraphPad Prism versión 8.0 (GraphPad Software, Inc, EE. UU) se realizó un análisis XY fit spline/LOWESS

para interpolar los datos a los que se obtiene la inhibición del 25 y 50%.

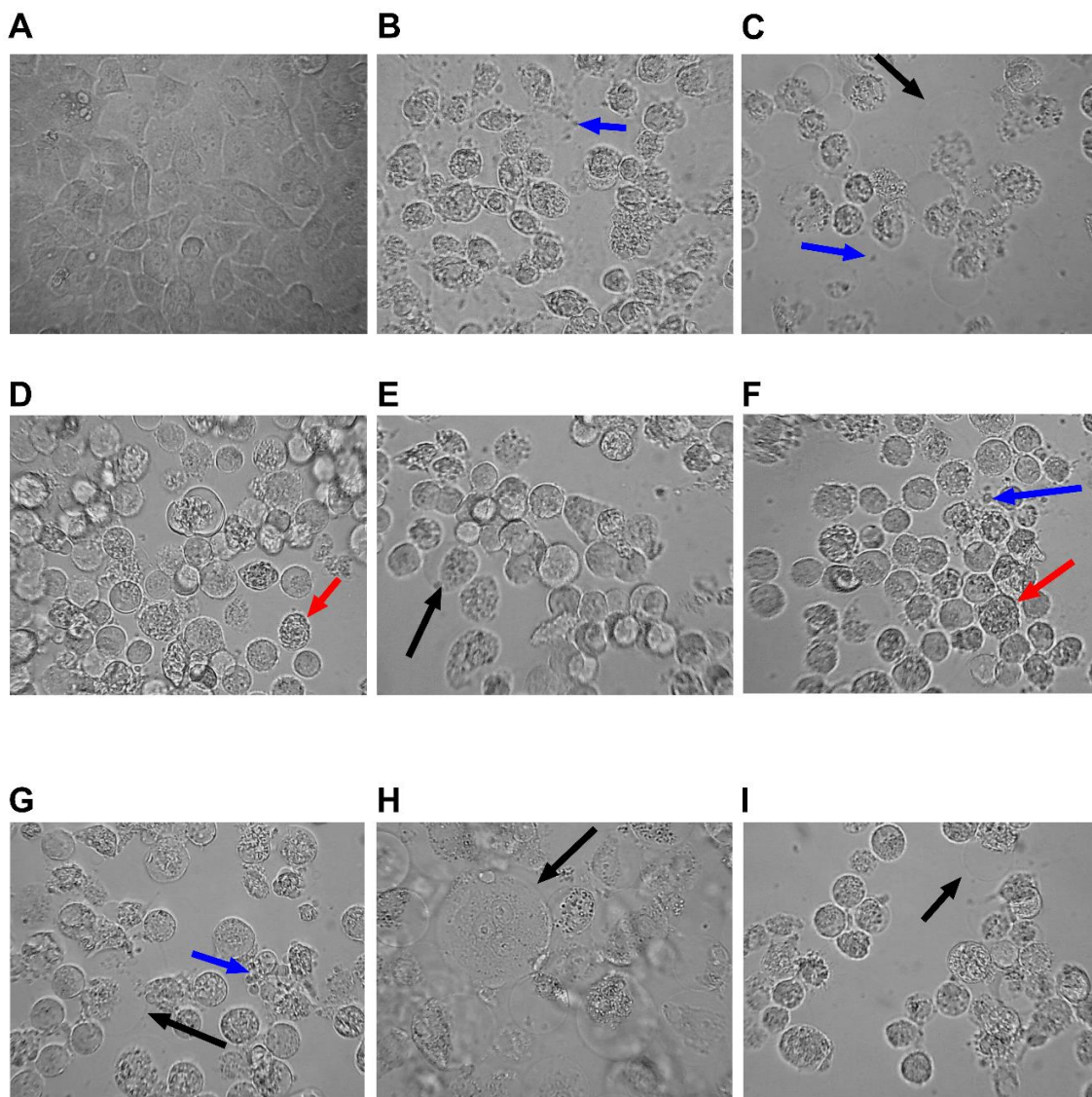
2. Resultados y Discusión

2.1 Cambios morfológicos inducidos por los extractos proteicos de inclusiones parasporales de Bt en HeLa

Con el fin de observar los cambios morfológicos producidos por los extractos proteicos de las inclusiones parasporales de las siete cepas de Bt, las células tratadas se visualizaron en el microscopio invertido (Figura 1). Las células no tratadas mostraron una morfología adherente, irregular y con una alta densidad de unión (Figura 1A). En contraste, las células tratadas con 10% de DMSO mostraron una morfología circular con una reducción del citoplasma y pérdida de adherencia entre células y la superficie (Figura 1B). Por su parte los extractos de las inclusiones parasporales de Bt *Seouloensis*, Bt HD-2, Bt *Seromalayensis*, BT *Dakota 2*, Bt *Neoleonensis*, y Bt *Israelensis* mostraron efectos en células HeLa asociados a hinchamiento citoplasmático, formación de ampollas o agregados citoplasmáticos en los límites del citoplasma (Flecha negra) y en algunos casos liberación de contenido citoplasmático en el medio (Flecha azul) (Figura 1), estos efectos en los cambios morfológicos están relacionados con muerte celular asociada a necrosis (Festjens et al., 2006).

Por su parte, los extractos proteicos de Bt *Dakota 1* y Bt *Oswaldocruzi* muestran efectos en células HeLa asociados a reducción en el tamaño citoplasmático, pérdida de la adherencia celular, y formación de agregados citoplasmáticos relacionados posiblemente con vacuolas o vesículas (Flecha roja), efectos relacionados con muerte celular por autofagia (Veeran et al., 2017)

o apoptosis (Elmore et al., 2007). Sin embargo, la principal diferencia entre Bt *Dakota* 1 y Bt *Dakota* 2 es la concentración del tratamiento. Bt *Dakota* 1 se administró a una concentración de 12 $\mu\text{g/mL}$, en comparación a *Dakota* 2 a una concentración de 0.73 $\mu\text{g/mL}$, por lo que supone que la concentración del extracto de la inclusión parasporal juega un papel importante en el tipo de muerte celular. Adicionalmente a una menor concentración se observó efectos de hinchamiento citoplasmático más notorios en comparación con los otros tratamientos (Figura 1.H).



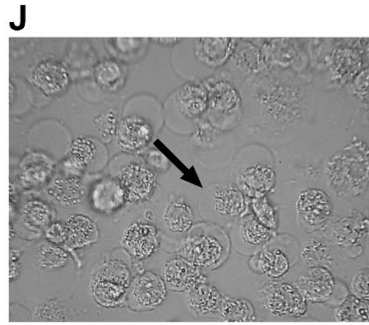


Figura 1. Efecto citopático de las inclusiones parasporales de siete cepas de Bt en células HeLa. Las células se incubaron durante 24 horas con los diferentes extractos proteicos de las inclusiones parasporales. A) Células sin tratamiento, B) DMSO 10%, C) *Bt seouloensis* (12.00 $\mu\text{g/mL}$), D) *Bt dakota 1* (12.00 $\mu\text{g/mL}$), E) *Bt HD-2* (12.00 $\mu\text{g/mL}$), F) *Bt oswaldocruzi* (12.00 $\mu\text{g/mL}$), G) *Bt seromalayensis* (8.66 $\mu\text{g/mL}$), H) *BT dakota 2* (0.73 $\mu\text{g/mL}$), I) *Bt neoleonensis* (2.17 $\mu\text{g/mL}$), y J) *Bt israelensis* (7.75 $\mu\text{g/mL}$). Las células HeLa se observaron en un campo óptico de 40X. Las flechas azules indican componentes extracelulares, las flechas rojas visualizan formación de agregados intracelulares o vacuolas y las flechas negras indican hinchamiento del citoplasma.

2.2 Evaluación del efecto citotóxico de los extractos proteicos de inclusiones parasporales de Bt

Los efectos en la citotoxicidad de la línea celular HeLa producidos por los extractos proteicos de las inclusiones parasporales de siete cepas de Bt fue evaluada mediante ensayos de MTT. Todos los extractos evaluados presentaron una reducción significativa en el porcentaje de viabilidad celular después de 24 h de administración (Figura 2). Los extractos que presentaron mayor efecto citotóxico fueron: *Bt dakota 2* (96.64%), *Bt israelensis* (92.75%), *Bt seoulensis* (87.10%), *Bt HD-2* (86.05%), *Bt dakota 1* (79.94%) y *Bt oswaldocruzi* (75.68%).

En otros estudios, se ha analizado el efecto citotóxico en células T de leucemia y hemolítico en eritrocitos de cabra de las inclusiones parasporales de cinco de las siete cepas probadas en este trabajo (*Bt seoulensis*, *Bt dakota*, *Bt neoleonensis*, *Bt israelensis* y *Bt oswaldocruzi*) (Mizuki et al., 1999). El estudio en mención se observó que las inclusiones parasporales de *Bt oswaldocruzi* y *Bt seoulensis* no mostraron ningún efecto en contra de los dos tipos de líneas celulares

mencionadas anteriormente. Sin embargo, en este estudio se observó un alto efecto citotóxico frente a células de cáncer de cuello uterino HeLa (Figura 2), por lo que estos dos tipos de inclusiones parasporales pueden ser estudiados en otro tipo de células no cancerígenas para observar su comportamiento y poder ser tomadas en cuenta para futuros experimentos *in vivo*.

Asimismo, *Bt dakota*, *Bt neoleonensis* y *Bt israelensis* mostraron efecto citotóxico contra células T de leucemia (Mizuki et al., 1999), lo que, en adición con este trabajo, el efecto de muerte celular en células de cáncer de cuello uterino HeLa producido por estos 3 extractos de inclusiones parasporales implica un mayor espectro de acción sobre distintos tipos de cáncer.

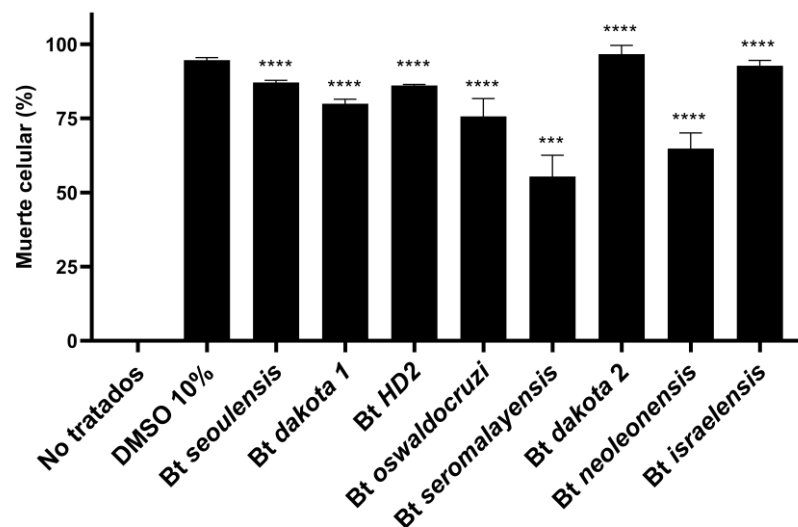


Figura 2. Porcentaje de muerte celular inducida por los extractos de inclusiones parasporales de siete cepas de Bt. Las células HeLa se incubaron con cada uno de los extractos obtenidos de las cepas de Bt durante 24 horas y evaluados mediante ensayos de MTT. Los valores se representan como la media \pm SEM de tres experimentos individuales (n=3). Las diferencias estadísticas entre los extractos fueron determinadas por medio de una prueba *t*-Student (***) $p=0.0003$, **** $p<0.0001$).

Se ha descubierto que el componente de inclusión parasporal Cyt1A de *Bt israelensis* ha mostrado un EC50 de 8,6 $\mu\text{g/mL}$ (Mizuki et al., 2000), por lo que la reducción de la viabilidad

celular del 92.75% del extracto evaluado a una concentración de 7.75 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 2) sugiere un efecto adicional de otros componentes proteicos presentes en el extracto.

En conjunto estos hallazgos destacan el potencial rol citotóxico de las inclusiones parasporales obtenidos de las siete cepas de Bt en cáncer de cuello uterino. Sin embargo, para poder ahondar en los efectos observados, es importante aislar y purificar las proteínas presentes en cada cepa bacteriana en estado de esporulación. Esto con el propósito de determinar la presencia de parasporinas y adicionalmente, otras proteínas implicadas en procesos de muerte celular en células HeLa. Así mismo, es relevante poder evaluar las proteínas específicas en un rango amplio de concentraciones para calcular el IC50 en el mismo cultivo celular.

2.3 Modelamiento estructural de los péptidos sintéticos PS6DONE y PS6DTWO

Debido a la baja concentración obtenida de los extractos derivados de las cepas de Bt, se procedió a analizar dos péptidos sintéticos derivados de regiones de interés de la PS6 denominados PS6DONE y PS6DTWO. El PS6DONE es un péptido de 30 aminoácidos [GPIGTTIGGAISGPIANALFGLIPGMKPLT] derivado del dominio 1 de la PS6. Su estructura secundaria corresponde a una α -hélice (Figura 3A) con una carga neta positiva de +1 (Tabla 1). Esta región fue seleccionada debido a antecedentes con péptidos derivados de proteínas Cry11Bb como posibles antimicrobianos denominados péptidos antimicrobianos catiónicos como el péptido BTM-P1 derivado del dominio 1 de 26 aminoácidos con estructura helicoidal, el cual ha demostrado tener actividad contra distintas cepas bacterianas (Segura et al., 2007).

Por su parte, el PS6DTWO es un péptido de 20 aminoácidos [QNLTLTLDTIGPIFPGKYVIN], el cual corresponde a la estructura del bucle 3 (Figura 3B) del dominio 2 de la PS6, con una carga neta neutra (Tabla 1). Esta región fue considerada teniendo en cuenta que se ha demostrado en ensayos de mutagénesis dirigida a residuos de fenilalanina la

importancia de los bucles expuestos a superficie con el dominio de unión a receptor, además, los residuos hidrófobos desempeñan un papel importante al generar interacciones con las regiones hidrófobas de la bicapa lipídica la actividad insecticida (Wu et al., 2000). Sin embargo, la secuencia de este péptido presenta 8 aminoácidos hidrofóbicos (I:3, V:1, L:3 y F:1) lo que presenta un radio de hidrofobicidad de 40% (Wang et al.2016), en contraste con un 50% de hidrofobicidad presentada por la mayoría de los péptidos antimicrobianos (Yeaman et al., 2003).

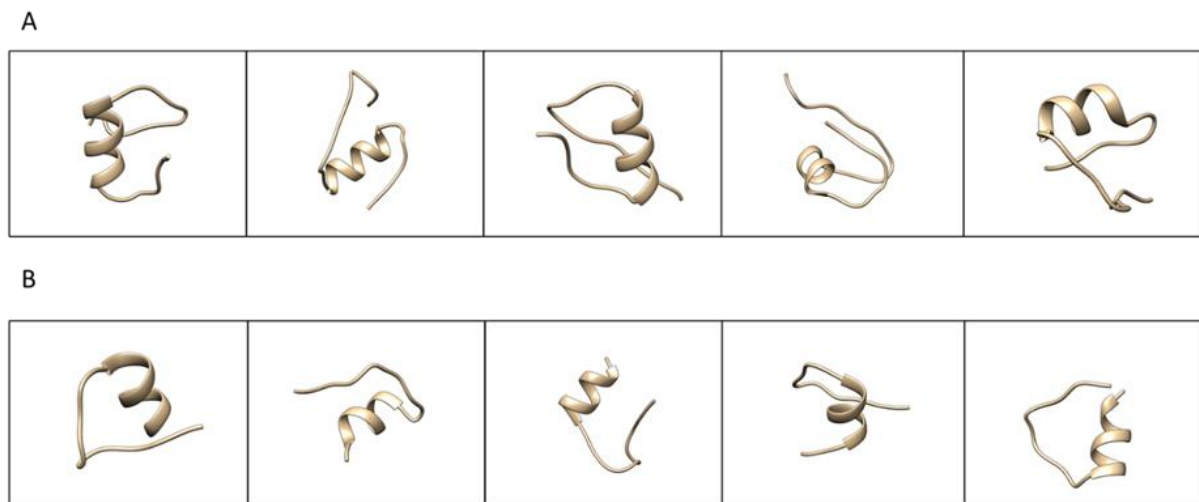


Figura 3. Modelo estructural propuesto para los péptidos sintéticos por medio de I-TASSER; A) α -hélice del péptido PS6DONE, B) loop 3 del péptido PS6DTWO. Los péptidos se visualizaron por medio de Chimera versión 1.15.

2.4 Efecto citotóxico de péptidos sintéticos derivados de PS6

Empleando los dos péptidos sintéticos PS6DONE y PS6DTWO se procedió a evaluar sus efectos citotóxicos en células HeLa. Inicialmente, los péptidos fueron analizados por medio de diluciones seriadas a partir de 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (250, 125, 62.5, 31.25 y 15.62 $\mu\text{g}/\text{mL}$). El péptido PS6DONE generó una reducción significativa en la viabilidad celular en concentraciones superiores a 31.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Figura 4A). La concentración con la mayor reducción en la viabilidad celular fue de 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ tras 24 horas con el tratamiento. Por su parte, el péptido PS6DTWO no presentó un efecto citotóxico en ninguna concentración, por el contrario, en concentraciones de

125, 62.5 y 15.62 $\mu\text{g/ml}$ mostró un aumento en la proliferación celular (Figura 4B).

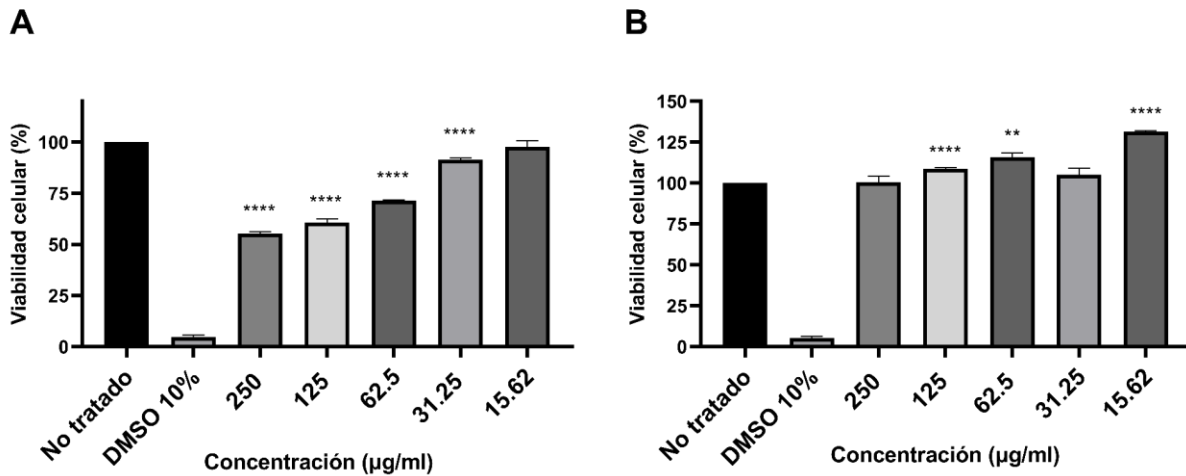


Figura 4. Porcentaje de viabilidad celular observado en la línea celular de cáncer de cuello uterino HeLa tratada con PS6DONE y PS6DTWO. Las células fueron tratadas con (A) PS6DONE y (B) PS6DTWO en un rango de concentraciones entre 15.62-250 $\mu\text{g/mL}$ durante 24 h y analizadas mediante un ensayo MTT. Los valores se representan como media \pm SEM de tres experimentos individuales ($n=3$). Las diferencias estadísticas fueron determinadas por medio de una prueba *t*-Student (** $p<0.001$, **** $p<0.0001$).

Una posible explicación de los efectos citotóxicos producidos por PS6DONE en comparación al péptido PS6DTWO (Figura 4) es por la naturaleza química de los mismos (Barreto et al., 2019; Muñoz et al., 2007; Segura et al., 2007). Los péptidos con cargas netas positivas denominados péptidos catiónicos antimicrobianos (Barreto et al., 2019) o péptidos anticancerígenos (Felicio et al., 2017) presentan una mayor actividad citotóxica frente a péptidos con carga negativa o péptidos con carga neta neutra (Barreto et al., 2019). Los péptidos catiónicos como PS6DONE pueden presentar una mayor interacción electrostática con diferentes moléculas que le confieren una carga negativa a la membrana de células cancerígenas como la fosfatidilserina (Barreto et al., 2019; Epanand et al., 1999; Yamaji et al., 2006). Adicionalmente, otra característica importante que determinan la efectividad de los péptidos anticancerígenos es su estructura y su hidrofobicidad, ya que estructuras α -hélice tienden a ser más activas, y péptidos con un porcentaje

alto de aminoácidos hidrofóbicos permiten una mayor interacción con la bicapa lipídica (Barreto et al., 2019).

Por consiguiente, las propiedades fisicoquímicas como la carga, la hidrofobicidad y la estructura de los péptidos anticancerígenos son importantes para generar un efecto citotóxico frente a células cancerígenas. Por ello, se sugiere aumentar la carga neta de los péptidos PS6DONE y PS6DTWO realizando una sustitución ácido-amida el cual consiste en sustituir el grupo -COOH (Carboxi) terminal por un grupo -CONH₂ (Amida) terminal (Jin et al., 2016). Por su parte, para el péptido PS6DTWO se puede sustituir aminoácido aspartato (Asp) por su homólogo amida la asparagina (Asn) (Ueno et al., 2011). Cabe resaltar que la adición aleatoria de aminoácidos con carga positiva supone una desventaja ya que puede interferir con la estructura original del péptido (Ueno et al., 2011).

Debido al efecto citotóxico presentado por el péptido PS6DONE se calculó el IC₅₀ (Figura 5A). La concentración a la que presentó el 50% de la muerte celular fue de 244.3 µg/mL, una dosis alta en comparación con el IC₅₀ reportado en otros trabajos para la PS6 (Nagamatsu et al., 2010) u otros péptidos anticancerígenos (Risso et al., 1998). Considerando la posibilidad de que el péptido pudiese afectar células no tumorales, se calculó también el IC₂₅ del péptido siendo de 57.6 µg/mL. A esta concentración, se reduce un 25% la viabilidad celular en HeLa como se observa en la figura 5A.

Por tanto, se evaluaron dos concentraciones del péptido PS6DONE 244.3 µg/mL y 57.6 µg/mL en células VERO, un linaje de células no cancerígenas proveniente de tejido epitelial de riñón de mono verde africano. Se observó que el péptido PS6DONE tiene un efecto similar en este linaje comparado con células HeLa ya que un tratamiento con el péptido a una concentración de 244.3 µg/ml redujo la viabilidad celular un 28.3%, y el tratamiento con el péptido a una

concentración de 57.6 $\mu\text{g/ml}$ redujo la viabilidad celular un 18.96% como se observa en la figura 5B. A razón de la disminución en la viabilidad celular debido a la concentración del péptido en células no cancerígenas, los posteriores ensayos se realizaron con la concentración al que se produce el IC25 en células HeLa.

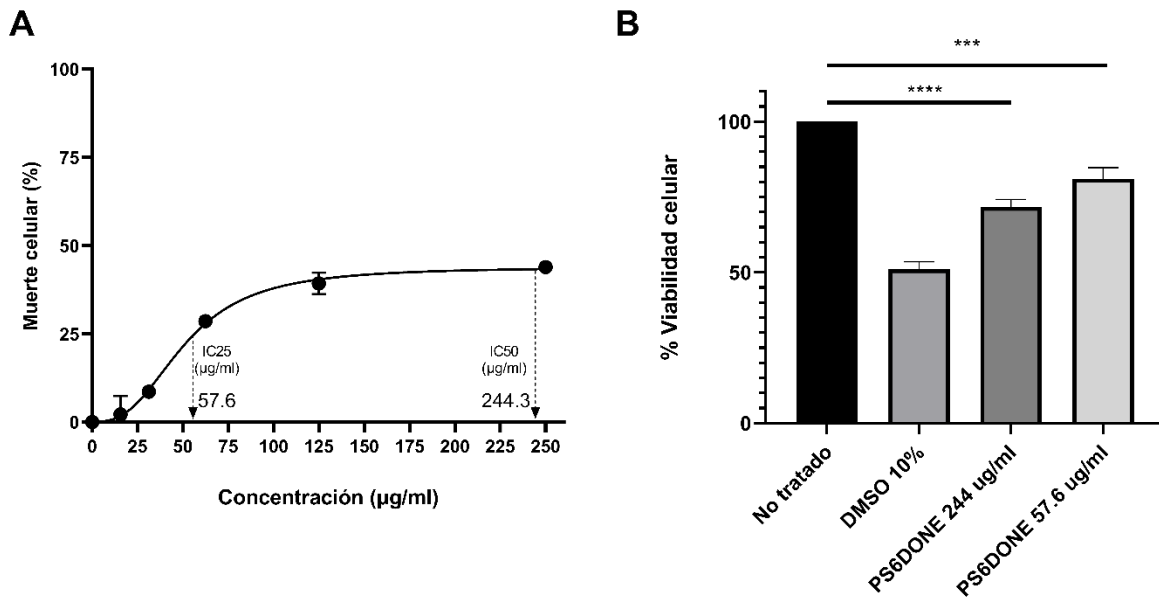


Figura 5. Actividad citocida del péptido PS6DONE en células HeLa y VERO. A) Curva de dosis-respuesta en la que se muestra el IC50 y el IC25 a partir de la exposición a diferentes concentraciones del péptido en la línea celular HeLa. (B) Porcentaje de viabilidad celular de células VERO con tratamientos del péptido PS6DONE a una concentración de 244.3 $\mu\text{g/ml}$ y 57.6 $\mu\text{g/ml}$ durante 24 horas. Las condiciones experimentales fueron analizadas mediante un ensayo MTT. Los valores se representan como media \pm SEM de tres experimentos individuales ($n=3$) Las diferencias estadísticas fueron determinadas por medio de una prueba *t*-Student (***) $p=0.001$, **** $p<0.0001$).

Adicionalmente, se realizó un ensayo de tiempo-respuesta del péptido PS6DONE en HeLa y se midió el efecto en la viabilidad celular tras la incubación en periodos de tiempo de 0, 24, 48 y 72 horas. Se logró observar una reducción en la viabilidad celular del 24.74% en un tiempo de 0 horas, y del 24.71% a las 24 horas. Posterior a las 48 horas se observó un efecto de muerte celular, reduciendo la viabilidad celular un 3.04%. Finalmente, tras 72 horas con el tratamiento se observó un efecto de proliferación celular aumentando un 3.54% la viabilidad celular, indicando que el

tiempo al que se presenta mayor efecto citotóxico es entre 0 y 24 horas. Sin embargo, no se presentaron diferencias significativas entre los tiempos analizados (Figura 6).

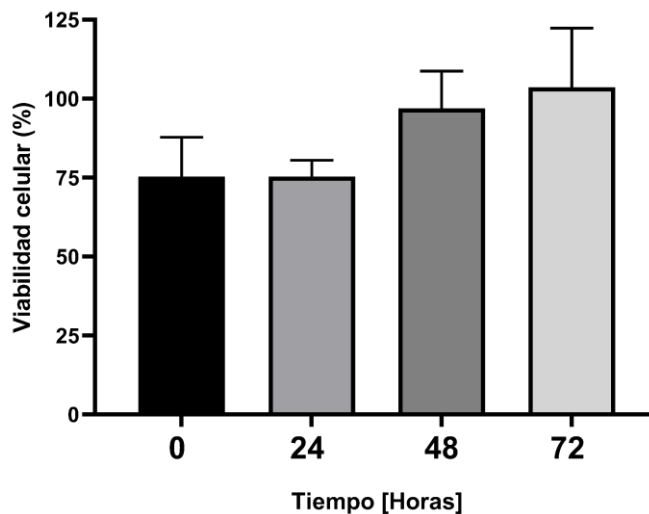


Figura 6. Porcentaje de viabilidad celular observado en la línea celular de cáncer de cuello uterino HeLa tratada con PS6DONE en diferentes periodos de tiempo. El péptido PS6DONE fue suministrado a células HeLa a una concentración de 57.6 $\mu\text{g/mL}$ y sus efectos en viabilidad fueron determinados en intervalos de tiempo de 0, 24, 48 y 72 horas por medio de un ensayo MTT. Los valores se representan como media \pm SEM de tres experimentos individuales ($n=3$). Los datos fueron analizados mediante una ANOVA a una vía y pos-test de Tukey, no se presentaron diferencias significativas.

2.5. Cambios morfológicos inducidos por el péptido PS6DONE en células HeLa

Los cambios morfológicos generados por el péptido PS6DONE fueron estudiados mediante un microscopio invertido en un campo óptico de 40X. Las células no tratadas muestran una alta confluencia con una alta densidad de unión y presentan una morfología característica de células epiteliales ya que se observan células adherentes y alargadas (Figura 7A). Las células tratadas con DMSO presentan una baja confluencia y muestran una morfología redondeada y reducción en el tamaño celular (Figura 7B). Finalmente, para las células tratadas con PS6DONE se observó pérdida en la confluencia celular, una morfología circular y una condensación celular posiblemente debido a la formación de vacuolas, las flechas indican los cambios morfológicos

asociados a una reducción celular y cambios hacia una morfología circular (Figura 7C), características asociadas a muerte celular por autofagia (Veeran et al., 2017), a diferencia de la muerte celular producida por necrosis esta no presenta hinchamiento citoplasmático.

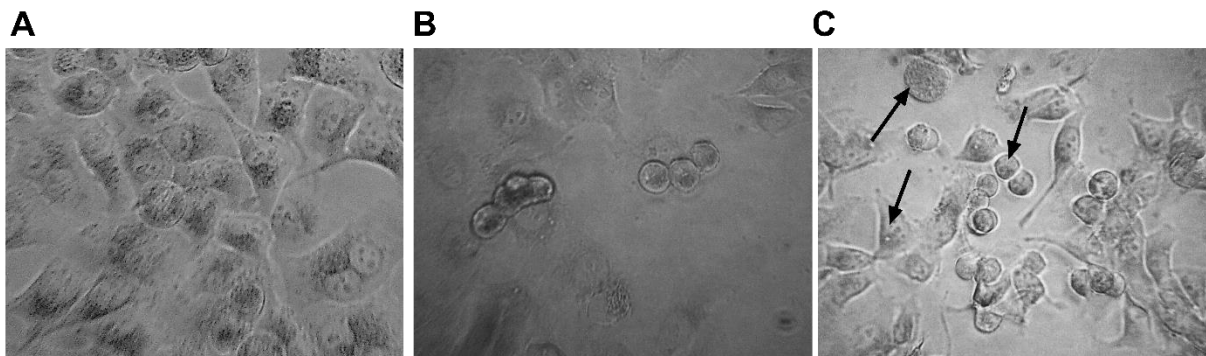


Figura 7. Efecto citopático inducido por el péptido PS6DONE en células HeLa. (A) Células no tratadas. (B) Células con DMSO al 10% y (C) células HeLa tratadas con péptido PS6DONE a una concentración de 57.6 µg/ml durante 24 horas. Las células HeLa se observaron en un campo óptico de 40X. Las flechas indican la morfología circular y la aparición de agregados o vacuolas intracelulares.

2.6 Niveles de AMPc en células HeLa tratadas con PS6DONE

Con el propósito de evaluar los posibles mecanismos de acción del péptido PS6DONE, se analizaron los niveles de AMPc en las diferentes condiciones experimentales. Los principales reguladores de AMPc en la célula son la Adenilil Ciclasa transmembrana (AC_{tm}) (Taussig et al., 1995) y la Adenilil Ciclasa soluble (AC_s) (Chen et al., 2000). La familia de estas enzimas es responsable de catalizar la conversión de ATP a AMPc y fosfato inorgánico (Kamenetsky et al., 2006). La vía de señalización mediada por el segundo mensajero AMPc involucra múltiples procesos fisiológicos de muerte y proliferación celular (Ladilov et al., 2014). Esta vía de señalización ha sido propuesta como activación por proteínas Cry1Ab y Cry1Ac, generando la unión de dichas proteínas a MsCAD (Cadherina Bombyx mori) o BT-R1, provocando la activación e inicio de cascada de señalización por la AC, aumentando los niveles intracelulares de PKA y

generando muerte celular y formando vesículas en la membrana, hinchamiento citoplasmático y posterior lisis (Zhang et al., 2006) A consecuencia de esto, se determinó la concentración de AMPc en células HeLa por medio de un inmunoensayo-ELISA competitivo directo.

IBMX es un inhibidor de fosfodiesterasas por lo que se usó como supresor de la degradación de AMPc en todos los grupos en una concentración de 500 μ M (Brueggemann et al., 2018). La concentración basal de AMPc en células HeLa solamente con IBMX fue de 7.12 pmol/mL (Figura 8A). Como control positivo se tomaron células tratadas con el diterpeno forskolina (Taussig et al., 1995) e IBMX que mostró una concentración de 27.3 pmol/mL. Por su parte, las células HeLa tratadas con el péptido PS6DONE a una concentración de 57.6 μ g/mL aumentaron significativamente los niveles de AMPc a 11.05 pmol/mL en comparación con las células sin tratamiento (Figura 8A).

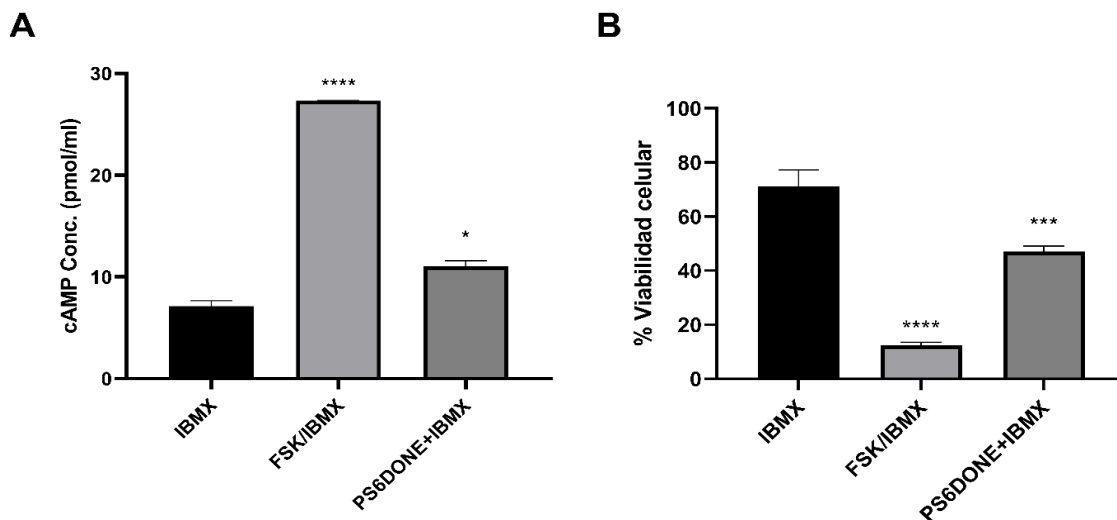


Figura 8. Niveles intracelulares de AMPc en células HeLa tratadas con el péptido PS6DONE. (A) Se incubaron células HeLa con IBMX (500 μ M), forskolina (50 μ M) e IBMX (500 μ M) y el péptido PS6DONE con IBMX (500 μ M) durante 24 horas. Los listados celulares se analizaron mediante un ensayo de ELISA para la cuantificación de AMPc. Los valores se representan como media \pm SEM de dos experimentos individuales (n=2). Los datos fueron analizados mediante una ANOVA a una vía y pos-test de Tukey (* $p=0.0161$, **** $p<0.0001$). (B) Porcentaje de viabilidad celular de los tratamientos con IBMX/FSK, IBMX y PS6DONE con IBMX (500 μ M) durante 24 horas. Los valores se representan como media \pm SEM de tres experimentos individuales (n=3).

Los datos fueron analizados mediante una ANOVA a una vía y pos-test de Tukey (***) $p=0.0005$, **** $p<0.0001$).

Uno de los mecanismos propuestos para péptidos con α -hélice como el péptido PS6DONE es la formación transmembranal de poros o canales iónicos por oligomerización (Hallock et al., 2002; Hoskin et al., 2008; Porcelli et al., 2004), generando un aumento en los niveles intracelulares de Ca^{+2} (calcio) y HCO_3^- (bicarbonato) presentes en el medio DMEM. En consecuencia, la ACs puede ser estimulada de forma dependiente de la concentración de estos iones (Geng et al., 2005) y aumentar los niveles de AMPc como se observa en la figura 8A. Un aumento en los niveles de AMPc puede desencadenar dependiendo de la línea celular en muerte o proliferación celular (Ladilov et al., 2014). Sin embargo, en este estudio observamos que una disminución significativa en el porcentaje de viabilidad celular producido por forskolina el cual disminuye a 12.48% y por el péptido PS6DONE a 47.12% (Figura 8B), poniendo evidencia que una mayor concentración de AMPc puede influir en la muerte celular de células HeLa. Estos hallazgos sugieren que el péptido PS6DONE podría inducir la muerte celular mediante una vía que involucra el aumento del AMPc.

2.7 Evaluación de muerte celular por apoptosis por el péptido PS6DONE

Para estudiar la muerte inducida por apoptosis producidos por el péptido PS6DONE se utilizó el inhibidor de caspasas Z-VAD-FMK (Pagani et al., 2020) y analizados mediante un ensayo MTT. Los resultados indicaron que no hubo reducción significativa en la muerte celular entre los grupos con células tratadas solamente con Z-VAD-FMK y las células tratadas con Z-VAD-FMK y el péptido PS6DONE. En contraste, se observó una diferencia significativa entre los grupos de células tratadas con el inhibidor y tratadas con Z-VAD-FMK y DMSO, el cual logró reducir la muerte celular como se observa en la figura 9. Por esta razón, se sugiere una posible vía de muerte celular por autofagia independiente de rapamicina (mTOR), a través de la activación de PKA/ERK y por último beclina-1 (Ugland et al., 2011). Esta posible vía de acción es señalada

también por los cambios morfológicos descritos anteriormente. Sin embargo, es importante realizar estudios moleculares específicos para lograr corroborar el mecanismo sugerido y determinar con mayor exactitud las vías implicadas en el proceso de muerte celular de HeLa por el péptido PS6DONE.

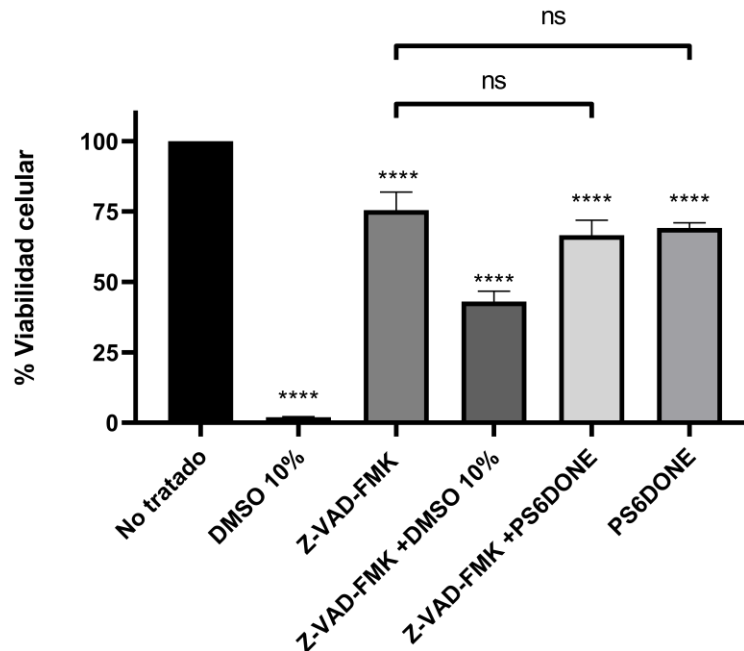


Figura 9. Efecto del péptido PS6DONE en la vía de muerte celular por apoptosis. Las células se trataron con el péptido PS6DONE, el inhibidor de caspasas Z-VAD-FMK (20 μ M) solo o en combinación con DMSO al 10% o el péptido PS6DONE. Los valores se representan como media \pm SEM de tres experimentos individuales (n=3). Los datos fueron analizados mediante una ANOVA a una vía y pos-test de Tukey (**** $p < 0.0001$).

3. Conclusiones

- Los diferentes tratamientos con los extractos de proteínas de las siete cepas de Bt en el ensayo de viabilidad generan distintos niveles de citotoxicidad frente a la línea de cáncer de cuello uterino HeLa. El mayor efecto citotóxico lo produjo el extracto proteico de la cepa Bt *dakota* a una concentración de 0.73 μ g/mL, reduciendo la viabilidad celular en un 96.6%. Los efectos citopáticos producidos por los diferentes extractos de Bt evidenciaron

una expansión o hinchamiento del citoplasma y formación de ampollas, efectos relacionados con necrosis.

- Los efectos en la viabilidad celular de los extractos proteicos de las inclusiones parasporales pueden estar determinados por las concentraciones a las que se realizaron los ensayos, y la posible presencia de diferentes parasporinas o proteínas Cry. Por ello es importante realizar una purificación y caracterización de proteínas como parasporinas u otras proteínas implicadas.
- El péptido PS6DONE induce cambios importantes en la morfología celular como pérdida de adherencia, forma redondeada, agregados intracelulares o formación de vacuolas, indicando que este péptido puede inducir muerte celular en células HeLa. Adicionalmente, el péptido catiónico PS6DONE presenta un efecto citotóxico a concentraciones superiores a 31.25 $\mu\text{g/mL}$, efecto que no fue observado con el péptido neutro PS6DTWO, posiblemente debido a la naturaleza química de cada péptido. PS6DONE puede generar poros transmembranales al unirse a moléculas cargadas negativamente que se encuentran en la membrana de células cancerígenas como la fosfatidilserina.
- El péptido PS6DONE ostenta un IC₅₀ de 244.3 $\mu\text{g/mL}$ y un IC₂₅ de 57.6 $\mu\text{g/mL}$ en la línea celular HeLa. En las células no cancerígenas VERO estas dos concentraciones mostraron un efecto citotóxico moderado, reduciendo la viabilidad celular en un 28.3% a una concentración de 244.4 $\mu\text{g/ml}$ y 18.96% a una concentración de 57.6 $\mu\text{g/ml}$.
- El tratamiento con el péptido PS6DONE genera un incremento significativo en los niveles de AMPc en la línea celular HeLa, acompañado de una disminución en la viabilidad celular. Por tanto, es posible que el péptido PS6DONE induzca la muerte celular por medio de la vía de la adenilato ciclasa, posiblemente por medio de la formación de poros

transmembranales que permitan el paso de iones como el Ca^{+2} y el HCO_3^- del espacio extracelular al citoplasma, activando así la ACs.

- El péptido PS6DONE no induce la muerte celular por la vía apoptótica dependiente de caspasas, lo cual apoyaría un mecanismo alternativo de muerte celular mediada por la vía de la AC y posiblemente la activación de PKA/ERK, PI3K y beclina-1. Sin embargo, es importante realizar estudios para determinar la posterior activación de la cascada de señalización por parte del AMPc.

Agradecimientos

Agradezco a la Universidad Antonio Nariño y al Ministerio de Ciencia, Tecnología e innovación quienes financiaron el proyecto identificado con el código de contrato CT 802-2018. Agradezco a mi tutora de proyecto de grado la Dr. Mónica Losada Barragán por brindarme la oportunidad de desarrollar este proyecto, por su paciencia, tiempo y dedicación. Al Dr. Silvio López por los conocimientos brindados. De igual manera, a las profesoras Laura Cuervo y Arelis Corrales por el acompañamiento en mi proceso formativo. Agradezco a mi familia, compañeros y amigos por el apoyo que me han brindado durante la carrera.

Referencias

Appleby P, Beral V, Berrington de Gonzalez A, et al. Carcinoma of the cervix and tobacco smoking: collaborative reanalysis of individual data on 13,541 women with carcinoma of the cervix and 23,017 women without carcinoma of the cervix from 23 epidemiological studies. *Int J Cancer*. 2006;118(6):1481–1495

Barreto-Santamaría, A., Patarroyo, M. E., & Curtidor, H. (2019). Designing and optimizing

new antimicrobial peptides: all targets are not the same. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 56(6), 351–373. <https://doi.org/10.1080/10408363.2019.1631249>

Bhatla, N., Aoki, D., Sharma, D. N., & Sankaranarayanan, R. (2018). Cancer of the cervix uteri. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*, 143, 22–36. <https://doi.org/10.1002/ijgo.12611>

Bhatla, N., Berek, J. S., Cuello Fredes, M., Denny, L. A., Grenman, S., Karunaratne, K., Kehoe, S. T., Konishi, I., Olawaiye, A. B., Prat, J., & Sankaranarayanan, R. (2019). Revised FIGO staging for carcinoma of the cervix uteri. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*, 145(1), 129–135. <https://doi.org/10.1002/ijgo.12749>

Brueggemann, L., Cribbs, L., Schwartz, J., Wang, M., Kouta, A., & Byron, K. (2018). Mechanisms of PKA-Dependent Potentiation of Kv7.5 Channel Activity in Human Airway Smooth Muscle Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(8), 2223. <https://doi.org/10.3390/ijms19082223>

Castella, C., Pauron, D., Hilliou, F., Trang, V. T., Zucchini-Pascal, N., Gallet, A., & Barbero, P. (2019). Transcriptomic analysis of *Spodoptera frugiperda* Sf9 cells resistant to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ca toxin, reveals that extracellular Ca²⁺, Mg²⁺ and production of cAMP are involved in toxicity. *Biology Open*. <https://doi.org/10.1242/bio.037085>

Cervix Uteri Source: 2020. (2021) Recuperado de <https://gco.iarc.fr/today/factsheets/cancer/23-Cervix-uteri-fact-sheet.pdf>

Chen, Y., Cann, M. J., Litvin, T. N., Iourgenko, V., Sinclair, M. L., Levin, L. R., & Buck, J. (2000). Soluble Adenylyl Cyclase as an Evolutionarily Conserved Bicarbonate

Sensor. *Science*, 289(5479), 625–628. <https://doi.org/10.1126/science.289.5479.625>

Crickmore, N.; Zeigler, D.R.; Schnepf, E.; Rie, J.; Lereclus, D.; Baum, J.; Bravo, A.; Dean, D.H. *Bacillus thuringiensis* Toxin Nomenclature. Available online: http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/ (Acceso en marzo de 2021).

Deng, H., Hillpot, E., Mondal, S., Khurana, K. K., & Woodworth, C. D. (2018). HPV16-Immortalized Cells from Human Transformation Zone and Endocervix are More Dysplastic than Ectocervical Cells in Organotypic Culture. *Scientific Reports*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-33865-2>

Deng, H., Mondal, S., Sur, S., & Woodworth, C. D. (2019). Establishment and optimization of epithelial cell cultures from human ectocervix, transformation zone, and endocervix optimization of epithelial cell cultures. *Journal of Cellular Physiology*, 234(6), 7683–7694. <https://doi.org/10.1002/jcp.28049>

Elmore, S. (2007). Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology*, 35(4), 495–516. <https://doi.org/10.1080/01926230701320337>

Epanand, R. M., & Vogel, H. J. (1999). Diversity of antimicrobial peptides and their mechanisms of action. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1462(1–2), 11–28. [https://doi.org/10.1016/s0005-2736\(99\)00198-4](https://doi.org/10.1016/s0005-2736(99)00198-4)

Felício, M. R., Silva, O. N., Gonçalves, S., Santos, N. C., & Franco, O. L. (2017). Peptides with Dual Antimicrobial and Anticancer Activities. *Frontiers in Chemistry*, 5. <https://doi.org/10.3389/fchem.2017.00005>

Festjens, N., Vanden Berghe, T., & Vandenabeele, P. (2006). Necrosis, a well-orchestrated form of cell demise: Signalling cascades, important mediators and concomitant immune response. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1757(9–10), 1371–

1387. <https://doi.org/10.1016/j.bbabbio.2006.06.014>

Flotte, T. R., & Berns, K. I. (Eds.). (1969). *Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology* (Vol. 31). Elsevier.

Fotakis, G., & Timbrell, J. A. (2006). In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicology Letters*, *160*(2), 171–177. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2005.07.001>

Geng, W., Wang, Z., Zhang, J., Reed, B. Y., Pak, C. Y. C., & Moe, O. W. (2005). Cloning and characterization of the human soluble adenylyl cyclase. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, *288*(6), C1305-C1316. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00584.2004>

Hallock, K. J., Lee, D. K., Omnaas, J., Mosberg, H. I., & Ramamoorthy, A. (2002). Membrane Composition Determines Pardaxin's Mechanism of Lipid Bilayer Disruption. *Biophysical Journal*, *83*(2), 1004–1013. [https://doi.org/10.1016/s0006-3495\(02\)75226-0](https://doi.org/10.1016/s0006-3495(02)75226-0)

Herbst, A. L., Ulfelder, H., & Poskanzer, D. C. (1971). Adenocarcinoma of the Vagina. *New England Journal of Medicine*, *284*(16), 878–881. <https://doi.org/10.1056/nejm197104222841604>

Hiramoto, S., Asano, H., Miyamoto, T., Takegami, M., & Kawabata, A. (2021). Risk factors and pharmacotherapy for chemotherapy-induced peripheral neuropathy in paclitaxel-treated female cancer survivors: A retrospective study in Japan. *PLOS ONE*, *16*(12), e0261473. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0261473>

Hoover, R. N., Hyer, M., Pfeiffer, R. M., Adam, E., Bond, B., Cheville, A. L., Colton, T., Hartge, P., Hatch, E. E., Herbst, A. L., Karlan, B. Y., Kaufman, R., Noller, K. L., Palmer, J. R., Robboy, S. J., Saal, R. C., Strohsnitter, W., Titus-Ernstoff, L., & Troisi, R. (2011). Adverse

Health Outcomes in Women Exposed In Utero to Diethylstilbestrol. *New England Journal of Medicine*, 365(14), 1304–1314. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1013961>

Hoskin, D. W., & Ramamoorthy, A. (2008). Studies on anticancer activities of antimicrobial peptides. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1778(2), 357–375. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2007.11.008>

Jin, L., Bai, X., Luan, N., Yao, H., Zhang, Z., Liu, W., Chen, Y., Yan, X., Rong, M., Lai, R., & Lu, Q. (2016). A Designed Tryptophan- and Lysine/Arginine-Rich Antimicrobial Peptide with Therapeutic Potential for Clinical Antibiotic-Resistant *Candida albicans* Vaginitis. *Journal of Medicinal Chemistry*, 59(5), 1791–1799. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b01264>

Jordan, J., Singer, A., Jones, H., & Shafi, M. (Eds.). (2009). The cervix. John Wiley & Sons.

Kamenetsky, M., Middelhaufe, S., Bank, E. M., Levin, L. R., Buck, J., & Steegborn, C. (2006). Molecular Details of cAMP Generation in Mammalian Cells: A Tale of Two Systems. *Journal of Molecular Biology*, 362(4), 623–639. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.07.045>

Kumar, P., Nagarajan, A., & Uchil, P. D. (2018). Analysis of Cell Viability by the MTT Assay. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2018(6), pdb.prot095505. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot095505>

Ladilov, Y., & Appukuttan, A. (2014). Role of soluble adenylyl cyclase in cell death and growth. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1842(12), 2646–2655. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2014.06.034>

Mendoza-Almanza, G., Esparza-Ibarra, E. L., Ayala-Luján, J. L., Mercado-Reyes, M., Godina-González, S., Hernández-Barrales, M., & Olmos-Soto, J. (2020). The Cytocidal Spectrum of *Bacillus thuringiensis* Toxins: From Insects to Human Cancer Cells. *Toxins*, *12*(5), 301. <https://doi.org/10.3390/toxins12050301>

Ministerio de salud y protección social-Instituto Nacional de cancerología. (2012). Plan Decenal para el control del cáncer en Colombia. Bogotá, Colombia.

Mizuki, E., Ohba, M., Akao, T., Yamashita, S., Saitoh, H., & Park, Y. S. (1999). Unique activity associated with non-insecticidal *Bacillus thuringiensis* parasporal inclusions: in vitro cell-killing action on human cancer cells. *Journal of Applied Microbiology*, *86*(3), 477–486. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1999.00692.x>

Mizuki, E., Park, Y. S., Saitoh, H., Yamashita, S., Akao, T., Higuchi, K., & Ohba, M. (2000). Parasporin, a Human Leukemic Cell-Recognizing Parasporal Protein of *Bacillus thuringiensis*. *Clinical Diagnostic Laboratory Immunology*, *7*(4), 625–634. <https://doi.org/10.1128/cdli.7.4.625-634.2000>

Muñoz, A., López-García, B., Pérez-Payá, E., & Marcos, J. F. (2007). Antimicrobial properties of derivatives of the cationic tryptophan-rich hexapeptide PAF26. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *354*(1), 172–177. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.12.173>

NAGAMATSU, Y., OKAMURA, S., SAITOU, H., AKAO, T., & MIZUKI, E. (2010). Three Cry Toxins in Two Types from *Bacillus thuringiensis* Strain M019 Preferentially Kill Human Hepatocyte Cancer and Uterus Cervix Cancer Cells. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, *74*(3), 494–498. <https://doi.org/10.1271/bbb.90615>

Pagano, N., Longobardi, V., de Canditiis, C., Zuchegna, C., Romano, A., Michal Andrzej, K., Pero, M. E., & Gasparri, B. (2020). Effect of caspase inhibitor Z-VAD-FMK on bovine sperm cryotolerance. *Reproduction in Domestic Animals*, 55(4), 530–536. <https://doi.org/10.1111/rda.13648>

Peraro, M. D., & van der Goot, F. G. (2015). Pore-forming toxins: ancient, but never really out of fashion. *Nature Reviews Microbiology*, 14(2), 77–92. doi:10.1038/nrmicro.2015.3

Porcelli, F., Buck, B., Lee, D. K., Hallock, K. J., Ramamoorthy, A., & Veglia, G. (2004). Structure and Orientation of Pardaxin Determined by NMR Experiments in Model Membranes. *Journal of Biological Chemistry*, 279(44), 45815–45823. <https://doi.org/10.1074/jbc.m405454200>

Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C., & Ferrin, T. E. (2004). UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of computational chemistry*, 25(13), chimera1605–1612. <https://doi.org/10.1002/jcc.20084>

Risso, A., Zanetti, M., & Gennaro, R. (1998). Cytotoxicity and Apoptosis Mediated by Two Peptides of Innate Immunity. *Cellular Immunology*, 189(2), 107–115. <https://doi.org/10.1006/cimm.1998.1358>

Roy, A., Kucukural, A., & Zhang, Y. (2010). I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nature Protocols*, 5(4), 725–738. <https://doi.org/10.1038/nprot.2010.5>

SAITOH, H., OKUMURA, S., ISHIKAWA, T., AKAO, T., MIZUKI, E., & OHBA, M. (2006). Investigation of a Novel *Bacillus thuringiensis* Gene Encoding a Parasporal Protein, Parasporin-4, That Preferentially Kills Human Leukemic T Cells. *Bioscience, Biotechnology, and*

Biochemistry, 70(12), 2935–2941. <https://doi.org/10.1271/bbb.60352>

Segura, C., Guzmán, F., Salazar, L. M., Patarroyo, M. E., Orduz, S., & Lemeshko, V. (2007). BTM-P1 polycationic peptide biological activity and 3D-dimensional structure. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 353(4), 908–914. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.12.113>

Schiffman, M., Clifford, G., & Buonaguro, F. M. (2009). Classification of weakly carcinogenic human papillomavirus types: addressing the limits of epidemiology at the borderline. *Infectious Agents and Cancer*, 4(1). <https://doi.org/10.1186/1750-9378-4-8>

Schirmacher, V. (2019). From chemotherapy to biological therapy: A review of novel concepts to reduce the side effects of systemic cancer treatment (Review). *International Journal of Oncology*, 54, 407–419. <https://doi.org/10.3892/ijo.2018.4661>

Simino, G. P. R., Reis, I. A., Acurcio, F. D. A., Andrade, E. I. G., Brazil, N. M. L., & Cherchiglia, M. L. (2020). Fatores de risco associados a náuseas e vômitos induzidos por quimioterapia antineoplásica. *Revista de Saúde Pública*, 54, 106. <https://doi.org/10.11606/s1518-8787.2020054002178>

Su, B., Qin, W., Xue, F., Wei, X., Guan, Q., Jiang, W., Wang, S., Xu, M., & Yu, S. (2018). The relation of passive smoking with cervical cancer. *Medicine*, 97(46), e13061. <https://doi.org/10.1097/md.00000000000013061>

Taussig, R., & Gilman, A. G. (1995). Mammalian Membrane-bound Adenylyl Cyclases. *Journal of Biological Chemistry*, 270(1), 1–4. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.1.1>

Torre, L. A., Bray, F., Siegel, R. L., Ferlay, J., Lortet-Tieulent, J., & Jemal, A. (2015). Global cancer statistics, 2012. *CA: A cancer journal for clinicians*, 65(2), 87–108. <https://doi.org/10.3322/caac.21262>

Ueno, S., Minaba, M., Nishiuchi, Y., Taichi, M., Tamada, Y., Yamazaki, T., & Kato, Y. (2011). Generation of novel cationic antimicrobial peptides from natural non-antimicrobial sequences by acid-amide substitution. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 10(1). <https://doi.org/10.1186/1476-0711-10-11>

Ugland, H., Naderi, S., Brech, A., Collas, P., & Blomhoff, H. K. (2011). cAMP induces autophagy via a novel pathway involving ERK, cyclin E and Beclin 1. *Autophagy*, 7(10), 1199–1211. <https://doi.org/10.4161/auto.7.10.16649>

van Hede, D., Langers, I., Delvenne, P., & Jacobs, N. (2014). Origin and immunoescape of uterine cervical cancer. *La Presse Médicale*, 43(12), e413-e421. <https://doi.org/10.1016/j.lpm.2014.09.005>

Veeran, S., Shu, B., Cui, G., Fu, S., & Zhong, G. (2017). Curcumin induces autophagic cell death in *Spodoptera frugiperda* cells. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 139, 79–86. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2017.05.004>

Velásquez, L., Rojas, D., y Cerón, J. (2018). TOXINAS DE *Bacillus thuringiensis* CON ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA: PARASPORINAS. *Revista Colombiana de biotecnología*, Volumen 20, Número 2, p. 89-100.

Wang, G., Li, X. and Wang, Z. (2016) APD3: the antimicrobial peptide database as a tool for research and education. *Nucleic Acids Research* 44, D1087-D1093.

Wu, S. J., Koller, C., Miller, D. L., Bauer, L. S., & Dean, D. H. (2000). Enhanced toxicity of *Bacillus thuringiensis* Cry3A δ -endotoxin in coleopterans by mutagenesis in a receptor binding loop. *FEBS Letters*, 473(2), 227–232. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(00\)01505-2](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(00)01505-2)

Xu, C., Wang, B. C., Yu, Z., & Sun, M. (2014). Structural Insights into *Bacillus thuringiensis* Cry, Cyt and Parasporin Toxins. *Toxins*, 6(9), 2732–2770. <https://doi.org/10.3390/toxins6092732>

Yamaji-Hasegawa, A., & Tsujimoto, M. (2006). Asymmetric Distribution of Phospholipids in Biomembranes. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 29(8), 1547–1553. <https://doi.org/10.1248/bpb.29.1547>

Yamashita, S., Katayama, H., Saitoh, H., Akao, T., Park, Y. S., Mizuki, E., Ohba, M., & Ito, A. (2005). Typical Three-Domain Cry Proteins of *Bacillus thuringiensis* Strain A1462 Exhibit Cytocidal Activity on Limited Human Cancer Cells. *The Journal of Biochemistry*, 138(6), 663–672. <https://doi.org/10.1093/jb/mvi177>

Yeaman, M. R., & Yount, N. Y. (2003). Mechanisms of Antimicrobial Peptide Action and Resistance. *Pharmacological Reviews*, 55(1), 27–55. <https://doi.org/10.1124/pr.55.1.2>

Zhang, X., Candas, M., Griko, N. B., Taussig, R., & Bulla, L. A. (2006). A mechanism of cell death involving an adenylyl cyclase/PKA signaling pathway is induced by the Cry1Ab toxin of *Bacillus thuringiensis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(26), 9897–9902. <https://doi.org/10.1073/pnas.0604017103>

Zhu, H., Shen, Z., Luo, H., Zhang, W., & Zhu, X. (2016). Chlamydia Trachomatis Infection-Associated Risk of Cervical Cancer. *Medicine*, 95(13), e3077. <https://doi.org/10.1097/md.0000000000003077>