



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

**Ana María Becerra Manrique**

**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA  
FACULTAD CIENCIAS DE LA SALUD  
PROGRAMA BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO  
BOGOTÁ, 2020**



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

**Ana María Becerra Manrique**

**Orientador Interno**

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

**Orientador Externo**

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

**Universidad Antonio Nariño**

**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA  
FACULTAD CIENCIAS DE LA SALUD  
PROGRAMA BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO  
BOGOTÁ, 2020**



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

**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA**  
**FACULTAD CIENCIAS DE LA SALUD**  
**PROGRAMA BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO**  
**BOGOTÁ, 2020**

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco principalmente a mis padres por su apoyo incondicional para culminar este proceso. A mi docente el Dr. Silvio Alejandro López Pazos por su dedicación y paciencia, por guiarme y enseñarme el proceso de la investigación. A la docente MSc. Sandra Mónica Estupiñán, quien asesoró mi proceso en la realización de este trabajo de grado.

## Contenido

<b>RESUMEN</b> .....	8
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	10
<b>OBJETIVOS</b> .....	12
Objetivo general .....	12
Objetivos específicos .....	12
<b>1. ANTECEDENTES</b> .....	13
<b>2. MARCO REFERENCIAL</b> .....	20
<b>2.1. Generalidades de <i>Bacillus thuringiensis</i></b> .....	20
<b>2.2 Proteínas de Cry</b> .....	21
<b>2.3 Mecanismo de acción de Cry</b> .....	22
<b>2.5 Aplicaciones de parasporina</b> .....	27
<b>2.6 Modo de acción de las proteínas tipo parasporina</b> .....	28
<b>2.7 Cáncer</b> .....	30
<b>3. METODOLOGÍA</b> .....	33
<b>3.1 Tipo de investigación</b> .....	33
<b>3.2 Universo:</b> .....	33
<b>3.3 Población:</b> .....	33
<b>3.4 Muestra:</b> .....	33
<b>3.5. Variables</b> .....	33
<b>3.6. Indicadores</b> .....	33
<b>3.7. Hipótesis</b> .....	34
<b>3.8. Técnicas y Procedimientos</b> .....	34
<b>3.8.1 Microscopia</b> .....	34
<b>3.8.2 Diseño de oligonucleótidos específicos para genes tipo parasporina</b> .....	34
<b>3.8.3. Análisis genómico</b> .....	35
<b>3.8.4 Extracción de ADN</b> .....	35
<b>3.8.5. Lavado de Biomasa y Solubilización de Proteínas</b> .....	36
<b>3.8.7 Cuantificación de Proteínas por método Bradford</b> .....	36
<b>4.1. Caracterización morfológica de <i>B. thuringiensis</i> serovar <i>coreanensis</i></b> .....	38
<b>4.1.2. Microscopia</b> .....	38
<b>4.1.3 Microscopia de contraste de fases</b> .....	39
<b>4.2 Diseño de oligonucleótido específicos de genes tipo parasporina</b> .....	40

<b>4.3</b>	<b>Análisis genómico de <i>B. thuringiensis</i> serovar <i>coreanensis</i> .....</b>	<b>42</b>
4.3.1	Genoma de <i>B. thuringiensis</i> serovar <i>coreanensis</i> cepa ST7 .....	42
4.3.2	Genoma de Bt serovar <i>coreanensis</i> cepa 4AL1 .....	43
4.3.2.1	Análisis de PS5 en el genoma de Bt serovar <i>coreanensis</i> CEPA 4AL1 .....	44
4.3.3	Análisis de secuencia de aminoácidos extraída de la literatura .....	45
<b>4.4.</b>	<b>Características de las proteínas tipo parasporina .....</b>	<b>46</b>
<b>4.6.</b>	<b>Cuantificación de proteínas.....</b>	<b>47</b>
<b>4.7.</b>	<b>Perfiles proteicos.....</b>	<b>49</b>
<b>5.</b>	<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>50</b>
<b>6.</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>54</b>
	<b>Bibliografía .....</b>	<b>55</b>



**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD**  
**PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO**

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

**RESUMEN**

Las proteínas parasporina (PS) son sintetizadas en la fase de esporulación de *Bacillus thuringiensis* (Bt), una bacteria Gram positiva ampliamente estudiada por actividad insecticida debida a sus toxinas altamente específicas (proteínas Cry). Las PS son una clase de proteínas Cry, y tienen actividad citotóxica y específica frente a células cancerosas, induciéndoles muerte celular por necrosis o apoptosis, además de poseer baja o nula actividad sobre las células con funcionamiento normal. Se han descrito varias cepas portadoras de actividad anticancerígena: Bt *coreanensis*, Bt *dakota* o Bt *colmeri*. En este trabajo se decidió caracterizar la cepa de Bt *coreanensis* 4AL1, en relación a posible actividad anticancerígena mediada por PS. Para este fin, se diseñaron oligonucleótidos específicos para cada uno de los grupos de PS (PS1, PS2, PS3, PS4, PS5, y PS6) registrados en *Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature, tanto para identificar la presencia del gen como para su posterior aislamiento. En segunda instancia se estudió la cepa de Bt *coreanensis* 4AL1, en el contexto de analizar bioinformáticamente sus genomas en la búsqueda de genes codificantes de PS, y su caracterización bioquímica *in silico*, donde se determinó la presencia de un péptido relacionado con PS2Aa. Finalmente, se utilizó la cepa Bt *coreanensis* 4AL1, para obtener ADN genómico por método Hot Shot + Tween, la purificación de cristales posiblemente asociados a PS, y su determinación mediante SDS-PAGE, con presencia de una banda de 37 kDa que podría estar asociada a PS2Aa. Este

trabajo aporta a la caracterización de cepas de Bt, específicamente en el contexto de la síntesis de PS asociadas a control de cáncer.

**Palabras clave:** *Bacillus thuringiensis* serovar *coreanensis*, Parasporina, cáncer, oligonucleótido, PS2Aa

**Estudiante:** Ana María Becerra Manrique

**Docentes:** Silvio Alejandro López Pazos, Universidad Antonio Nariño y Sandra Mónica Estupiñán Torres, UCMC

**Fecha:** 13 de Marzo de 2020



## INTRODUCCIÓN

El cáncer en Colombia está catalogado como enfermedad crónica de importancia en salud pública, donde el Ministerio de Salud y Protección social ha desarrollado diferentes estrategias para hacer un seguimiento epidemiológico confiable para lograr un control sobre los riesgos asociados que originan estas neoplasias, la prevención y promoción no solo deben orientarse a los factores de riesgo (tabaquismo, dieta pobre en verduras, alcoholismo, obesidad, exposición a agentes carcinogénicos, y agente biológicos como el Virus del Papiloma Humano (VPH) y hepatitis B), sino a fomentar prácticas de vida saludable (1). Existen dificultades para un diagnóstico oportuno y tratamiento efectivo, a pesar de los mecanismos que ha desarrollado el gobierno (2).

Uno de los tratamientos más empleados para cáncer es la quimioterapia, que consiste en emplear fármacos que detengan directamente el crecimiento celular tumoral, o de inducir apoptosis, por esto existen dos tipos de clasificación según la acción de los fármacos: citostáticos que actúan como inhibidores de la angiogénesis, inhibidores de factores de crecimiento, y reducen la resistencia farmacológica, que incluyen la talidomida, el interferón, el bevacizumab (Avastin), la cilengitida y el cediranib o Recentin; el otro grupo corresponde a los citotóxicos, entre los cuales están agentes alquilantes, (carboplatino, el cisplatino, la ciclofosfamida y la temozolomida o Temodar), antimetabolitos que evitan que las células tumorales elaboren las enzimas necesarias para el crecimiento (metotrexato), al igual que antibióticos antitumorales, hormonas (tamoxifeno) inhibidores mitóticos (como el etopósido (VP-16)), el paclitaxel (Taxol) y la vincristina, además del uso de esteroides principalmente para reducir la inflamación alrededor del tejido afectado. Estas terapias son útiles en el tratamiento de los pacientes, sin embargo son ineficaces en aproximadamente el 50% de los casos (3).

La búsqueda de nuevos tratamientos que posean alta especificidad para eliminar células neoplásicas del organismo, y que a su vez garanticen el bienestar del paciente, es un objetivo en esta área. Las proteínas tipo parasporina (PS), producidas por el bacilo Gram positivo *Bacillus thuringiensis* (Bt) (4). Bt tiene relevancia en el campo agroindustrial debido a su producción de proteínas denominadas Cry de capacidad insecticida frente a plagas que han afectado cultivos a nivel mundial. Las proteínas Cry se agrupan como

cristales parasporales en condiciones desfavorables para el crecimiento del microorganismo, son sintetizados cuando la bacteria pasa a un estadio donde genera esporas, en el momento en que el insecto ingiere las esporas de Bt, los cristales se solubilizan liberando las proteínas Cry que llegan al intestino medio del insecto formando poros en la membrana celular causando desequilibrio celular y la muerte (5).

Se han descrito proteínas Cry que no generan daño a los insectos, sino que afectan a células tumorales, y se llaman PS que se clasifican desde PS1 a PS6. Según bioensayos en cultivo celular se ha encontrado en la línea celular de cáncer de cuello uterino (HeLa) que PS1, PS2 y PS3 han tenido una fuerte reacción tóxica induciendo apoptosis (6) (7), en el caso de líneas obtenidas de otros mamíferos como la línea celular derivada del riñón del mono verde africano (VERO) mostró susceptibilidad al entrar en contacto con PS1 (8), la acción de PS2 es más amplia afectando líneas celulares de carcinoma de colon (CACO-2), carcinoma hepático humano (HepG2) y líneas de células leucemoides (MOLT-4, Jurkat y HL-60) (7), en el caso de PS4 se ha logrado evidenciar que tiene especificidad frente a líneas celulares como MOLT-4 (con una acción similar a PS2), en cuanto a la PS5 se ha visto que presenta toxicidad frente a células cancerígenas de cérvix (HeLa, TCS) además de células MOLT-4, y por último esta PS6 de la cual no se ha obtenido un resultado claro sobre líneas objetivo (10).

Esta acción citotóxica hacia células de cáncer ha sido estudiada en cepas de Bt de diverso origen, las cuales se han clasificado de acuerdo a su antígeno H (antígeno correspondiente al flagelo). Cepas pertenecientes al serotipo H25 aisladas en Japón han mostrado una acción toxica frente a células T de leucemia (de la línea celular MOLT-4), evidenciado por la hinchazón coloide-osmótica sin generar daño, y preservando la inocuidad de las células biológicamente funcionales de células T normales. Se han secuenciado los genomas de dos cepas de Bt tipo *coreanensis* H25: 4AL1 y ST7, que se aislaron en proyectos de control de insectos. La cepa en este proyecto es Bt serovar *coreanensis* (4AL1, T25001, serotipo H-25), aislada de suelo de Corea. Esta iniciativa se enmarca en discernir la posible aplicación de proteínas PS como un posible candidato para el desarrollo de nuevos métodos terapéuticos frente al cáncer (4).

- Pregunta problema ¿La cepa 4AL1 (T25001) serovar *coreanensis* de Bt es productora de proteínas tipo PS?

## OBJETIVOS

### Objetivo general

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

### Objetivos 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.

## 1. ANTECEDENTES

La búsqueda de efectividad de proteínas de Bt frente a distintas líneas celulares de origen neoplásico en mamíferos permitió identificar a una proteína de 81 kDa, que después de ser digerida por tripsina a concentraciones altas de 300 ug/ml presentó bandas de 56 kDa, cuya secuencia de ADN correspondiente tiene 723 pares de bases (pb), y corresponde a PS1Aa1, la primer PS que se encontró con actividad citotóxica en células tumorales, y se ha demostrado que ejerce una acción de muerte celular al estar en contacto con líneas de leucemia de células T (MOLT-4), célula de cáncer de cuello uterino células (HeLa), siendo no tóxicas para las células T normales (6). La acción ejercida por la PS se designó como apoptótica, debido a que hacen que la célula produzca un factor citotóxico conocido como ligando inductor de apoptosis relacionado con el factor de necrosis tumoral (TRAIL), el cual induce apoptosis específicamente en células cancerosas, a pesar de esto se produjo una afectación a las células normales T, lo que los investigadores atribuyeron a la presencia de proteínas Cyt, las cuales fueron las que ejercieron la acción citocida de amplio espectro en las inclusiones parasporales afectando las células normales (6).

En cuanto a la PS2Aa1 su acción citotóxica fue evaluada en varias líneas celulares humanas cancerígenas como MOLT-4 (célula T leucémica), Jurkat (células T leucémicas), HL60 (leucemia promielocítica), Sawano (células de cáncer endometrial), HepG2 (cáncer de hepatocitos humanos), HeLa (célula de cáncer de cuello uterino), TCS (cáncer cervical uterino) A549 (célula de cáncer de pulmón), MRC-5 (célula de fibroblastos de pulmón normal) y células Caco-2 (adenocarcinoma colorrectal epitelial humano), las cuales al ser expuestas a una concentración de 0,3 µg/ml de la toxina, se vio como en células HepG2 y Jurkat tuvo mayor efecto tóxico, ya que causó un aspecto marcadamente degenerativo, donde el núcleo y borde del citoplasma desaparecieron, con presencia de núcleos pequeños, picnóticos y de forma irregular, también se pudo observar una baja acción tóxica de la PS en líneas celulares HeLa y en células T normales, la afectación de esta PS se vio relacionada con la especificidad de la toxina frente a células cancerígenas colon y el hígado (7).

PS1Aa2 (Cry31Aa2) ha sido solubilizada con tripsina, quimiotripsina y proteinasa K, a pH alcalino, obteniéndose un fragmento de 70 kDa, con tripsina se observó que se escindía en bandas de 70 y 55 kDa, la quimiotripsina y la proteinasa K dividen entre los

residuos Tyr y Asp en las posiciones 108-109 para producir un polipéptido de 70 kDa, mientras que la tripsina digiere entre los residuos Arg y Asn, Arg y Ser, y Arg, en las posiciones 97–98, 112–113 y 250 a 251 respectivamente. PS1Aa2 activada ha mostrado hasta 500 veces más toxicidad que PS1Aa1 activada sobre células Jurkat y HepG2 respectivamente, además que se observa actividad dependiente de la dosis similar a PS1Aa1 (0.6 ng-10 µg) para células HeLa y TCS, pero no mantiene su toxicidad en la línea celular Sawano. Del mismo modo, mostró actividad dependiente de la dosis en células HL-60, mientras que no es tóxica en células MOLT-4 o células T normales. PS1Aa2 no tiene toxicidad para las líneas celulares A549, MRC-5, Caco-2, VERO y células de ratón (NIH3T3) (8).

PS1Aa1 (Cry31Aa1) es un polipéptido de 723 residuos, 81,045 kDa, cuyo gen codificante tiene 2.169 pb. PS1Aa1 muestra actividad de destrucción de células cancerosas al ser activada con proteasas, pasando de ser una proteína de 81 kDa a una proteína heterodímera de 15 y 56 kDa. PS2Aa1 (Cry46Aa1) es un polipéptido de 338 residuos, 37,446 kDa, con 1.014 pb, de longitud en el gen que la codifica, al ser digerida por proteasas produce una citotoxina activa de 30 kDa. PS3Aa1 (Cry41Aa1) tiene 825 residuos, 93,689 kDa, en su forma activa pesa 64 kDa. PS4Aa1 (Cry45Aa1) está conformada por 275 residuos, de peso molecular de 30,078 kDa, y una longitud de 828 pb en su gen (10).

Entre las cepas de las cuales se ha visto producción de PS se logró aislar el serotipo *coreanensis*, del cual se mostró la síntesis de cristales parasporales que al ser sometidos a un proceso de digestión por proteinasa K se obtuvo un fragmento de 29 kDa, al realizar electroforesis en SDS-PAGE, y al realizar el bioensayo con células de leucemia T se evidencio su acción citotóxica. El mecanismo por el cual genera este daño en las células susceptibles no se determinó, pero los investigadores lo asocian a la inducción de la apoptosis gracias a el reconocimiento de los receptores de membrana por parte de las PS que facilitan selectivamente liberación de iones monovalentes con fragmentación del ADN, culminando en la muerte de la célula neoplásica (11).

La activación de las PS es clave en el mecanismo por el cual logran causar daño en células tumorales en líneas mamíferos, la activación se genera en pH alcalino con enzimas como proteinasa K, tripsina, y quimiotripsina. Se encontró que el uso de proteinasa K en altas concentraciones (>60 µg/ml) para el caso de una PS1, logra la digestión, pero al

aumentar la concentración de la enzima se pierde la toxicidad, entonces se optó por el uso de tripsina para la activación de esta PS en altas concentraciones (>50 µg/ml) con aumento de la acción citotóxica frente a la línea celular HeLa a concentración de 10 µg/ml de PS1, en el análisis de SDS-PAGE la bandas de la proteína se caracterizan por alto peso molecular, las cuales al tratamiento con tripsina se encontró bandas de 15-56 kDa (12).

Para entender un poco más sobre el mecanismo de apoptosis que ejerce PS2Aa1 en células cancerosas, Brasseur et al. evidenciaron que esta proteína activa a las caspasas 3 y 7 induciendo apoptosis en líneas celulares de hepatocitos humanos tumorales (HEPG2) y cáncer de próstata (PC-3), también se determinó que la caspasa 3 era capaz de realizar una escisión proteolítica en la proteína de reparación PARP, la cual controla el crecimiento tumoral inhibiendo factores de inflamación (NF-Kb y AP-1) ayudando así al proceso de apoptosis. Para la activación de la caspasa 3 que genera la apoptosis, debe activarse previamente la vía intrínseca (caspasa 9), además de que al analizar las vías de supervivencia, se mostró que en el caso de células cancerígenas susceptibles a PS, estas vías se regulaban al inhibir tanto la caspasas 3 y 9 (13).

PS2 tiene capacidad de unirse a la membrana celular específicamente a las balsas lipídicas, lo que genera formación de oligómeros induciendo poros en la membrana plasmática. En ausencia de bajo contenido de lípidos la acción de esta PS no es posible. Dicha acción se ha visto en células pertenecientes a la línea HepG-2, las cuales son susceptibles a PS2 al expresar los receptores necesarios para la unión, que a pesar de las investigaciones aun no son claros. A diferencia de PS1 y PS3, de fuerte acción citotóxica frente a células HeLa y HepG-2 por inducción de apoptosis, PS2 actúa como citolisina con formación de ampollas en membrana (14).

El hallazgo de cepas de Bt productoras de PS, como *shandongiensis* y *coreanensis*, que al ser solubilizadas en un pH alcalino ( pH 10.5) generaban una mayor concentración de toxina con acción citotóxica para células tumorales en ratones, al igual que potenciaban la acción de agentes antitumorales en ensayos *in vitro* como bleomicina, produciendo radicales libres fuertemente reactivos, con fragmentación de las cadenas de ADN, y en células tumorales HeLa y MOLT-4 se obtuvo acción citotóxica del 50% a una concentración de 0.12 µg/ml. No es extraño que algunos ensayos demuestren citotoxicidad

de PS frente a insectos, esto se ha correlacionado con la toxina Cyt1, una citolisina de amplio espectro (15).

Una clasificación de PS se pudo realizar basándose en la masa molecular: el grupo de mayor masa molecular (PS1, PS3 y PS6) se expresan como precursores de proteínas de 80 kDa, y son procesadas a formas activas de un peso aproximado de 60 kDa, conformadas por tres dominios de cinco bloques conservados en la mayoría de proteínas Cry. El grupo de PS de menor peso molecular (PS2, PS4 y PS5) presentan precursores con peso entre 33-37 kDa, este grupo de proteínas presenta una estructura conservada de tres dominios semejantes a la toxinas formadora de poro (PFT) similar a la toxina épsilon, la citolisina o la aerolisina (16).

Actualmente se han identificado 19 tipos de PS, cada una a su vez clasificada dentro de los seis niveles de primer rango (PS1- PS6). Se ha evidenciado que una misma bacteria es capaz de sintetizar más de un tipo de PS simultáneamente. Se ha planteado que esta producción de diferentes tipos de PS se debe a una acumulación de mutaciones y adquisición de genes, lo que permite que el genoma de Bt evolucione (17).

Cuando se habla del espectro citotóxico que las PS tienen sobre las células susceptibles, este se puede medir gracias al efecto citopático, es decir el daño morfológico que se genera en las células al estar en contacto con las PS, cabe resaltar que este espectro varía de acuerdo a cada PS, como es el caso de mayor especificidad frente a ciertas células, por ejemplo PS1 afecta líneas celulares como HeLa, o de tener un alto espectro como PS2 que genera daño a diferentes tipos de líneas, o en el caso de PS6 en el que no se ha logrado a encontrar a cabalidad la acción frente algún tipo de células neoplásicas. Son varios los mecanismos que emplean las PS para provocar el efecto citopático en las células neoplásicas, se han descrito tres: a través de reconocimiento de receptores de membrana, apoptosis, y por último necrosis (18).

Al intentar estudiar más a fondo estas proteínas se evidenció que estas necesitan activarse con el fin de volverse biológicamente eficientes, suelen digerirse con las enzimas proteinasa K y tripsina, en un medio alcalino, aunque no es el único método por la cual se activa. El daño causado por estas proteínas a células con alguna alteración fueron notorios, al observar el efecto citopático, incluyendo hinchazón celular y vacuolas en el citoplasma para PS1, similares a las observadas durante la apoptosis, mientras que con PS2 los

cambios surgieron a nivel de alteraciones en el citoesqueleto, fragmentación del retículo mitocondrial y endoplásmico, y un aumento anormal de la permeabilidad celular (19).

Como ya se ha mencionado la producción de PS en Bt se desarrolla durante la fase estacionaria, se ha descrito que para la formación de un cristal parasporal, la célula debe sintetizar de  $1 \times 10^6$  a  $2 \times 10^6$  moléculas de protoxinas. Este proceso se creía se desarrollaba a nivel transcripcional, post transcripcional y postraducciona, de tal forma que la producción de estas protoxinas se dieran en masa y así su posterior síntesis de los cristales parasporales de manera ordenada en la espora, pero se ha logrado evidenciar que varias cepas de Bt tienen fragmentos heterólogos de ADN de doble cadena, de hasta 20 Kb, los cuales han participado en la síntesis de los cristales parasporales (20).

En el proceso en que la célula pasa a formar la espora, este contiene dos cromosomas ya condensados conocidos como filamentos axiales, que se extienden desde el polo al otro polo con los orígenes ubicados en sus extremos, mientras que el tabique se forma cerca de un polo y divide la célula en desarrollo de manera desigual en una forespora y una célula madre, y luego una enzima ADN translocasa bombearía el cromosoma a través del septum en la forespora. En Bt se mostró que existían dos fuertes señales que condensan dos ADN genómicos, uno permanece en la forespora, mientras que el otro permanece en la célula madre, durante el estudio se determinó que el ADN que se incluyó en la forespora es totalmente envuelto por la estructura cuando llega a su fase madura, pero a nivel del ADN de la célula madre este se empieza a dispersar en dirección donde se formará la inclusión parasporal, lo que podría explicar la presencia de fragmentos de ADN (20).

Bt es un microorganismo el cual se ha logrado aislar de diversos ambientes naturales, y de dichas cepas aisladas se ha visto que es capaz de producir PS, pero que el efecto frente a las células neoplásicas puede variar de acuerdo a las condiciones del cultivo de línea celular que se le presente, ya que debe generar una nueva adaptación para su desarrollo lo que en ocasiones interviene en la efectividad de su toxicidad, además de que, las células cancerosas adquieren más características resistentes a medida que avanzan desde una etapa primaria a una etapa metastásica más agresiva (21).

En las primeras investigaciones sobre Bt, que se realizaron desde su identificación, se mostraron únicamente las propiedades insecticidas que este posee, pero gracias a la observación hecha por Mizuki et al., en 1999, se encontró una serie de proteínas en esta



bacteria, con pesos moleculares que eran menores a los de las toxinas Cry, además de que no causaban daño citopático en el epitelio intestinal de invertebrados, pero sí mostró efectos tóxicos en las células alteradas de algunos tipos de cáncer. Dichas proteínas con pesos moleculares por debajo de 90 kDa fueron las PS (22).

En cuanto a PS1Aa1, esta fue determinada en la cepa A1190, fue la primera PS de estudio de la cual se pudo obtener su forma activa, compuesta de polipéptidos de 15 kDa y 56 kDa por proteólisis utilizando tripsina, de la cual al ponerla en contacto con la línea celular HeLa, se determinó que las dosis letales 50 (LD50) para estas células eran de 0.12 y 0.32  $\mu\text{g} / \text{ml}$ , empleando como mecanismo el inducir el influjo de calcio, elevando la concentración de calcio intracelular en las células susceptibles, activando la vía de señalización apoptótica característica de esta PS. PS2Aa1 se obtuvo de la cepa A1547 *de Bt* en su forma activa de 30 kDa mediante proteinasa K, fue altamente tóxica frente a las líneas celulares HepG2, CACO-2, MOLT-4, Jurkat y HL-60, el efecto citopático que se logró evidenciar fue hinchazón, ampollas y lisis, así como el desmontaje de microtúbulos, enredo de los filamentos de actina, y fragmentación de las mitocondrias y endoplasma reticular. Estos dos tipos de PS comparten una estructura de tres dominios, similar a PFT, se ven relacionadas con la vía que eligen las células generalmente llevándola a la apoptosis (22).

El mecanismo de acción de las PS explicado según el artículo “*Cell lines as models for the study of Cry toxins from Bacillus thuringiensis*” lo clasificaron de acuerdo a la familia a la que pertenece las PS; La familia 3d-Cry (PS1, PS3 y PS6) se ha descrito como estas proteínas que generan afectación en las células susceptibles, al hablar de la PS1 se evidencia activación de la caspasa 3 y apoptosis, es clave anotar que al presentarse inhibidores de la apoptosis como Z-VAD570 FMK y Z-DEVD-FMK, evitan el efecto citotóxico de la PS1, PS1 causa a autofagia, además de apoptosis, por unión a una proteína beclin-1. PS3 no logra activar apoptosis, se propuso que causa formación de poros en la membrana, agotando el ATP, además de generar inflamación celular y finalmente el daño en la membrana. Esta PS está codificada por un operón compuesto por tres genes. Al referirse a estos se determinaron ORF1, sin función conocida, ORF2 para el fragmento tóxico de Cry41Aa, y un dominio extra en el C-terminal que tiene similitudes con un dominio tipo ricina, y por último ORF3 que tiene similitudes con la región C-terminal de

protoxinas Cry. A nivel de PS6, su mecanismo aún no está claro pero su acción tóxica se logró determinar en varias líneas celulares (23).

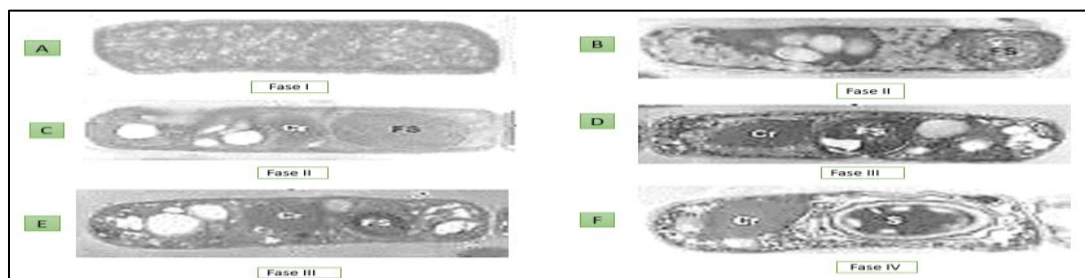
PS2Aa1 muestra similitudes estructurales a beta-PFT, como la aerolisina o citolisina, la cual está conformada por tres dominios, el primero con residuos aromáticos, los dominios 2 y 3 están formados por beta láminas estructuradas en un beta-sándwich, y una horquilla beta anfifática, la cual se inserta en la membrana durante la formación de poros estimulando ampollas, encogimiento nuclear y formación de células en forma de globo, debido a que induce la fuga de lactato deshidrogenasa y la afluencia de FITC-dextranos extracelulares. En cuanto a la PS4 y PS5 no muestran la activación de la caspasa 7 lo que anula la acción de apoptosis (23).

Chubicka et al., indicaron que hasta el 65% de las cepas de Bt poseen genes para la producción de PS, siendo la más predominantes PS2, con 38%, al compararlo con las demás PS, que llegan a estar entre un 20 a 23% de las cepas de Bt (24). Al igual que el mecanismo de muerte programada o apoptosis celular es el más relacionado con las PS mediante la activación de la caspasa 3 y la vía intrínseca (caspasa 9), esta activación se genera siempre y cuando las concentraciones de este péptido sean bajas (1ug/ml), mientras que a concentraciones más altas (3 ug/ml), las células HeLa mostraron una pérdida de lactato deshidrogenasa (LDH) y muerte celular necrótica, pero que de usar dicho mecanismo, la PS se apoya en acción tipo aerolisina, una toxina PFT (24).

## 2. MARCO REFERENCIAL

### 2.1. Generalidades de *Bacillus thuringiensis*

Bt es un microorganismo procariota, aislada por primera vez en 1901 por Shigetane Ishiwata, quien debido a pérdidas económicas en la industria de seda en Japón, basada en el gusano de seda (*Bombyx mori*), el cual estaba siendo afectado por dicho microorganismo (25). Bt se describe como un bacilo Gram positivo móvil debido a que posee flagelos peritricos, con un tamaño aproximado entre 3 y 5  $\mu\text{m}$  de largo por 1 a 1,2  $\mu\text{m}$  de ancho, anaerobio facultativo, ubicuo en el ambiente, aislado de suelos, lagos, mar entre otros lugares, quimiorganotrofo, este microorganismo fermenta glucosa, fructosa, trehalosa, maltosa y ribosa, al igual que hidroliza gelatina, almidón, glucógeno, esculina y N-acetilglucosamina (26). Según la clasificación taxonómica, este microorganismo pertenece a la familia Bacillaceae y se ubica dentro del grupo I del género *Bacillus* al igual que *B. cereus*, *B. anthracis*, y *B. mycoides* (27). A nivel de la conformación del genoma de Bt, este llega a medir entre 2.4 Mb a 5.4-6.3 Mb, esta bacteria exhibe un complejo perfil de plásmidos circulares y lineales cuyos tamaños varían desde 2 hasta más de 200 kb (28). En cuanto a su ciclo de vida, esta se desarrolla a través de cuatro fases (Figura 1) (29).



**Figura 1:** Ciclo de vida y estadios de esporulación de Bt. A. Fase I: Célula vegetativa; B y C. Fase II: Inicio de la formación de la protospora en el incipiente esporangio protospora (fs); Formación de la primera capa de la protospora (fs) y el inicio de la formación del cristal parasporal (Cr); D y E. Fase III: Acumulación de capas de la protospora (fs) y aumento del tamaño del cristal (Cr); Inicio de la formación del exosporium en la protospora (fs) y aumento de tamaño del cristal (Cr); F. Fase IV: Estado final de la esporulación, mostrando la protospora (S), cristal (Cr) (30).

Cabe resaltar que Bt sintetiza uno o varios cristales parasporales, conformado por proteínas de la bacteria, estos se han clasificado en tres grandes grupos: las proteínas Vip, las cuales son proteínas sintetizadas en fase vegetativa con acción insecticida (Vip1-Vip3) cada una con un receptor específico. Las Vip1 son proteínas con una masa molecular de 100 kDa capaz de reconocer receptores específicos de las células del intestino medio del insecto, formando poros en este, las Vip2 tienen una masa molecular de 52 kDa y reconocen un receptor ADP-ribosiltransferasa inhibiendo su polimerización, y por último Vip3 posee una masa de 88 kDa, con gran espectro de acción a múltiples insectos, tendría una acción similar a la Vip1. El segundo grupo de proteínas, son las proteínas Cyt (del inglés *Cytotoxic*), son proteínas que muestran un amplio espectro de actividad *in vitro* contra células de invertebrados y vertebrados, incluyendo eritrocitos de mamíferos, además de ejercer un efecto letal *in vivo* contra las larvas de insectos dípteros (31) y por último las proteínas Cry (o proteínas Crystal) que han sido ampliamente empleadas desde la década de 1930 como principio activo para la elaboración de múltiples bioinsecticidas debido a la gran especificidad y acción citotóxica (27).

## 2.2 Proteínas de Cry

Las proteínas Cry forman inclusiones parasporales proteicas con efectos tóxicos en insectos blanco (32) Desde su descubrimiento se han reportado más de 700 proteínas Cry que se clasificaron de acuerdo a homología de aminoácidos en más de 70 familias, con diferente especificidad hacia distintos órdenes de insectos: lepidópteros, coleópteros o dípteros entre otros (28) (30). Los cristales parasporales son ricos en dichas proteínas, y estos pueden clasificarse en bipiramidales, cúbicos, cuadrados, aplanados, esféricos y en algunas ocasiones amorfos. Estos cristales parasporales suelen ocupar el 30% de la bacteria (27).

Los genes *cry* poseen una secuencia codificante de entre 1900 pares de bases (pb) (*cry2Ab*) o unos 3600 pb (*cry1Aa*, *cry1Ab*, *cry1Ac*) entre otros. Las proteínas que codifican estos genes llegan a tener una identidad aminoacídica que puede variar desde más de un

90% hasta menos de un 20%, y el intervalo de pesos moleculares entre 50 y 140 kDa (27) (30)

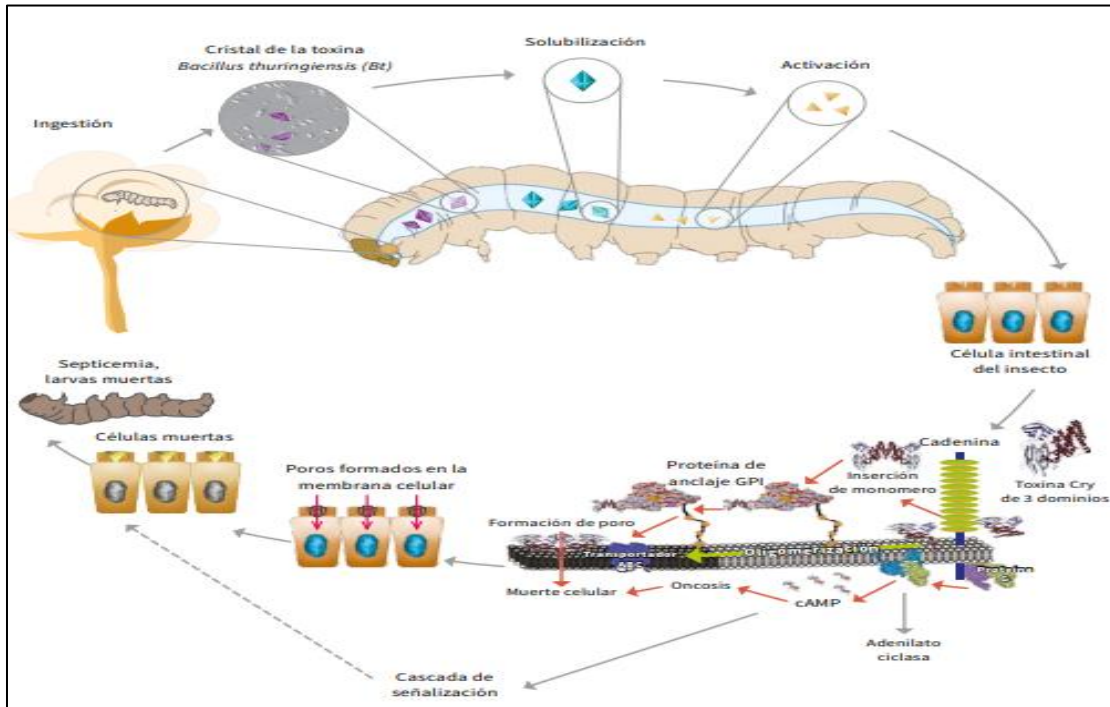
La estructura de las proteínas Cry se describe en forma tridimensional, la cual consta de tres dominios: el dominio I consta de siete alfa-hélices antiparalelas, hidrofóbicas y anfipáticas, donde la quinta hélice se ubica en el centro siendo rodeada por las demás, se le atribuye la formación de poros en el epitelio del intestino, lo que se puede suponer, ya sea porque una horquilla helicoidal hidrofóbica (alfa4-alfa5) genera una estructura que envuelve las hélices anfipáticas, con las caras hidrofílicas formando el lumen del canal iónico, o porque al unirse las hélices hidrofóbicas alfa5 y alfa6 forman un loop en el extremo de la estructura abriendo espacio a manera de navaja e insertándose en la superficie de la membrana (32). El dominio II tiene tres láminas antiparalelas beta distribuidas según topología de “llave griega”, dispuesta en beta-prisma, adquiriendo gran importancia ya que se asemeja a los sitios de unión de antígeno-anticuerpo, por tal motivo se considera como la sección que reconoce al receptor, el dominio III consiste en dos tipos de láminas beta antiparalelas dobladas formando un beta emparedado, este dominio se ve involucrado tanto en el mantenimiento de la integridad estructural y unión al receptor (32)

### **2.3 Mecanismo de acción de Cry**

El mecanismo de acción de las proteínas Cry frente a insectos, ha sido ampliamente descrito, se basa en la formación de poros líticos en las membranas de las células del intestino del insecto, con cese de alimentación, parálisis del intestino, vómito, diarrea, descompensación osmótica, parálisis total y finalmente la muerte (33) (26).

Existen tres modelos que lo explican de manera más descriptiva; el primero dado por Bravo es el mecanismo clásico (Figura 2), propone que después de que el insecto ingiere la espora con el cristal, estos últimos se solubilizan bajo condiciones alcalina, y al llegar al intestino medio de la larva blanco se libera la protoxina que a su vez es clivada por proteasas (tripsinas o quimiotripsinas) dejando un fragmento activo de 60-70 kDa; esta toxina activa, reconoce un receptor caderina (CADR), proteínas transmembrana en la microvellosidad apical intestinal con un dominio citoplasmático y un ectodominio extracelular que consiste de varias repeticiones, las repeticiones 7, 11 y 12 entran en

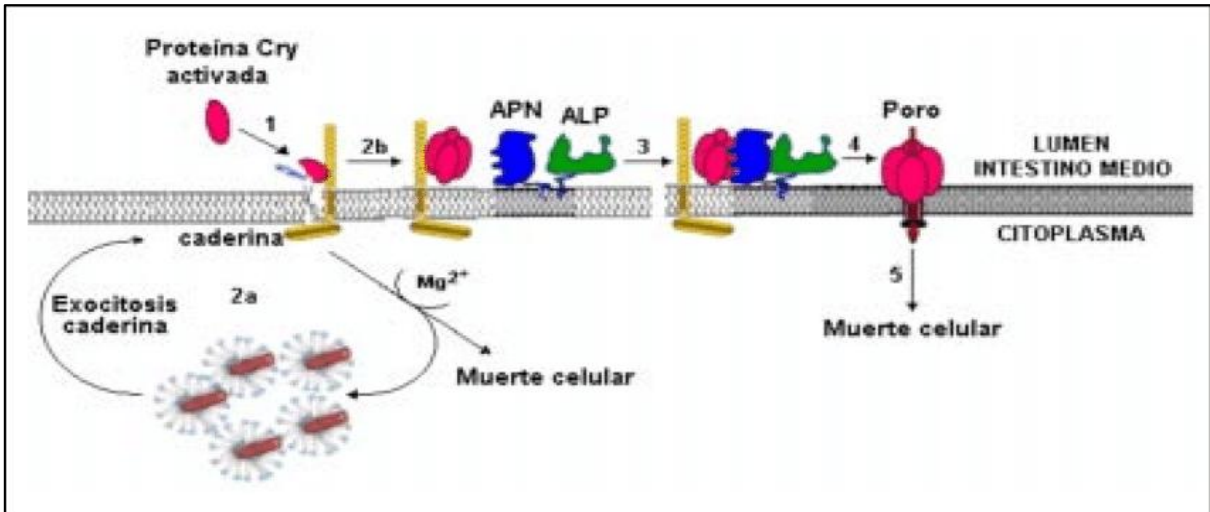
contacto con el dominio II de la proteína Cry, posterior a esto la hélice alfa-1 es clivada por las proteasas asociadas a vesículas con lo cual se forman oligómeros que interactúan con otros receptores (34).



**Figura 2:** Mecanismo clásico de acción entomopatógena de proteínas Cry. El grupo de toxinas Cry destruyen la barrera del epitelio intestinal para favorecer el paso de la bacteria a la hemolinfa, donde normalmente se suceden ciclos de esporulación y división, causando septicemia y muerte del insecto (30).

Otros receptores incluyen aminopeptidasa N (APN), fosfatasa alcalina (ALP), proteínas ancladas a glicosilfosfatidil-inositol (GPI) de ~65 kDa, y por último están los glicolípidos que son glicoconjugados de 270 kDa y proteínas de 252 kDa (19).

En relación al modelo que planteo Zhang o de vía de señalización (Figura 3) propone que la unión de la proteína Cry con el receptor CADR está mediada por iones de magnesio (vía adenilciclase (AC)/Proteína quinasa A (PKA)), esta vía de señalización que incluye la estimulación de la proteína G y a su vez de AC, incrementando así niveles de AMP cíclico (adenosina 3',5'-monofosfato) y la activación de PKA, con desestabilización del citoesqueleto y canales de iones llevando a la muerte celular (32).



**Figura 3:** Mecanismo de acción entomopatógena por vía de señalización de proteínas Cry 1 con reconocimiento a CADR y activación de cascada de señalización dependiente de magnesio y estimulación de exocitosis (27).

#### 2.4 Cepas de parasporina de *Bacillus thuringiensis* activas contra el cáncer

Las cepas aisladas y reportadas de Bt se han clasificado de acuerdo a su antígeno H o antígeno flagelar, ya que se basó en la reacción inmunológica al antígeno flagelar bacteriano, la flagelina, obteniendo así los 69 serotipos H que a su vez se subdividieron en 84 serovares (Tabla 1) (35) (27)

**Tabla 1: Clasificación de Bt de acuerdo al antígeno flagelar o antígeno H (27).**

Antígeno H	Serovar	Antígeno H	Serovar	Antígeno H	Serovar
1	<i>thuringiensis</i>	19	<i>tochigiensis</i>	44	<i>higo</i>
2	<i>finitimus</i>	20a, 20b	<i>yunnanensis</i>	45	<i>roskildiensis</i>
3a, 3c	<i>alesti</i>	20a, 20c	<i>pondicheriensis</i>	46	<i>chanpaisis</i>
3a, 3b, 3c	<i>kurstaki</i>	21	<i>colmeri</i>	47	<i>wratislaviensis</i>
3a, 3d	<i>sumiyoshiensis</i>	22	<i>shandongiensis</i>	48	<i>balearica</i>
3a, 3d, 3e	<i>fukuokaensis</i>	23	<i>japonensis</i>	49	<i>muju</i>
4a, 4b	<i>sotto</i>	24a, 24b	<i>neoleonensis</i>	50	<i>navarrensis</i>
4a, 4c	<i>kenyae</i>	24a, 24c	<i>novosibirsk</i>	51	<i>xianguangensis</i>
5a, 5b	<i>galleriae</i>	25	<i>coreanensis</i>	52	<i>kim</i>
5a, 5c	<i>canadensis</i>	26	<i>silo</i>	53	<i>asturiensis</i>
6	<i>entomocidus</i>	27	<i>mexicanensis</i>	54	<i>poloniensis</i>
7	<i>aizawai</i>	28a, 28b	<i>monterrey</i>	55	<i>palmanyolensis</i>
8a, 8b	<i>morrisoni</i>	28a, 28c	<i>jegathesan</i>	56	<i>rongseni</i>
8a, 8c	<i>ostrinae</i>	29	<i>amagiensis</i>	57	<i>pirenaica</i>
8a, 8d	<i>nigeriensis</i>	30	<i>medellin</i>	58	<i>argentiniensis</i>
9	<i>tolworthi</i>	31	<i>toguchini</i>	59	<i>iberica</i>
10a, 10b	<i>darmstadiensis</i>	32	<i>cameroun</i>	60	<i>pingluonsis</i>
10a, 10c	<i>londrina</i>	33	<i>leesis</i>	61	<i>sylvestriensis</i>
11a, 11b	<i>toumanoffi</i>	34	<i>konkukian</i>	62	<i>zhaodongensis</i>
11a, 11c	<i>kyushuensis</i>	35	<i>seoulensis</i>	63	<i>bolivia</i>
12	<i>thompsoni</i>	36	<i>malaysiensis</i>	64	<i>azorensis</i>
13	<i>pakistani</i>	37	<i>andaluciensis</i>	65	<i>pulsiensis</i>
14	<i>israelensis</i>	38	<i>oswaldocruzi</i>	66	<i>graciosensis</i>
15	<i>dakota</i>	39	<i>brasiliensis</i>	67	<i>vazensis</i>
16	<i>indiana</i>	40	<i>huazhongensis</i>	68	<i>thailandensis</i>
17	<i>tohokuensis</i>	41	<i>sooncheon</i>	69	<i>pahangi</i>
18a, 18b	<i>kumamotoensis</i>	42	<i>jinrongiensis</i>	70	<i>sinensis</i>
18a, 18c	<i>yosoo</i>	43	<i>guiyangiensis</i>	71	<i>jordanica</i>

Entre las cepas con actividad anticancerígena se encontraron varias relacionadas por el antígeno H a los serovares *dakota*, *shandongiensis*, *neoleonensis*, y *coreanensis*. Dichas cepas han sido aisladas de suelos y filoplanos de nueve localidades diferentes en Japón, y la cepa *neoleonensis* en México. Existen cepas con acción citotóxica para insectos, como *israelensis* y *kyushuensis*, que también demostraron actividad anticancerígena atribuible a la presencia de proteínas Cyt (36).

La serovar *dakota* cepa A1547 es una de las cepas de la cual se han registrado efecto frente a líneas celulares de mamíferos, caracterizada por sintetizar PS2Aa1, y ser más tóxica al ser solubilizada por proteinasa K que con tripsina, la efectividad de esta cepa ha sido evaluada en las líneas HepG2, línea celular de adenocarcinoma de mama de humano (MCF-7), y tumoral de próstata (PC-3) (13).

De lo diversos aislamientos predomina serovares como *kurstaki*, *galleriae*, *aizawai*, *morrisoni*, *sumiyoshiensis*, *dakota*, *tohokuensis/mexicanensis*, *colmeri*, *toguchinimuju* y



*jinghongiensis*; el 77% de los aislados no tenían actividades larvicidas concordado así con reportes de que las PS de aislados no insecticidas de Bt presentan ocasionalmente fuertes actividades citolíticas para el cáncer humano (37). Otra de las cepas con mayor aislamiento, tanto en la zona de Corea como del Japón, es el serovar *coreanensis* con afectación morfológica en ciertas células cancerosas humanas *in vitro* (38).

A cepas aisladas de la isla de Ryukyus (Japón), como serovares *canadensis/colmeri*, *sumiyoshiensis*, *indiana*, *londrina* y serovar *pakistani* al igual que cepas nativas (serovar *amagiensis*, *fukuokaensis*, *tohokuensis/mexicanensis* y *kyushuensis*) no se les asoció actividad insecticida (39). El serovar *israelensis* mostro un efecto citopático en líneas celulares MOLT-4, HeLa y células T normales, esto se debe a la presencia de proteínas Cyt (40).

El serovar *coreanensis* ha sido una de las cepas con mayor aislamientos en suelos, principalmente de Corea, esta ha sido designada según su antígeno flagelar H25, y se ha visto la producción de inclusiones parasporales por parte de esta cepa (40). De la cepa A1519 del serovar *coreanensis* se ha logrado aislar una proteína cristalina de masa molecular de 29 kDa, la cual al ser puesta en contacto con células de mamíferos (células Jurkat) logró inducir la activación de caspasas y finalmente la muerte celular, con un modo de acción diferente al de la inducción de la apoptosis ya que al haber administrado 50 ng/ml de la proteína de 29 kDa se observó que ocurrió un cambio morfológico en las células Jurkat, después de una hora de haber sido suministrada, y al transcurrir más de tres horas se evidenció un daño por apoptosis (41). Lo que se ha relacionado en cuanto al mecanismos de acción de esta proteína, es que en el momento de generar el reconocimiento del receptor e introducirse en la célula, genera una pérdida de potasio intracelular, y que a su vez inicia la activación de la caspasa 9, es decir el mecanismo de apoptosis inicia, pero que la subsiguiente inhibición de la pérdida de potasio bloquea completamente la apoptosis, sin embargo la formación de poros transmembranales es evidente permitiendo la entrada de calcio ( $Ca^{+2}$ ), sin que existiera la degradación de material genético, ni la activación de la caspasa 3, lo que no genero una acción por vía apoptótica importante en la muerte de células Jurkat (41).

Se ha descrito que la células de mamíferos pueden llevar a cabo la apoptosis mediante dos vías: la vía del receptor de muerte y la vía mitocondrial, en cuanto a la

primera vía se observa que se activa mediante la unión de ligandos a los receptores de la membrana de la célula (Fas/CD95, factor de necrosis tumoral (TNF), y el ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF (TRAIL), activando así la caspasa 9 y dar paso a la cascada de señalización (41). En el caso de la vía mitocondrial, los cambios en el potencial de la membrana de las mitocondrias conduce a translocación citocromática desde la lámina mitocondrial interna al citosol, activando la caspasa 9, y seguida de la caspasa 3, pero que la muerte celular fue reprimida por la proteína Bcl-2 (B cell Lymphoma) un grupo de proteínas reguladoras en la vía mitocondrial (42).

## **2.5 Aplicaciones de parasporina**

Las proteínas tipo PS han adquirido gran importancia debido a su capacidad única para matar células cancerígenas de manera específica (38). La PS1 ha sido ampliamente clasificada en tres grandes grupos: PS1Aa, PS1Ab y PS1Ac, que puestas en contacto con células Hela, la afectación a las 24 horas fue mayor del 90%, con un efecto citopático en forma de globo, estas mismas PS activadas han sido probadas en otras líneas celulares como UtSMC (Células prolíficas lisas uterinas), y línea celular HC (43). PS1Aa1 tiene gran afectación en células Hela llegando a generar muerte del 50% de las células en presencia de una concentración de 0.12 µg/ml de la PS. Esta proteína PS1Aa1 también ha logrado generar daños en células MOLT-4 con una concentración de 2.2 µg/ml, en el cultivo de HL-60 la concentración citotóxica es de 0.32 µg/ml, y por último la línea HepG2 tiene una DL50 de 3.0 µg/ml (44).

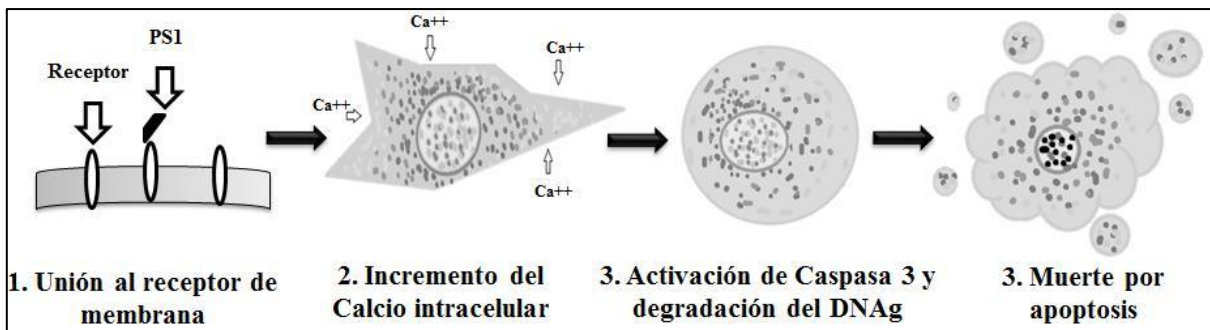
La PS2 ha generado efecto letal en las células Sawano, con CL50 de 0.002 µg/ml, para los cultivos celulares HepG2 y Caco-2 su actividad fue similar a la de las células Sawano, en cuanto a las células MOLT-4, Jurkat y HL-60 las concentraciones fueron entre 0.013 y 0.022 µg/ml. En la única línea en la que se vio menor eficacia fue en TCS, con una concentración de 7,8 µg/ml (44). Para PS2Aa1 se requieren concentraciones oscilando entre 1 y 2 µg/ml (13).

En cuanto a PS3, necesita mayor concentración para el cultivo HL-60 de 1.32 µg/ml. PS4 para su evaluación en células Caco-2 requiere una concentración de 0.124 µg/ml, de igual forma PS4 es activa contra células Sawano y TCS con 3.5 µg/ml, aunque se

ha visto que con concentraciones menores también tiene efecto en las mismas células (0.245 µg/ml) (13).

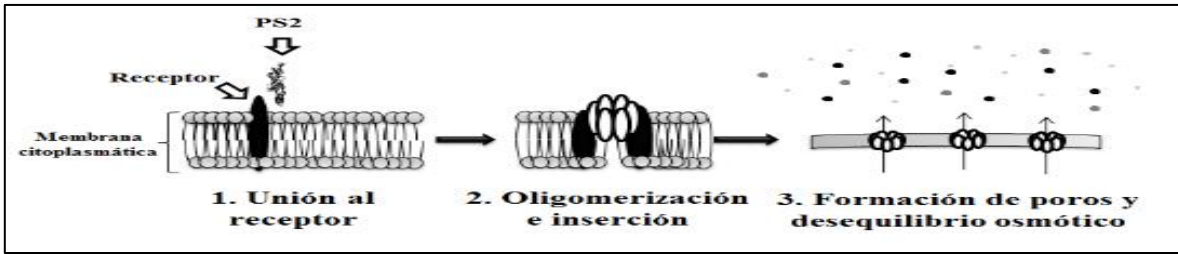
## 2.6 Modo de acción de las proteínas tipo parasporina

El mecanismo por el cual las PS generan el daño a las células neoplásicas se basa en inducir una apoptosis a través de una cascada de señalización correspondiente a la activación de la caspasa 3 la cual se evidencia que al haber una alta presencia de calcio intracelular que induce a la caspasa 3 a escindir y activar a la vía intrínseca (cascada 9), lo que genera una destrucción masiva de la proteínas de la célula culminando en lisis celular o alteraciones en membrana celular, como formación de poros, contracción de la membrana e incluso necrosis (13). Se han descrito mecanismos similares a los de las proteínas Cry, las cuales al entrar en contacto con una línea celular cancerígena susceptible, se activan las vías apoptóticas de la célula, después de la interacción de la PS con receptores, afectando la permeabilidad celular que a su vez estimula la oligomerización y conduce a la muerte celular (Figura 4) (45) (46).



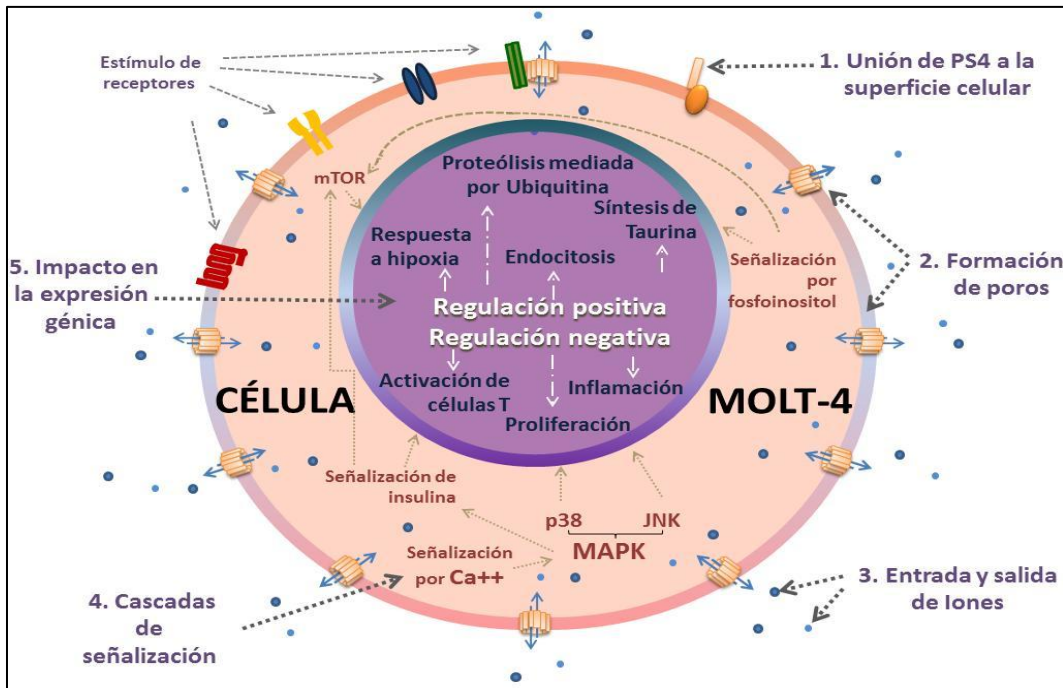
**Figura 4:** Mecanismo de acción de PS1, con reconocimiento del receptor beclina 1, activación de caspasa 3 y muerte celular programada (18).

PS2 se inserta en la membrana con interacción hacia un probable receptor, con acumulación en la bicapa lipídica, induciendo la formación de poros (Figura 5) (45).



**Figura 5:** Mecanismo de acción de PS2. La proteína interactúa con la bicapa lipídica y balsas de colesterol, llevando a desequilibrio osmótico y formación de poros (18).

La PS4 tiene similitud en cuanto su mecanismo de acción con la PS2, debido a que son toxinas beta-PFT, PS4 es independiente de colesterol y ocasiona que haya una liberación de lactato deshidrogenasa y captación intracelular de FITC-dextranos por parte de las líneas celulares susceptibles, genera activación de las caspasa 3 y 7 induciendo apoptosis (Figura6) (45). PS5 no activa caspasas (23)



**Figura 6:** Mecanismo de acción de la PS4. Inicia con interacción dirigida a un receptor de membrana, con posterior oligomerización y formación de poros en la membrana, desequilibrio osmótico debido a flujo de calcio, activación de vías de señalización celular (18).

## 2.7 Cáncer

El cáncer es una enfermedad desencadenada por un grupo celular que se multiplica autónomamente y sin control, que invaden localmente y a distancia órganos y tejidos; es una de las principales causas de muerte en todo el mundo, una de cada seis muertes se debe a cáncer, representando 8,8 millones de muertes en 2015. Entre los tipos de cáncer con mayor relevancia en cuanto a salud pública y mortalidad son: cáncer de pulmón (19,2%), hígado (8,9%), colorrectal (8,8%), estómago (8,6%) y mama (6,4%). Alrededor del 70% de muertes por cáncer ocurren en personas con ingresos bajos y medios (1). Durante el año 2018, se mostró un aumento notable en su carga mundial con 18.1 millones de casos recién diagnosticados, 9.6 millones de muertes, lo que para el 2030, se proyecta a 26,4 millones de casos recientemente diagnosticados y 17 millones de muertes relacionadas con el cáncer (46). A pesar de que son múltiples los tipos de cáncer que generan gran alerta, en la comunidad de la salud se destacan tres: cáncer de pulmón, cáncer de mama (BC de Breast Cáncer), y por último cáncer colorrectal (CCR). Cabe resaltar que la afectación suele variar de acuerdo a sexo, dicho esto, el CCR ocupa el tercer lugar (10,9%) en términos de incidencia en los hombres, mientras que el cáncer de mama (BC) ocupa el primer lugar en las mujeres (24,2%), en cuanto al cáncer cervical ocupa el cuarto lugar en ambos, y por último el cáncer de cuello uterino lidera la carrera tanto por incidencia (6,6%) como por mortalidad (7,5%) en el cuarto puesto entre las mujeres (1).

El gran impacto que el cáncer genera a nivel mundial, ha llevado a que este sea considerado como un problema en salud pública, debido a su alta mortalidad y morbilidad, ya que en estudios realizados por la Organización Mundial de la Salud desde el año 2012 se estimó que para el 2018 la carga del cáncer incrementaría hasta 18 millones de casos nuevos, y 9.6 millones de muertes, además de que aproximadamente después de cinco años del diagnóstico hay 43.8 millones de personas sobrevivientes, es decir que aproximadamente uno de cada cinco hombres, y una de cada seis mujeres en todo el mundo desarrollan cáncer durante su vida, y uno de cada ocho hombres y una de cada once mujeres muere a causa de la enfermedad (47). Los tipos de cáncer con mayor incidencia a nivel mundial son principalmente tres: pulmón, mama femenina y colorrectal, siendo reportados los dos primeros 2,1 millones de diagnósticos en 2018 con una incidencia del

11,6%, en cuanto al cáncer colorrectal con 1,8 millones de casos, es decir el 10,2% también se encuentra el cáncer de próstata ocupando el cuarto lugar, siendo diagnosticados 1.3 millones de casos, (7.1%), A pesar de las grandes campañas de prevención diagnóstica y tratamiento que el sector salud desarrolla continuamente se evidencia como en el caso de Europa, a pesar de que el tamaño de la población mundial es el menor es el primer continente en cuanto a diagnósticos y muertes de personas por esta enfermedad (23,4% de los casos de cáncer en el mundo y el 20,3% culminados en muerte), y en segundo lugar lo ocupa el continente Americano con 13,3% de nuevos casos registrados a nivel mundial, lo que representa el 1,3% de la población mundial, y por último se encuentran Asia y África (57,3% y 7,3%, respectivamente), pero estos datos son superiores a las proporciones de casos de incidentes (aproximadamente 48,4% y 5,8%, respectivamente) (47), por lo que es evidente que a pesar de que es una enfermedad la cual se puede desencadenar por múltiples factores es clave disminuir los factores de riesgo y mantener buenos hábitos de vida, con lo cual mejorarían el pronóstico de las cifras en los siguientes años (47).

El término cáncer se le es atribuido a diferentes enfermedades que generan un daño en cualquier parte del cuerpo, y consiste en la proliferación sin control de manera continua y autónoma de un grupo de células anormales, que tiene la capacidad de invadir y destruir tejido local o a distancia (48); Además de que el cáncer se puede originar a partir de cualquier tipo de célula, por lo tanto no es una enfermedad única sino que se refiere a un conjunto de enfermedades que se clasifican en función del tejido y célula de origen (49). Existen tres subtipos de cáncer en primer lugar están los sarcomas, los cuales se originan a partir de tejidos como: tejido conectivo (huesos, cartílagos, nervios, vasos sanguíneos, músculos y tejido adiposo), después se habla de carcinomas cuando las células anormales son originarias de tejido ya sea tejido epitelial (piel o epitelios que tapizan las cavidades y órganos corporales) o tejidos glandulares de la mama y de la próstata, y por último encontramos los linfomas y leucemias, derivados de células de tejidos formadores de las células sanguínea, médula ósea, ganglios linfáticos (49).

El origen del cáncer es multifactorial, hay múltiples causas que pueden desencadenar la anomalía en el desarrollo y funcionamiento de las células. Una de las razones ha sido por la alteración o anomalías en el material genético, a este proceso se le conoce como carcinogénesis, la cual es ocasionada por agentes carcinógenos, como las

irradiaciones (ionizantes o ultravioleta), productos químicos (humo del tabaco y el humo de leña) contaminación ambiental en general, por agentes infecciosos como el virus del papiloma humano y el de la hepatitis B (48).

Las anormalidades genéticas adquiridas durante la replicación del ADN, (los errores de transcripción no se pueden corregir durante este proceso por lo que pueden ser heredados y, por consiguiente, se presentan en todas las células desde el nacimiento, y originan mayor probabilidad de que se presente la enfermedad. Estas anormalidades genéticas se han asociado a que existen hasta 60 proto-oncogenes que estimulan la división celular normal (desarrollo embrionario, cicatrización, recuperación de células), estos proto-oncogenes se ha visto que llegan a sufrir cambios en su secuencia, ya sea por mutaciones, translocaciones o deleciones en cromosomas, al sufrir estas alteraciones se les llama oncogenes, dicha mutación es dominante por lo tanto totalmente heredable (49) y la teoría postulada por Knudson, un modelo de dos causas en el desarrollo del retinoblastoma asociado a una mutación en el gen RB1, donde se descubrió la presencia de 20 genes supresores los cuales se encargan de controlar lo anteriormente mencionado, además de la reparación de ADN y el inicio de la apoptosis, en el primer hit se genera la primera mutación en la línea germinal que inactiva uno de los alelos del gen RB1, y activa otro alelo dejando la proteína con un 50% de funcionalidad, pero para que ocurra el proceso carcinógeno debe darse el hit 2 que es la mutación completa del alelo RB1 donde la proteína queda totalmente inservible (50). Durante el proceso de carcinogénesis también se han visto alteradas algunas vías de señalización como lo son las vías RTK / RAS / MAP-Quinasa comúnmente mencionada RTK-RAS, vía de señalización PI3K / Akt. Se ha visto la estrecha comunicación entre estas vías, ya que después de que es alterada alguna de estas vías, continúan las demás (51).

### 3. METODOLOGÍA

#### 3.1 Tipo de investigación

Este proyecto tuvo varios enfoques: descriptivo, explicativo, exploratorio y experimental, designando la investigación de tipo mixto.

#### 3.2 Universo:

Cepas de Bt

#### 3.3 Población:

La población seleccionada para el estudio corresponde a cepas de referencia de Bt productoras de PS

#### 3.4 Muestra:

La muestra seleccionada corresponde a la cepa de referencia Bt *coreanensis* 4AL1 (T25001) evaluada para la producción de PS.

#### 3.5. Variables

**3.5.1. Independiente:** Cepa de referencia de Bt *coreanensis* 4AL1

**3.5.2. Dependiente:** secuencias de ADN relacionadas a PS

#### 3.6. Indicadores

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



### **3.7. 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

### **3.8. Técnicas y Procedimientos**

#### **3.8.1 Microscopia**

Para la caracterización morfológica de Bt serovar *coreanensis* 4AL1 (T25001) fue necesario realizar la coloración de Gram, donde se empleó un tiempo de coloraciones un minuto para los colorantes cristal violeta, lugol y fucsina de Gram y 30 segundos para el alcohol. Además, se realizó la coloración de Schaeffer Fulton de cajas incubadas entre 20 y 30 días, dejando diez minutos el colorante de verde malaquita calentado de manera constante durante este mismo tiempo, y por último se agregó la safranina por 1 minuto aproximadamente. Para la identificación de cristales parasporales en Bt serovar *coreanensis* 4AL1 (T25001), se realizó a través de un microscopio de contraste de fases (Nixon), y solución salina.

#### **3.8.2 Diseño de oligonucleótidos específicos para genes tipo parasporina**

El diseño y elaboración de los oligonucleótidos, se basó en las secuencias encontradas en la base de datos Bt toxin nomenclature ([http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil\\_Crickmore/Bt/intro.html](http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/intro.html)) enlazada con NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), donde de acuerdo a la secuencia de nucleótidos codificantes de cada una de las PS se introdujeron en el programa Clustal Omega para lograr encontrar regiones conservadas, y se procedió a elaborar 10 pares de oligonucleótidos (secuencias de ADN codificantes de PS1, PS1Aa1, PS2Aa, PS2Aa1,

PS2Ab, PS3, PS3Aa1, PS4, PS5, PS6) de manera manual con una longitud de 30 pares de bases cada uno.

### **3.8.3. Análisis genómico**

Con base a los dos genomas encontrados en la base de datos Genome del NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome>) correspondientes a Bt serovar *coreanensis* (cepa ST7 y cepa 4AL1) se usó el programa Blastx y la matriz Blosum45, para buscar la presencia de genes codificantes de PS en dichos genomas, usando las 19 secuencias de aminoácidos de las PS registradas en la base de datos de PS (<http://parasporin.fitc.pref.fukuoka.jp/intro.html>). Para verificar la presencia de ORFs relacionados a PS se usó la herramienta Translate del servidor Expasy (<https://web.expasy.org/translate/>). Las características bioquímicas de las 19 PS se realizaron con el programa Protparam de Expasy (<https://web.expasy.org/protparam/>).

### **3.8.4 Extracción de ADN**

Fue analizada la cepa de referencia Bt serovar *coreanensis* 4AL1 (T25001) del Instituto Pasteur, la cual fue reactivada al sembrarse en medio Tripticasa Soya por aislamiento para ser incubada por 24 horas a 30°C. La biomasa se recogió y fue inoculada en medio líquido Luria Bertani (LB) por 24 horas, 30°C y 240 rpm. Pasado el tiempo de incubación, se centrifugó la muestra a 10.000 rpm por 10 minutos, descartando el sobrenadante, y se le adiciona 10 µl de buffer de lisis (Buffer 5X Hot-Shot + Tween: 125mM de NaOH, 1mM EDTA pH 8.0, 0.1 Tween). En este protocolo se le adiciono 5µl de Lisozima e inmediatamente se incubo a 100°C por 10 minutos, y posteriormente se incubo a 4°C por 5 minutos, después se agregó 100 µl de Tris-HCL 1M pH 8.0, y se llevó a centrifugar por 10 minutos a 10.000 rpm, y por último se trasladó el sobrenadante a un nuevo tubo eppendorf estéril y se conservó a temperatura de -20°C. El ADN se visualizó en electroforesis en agarosa 1%, teniendo un tiempo de corrida de 90 minutos con un potencial eléctrico de 80 voltios, para la preparación de las muestras se añadió 6 ul de muestra y 2 ul

de buffer de carga (6XLD), fue empleado un marcador de peso molecular (Fementas) con el cual fue comparado las bandas obtenidas de las muestras.

### **3.8.5. Lavado de Biomasa y Solubilización de Proteínas**

La purificación de cristales tipo PS se realizó a partir de la inoculación de Bt serovar *coreanensis* 4AL1 (T25001) en agar Tripticasa Soya, dejándola 30 días a temperatura ambiente, siendo monitoreada para observar más del 90% de esporulación, y entonces se procedió a recolectar toda la biomasa en tubos eppendorf estériles, se realizaron 4 lavados a la biomasa agregando 1ml de agua destilada estéril, y 5 µl de PMFS 100 mM (después de cada lavado se realiza una centrifugación a 8000 rpm durante 15 minutos), el pellet final se resuspende en 1 ml de buffer carbonato de Sodio, 1 ul de DTT 2 mM y 1 ul de PMFS, se dejó en incubación por 2 horas y 30 minutos en agitación constante a 37°C en oscuridad, luego de esta incubación la muestra es centrifugada por 25 minutos a 10.000 rpm, por último se tomó el sobrenadante obtenido y se conserva a 4°C en oscuridad.

### **3.8.7 Cuantificación de Proteínas por método Bradford**

La cuantificación de proteínas se desarrolló por el método colorimétrico de Bradford para el cual se tomaron 100 µl de muestra de las proteínas extraídas previamente, y se le añadió 1 ml de reactivo de Bradford, la muestra blanco se realizó con 100 µl de agua destilada con 1 ml de reactivo de Bradford y se procedió a realizar la lectura en el espectrofotómetro a 590 nm, se realizaron tres lecturas en tiempos diferentes siendo el final 1 hora después de la primera lectura. Para determinar la concentración de las muestras analizadas se tomó como referencia la curva de patrón de Albumina Bovina (BSA) la cual se elaboró con 4 muestras a diferentes concentraciones de albumina bovina 0,5 mg/ml (25 hasta 100 µl de BSA), a las cuales se les añadió 1 ml de reactivo de Bradford, y se procedió la lectura en el espectrofotómetro a 590 nm (52).

### **3.8.8 Electroforesis de proteínas en SDS-PAGE**

Para evidenciar la síntesis de proteínas tipo PS se desarrolló la electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) a una concentración del 10% tanto el gel separador preparado con: 1462  $\mu$ l de agua destilada esteril, a 1800  $\mu$ l de poliacrilamida que contiene 30 % acrilamida + 0.8 % bisacrilamida, 1125  $\mu$ l de Tris 1M de pH 8,8, 24  $\mu$ l de SDS al 10%, 4,5  $\mu$ l de TEMED, y por ultimo 45  $\mu$ l de Persulfato de amonio el cual fue previamente disuelto 100mg/ml para el gel concentrador se adiciono: 1125  $\mu$ l de agua destilada esteril, 421  $\mu$ l de Poliacrilamida, 703  $\mu$ l de Tris 1M de pH 6,8, 28  $\mu$ l de SDS al 10%, 2,8  $\mu$ l de TEMED, y por ultimo 28  $\mu$ l de Persulfato de amonio, estos reactivos ayudan a la polimerizacion del gel, Primero se polimeriza el gel separador el cual se adiciona la mezcla todavía líquida, entre las dos placas hasta unos 3 cm del borde superior del cristal corto, y completar con agua destilada estéril hasta llegar al borde de la placa , posterior a que ya polimerice se retira el agua y se añade sobre este gel separador la mezcla del gel concentrador al 10% colocado el peine para la formación de los pozos, después de polimerizado los geles se retira el peine con mucho cuidado para añadir las muestras, se empleó 2  $\mu$ l del marcador de peso molecular (26616) Thermo Scientific), las muestras se realizaron al añadir 12  $\mu$ l de muestra más 5  $\mu$ l de buffer de carga (Norgen), y se desnaturalizaron a una temperatura de 100°C por 10 minutos, posterior a esto se corrieron los geles a 80 voltios por 5 horas; la coloración de los geles se realizó con la coloración azul de Comassie la cual se preparó adicionando 0,5 gr de azul de comassie, 90 ml de metanol y 20 ml de ácido acético durante toda una noche y se decoloraron con solución decolorante, la cual tenía 125 ml de etanol, 25 ml de ácido acético y 25 ml y 100 ml de agua destilada estéril por dos horas aproximadamente.

## 4. RESULTADOS

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

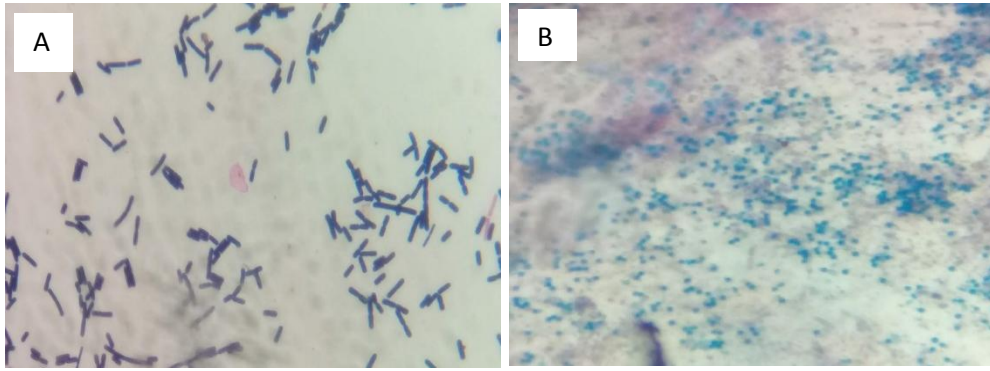
Para este trabajo de investigación fue considerada la cepa de Bt serovar *coreanensis* 4AL1 (T25001) proveniente del Instituto Pasteur (Figura 7), para implementar un método básico para la caracterización de cepas de Bt que posean genes *ps* debido a que en la literatura se ha reportado que cepas pertenecientes a este serovar poseen PS de actividad relacionada a control del cáncer, sin actividad insecticida, ni daño a células normales.



**Figura 7.** Crecimiento de colonias planas blancas opacas con bordes irregulares en agar tripticosa soya después de 24 horas de incubación a 37°C

#### 4.1.2. Microscopia

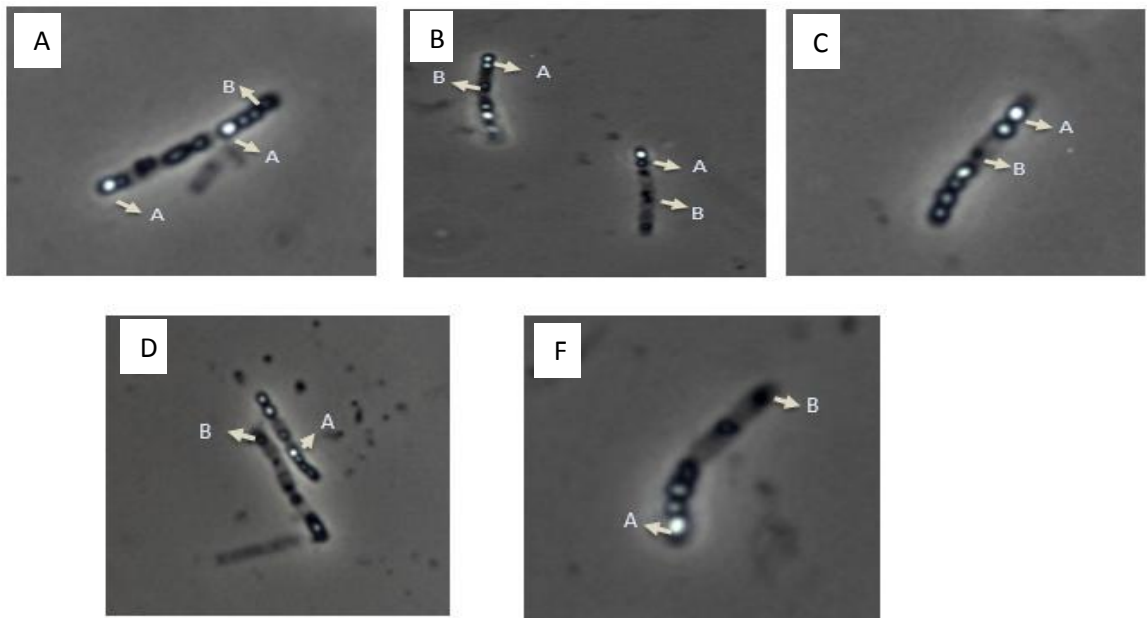
La bacteria en incubación después de 24 horas a 37°C, fue caracterizada a través de la coloración de Gram, mientras que el cultivo incubado entre 20 y 30 días a temperatura ambiente, que posterior a esto se logró evidenciar la formación de esporas y cristales gracias a la coloración de Schaeffer-Fulton (Figura 8).



**Figura 8.** A) Bacilos Gram positivos observados en coloración de Gram, B) Esporas de Bt serovar *coreanensis* observadas en coloración Schaeffer-Fulton

#### 4.1.3 Microscopia de contraste de fases

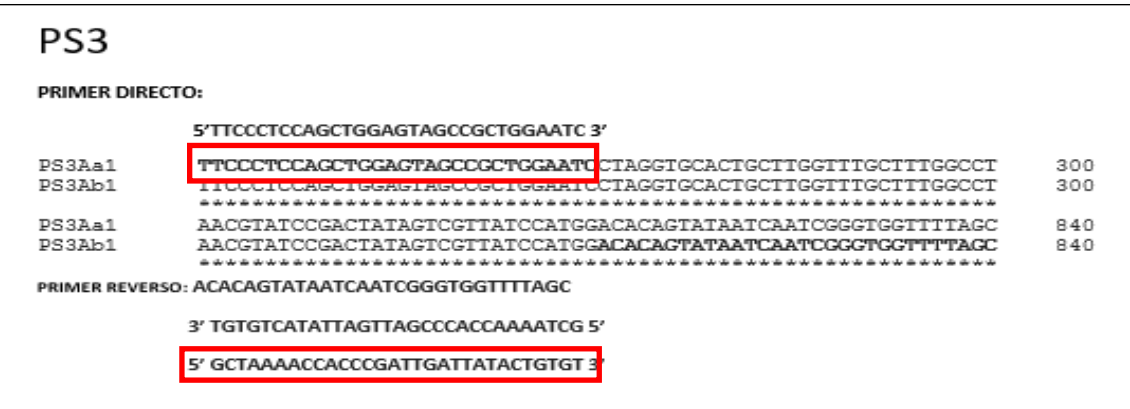
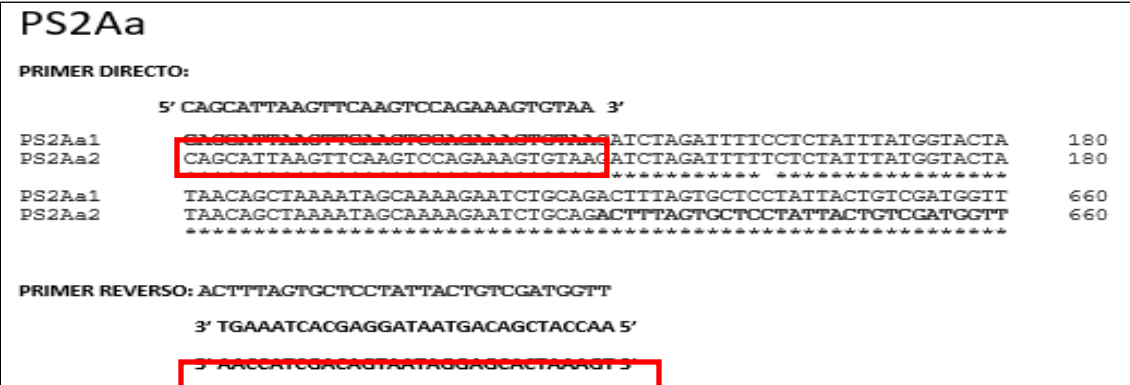
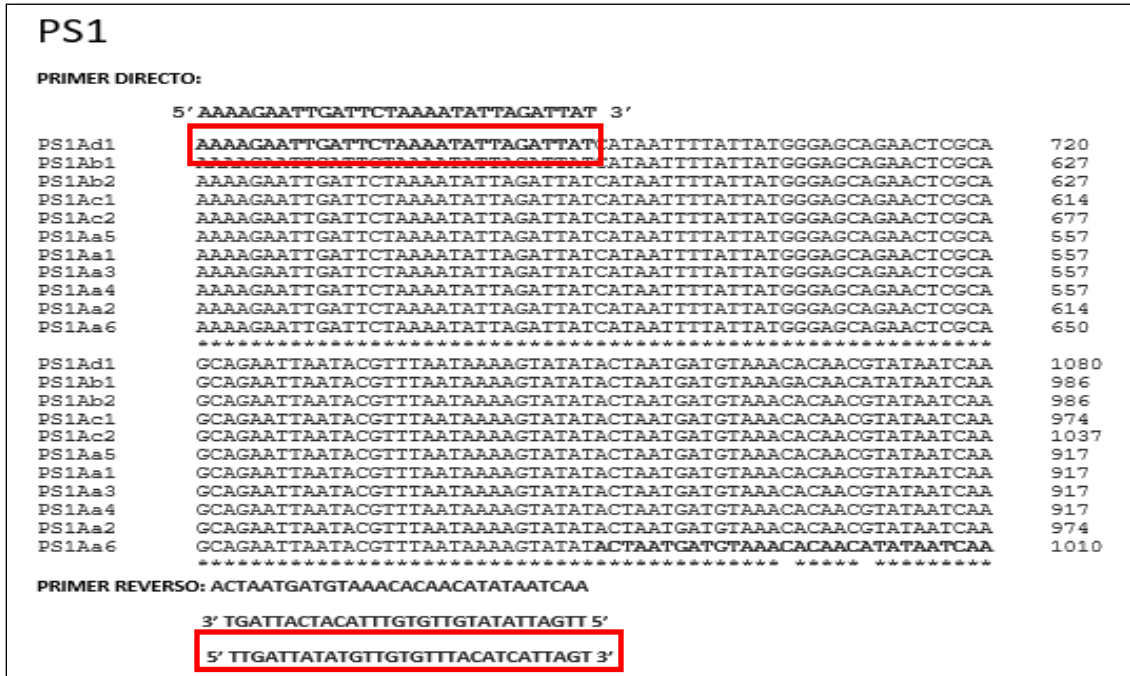
En cuanto a la observación de los cristales parasporales se usó microscopia de contraste de fases enfocando la muestra en cada una de las fases del microscopio, del cual se obtuvieron fotografías de Bacilos tanto con esporas, las cuales se ven refringentes, y de cristales parasporales característicos por ser opacos (Figura 9).



**Figura 9. Panel A, B, C, D, F.** Bt serovar *coreanensis* observado en microscopia de contraste de fases en fase 2 (ph2) **A.** Células esporuladas **B.** Cristales parasporales de Bt

## **4.2 Diseño de oligonucleótido específicos de genes tipo parasporina**

En un principio se quiso realizar un juego de oligonucleótidos específicos universales para el grupo de genes reportados de PS, los cuales debido a la ausencia de una región altamente conservada entre las 19 proteínas tipo PS no se lograron elaborar, por lo que se decidió desarrollar el diseño de juegos de oligonucleótidos específico de cada uno de los grupos clasificados de la PS (PS1, PS2, PS3, PS4, PS5, y PS6). Se lograron obtener 10 juegos de oligonucleótidos, los cuales después de realizar alineamiento de las secuencias, a través del programa Clustal Omega se logró identificar regiones conservadas, altamente similares entre los grupos mayores de PS (PS1, PS2, PS3), las cuales fueron elegidas teniendo en cuenta que el nivel de conservación de la secuencia fuera mayor al 90%, y que flanquearan una región de mínimo de 300 pares de bases. Teniendo esto en cuenta al realizar el alineamiento para el grupo de las PS1 se evidenció una región altamente conservada de la cual se elaboró un par de oligonucleótidos para los 11 subgrupos, para el grupo de la PS2 se optó por realizar un par de oligonucleótidos para una región conservada de las PS2Aa y uno específico para la PS2Ab1, ya que en el alineamiento arrojado por Clustal Omega la PS2Ab1 no tenía una región altamente conservada compartida con las secuencias de las PS2Aa, en el caso de las PS3 existe una región altamente conservada. Por otra parte, al solo existir un miembro en el grupo de las PS4, PS5 y PS6 se elaboraron un par de oligonucleótidos para toda la secuencia del gen codificante (Figura 10 y Tabla 2).



**Figura 10.** Regiones conservadas de las PS de los grupos PS1,PS2 y PS3 con el programa Clustal Omega. En rojo los oligonucleótidos diseñados para cada grupo.



**Tabla 2.** Oligonucleótidos diseñados para genes codificantes de PS.

PS	Bloque secuencia conservada	Primer Directo sentido 5'-3'	Primer Reverso sentido 5'-3'	pb
PS1	720 de PS1Ad1 a 1010 de PS1Aa6	AAAAGAATTGATTCTA AAATATTAGATTAT	TTGATTATATGTTGT GTTTACATCATTAGT	360 pb
PS2Aa	180 de PS2Aa1 a 660 de PS2Aa2	CAGCATTAAGTTCAAG TCCAGAAAGTGTA	AACCATCGACAGTAA TAGGAGCACTAAAAGT	480 pb
PS2Ab	Toda la secuencia	ATGTATTATACTACCC AAGTAACAGGTGGA	TTATAATCCAATTGT TTGTTGTATTTGTTT	915 pb
PS3	300 de PS3Aa1 a 840 de PS3Ab1	TTCCCTCCAGCTGGAG TAGCCGCTGGAATC	GCTAAAACCACCCGA TTGATTATACTGTGT	540 pb
PS4	Toda la secuencia	TCTAAACACACGAACA ACATGGTTGTTATA	GATAAAGCGATTCAT CCATATACTGTCTGA	1116 pb
PS5	Toda la secuencia	ATGGCGATTTTTGATG TTGAAGCAGATCTT	TTATCTTTGTAAATA CCTCTGATATTCTGG	918 pb
PS6	Toda la secuencia	ATGTTCGGTTGTTACT ATGTGAAAGGTGGA	TTATGCGTTTAAATAT ATTTATAAAATCATT	2262 pb
PS1Aa1	Toda la secuencia	GTGGACCCGTTTTCTA ATTATTCTGAACAA	TTATGAAACAGGACT AAAAATAATGGAATC	2172 pb
PS2Aa1	Toda la secuencia	ATGTATAATGATAAAA GAATGTGTTCTGAT	CTAATTCCCCCATT TGGGCATTGGCATT	1017 pb
PS3Aa1	Toda la secuencia	ATGAATCAAAATTGTA ATAACAATGGATAT	TAACTCAACTTAAA TTTTTGATTGGTACT	2478 pb

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

Durante el desarrollo de la investigación se analizaron los dos genomas depositados en la base de datos de NCBI de *Bt serovar coreanensis*, los cuales eran pertenecientes cada uno a una cepa diferente: el primer genoma corresponde a la cepa ST7, y el segundo genoma a la cepa 4AL1, con los cuales se pretendió encontrar una similitud entre estos y alguna de las secuencias de aminoácidos de las 19 PS reportadas actualmente.

#### 4.3.1 Genoma de *B. thuringiensis* serovar *coreanensis* cepa ST7

Al realizar 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 programa Blastx, no se encontró resultados válidos (E=0.01, identidad >40% y cobertura >50%) para realizar un estudio más profundo y detallado sobre este genoma y su relación con las proteínas anti-cancerígenas (Tabla 3).

**Tabla 3.** Alineamientos del genoma de Bt serovar *coreanensis* CEPA ST7 vs las secuencias de aminoácidos de las 19 PS con el programa Blastx.

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

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

En cuanto al segundo genoma de Bt serovar *coreanensis* cepa 4AL1, los resultados en la descripción de Blastx mejoraron en comparación con el primer genoma analizado, con un resultado (Tabla 4), ya que al interpretar el alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las PS con el genoma este nos muestra un resultado del que se puede analizar, relacionado con PS5.

**Tabla 4.** Descripción del genoma de *Bt* serovar *coreanensis* cepa 4AL1 en comparación con las secuencias de aminoácidos de las 19 PS en el programa Blastx.

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

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

Teniendo como base los resultados de Blastx, y analizando los fragmentos en donde la secuencia de la PS5 alineaba con el genoma de la cepa 4AL1, el fragmento de la posición 661027 a 660941 según el programa Blastx, fue tomado para obtener la secuencia de ADN de 915 pb correspondiente al código AB555650, y se analizó con la herramienta Translate de Expaty, para encontrar los marcos de lectura codificantes (Tabla 5), pero estos péptidos no se ven relacionados con PS en primera instancia.

**Tabla 5.** Marcos de lectura de posible secuencia de PS5 analizados en Clustal Omega con la secuencia de aminoácidos de PS5.

MARCO	PEPTIDOS
-2	KCLNGGLTLILHKGDVLFQRQGEDGPLYFIKTGLLKVVRIEEDGTPFLFNIIVP GETIPHHSLISPKEYHGTALMKTEVELISSNEWYDQLQANPASYAN
-2	MIAFAGILISVIFIASNNILNPLQRIHC
-2	MQNHLLQILSLYFISLYILSI

#### 4.3.3 Análisis de secuencia de aminoácidos extraída de la literatura

Según el artículo *The cytotoxicity of Bacillus thuringiensis subsp. coreanensis A1519 strain against the human leukemic T cell*, secuenciaron un péptido con actividad anticancerígena (DVIREYLMFNELSALSSSPE) dicho fragmento fue puesto en el programa Blastx contra cada una de las 19 secuencias de aminoácidos de las PS, donde arrojó resultados validos tan solo con las PS del grupo PS2. De igual forma al someter la secuencia del artículo con los dos genomas de Bt serovar *coreanensis*, el alineamiento para cada uno de los genomas no fue de gran relevancia (Tabla 6).

**Tabla 6.** Análisis en el programa Blastx del péptido DVIREYLMFNELSALSSSPE, con secuencias de aminoácidos de proteínas anticancerígenas PS2Aa y los genomas de *Bt* serovar *coreanensis*.

	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%

#### 4.4. Características de las proteínas tipo parasporina

Las proteínas tipo PS, son proteínas de pesos moleculares menores a las 90 kDa, además de ser proteínas ácidas con coeficiente de extinción de hasta 1.282, la mayoría de las PS son proteínas estables, exceptuando la PS1Ad1 quien es la única inestable, además de ser termorresistentes, por último, se evaluó el parámetro del valor GRAVY, donde se obtuvieron resultados negativos es decir son proteínas hidrofílicas.

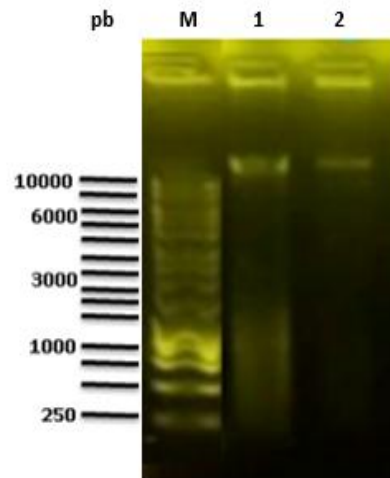
**Tabla 7. Características de proteínas tipo PS**

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

#### 4.5.Extracción de ADN genómico

La extracción de ADN fue observada a través de una electroforesis en gel de agarosa al 1% evidenciando una banda superior a 10000 pb en los pozos 1 y 2 de acuerdo al marcador

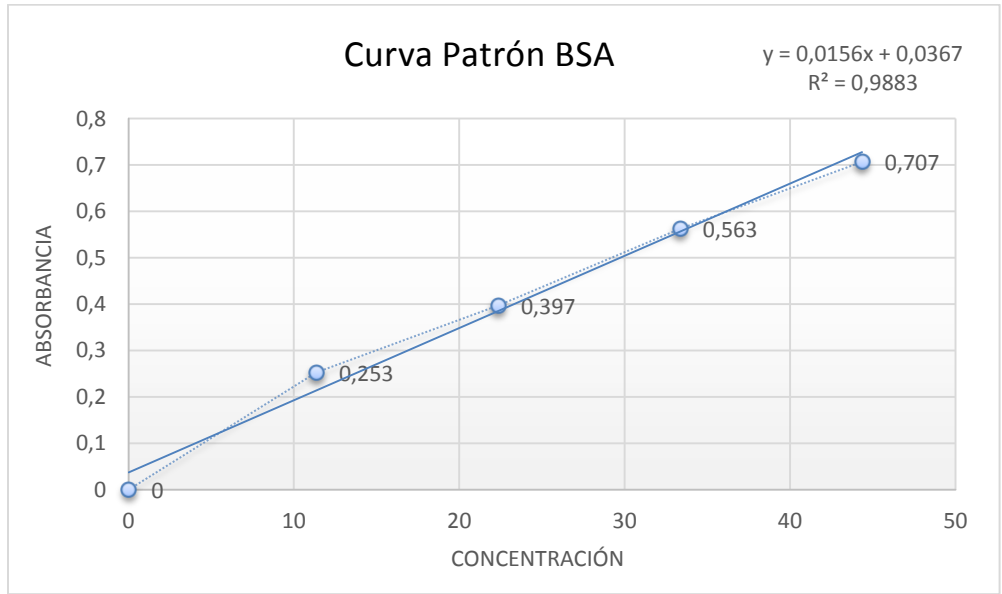
GeneRuler 1kb evidenciando así ADN genómico de Bt serovar *coreanensis*.



**Figura 11.** Electroforesis en gel de Agarosa al 1% de ADN genómico de Bt serovar *coreanensis*. M. Marcador, 1. ADN genómico de Bt serovar *kurstaki* HD-1, 2. ADN genómico de Bt serovar *coreanensis*

#### 4.6. Cuantificación de proteínas

El método empleado durante la investigación fue la cuantificación de proteínas por método Bradford el cual se basa en que al emplear un colorante de color pardo de naturaleza hidrofóbica en el momento de entrar en contacto con el interior de la proteína (igual hidrofóbico), se origina un color azul el cual se puede medir a través de espectrofotometría. El método fue elegido ya que es más rápido, fácil y de igual forma sensible a comparación de los otros métodos existentes. La cuantificación de la muestra se realizó tomando 100 ul de la muestra y 1 ml de reactivo de Bradford siendo comparada posteriormente con el patrón de albumina bovina (BSA) (Tabla 8) previamente realizado, así obteniendo 0,240 mg/ml de cristales parasporales de *Bt serovar coreanensis* 4AL1 (Figura 12, Tabla 8).



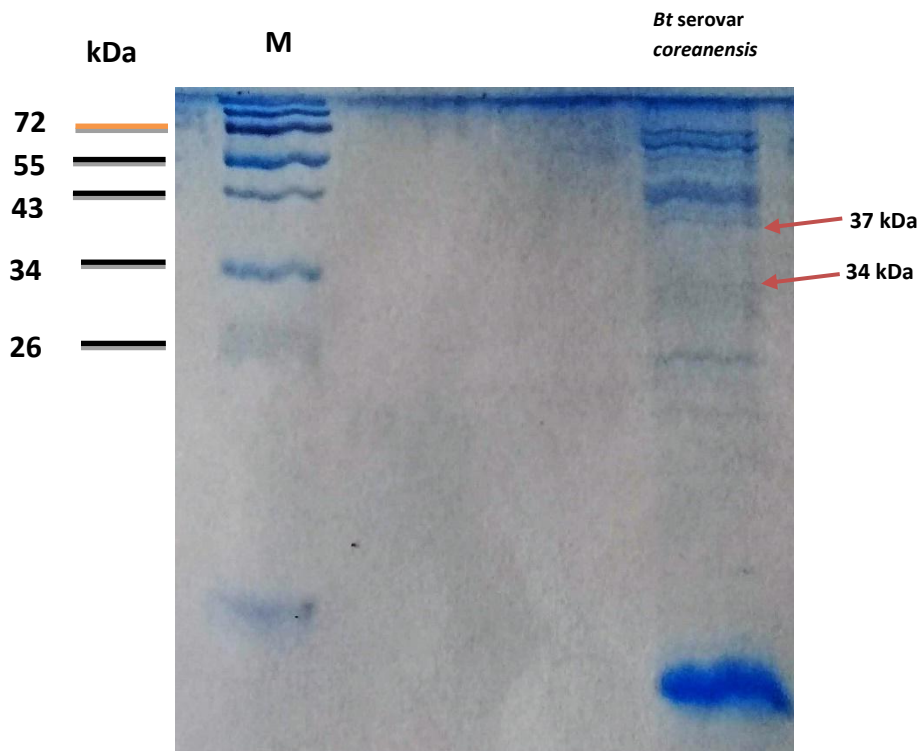
**Figura 12.** Curva de calibración para la cuantificación de proteína

**Tabla 8.** Cuantificación de proteínas con absorbancia a 595 nm.

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

#### 4.7. Perfiles proteicos

La evaluación de la síntesis de proteínas tipo PS se realizó geles de poliacrilamida al



10% donde se muestran patrones de las proteínas tipo PS (Figura 13).

**Figura 13.** 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%.



## 5. DISCUSIÓN

El cáncer es una de las enfermedades considerada como una de las más grandes amenazas para el sector salud y la calidad de vida de la población, lo que ha llevado a la búsqueda de nuevos tratamientos, ya que a pesar de generar campañas de sensibilización frente a los factores de riesgo, la carga de la enfermedad aumenta. Desde el estudio realizado por Mizuki et al. sobre las proteínas tipo PS con actividad anticancerígena que sintetiza Bt, se tomó una nueva visión de cómo atacar las células neoplásicas sin causar mayor daño a las demás células biológicamente funcionales, pero para ello se debe analizar cada una de las cepas de Bt reportadas como anticancerígenas, como las pertenecientes al serovar *coreanensis*, ya que dentro de un serovar puede existir amplia diversidad genética (53).

El microorganismo de estudio al ser una bacteria Gram positiva perteneciente al género *Bacillus*, se caracteriza por tener un crecimiento en medio sólido de colonias aplanadas, blanco mate, de bordes irregulares, además de la producción de esporas los cuales suelen diferenciarse las especies por la posición en la que se forma la espora, que en el caso de *Bt* esta se ubican subcentrales o terminales de la bacteria (54). Estas características concuerdan con las obtenidas en este estudio ya que el crecimiento de las colonias en agar Trypticase soya, fueron colonias planas de color blancas opacas, de bordes irregulares. La observación de esporas a través de la coloración de Schaeffer-Fulton se ha realizado aproximadamente después de 72 a 96 horas (55), pero en la experiencia obtenida en este estudio se encuentra que la esporulación y síntesis de cristales es evidente entre los 20 y 30 días de incubación. La mayoría de esporas se ubicaban terminales, lo que se pudo evidenciar de manera más clara por microscopia de contraste de fases. La relevancia de este microorganismo es la producción de cristales parasporales que en la mayoría de los aislados de *Bt* estos suelen ser de morfología bipiramidal, aunque también pueden ser esféricas o sin forma alguna (56), lo que en el momento de realizar la microscopia de contraste de fases se observan inclusiones redondas o amorfas.

La primera etapa para el análisis de un genoma bacteriano es la identificación de todos los genes que codifican para proteínas, y la posible función de cada una de estas secuencias, dicho proceso se conoce como anotación del genoma (57). Se ha reportado el

desarrollo de oligonucleótidos para genes de importancia agrícola por su asociación a control de insectos, teniendo en cuenta las secuencias de una región altamente conservada, como en el caso de genes *cry*, incluyendo el análisis de un fragmento específico que alineaba con la región de *cryIA(a)*, *cryIA(b)*, *cryIA(c)*, *cryIA(d)*, *cryIB*, *cryIC*, *cryID*, *cryIE*, *cryIF*, útil para la reacción de PCR (58) (59). Las proteínas tipo PS sintetizadas por Bt son herramientas prometedoras para el control de células neoplásicas, por lo que en este estudio se diseñó un nuevo conjunto de oligonucleótidos específicos, partiendo de las secuencias obtenidas de la base de datos, de las cuales se buscó regiones altamente conservadas determinadas por el programa Clustal Omega, de donde se realizaron 10 pares de oligonucleótidos para cada uno de los seis grupos que albergan los 19 genes que codifican proteínas tipo PS.

Para el análisis de proteínas se usó herramientas de bioinformática, iniciando con búsqueda de secuencias y la alineación de estas para determinar posible homología (60), además de identificar diferencias entre ellas, determinando tanto el lugar como el nivel de conservación entre las secuencias alineadas. Dicho proceso se implementó en la investigación realizada titulada “diseño de un gen semisintético *cryIAC* y análisis de la estructura de la proteína traducida”, en donde se utilizó herramientas como ClustalW, para el proceso de alineamiento de las secuencias de los genes *cryIAC*, el análisis de la proteína codificada por dichos genes por programas como Blastx para buscar secuencias con alto nivel de homología, además del programa ExPasy, en donde se identificó características de la proteína de estudio (61).

Algunos estudios realizados en cepas pertenecientes a *Bt* serovar *coreanensis*, muestran que algunos miembros de este serovar sintetiza cristales parasporales que al ser digeridos por proteinasa K inducían en células MOLT-4 un efecto citopático, generando hinchazón coloidal-osmótica y la lisis celular (7). En este proyecto se realizó un análisis *in silico* donde la búsqueda de una posible secuencia codificante para proteínas tipo PS en los genomas secuenciados de dos cepas pertenecientes al serovar *coreanensis*, cepa ST7 y cepa 4AL1, esta última corresponde a la cepa de estudio de este trabajo. Se encontró una secuencia en la cepa 4AL1 con posible similaridad a la proteína PS5 (NCBI ID: AB555650, E=0.027, identidad=39%, cobertura=64%), es posible que esta secuencia corresponda a una PS.

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

En cuanto a las características fisicoquímicas de las proteínas tipo PS, se evaluaron seis parámetros, el primer valor calculado fue el peso molecular, el cual de las 19 PS ninguna superó los 90 kDa, característica de las protoxinas anticancerígenas al igual que ser clasificadas como polipéptidos (62). Al hablar del punto isoeléctrico de las proteínas, se refiere al pH al cual poseen las mismas cargas positivas y negativas, generando una carga neta de cero. En el caso de las PS el valor de pI no superó 7, por lo tanto indicaría que estas proteínas tienden a ser ácidas, es decir al encontrarse en una solución esta tendría más iones H<sup>+</sup>, los cuales se unirían a los sitios negativos en los aminoácidos volviendo positiva la carga de la proteína (63); otro aspecto obtenido fue el coeficiente de extinción, el cual indica la cantidad de luz que es absorbida por una proteína en una longitud de onda determinada, el coeficiente de extinción de las PS está entre 0.77 y 1.282 (64). También se evaluaron dos características las cuales permiten saber que tan estables son las proteínas tipo PS, estos son el índice de inestabilidad y el índice alifático, el índice de inestabilidad proporciona un estimado de la estabilidad de la proteína de manera *in vitro*, si el valor de inestabilidad es menor a 40, la proteína se considera como estable, y si el valor es mayor a 40 esta es inestable, la otra característica es el índice alifático, el cual indica el volumen relativo o que llega a ocupar las cadenas alifáticas (Alanina, Valina, Isoleucina y Leucina), un índice alifático elevado corresponde a un alto contenido de cadenas alifáticas, lo que da termorresistencia y estabilidad en diferentes condiciones a la proteína (64). Al hacer referencia a los valores dados en estas dos últimas características, las PS son proteínas estables ya que el valor de índice de inestabilidad en 18 de estas fue mayor a 40, y tan solo PS1Ad1 fue menor de 40, de igual forma el índice alifático de todas las PS fue alto, por lo tanto tiene características de ser termorresistentes al igual de mantener una estabilidad en diversas condiciones. Por último se mostró el valor GRAVY (Grand Average of Hydrophaty) el cual al ser negativo, indica que son proteínas hidrofílicas lo que sería beneficioso ya que son solubles en agua (64).

La obtención y cuantificación de proteínas totales de Bt serovar *coreanensis* 4AL1, se obtuvieron extractos crudos de espora y cristal, ya que una de las características más importantes de Bt es la síntesis de inclusiones parasporales denominada cristal o delta-endotoxina durante su fase estacionaria (65). Basándose en la extracción y la cuantificación de los cristales parasporales de Bt serovar *coreanensis* 4AL1, se logró obtener 0,240 mg/ml de proteína. Sin embargo, hay que tener en cuenta que, en ensayos de citotoxicidad, la actividad biológica de una cepa no se define por la producción de cantidades determinadas de proteínas extraídas de los cristales, sino por su potencial en los ensayos biológicos (65).

En cuanto al perfil proteico de Bt serovar *coreanensis* 4AL1 se evidenció la presencia de dos bandas de masas moleculares de 37 (asociada a PS2) y 34 kDa (asociada a PS5) respectivamente, estas bandas sugieren la presencia de protoxinas o proteínas nativas, es decir proteínas que no han sufrido activación o tratamiento, por lo que no serían tóxicas para las células cancerígenas, pero que, de ser tratadas, podrán generar efectos en células neoplásicas. De acuerdo al corrido electroforético, el cual muestra que las bandas tienen una masa molecular menor a 90 kDa, una de las características de las proteínas tipo PS (6), por lo que estas bandas se pueden correlacionar con alguna de las 19 protoxinas reconocidas por el Comité de Nomenclatura de PS, y caracterizadas por múltiples investigaciones, en especial correlacionarlas con proteínas de menor tamaño, o las pertenecientes a la familia beta-formadoras de poro (beta-TFP) (16) (23).

La PS2Aa1 es una proteína cristalina de 37 kDa, originalmente aislada de Bt A1547, una toxina formadora de poros activa contra las células cancerosas humanas; donde en el estudio realizado de la cepa 4R2 de Bt, demostró producir la proteína cristalina PS2Aa1 (Cry46Aa1) cuya expresión fue confirmada por análisis de SDS-PAGE con una banda observada de 37 kDa (13). La primera banda que se puede identificar en el gel de poliacrilamida SDS-PAGE al 10% es una banda de 37 kDa, lo que sugiere la presencia de una protoxina caracterizada del grupo PS2, la cual es un polipéptido de aproximadamente 330 residuos de aminoácidos, de peso molecular 37,446 kDa y 1.014 pb en el gen codificante (10). Seguida de esta banda se observa una tenue banda de 34 kDa. Lo que también fue obtenido en el estudios realizados en base a la cepa A1100, de la cual en el perfil proteico de esta se observó una proteína citotóxica, la cual se expresó como un precursor no tóxico de 33.8 kDa que después de realizar los ensayos de PCR, como la

identificación de marco de lecturas ORF similar al gen promotor de PS5Aa1 (66), la cual concuerda con la banda descrita con un peso de 34 kDa en el perfil proteico realizado de la cepa 4AL1 serovar *coreanensis*.

## 6. 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*, potenciales para ensayos biológicos.
- 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, en especial las PS pertenecientes a la familia formadora de poro (beta-TFP), probablemente relacionada a PS5.
- Las proteínas PS poseen características bioquímicas relevantes para su función, incluyendo peso menor a 90 kDa, punto isoelectrico 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 de actividad anticancerígena, desde una aproximación bioinformática y experimental.

- **Bibliografía**

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 cytotoxic 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.
11. **Namba, Akitoshi, y otros.** The cytotoxicity of Bacillus thuringiensis subsp. coreanensis A1519 strain against the human leukemic T cell. May de 2003, págs. 29-35.
12. **Katayama, Hideki, y otros.** Parasporin-1, a Novel Cytotoxic Protein to Human Cells from Non-Insecticidal Parasporal Inclusions of Bacillus thuringiensis. 2005, Vol. 137, 1, págs. 17-25.
13. **Brasseur, Kevin , Auger, Pascal y Asselin, Eric .** Parasporin-2 from a New Bacillus thuringiensis 4R2 Strain Induces Caspases Activation and Apoptosis in Human Cancer Cells. July de 2015.
14. **Abe, Yuichi, Shimada, Hiroyasu y Kitada, Sakae .** Raft-targeting and Oligomerization of Parasporin-2, a Bacillus thuringiensis Crystal Protein with Anti-Tumour Activity. February de 2008, Vol. 143, 2.
15. **Nadarajah, y otros.** SELECTIVE CYTOTOXIC ACTIVITY AGAINST LEUKEMIC CELL LINES FROM MOSQUITOCIDAL BACILLUS THURINGIENSIS PARASPORAL INCLUSIONS. March de 2008, Vol. 39, 2.
16. **NAGAMATSU, Yasunori , y otros.** Three Cry Toxins in Two Types from Bacillus thuringiensis Strain M019 Preferentially Kill Human Hepatocyte Cancer and Uterus Cervix Cancer Cells. March de 2010, Vol. 74, 3.
17. **Okumura, Shiro , y otros.** Identification of a second cytotoxic protein produced by Bacillus thuringiensis A1470. November de 2013, Vol. 35.
18. **ESPINO VÁZQUEZ, ASTRID NALLELI .** *CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA DE PARASPORINAS EN CEPAS NATIVAS DE Bacillus thuringiensis*. UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN. 2014.
19. **de Almeida Melo, André Luiz , Soccol, Vanete y Soccol, Carlos .** Bacillus thuringiensis: mechanism of action, resistance, and new applications: a review. July de 2016, Vol. 36.

20. *The distribution pattern of DNA and protoxin in Bacillus thuringiensis as revealed by laser confocal microscopy analysis.* **Quanfang Hu, y otros.** July de 2015, Applied Microbiology and Biotechnology, Vol. 99.
21. *Screening and characterization of a non-insecticidal Bacillus thuringiensis strain producing parasporal protein with selective toxicity against human colon cancer cell lines.* **Periyasamy, Abirami , y otros.** September de 2016, Annals of Microbiology, Vol. 66.
22. *Parasporins 1 and 2: Their structure and activity.* **Akiba, Toshihiko y Okumura, Shiro.** January de 2017, Journal of Invertebrate Pathology, Vol. 142.
23. **Soberón, Mario, y otros.** Cell lines as models for the study of Cry toxins from Bacillus thuringiensis. February de 2018, Vol. 93.
24. *A parasporin from Bacillus thuringiensis native to Peninsular India induces apoptosis in cancer cells through intrinsic pathway.* **Chubicka, Thomas, y otros.** June de 2018, Journal of Biosciences, Vol. 43.
25. **Sauka, Diego.** Bacillus thuringiensis: ¿nuevas aplicaciones para un viejo conocido? 2017, Vol. 49, 2.
26. **BEEGLE, CLAYTON y YAMAMOT, TAKASHY.** INVITATION PAPER (C.P. ALEXANDER FUND): HISTORY OF BACILLUS THURINGIENSIS BERLINER RESEARCH AND DEVELOPMENT. JULY de 1992, Vol. 124.
27. **Sauka, Diego y BENINTENDE, GRACIELA .** Bacillus thuringiensis: generalidades: Un acercamiento a su empleo en el biocontrol de insectos lepidópteros que son plagas agrícolas. June de 2008, Vol. 2, 40.
28. **Ochoa, Gustavo y Arrivillaga, Jazzmin.** Bacillus thuringiensis: Avances y perspectivas en el control biológico de Aedes aegypti. Diciembre de 2009, Vol. 49, 2.
29. **Herrera, Fernando, y otros.** Formulación de un medio de cultivo para la producción de δ-endotoxinas de Bacillus thuringiensis. Noviembre de 2018, Vol. 17.
30. **Grijalba, Erika , y otros.** Bacterias entomopatógenas en el control biológico de insectos. Vol. 1.
31. **Jung, Y C, Mizuki, E y Coñte´, C J.** Isolation and characterization of a novel Bacillus thuringiensis strain expressing a novel crystal protein with cytotoxic activity against human cancer cells. February de 2007, Vol. 103.
32. **López-Pazos, Silvio Alejandro y Cerón, Jairo .** Proteínas Cry de Bacillus thuringiensis y su interacción con coleópteros. December de 2010, Vol. 8, 14.
33. **Portela, Diana Daniela , Chaparro, Alejandro y López, Silvio Alejandro.** Bacillus thuringiensis biotechnology in agriculture. December de 2013, Vol. 11, 20.
34. **Fernandez, Luisa E. , y otros.** A GPI-anchored alkaline phosphatase is a functional midgut receptor of Cry11Aa toxin in Aedes aegypti larvae. January de 2006, Vol. 394, 21.
35. **Xu, Dong y Côté, Jean-Charles .** Sequence Diversity of Bacillus thuringiensis Flagellin (H Antigen) Protein at the Intra-H Serotype Level. September de 2008, Vol. 47, 17.
36. **Mizuki , E, y otros.** Unique activity associated with non-insecticidal Bacillus thuringiensis parasporal inclusions: in vitro cell-killing action on human cancer cells. Septiembre de 1999, Vol. 86.
37. **Dong-Hyun , Lee, y otros.** Microbial ecology of Bacillus thuringiensis: fecal populations recovered from wildlife in Korea. 2003, Vol. 49, 7.

38. **Michio, Ohba, y otros.** Naturally occurring *Bacillus thuringiensis* in oceanic islands of Japan. 2002, Vol. 37, 7.
39. **Michio , Ohba, Naoya , Wasano y Mizuki, Eiichi.** *Bacillus thuringiensis* soil populations naturally occurring in the Ryukyus, a subtropic region of Japan. December de 1999.
40. **Hyung-Hoan, Lee, y otros.** New Serovars of *Bacillus thuringiensis*: *B. thuringiensis* ser. coreanensis (Serotype H25), *B. thuringiensis* ser. leesis (Serotype H33), and *B. thuringiensis* ser. konkukian (Serotype H34). March de 1994, Vol. 63, 2.
41. **Hiromi, AMANO, y otros.** A Novel 29-kDa Crystal Protein from *Bacillus thuringiensis* Induces Caspase Activation and Cell Death of Jurkat T Cells. May de 2005, Vol. 69, 11.
42. **Akitoshi, Namba, y otros.** The cytotoxicity of *Bacillus thuringiensis* subsp. coreanensis A1519 strain against the human leukemic T cell. June de 2003, Vol. 1662, 1.
43. *Identification of Parasporin Genes in Vietnamese Isolates of Bacillus thuringiensis.* **Koichi, Yasutake, y otros.** August de 2007, Z. Naturforsch, Vol. 63.
44. *Parasporins as new natural anticancer agents: a review.* **Almas , Okassov, y otros.** 1, 2015, JBUON , Vol. 20.
45. *DOĞAL BİR ANTI-KANSER PROTEİN OLAN PARASPORİNLER .* **KESİK OKTAY, Müjgan y GÜNEŞ , GÜNEŞ .** 2, Ağustos de 2017, Anadolu University Journal of Science and Technology C- Life Sciences and Biotechnology, Vol. 6.
46. *Informe sobre la situación mundial de las enfermedades no transmisibles 2010 RESUMEN DE ORIENTACIÓN.* **Salud, Organización Mundial de la.** Ginebra : s.n., 2011.
47. *Latest global cancer data: Cancer burden rises to 18.1 million new cases and 9.6 million cancer deaths in 2018.* **Thomas, Cours Albert .** Septiembre de 2018, International Agency for research on cancer.
48. *El cancer.* **de la Garza Salazar, Jaime G. y Paula , Juárez Sánchez.** La ciencia a tu alcance .
49. *MANUAL DE ENFERMERÍA ONCOLÓGICA.* **Manzur, Juan .** Instituto Nacional del Cáncer.
50. *Conociendo y comprendiendo la célula cancerosa: Fisiopatología del cáncer.* **N. Catherine , Sánchez.** 4, Julio de 2013, Revista Médica Clínica Las Condes, Vol. 24.
51. *Oncogenic Signaling Pathways in The Cancer Genome Atlas.*
52. **Bradford MM.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976, Vol. 7, 72.
53. *Specific Cytotoxic Effects of Parasporal Crystal Proteins Isolated from Native Saudi Arabian Bacillus thuringiensis Strains against Cervical Cancer Cells.* **Mourad A. M. , y otros.** 3, 2019, Molecules, Vol. 24.
54. *Biodiversity of Bacillus thuringiensis isolated from peruvian agroecosystem and evaluation of bioinsecticidal potential.* **Flores , Abad, y otros.** 1, s.l. : Ciencia e Investigación, Ciencia e Investigación, Vol. 14.
55. *SELECCIÓN DE CEPAS DE Bacillus spp. PRODUCTORAS DE ANTIBIÓTICOS AISLADAS DE FRUTOS TROPICALES.* **Ragazzo, Juan Arturo, y otros.** 11, s.l. : Revista Chapingo Serie Horticultura 17(, 2011, Vol. 5.



56. **Determination of *Bacillus thuringiensis* Berliner Isolates Autochthonous in Cuba.** Carreras Solís, Bertha . 2, s.l. : Fitosanidad, 2009, Vol. 13.
57. Yero Corona, Daniel. De la secuencia de un genoma bacteriano a la identificación de candidatos vacunales. *VacciMonito*. 1, 2006, Vol. 15.
58. **Multiplex PCR Screening To Detect cry9 Genes in *Bacillus thuringiensis* Strains.** Ben-Dov,, Eitan , y otros. 8, s.l. : Appl Environ Microbiol., 1999, Vol. 65.
59. **PCR-Based Approach for Detection of Novel *Bacillus thuringiensis* cry Genes.** JUA´REZ-PE´REZ, V. M., FERRANDIS, M. D y FRUTOS, R. . 8, s.l. : APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, 1997, Vol. 63.
60. Sievers, Fabian , y otros. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol Syst Biol*. 7, 2011, Vol. 539.
61. DIAZ GRANADOS D, CRISTINA , SANDOVAL, ANA MARÍA y CHAPARRO-GIRALDO, ALEJANDRO . DESIGN OF A CRY1Ac SEMISYNTHETIC GENE AND STRUCTURE ANALYSIS OF TRANSLATED PROTEIN. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustria*. 2013, Vol. 2.
62. Cozzone, Alain J. Proteins: Fundamental Chemical Properties. *ENCYCLOPEDIA OF LIFE SCIENCES*. 2002.
63. press, Oxford University. Amino Acids, Peptides, and Proteins. [En línea] [Citado el: 30 de Diciembre de 2019.]
64. Gasteiger, Elisabeth , y otros. Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. *The Proteomics Protocols Handbook* . 2005.
65. TORRES CABRA, Eneida, HERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, Javier y PERÉZ RUBIANO, Claudia Constanza. TOTAL PROTEIN OF CRUDE EXTRACTS AND QUANTIFICATION THE NATIVE *Bacillus thuringiensis* STRAINS ISOLATED FROM BOYACÁ AND CUNDINAMARCA. 2013, Vol. 3, 2.
66. Ekino, Keisuke, y otros. Cloning and Characterization of a Unique Cytotoxic Protein Parasporin-5 Produced by *Bacillus thuringiensis* A1100 Strain. 2014, Vol. 6, 6.