

**CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE**  
***Bacillus thuringiensis***  
**SEROVAR *coreanensis* 4AL1 (T25001)**  
**EN RELACIÓN A SU ACTIVIDAD HACIA CÉLULAS**  
**CÁNCERIGENAS**

**PRESENTADO POR**

**Ana María Becerra Manrique**

**Sandra Mónica Estupiñán Torres M.Sc.**

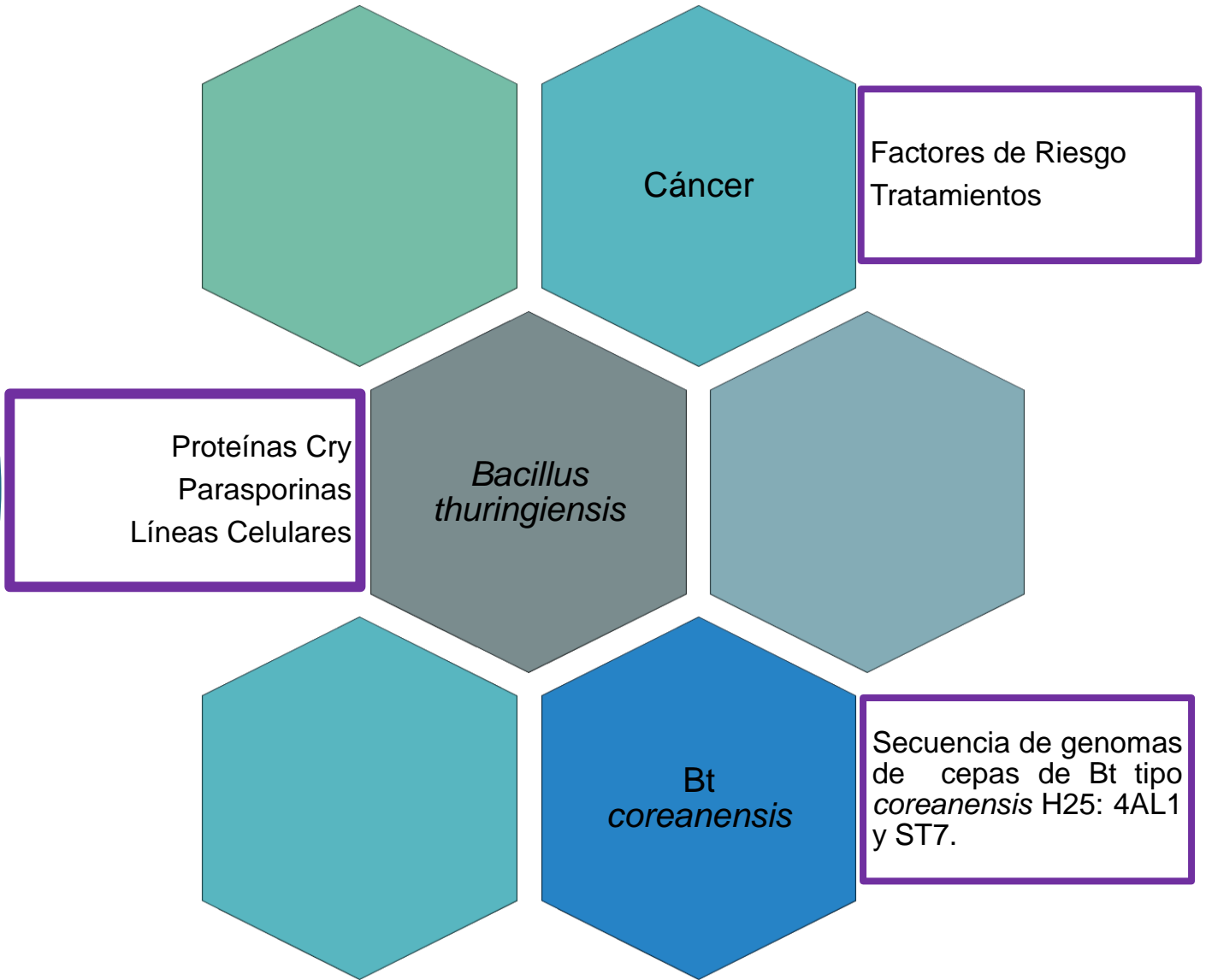
**Orientador Interno**

**Silvio Alejandro López Pazos Ph.D.**

**Orientador Externo Universidad Antonio Nariño**



# INTRODUCCIÓN



# Cáncer

Enfermedad crónica de importancia en salud pública

factores de riesgo

- Hábitos de vida
- Exposición a agentes carcinogénicos
- Agente biológicos como el Virus del Papiloma Humano (VPH) y hepatitis B

## Tratamientos

Posean alta especificidad para eliminar células neoplásicas del organismo, y que a su vez garanticen el bienestar del paciente

### Quimioterapia

Citostáticos

Citotóxicos

- Talidomida
- interferón
- bevacizumab (Avastin)
- cilengitida

- carboplatino
- metotrexato
- tamoxifeno)

Son efectivos pero se ha visto que son ineficaces en aproximadamente el 50% de los casos

Proteínas tipo parasporina (PS)  
*Bacillus thuringiensis* (Bt)

PS1 a PS6

Línea celular de cáncer de cuello uterino (HeLa)

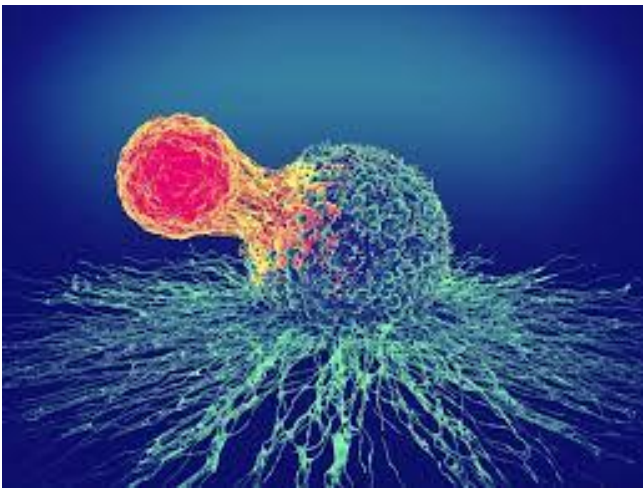
Línea celular derivada del riñón del mono verde africano (VERO)

Líneas celulares de carcinoma de colon (CACO-2)  
Carcinoma hepático humano (HepG2)  
Líneas de células leucemoides (MOLT-4, Jurkat y HL-60)

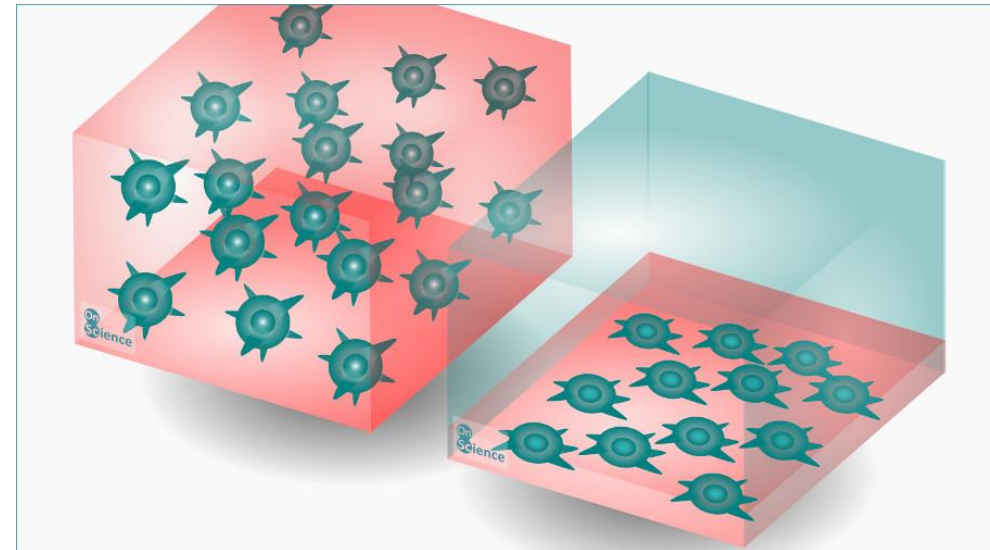
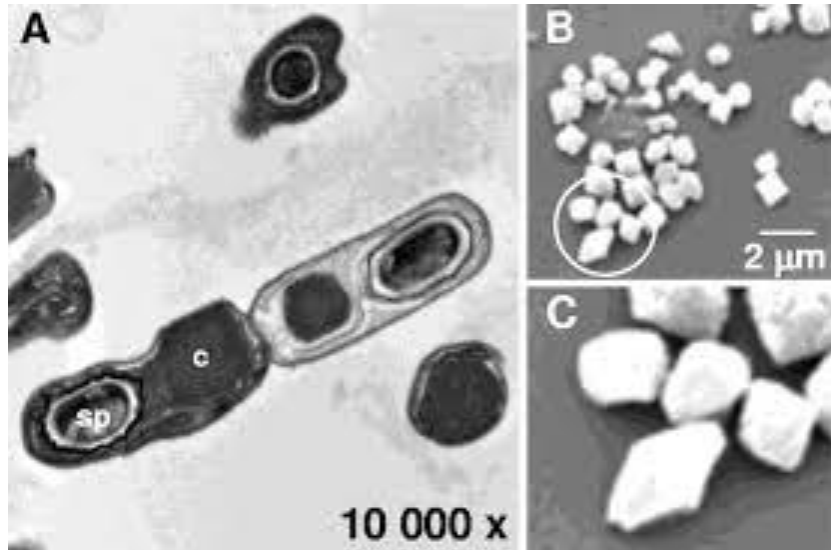
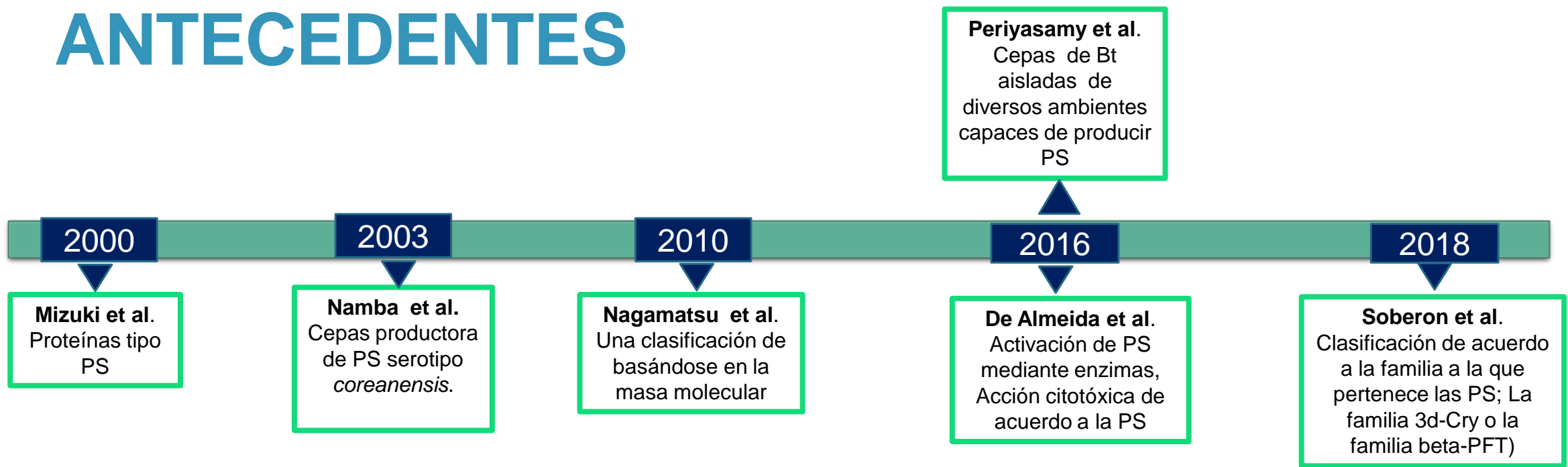
Células cancerígenas de cervix( TCS)

Proteínas Cry que no generan daño a los insectos, sino que afectan a células tumorales

Las proteínas Cry se agrupan como cristales parasporales

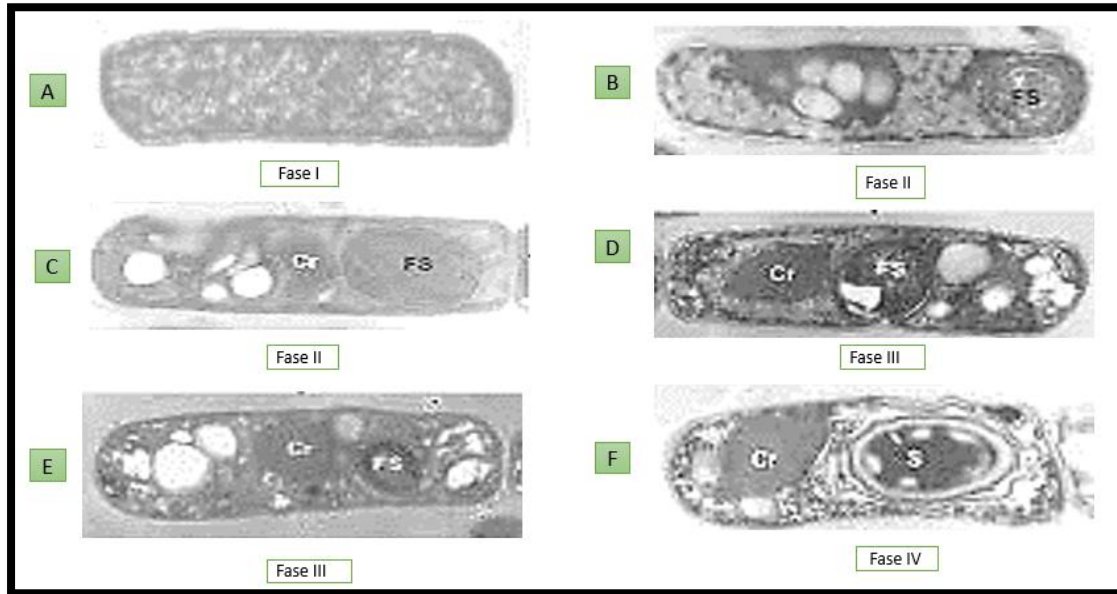


# ANTECEDENTES



# MARCO TEÓRICO

## Generalidades de *Bacillus thuringiensis*



- Bacilo Gram positivo

- Ubicuo en el ambiente

- 1901 gusano de seda (*Bombyx mori*), Japón

- Longitud del genoma, entre 2.4 Mb a 5.4-6.3 Mb

- Ciclo de vida y estadios de esporulación de Bt, sintetiza uno o varios cristales parasporales, conformado por proteínas de la bacteria.

Vip

Sintetizadas en fase vegetativa con acción insecticida

Cyt

Amplio espectro de actividad *in vitro* contra células animales, y efecto letal *in vivo* contra las larvas de insectos

Cry

Empleadas como principio activo para bioinsecticidas debido a la gran especificidad y acción citotóxica

# Proteínas de Cry

Inclusiones parasporales proteicas con efectos tóxicos en insectos blanco

Más de 700 proteínas

Lepidópteros

Coleópteros

Dípteros

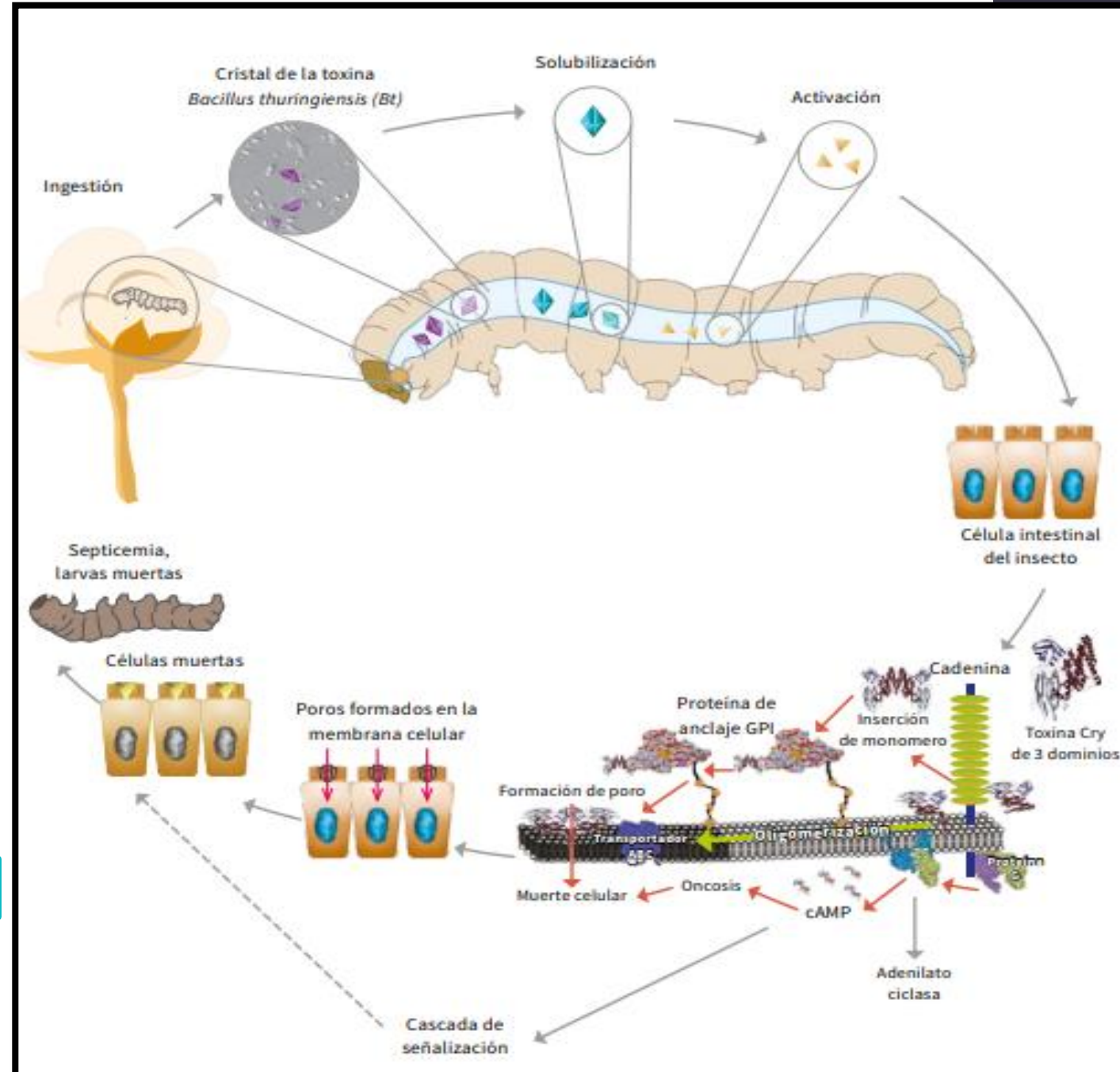
Las proteínas que codifican estos genes llegan a tener pesos moleculares entre 50 y 140 kDa

Mecanismo de acción

Se basa en la formación de poros líticos en las membranas de la células del intestino del insecto.

Mecanismo clásico

Vía de señalización



# Parasporinas

Capacidad única para matar células cancerígenas de manera específica

## Modo de acción

Inducir apoptosis a través de una cascada de señalización

PS1

- Hela
- MOLT-4
- HepG2

PS3

- Caco-2

PS6

Inducción la formación de poros

PS2

- HepG2
- Caco-2
- MOLT-4
- Jurkat y HL-60

PS4

- Sawano
- TCS

PS5

## Cepas con actividad anticancerígena

Serovares:

- *dakota*
- *shandongensis*
- *neoleonensis*
- *coreanensis*

Aislada principalmente de suelos de Corea

Designada según su antígeno flagelar H25

Producción de inclusiones parasporales

cepa A1519

Acción  
citotóxica

células Jurkat

# OBJETIVOS

## General

Caracterizar microscópica, molecular, y bioquímicamente a la cepa *Bacillus thuringiensis* coreanensis 4AL1 (T25001) en relación a su actividad hacia células de cáncer

## Específicos

Diseñar oligonucleótidos específicos para los genes codificantes de parasporinas de actividad hacia cáncer

Analizar el genoma de *Bacillus thuringiensis* serovar *coreanensis* 4AL1 en relación a secuencias de aminoácidos relacionadas con actividad hacia cáncer

Establecer el perfil proteico de *Bacillus thuringiensis* serovar *coreanensis* 4AL1 y su relación con parasporinas anticancerígenas



# DISEÑO METODOLÓGICO

Universo: Cepas de Bt

Población:  
Cepas de referencia de Bt  
productoras de PS

Muestra:  
Cepa de referencia Bt coreanensis  
4AL1 (T25001) evaluada para la  
producción de PS.

## VARIABLES

- Independiente: Cepa de referencia de Bt coreanensis 4AL1
- Dependiente: secuencias de ADN relacionadas a PS

## INDICADORES

- Secuencias de ADN relacionadas a PS
- Oligonucleótidos específicos de genes codificantes de PS
- Bandas en SDS-PAGE relacionadas a PS

## Hipótesis

**Nula:** la cepa 4AL1 (T25001) serovar *coreanensis* de Bt no es productora de proteínas tipo PS

**Alternativa:** La cepa 4AL1 (T25001) serovar *coreanensis* de Bt es productora de proteínas tipo PS

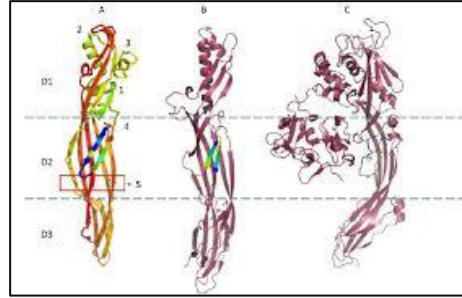
# METODOLOGÍA



Coloración de Gram

Coloración de Schaeffer Fulton de cajas incubadas entre 20 y 30 día

Microscopia de contraste de fases para la identificación de cristales parasporales



## Cuantificación de Proteínas por método Bradford

La cuantificación de proteínas se desarrolló por el método colorimétrico de Bradford para el cual se tomaron 100  $\mu$ l de muestra de las proteínas extraídas y se le añadió 1 ml de reactivo de Bradford

Se elaboró con 4 muestras a diferentes concentraciones de albumina bovina 0,5 mg/ml. La lectura en el espectrofotómetro se leyó a 590 nm

## Electroforesis de proteínas en SDS-PAGE

Gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) a una concentración del 10% tanto el gel separador como concentrador

Las muestras se realizaron al añadir 12  $\mu$ l de muestra más 5  $\mu$ l de buffer de carga

Desnaturalizaron a una temperatura de 100°C por 10 minutos, posterior a esto se corrieron los geles a 80 voltios por 5 horas

## Análisis genómico

Los dos genomas encontrados en la base de datos Genome del NCBI

Herramienta Blastx, usando las 19 secuencias de aminoácidos de las PS registradas en la base de datos de PS

Las características bioquímicas de las 19 PS se realizaron con el herramienta Protparam de Expasy

Identidad: > 40%  
cobertura: >50%  
valor E: 0,01

## Diseño y Elaboración de los oligonucleótidos

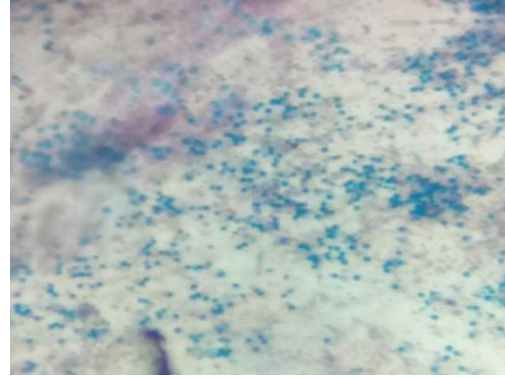
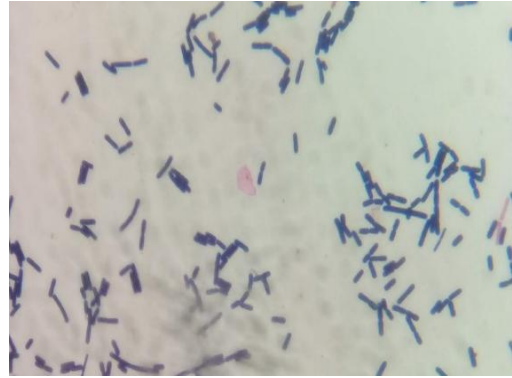
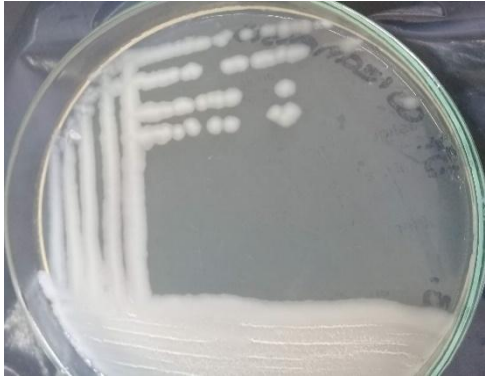
Secuencias de base de datos Bt toxin nomenclature

Se introdujeron en la herramienta Clustal Omega



# RESULTADOS y DISCUSION

## Caracterización morfológica de *B. thuringiensis* serovar *coreanensis*

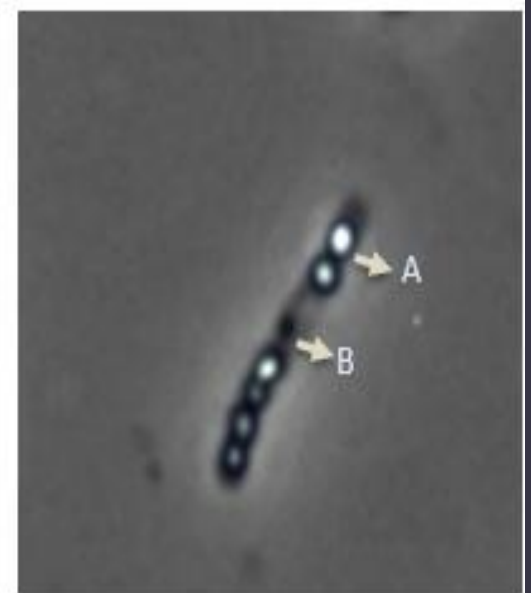
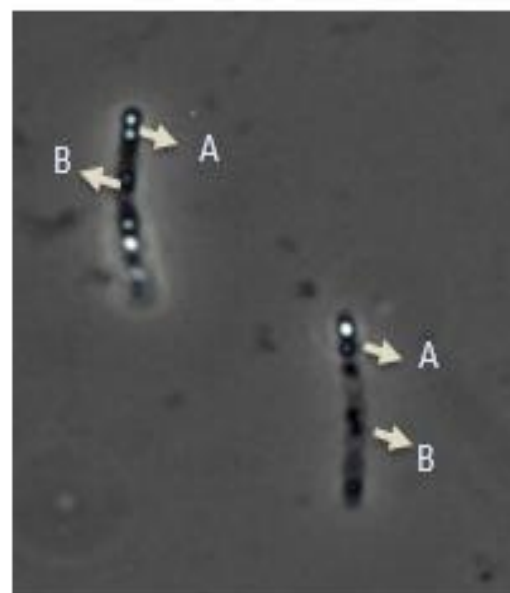
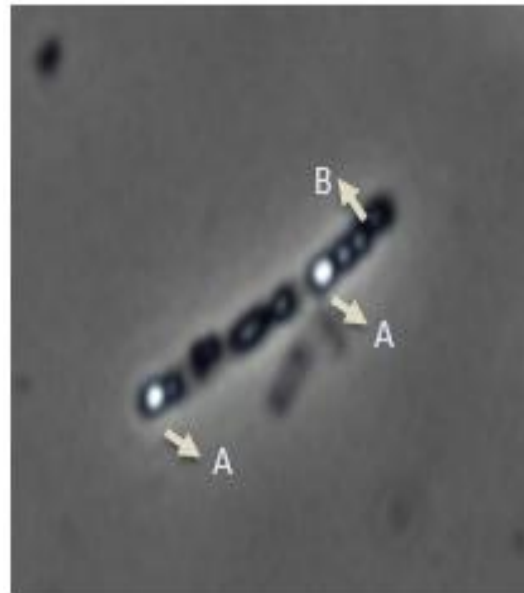


Flores et al. Colonias planas de color blancas opacas, de bordes irregulares. Bacilos Gram positivos observados en coloración de Gram. Esporas de Bt serovar *coreanensis* observadas en coloración Schaeffer-Fulton.

## Microscopia de contraste de fases

**A.** Células esporuladas. (Esporas terminales)

**B.** Cristales parasporales de Bt serovar *coreanensis* observadas en microscopia de contraste de fases en fase 2 (ph2) (Carreras Solís et al. inclusiones redondas o amorfas)



# Diseño de oligonucleótidos específicos de genes tipo parasporina

**PS1**

**PRIMER DIRECTO:**

5' AAAAGAATTGATTCTAAAATATTAGATTAT 3'

PS1Ad1	AAAAGAATTGATTCTAAAATATTAGATTATATAATTTTATTATGGGAGCAGAACTCGCA	720
PS1Ab1	AAAAGAATTGATTCTAAAATATTAGATTATATAATTTTATTATGGGAGCAGAACTCGCA	627
PS1Ab2	AAAAGAATTGATTCTAAAATATTAGATTATATAATTTTATTATGGGAGCAGAACTCGCA	627
PS1Ac1	AAAAGAATTGATTCTAAAATATTAGATTATATAATTTTATTATGGGAGCAGAACTCGCA	614
PS1Ac2	AAAAGAATTGATTCTAAAATATTAGATTATATAATTTTATTATGGGAGCAGAACTCGCA	677
PS1Aa5	AAAAGAATTGATTCTAAAATATTAGATTATATAATTTTATTATGGGAGCAGAACTCGCA	557
PS1Aa1	AAAAGAATTGATTCTAAAATATTAGATTATATAATTTTATTATGGGAGCAGAACTCGCA	557
PS1Aa3	AAAAGAATTGATTCTAAAATATTAGATTATATAATTTTATTATGGGAGCAGAACTCGCA	557
PS1Aa4	AAAAGAATTGATTCTAAAATATTAGATTATATAATTTTATTATGGGAGCAGAACTCGCA	557
PS1Aa2	AAAAGAATTGATTCTAAAATATTAGATTATATAATTTTATTATGGGAGCAGAACTCGCA	614
PS1Aa6	AAAAGAATTGATTCTAAAATATTAGATTATATAATTTTATTATGGGAGCAGAACTCGCA	650

PRIMER REVERSO: ACTAATGATGTAACACAAACATATAATCAA

3' TGATTACTACATTGTGTGTATATTAGTT 5'

5' TTGATTATATGTTGTGTTTACATCATTAGT 3'

**PS3**

**PRIMER DIRECTO:**

5'TTCCCTCCAGCTGGAGTAGCCGCTGGAATC 3'

PS3Aa1	TTCCCTCCAGCTGGAGTAGCCGCTGGAATCTAGGTGCACTGCTTGGTTTGCCTTTGGCCT	300
PS3Ab1	TTCCCTCCAGCTGGAGTAGCCGCTGGAATCTAGGTGCACTGCTTGGTTTGCCTTTGGCCT	300

PRIMER REVERSO: ACACAGTATAATCAATCGGGTGGTTTAGC

3' TGTGTCATATTAGTTAGCCACCAAAATCG 5'

5' GCTAAAACCACCCGATTGATTACTGTGT 3'

**PS2Aa**

**PRIMER DIRECTO:**

5' CAGCATFAAGTTC AAGTCCAGAAAAGTGTAA 3'

PS2Aa1	CAGCATFAAGTTC AAGTCCAGAAAAGTGTAAATCTAGATTCTCTATTTATGGTIACIA	180
PS2Aa2	CAGCATFAAGTTC AAGTCCAGAAAAGTGTAAATCTAGATTCTCTATTTATGGTIACIA	180

PRIMER REVERSO: ACTTTAGTGCTCCTATPACTGTGCGATGGTT

3' TGAAATCAGGAGGATAATGACAGCTACCAA 5'

5' AACCATCGACAGTAAATAGGAGCACTAAAAGT 3'

Ben-Dov et al y Jua´Rez et al. Desarrollaron oligonucleótidos para genes de importancia agrícola por su asociación a control de insectos, teniendo en cuenta las secuencias de una región altamente conservada,

Regiones conservadas de las PS de los grupos PS1,PS2 y PS3 con La herramienta Clustal Omega. En rojo los oligonucleótidos diseñados para cada grupo.

## Diseño de oligonucleótidos específicos de genes tipo parasporina

**Tabla 1.** Oligonucleótidos diseñados para genes codificantes de PS.

PS	Bloque secuencia conservada	Primer Directo sentido 5'- 3'	Primer Reverso sentido 5'- 3'	pb
<b>PS1</b>	720 de PS1Ad1 a 1010 de PS1Aa6	AAAAGAATTGATTCTAAAATATTAGATTAT	TTGATTATATGTTGTGTTTACATCATTAGT	360 pb
<b>PS2Aa</b>	180 de PS2Aa1 a 660 de PS2Aa2	CAGCATTAAAGTTCAAGTCCAGAAAGTGTA	AACCATCGACAGTAATAGGAGCACTAAAGT	480 pb
<b>PS2Ab</b>	Toda la secuencia	ATGTATTATACTACCCAAGTAACAGGTGGA	TTATAATCCAATTGTTTGTGTTGTTTGT	915 pb
<b>PS3</b>	300 de PS3Aa1 a 840 de PS3Ab1	TTCCCTCCAGCTGGAGTAGCCGCTGGAATC	GCTAAAACCAACCCGATTGATTATACTGTGT	540 pb
<b>PS4</b>	Toda la secuencia	TCTAAACACACGAACAACATGGTTGTTATA	GATAAAGCGATTCATCCATATACTGTCTGA	1116 pb
<b>PS5</b>	Toda la secuencia	ATGGCGATTTTTGATGTTGAAGCAGATCTT	TTATCTTTGTAAATACCTCTGATATTCTGG	918 pb
<b>PS6</b>	Toda la secuencia	ATGTCGGTTGTTTACTATGTGAAAGGTGGA	TTATGCGTTTAATATATTTATAAAATCATT	2262 pb
<b>PS1Aa1</b>	Toda la secuencia	GTGGACCCGTTTTCTAATTATTCTGAACAA	TTATGAAACAGGACTAAAATAATGGAATC	2172 pb
<b>PS2Aa1</b>	Toda la secuencia	ATGTATAATGATAAAGAATGTGTTCTGAT	CTAATTCCCCATTTTGGGCATTGGCATT	1017 pb
<b>PS3Aa1</b>	Toda la secuencia	ATGAATCAAATTGTAATAACAATGGATAT	TTAACTCAACTTAAATTTTTGATTGGTACT	2478 pb

Se realizaron 10 pares de oligonucleótidos para cada uno de los seis grupos que albergan los 19 genes que codifican proteínas tipo PS

## Análisis genómico de *B. thuringiensis* serovar *coreanensis*

### Genoma de Bt serovar *coreanensis* cepa ST7

El análisis de la secuencia de aminoácidos de cada una de las 19 PS, para buscar secuencias similares en el genoma de la cepa ST7 usando el herramienta Blastx, no se encontró resultados válidos.

PARASPORINA	No DE ACCESO	VALOR E	IDENTITIES	COBERTURA	ORF
PS1Aa1	AB031065	0.19	46%	73%	+2
PS1Aa2	AY081052	0.69	28%	41%	+1
PS1Aa3	AB250922	0.19	29%	48%	-2
PS1Aa4	AB274826	0.58	30%	51%	-2
PS1Aa5	AB274827	1.1	46%	73%	+2
PS1Aa6	AB375062	0.84	32%	47%	+2
PS1Ab1	AB250923	0.22	46%	73%	+2
PS1Ab2	AB274825	0.80	28%	45%	+3
PS1Ac1	AB276125	1.3	46%	73%	+2
PS1Ac2	AB731600	1.3	46%	73%	+2
PS1Ad1	AB375062	2.4	27%	46%	-3
PS2Aa1	AB099515	8.1	39%	60%	-3
PS2Aa2	AB454419	5.1	23%	46%	-3
PS2Ab1	AB186914	5.1	23%	46%	-3
PS3Aa1	AB116649	6.9	42%	69%	+3
PS3Ab1	AB116651	8.5	48%	65%	-2
PS4	AB180980	7.8	50%	67%	-1
PS5	AB555650	0.79	45%	68%	+3
PS6	AB375063	1.4	43%	56%	-1

### Genoma de Bt serovar *coreanensis* cepa 4AL1

PARASPORINA	No DE ACCESO	VALOR E	IDENTITIES	COBERTURA	ORF
PS1Aa1	AB031065	0.43	27%	47%	+1
PS1Aa2	AY081052	0.50	25%	55%	+1
PS1Aa3	AB250922	0.27	29%	49%	+1
PS1Aa4	AB274826	0.26	29%	49%	+1
PS1Aa5	AB274827	0.40	29%	48%	+1
PS1Aa6	AB375062	0.55	25%	39%	+2
PS1Ab1	AB250923	0.44	29%	48%	+1
PS1Ab2	AB274825	0.44	29%	48%	+1
PS1Ac1	AB276125	0.27	29%	48%	+1
PS1Ac2	AB731600	0.27	29%	48%	+1
PS1Ad1	AB375062	1.0	29%	50%	+2
PS2Aa1	AB099515	2.9	35%	55%	+3
PS2Aa2	AB454419	1.6	35%	55%	+3
PS2Ab1	AB186914	0.73	41%	55%	+2
PS3Aa1	AB116649	1.6	38%	47%	-1
PS3Ab1	AB116651	1.5	38%	47%	-1
PS4	AB180980	0.67	26%	42%	-2
<b>PS5</b>	<b>AB555650</b>	<b>0.027</b>	<b>39%</b>	<b>64%</b>	<b>-3</b>
PS6	AB375063	1.7	26%	48%	-2

Se encontró una secuencia en la cepa 4AL1 con posible similitud a la proteína PS5 (NCBI ID: AB555650, E=0.027, identidad=39%, cobertura=64%), es posible que esta secuencia corresponda a una PS.

## Análisis de PS5 en el genoma de Bt serovar *coreanensis* cepa 4AL1

MARCO	PEPTIDOS
-2	KCLNGGLTLILHKGDVLFRRQGEDGPLYFIKTGLLKVVRIEEDGTPFLFNIIVPGETIPHHSLISPKEYHGTAIALMKTEVELISSNEWYDQLQANPASYAN
-2	MIAFAGILISVIFIASNNILNPLQRIHC
-2	MQNHLLQILSLYFISLYILSI

El fragmento de la posición 661027 a 660941 según la herramienta Blastx, fue tomado para obtener la secuencia de ADN de 915 pb, y se analizó con la herramienta Traslate de Expasy, para encontrar los marcos de lectura codificantes

## Análisis de secuencia de aminoácidos extraída de la literatura

	VALOR E	QUERY COVER	PORCENTAJE DE IDENTIDAD
<b>PS2Aa1</b>	5e-12	100%	100.00%
<b>PS2Aa2</b>	5e-12	100%	100.00%
<b>Cepa ST7</b>	2.3	75%	56.25%
<b>Cepa BGSC 4AL1</b>	0.3	62%	46.67%

Bt serovar *coreanensis* se encontró un péptido con la secuencia DVIREYLMFNELSALSSSPE, que tuvo efecto citotóxico en línea celular MOLT-4 (42). Este péptido presenta 100% de identidad con secuencias de aminoácidos de las PS2Aa.

## Características de las proteínas tipo parasporina

PARASPORINA	Peso molecular	Punto Isoeléctrico teórico	Ext. coeficiente	Índice de inestabilidad	Índice alifático	Gran promedio de hidropática (GRAVY)
PS1Aa1	81049.52	5.73	1.210	39.23	79.88	-0.296
PS1Aa2	83104.76	5.35	1.282	39.55	79.42	-0.294
PS1Aa3	81049.52	5.73	1.210	39.23	79.88	-0.296
PS1Aa4	81095.57	5.73	1.210	38.95	79.34	-0.301
PS1Aa5	81094.57	5.79	1.259	39.61	79.75	-0.298
PS1Aa6	84419.39	6.01	1.263	37.81	81.25	-0.290
PS1Ab1	81778.42	5.96	1.230	39.65	81.03	-0.324
PS1Ab2	81616.14	5.77	1.184	39.87	81.71	-0.324
PS1Ac1	86747.19	5.83	1.246	38.95	82.11	-0.323
PS1Ac2	86760.15	5.75	1.246	39.42	81.98	-0.327
PS1Ad1	84782.64	5.23	1.180	42.31	82.64	-0.279
PS2Aa1	37447.66	5.35	0.891	34.26	63.11	-0.433
PS2Aa2	37495.66	5.21	0.929	34.09	62.54	-0.441
PS2Ab1	33016.63	5.12	0.875	39.99	75.00	-0.258
PS3Aa1	88693.80	6.18	2.215	30.98	76.22	-0.496
PS3Ab1	70841.89	6.19	2.004	31.41	75.16	-0.508
PS4	30079.88	6.09	1.524	29.03	81.16	-0.171
PS5	33798.55	5.99	1.326	35.57	72.85	-0.439
PS6	84563.95	5.75	0.777	33.39	94.79	-0.226

Cozzone et al. De las 19 PS ninguna supero los 90 kDa,

Press et al. En el caso de las PS el valor de pI no supero 7, indicaría que estas proteínas tienden a ser acidas.

**Según Gasteiger et al.**

El coeficiente de extinción, de las PS está entre 0.77 y 1.282

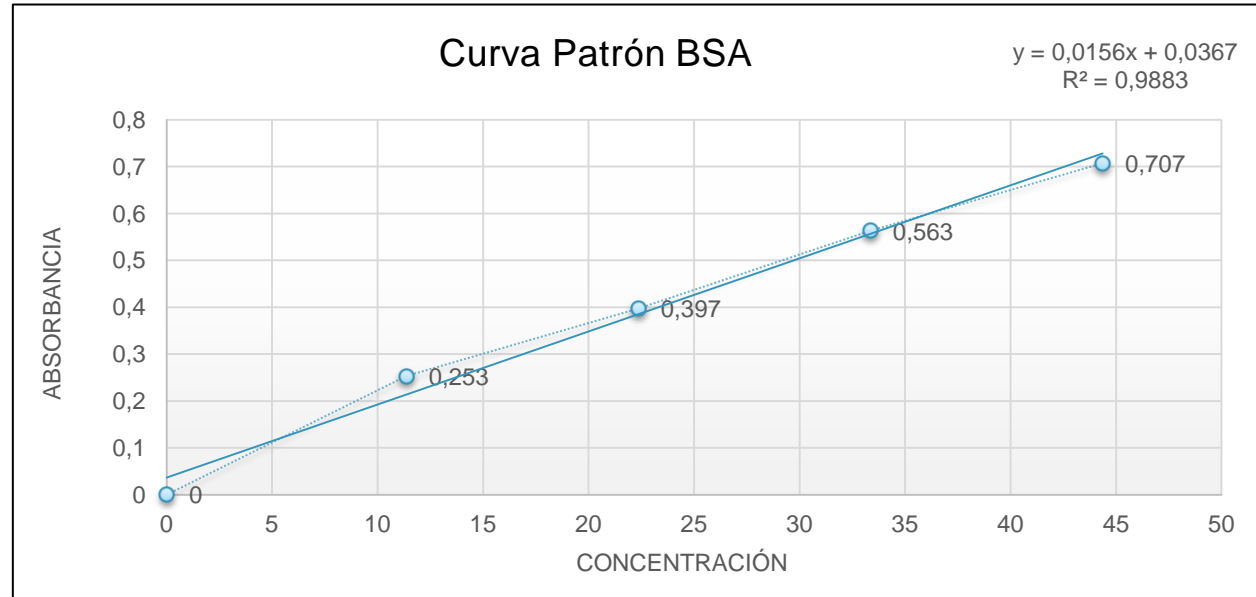
Las PS son proteínas estables, y tan solo PS1Ad1 fue menor de 40

El índice alifático de todas las PS fue alto.

El valor GRAVY (Grand Average of Hydrophaty), indica que son proteínas hidrofílicas



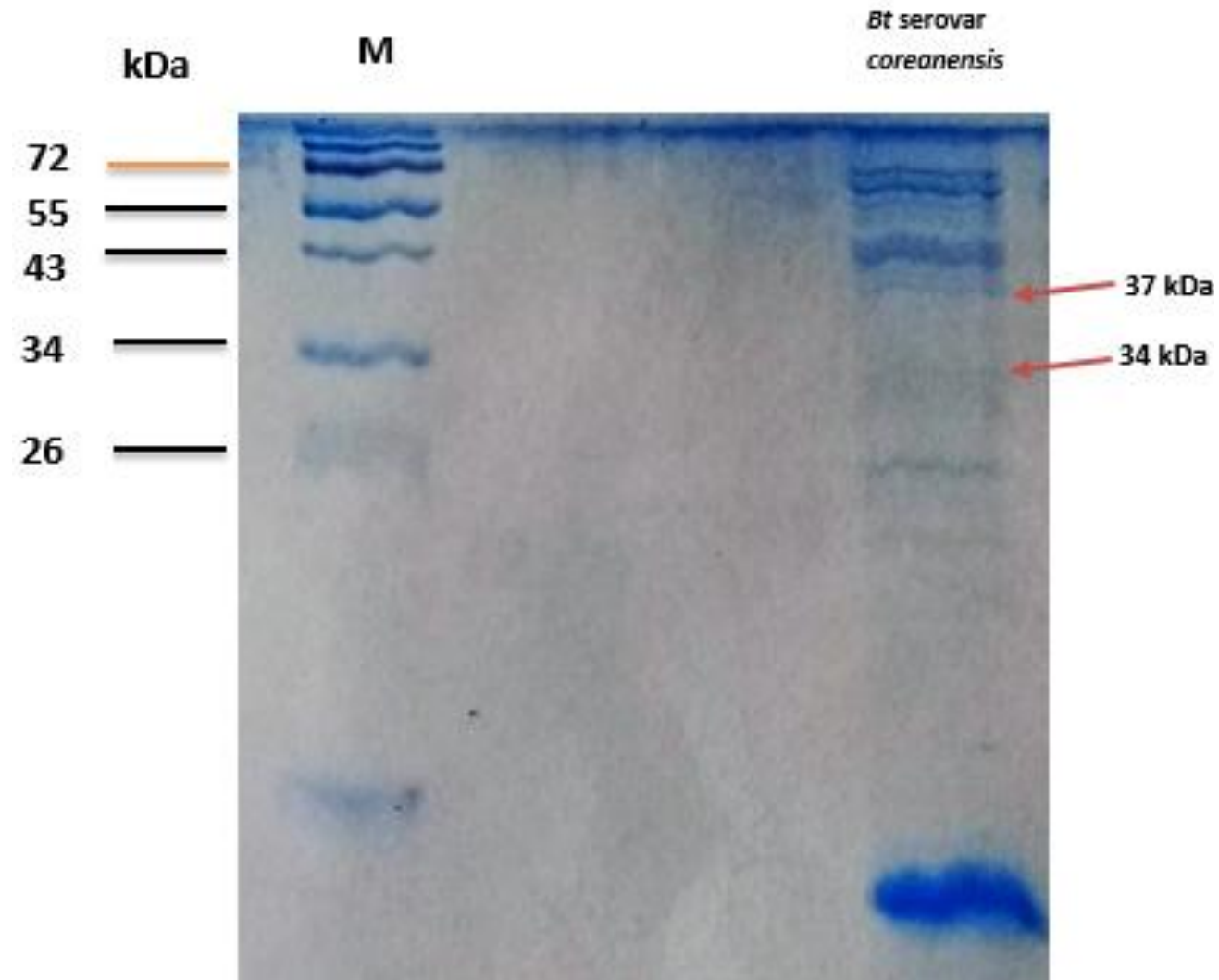
## Cuantificación de proteínas de *B. thuringiensis* serovar *coreanensis*



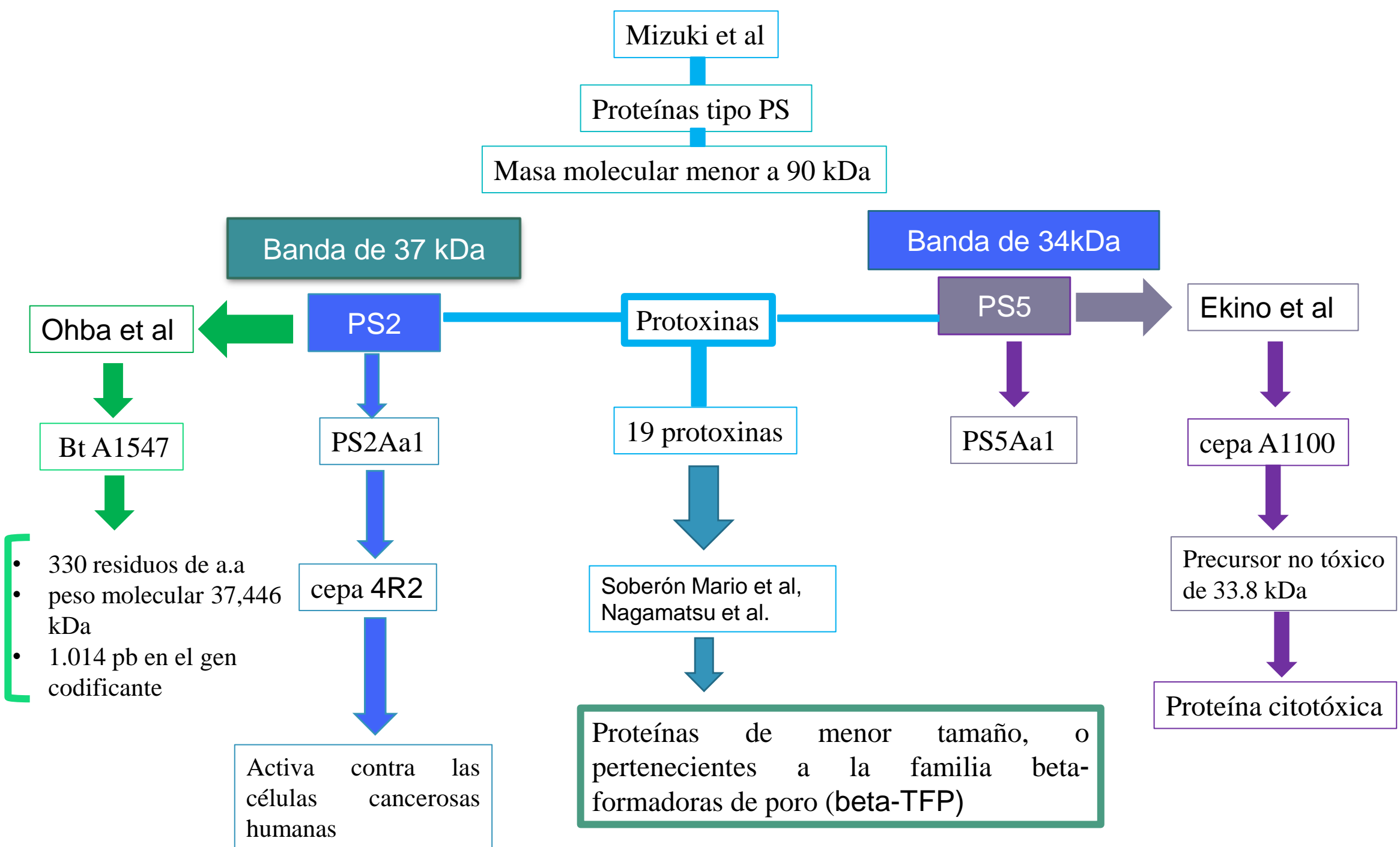
BSA 0,5 mg/ml	1 LECTURA	2 LECTURA	3 LECTURA	Promedio	Concentración mg/ml
0	0	0	0	0	0
25	0,269	0,262	0,221	0,253	11,36
50	0,420	0,410	0,363	0,397	22,36
75	0,605	0,570	0,515	0,563	33,36
100	0,776	0,730	0,615	0,707	44,36
Muestra	0,118	0,119	0,118	0,118	0,240

Se obtuvieron 0,240 mg/ml de cristales parasporales de *Bt serovar coreanensis* 4AL1

## Perfiles proteicos



Perfil proteico de cristales parasporales de Bt serovar *coreanensis* 4AL1. M. Marcador de peso molecular, Bt serovar *coreanensis* 4AL1) Las flechas rojas señalan la posible presencia de protoxinas tipo PS2 (37 kDa) y PS5 (34 kDa) observado en el corrido de electroforesis en gel de poliacrilamida SDS-PAGE al 10%.



Mizuki et al

Proteínas tipo PS

Masa molecular menor a 90 kDa

Banda de 37 kDa

Banda de 34kDa

Ohba et al

PS2

Protoxinas

PS5

Ekino et al

Bt A1547

PS2Aa1

19 protoxinas

PS5Aa1

cepa A1100

- 330 residuos de a.a
- peso molecular 37,446 kDa
- 1.014 pb en el gen codificante

cepa 4R2

Soberón Mario et al, Nagamatsu et al.

Precursor no tóxico de 33.8 kDa

Activa contra las células cancerosas humanas

Proteínas de menor tamaño, o pertenecientes a la familia beta-formadoras de poro (beta-TFP)

Proteína citotóxica

# CONCLUSIONES

En este estudio se diseñaron oligonucleótidos específicos para los genes codificantes de PS con actividad anticancerígena, permiten el seguimiento del estudio de cepas de *Bt*

El perfil proteico obtenido de *Bt* serovar *coreanensis* cepa 4AL1 (T25001) demuestra patrones de bandas con pesos moleculares menor a los 90 kDa, compatibles con protoxinas tipo PS, (beta-TFP).

Las proteínas PS poseen características bioquímicas relevantes para su función, incluyendo peso menor a 90 kDa, punto isoeléctrico menor a 7.0, carácter hidrofílico y estabilidad

Este trabajo es un esquema básico para la caracterización de cepas de *Bt* con posible síntesis de proteínas PS , desde una aproximación bioinformática y experimental.

**MUCHAS  
GRACIAS**

# BIBLIOGRAFIA

1. Socia, Ministerio De Salud Y Protección. Observatorio Nacional De Cancer Guía Metodológica. 2018.
2. Salud, Unión Internacional Contra El Cáncer Y Organización Mundial De La. Acción Mundial Contra El Cáncer. 2005.
3. Tumor, American Brain. *Quimioterapia*. 2014.
4. Sauka, Diego . Bacillus Thuringiensis: New Applications For An Old Acquaintance? 2017, Vol. 49, 2.
5. Toshihiko Akiba, Y Otros. Crystal Structure Of The Parasporin-2 Bacillus Crystal Structure Of The Parasporin-2 Bacillus. December De 2009, Vol. 386, 23.
6. Mizuki, Eiichi , Y Otros. Parasporin, A Human Leukemic Cell-Recognizing Parasporal Protein Of Bacillus Thuringiensis. March De 2000, Vol. 7, 4.
7. Ito, Akio, Y Otros. A Bacillus Thuringiensis Crystal Protein With Selective Cytocidal Action To Human Cells. March De 2004, Vol. 279, 29.
8. Jung, Y-C. , Y Otros. Isolation And Characterization Of A Novel Bacillus Thuringiensis Strain Expressing A Novel Crystal Protein With Cytocidal Activity Against Human Cancer Cells. February De 2007, Vol. 103, 25.
10. Ohba, Michio , Mizuki, Eiichi Y Uemori, Akiko. Parasporin, A New Anticancer Protein Group From Bacillus Thuringiensis. January De 2009, Vol. 29, 1.