

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



**OBTENCIÓN DE PÉPTIDOS CON ACTIVIDAD CITOTÓXICA DERIVADOS DE
LAS PARASPORINAS DE *Bacillus thuringiensis***

POR

VERÓNICA MELISSA SUÁREZ TREVIÑO

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA EN
CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN MICROBIOLOGÍA APLICADA

NOVIEMBRE, 2016

**OBTENCIÓN DE PÉPTIDOS CON ACTIVIDAD CITOTÓXICA DERIVADOS DE
LAS PARASPORINAS DE *Bacillus thuringiensis***



Aprobación de la de Tesis

Dr. Jesús Alberto Gómez Treviño
Director de Tesis

Dra. María Elena Cantú Cárdenas
Secretaria

Dr. Xristo Zárate Kalfópulos
Vocal

Dra. María Araceli Hernández Ramírez
Subdirectora de Estudios de Posgrado

**OBTENCIÓN DE PÉPTIDOS CON ACTIVIDAD CITOTÓXICA DERIVADOS DE
LAS PARASPORINAS DE *Bacillus thuringiensis***

Revisión de la tesis:

Dr. Jesús Alberto Gómez Treviño
Director de Tesis

Dr. Benito Pereyra Alférez
Co-director de Tesis

Dra. María Elena Cantú Cárdenas
Comité tutorial

Dr. Xristo Zárate Kalfópulos
Comité tutorial

Dr. Edgar Allan Blanco Gamez
Comité tutorial



ESTE TRABAJO SE LLEVÓ A CABO EN EL LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR DE LA FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS EDIFICIO CELAES BAJO LA DIRECCIÓN DEL DR. JESÚS ALBERTO GÓMEZ TREVIÑO, ASÍ COMO EN EL LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA 2 BAJO LA ASESORÍA DEL DR. XRISTO ZÁRATE KALFOPULOS Y EL LABORATORIO 4 DEL INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS BAJO LA ASESORÍA DEL DR. BENITO PEREYRA ALFÉREZ.

AGRADECIMIENTOS

Al CONACYT por el financiamiento del proyecto y el otorgamiento de la beca de maestría.

A la Universidad Autónoma de Nuevo León y la Facultad de Ciencias Químicas por la formación académica recibida en estos últimos años permitiéndome llegar al lugar en el que me encuentro ahora y desarrollarme profesionalmente.

Al Dr. Jesús Alberto Gómez Treviño por ser mi guía en este proyecto y compartirme su gran experiencia, pero sobre todo, brindarme sus valiosos consejos y amistad en esta etapa de mi vida.

Al Dr. Benito Pereyra por proporcionarme las cepas para la realización del proyecto así como las facilidades brindadas para la utilización de su laboratorio.

A la M.C. Claudia Berenice López Alvarado por su apoyo técnico durante las actividades realizadas en el Instituto de Biotecnología.

A mi comité tutorial: Dra. María Elena Cantú Cárdenas y Dr. Edgar Allan Blanco Gámez, por su guía y consejos durante la parte experimental, al Dr. Xristo Zárate Kalfópulos por su apoyo y asesoría durante la etapa de purificación.

A la M.C. Teresa Vargas Cortés por su gran apoyo y asesoría técnica con el proceso de Intercambio Aniónico y su constante amistad, sin duda alguna me quedo con grandes conocimientos y experiencia.

A la M.C. Margarita Ortiz Martínez por compartirme sus conocimientos en técnicas moleculares y sus valiosos consejos y amistad.

A mis compañeros de maestría por su amistad y su apoyo en nuestra estancia en el posgrado brindándome consejos, compañía, momentos de ocio y por ser siempre un excelente equipo dentro y fuera de las aulas: Javier Alberto Garza Cervantes, Claudia Barahona Munguía, Sujei Rodríguez Acevedo, Luis Fernando Ávila Galindo, Leonel Ignacio Blanco De la Cruz, Julio Alejandro Reyes Puente y Daniel Castañón Gaona.

DEDICATORIAS

Brindo mi primero dedicatoria y agradecimiento a Dios por permitirme cruzarme con personas, momentos, lugares, en este camino de la vida, dejándome tomar de cada uno de ellos una porción y formarme como persona.

A mis padres *Jovita Treviño Carrizales* y *Filiberto Suárez Torres* les dedico este y cada uno de mis logros, gracias por darme la vida y hacerme la persona que soy en estos momentos, son mi más grande ejemplo de unión y superación. Los amo eternamente y jamás dejaré de aplicar cada enseñanza que me han dejado en cada momento de mi vida.

A mis hermanos *Lupita* y *Mayel* por todo su apoyo, sus consejos, nunca me han dejado sola y son una parte muy importante de mis logros, son mi más grande orgullo y siempre serán mi ejemplo a seguir. Los amo.

A *Yessi* y *Luis* por sus consejos y por estar siempre ahí para mí, gracias por estar presentes en todo momento y siempre serán una parte importante de mis logros. Son mis segundos hermanos y yo también estaré ahí para ustedes.

A mi esposo *Arturo* por estar siempre a mi lado y crecer junto conmigo. Este logro es uno de los muchos que tendremos juntos. Lo mejor para nosotros está por venir, TE AMO.

A mi nueva familia que siempre está alentándome a seguir adelante: *July*, *Hugo*, *Dora*, *Saúl*, *Ramiro*, *Luisa*, mis suegros *Julieta* y *Ramiro*. Los quiero mucho y gracias por todo su apoyo.

Por último y no menos importante a mis pequeños compañeritos de aventuras, que siempre me sacan una sonrisa y hacen que los momentos de estrés queden en segundo plano, mis pequeños y no tan pequeños sobrinos, los quiero muchísimo y siempre contarán conmigo para todo: Yamileth, Luis, Fernando, Cristian, Montse, Saúl, Doris, Mauricio, Celeste, Aarón, Iker, Hiroshi y Daichi.

Con cariño

Melissa Suárez

Tabla de contenido

AGRADECIMIENTOS	iv
DEDICATORIAS	v
ÍNDICE DE TABLAS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	x
NOMENCLATURA	xi
RESUMEN	xii
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES	4
2.1 Estructura y características de las δ -endotoxinas	5
2.2 Descubrimiento de las parasporinas	7
CAPÍTULO 3. HIPÓTESIS	13
CAPÍTULO 4. OBJETIVOS	14
4.1 Objetivo general	14
4.2 Objetivos específicos.....	14
CAPÍTULO 5. MÉTODOS	15
5.1 Material biológico.....	15
5.1.1 Cepas de <i>Bacillus thuringiensis</i>	15
5.1.1.1 Cinética de crecimiento.....	16
5.1.2 Líneas celulares.....	17
5.2 Activación de las inclusiones paraesporales	19
5.3 Análisis de los cristales paraesporales en geles de poliacrilamida	20
5.4 Purificación mediante Cromatografía de Intercambio Aniónico	20
5.5 Ensayos de citotoxicidad	21
5.5.1 Ensayo con Rojo Neutro	22
5.5.2 Ensayo con kit de citotoxicidad.....	23
CAPÍTULO 6. RESULTADOS	24
6.1 Cepas de <i>Bacillus thuringiensis</i>	24
6.1.1 Cinética de crecimiento.....	27
6.2 Activación de las inclusiones paraesporales y perfiles proteicos	29
6.3 Purificación mediante Cromatografía de Intercambio Aniónico	31
6.4 Ensayos de citotoxicidad	39

6.4.1 Rojo neutro	40
6.4.2 Ensayo con kit de citotoxicidad	42
CAPÍTULO 7. DISCUSIÓN	44
7.1 Obtención y activación de inclusiones paraesporales	44
7.2 Cromatografía de Intercambio Aniónico	46
7.3 Pruebas de citotoxicidad	47
CAPÍTULO 8. CONCLUSIONES	48
LITERATURA CITADA.....	49

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla		Página
I	Características estructurales y funcionales de los dominios de las δ -endotoxinas.....	6
II	Espectro de citotoxicidad de las cuatro parasporinas.....	8
III	Lista de parasporinas reconocidas actualmente.....	11
IV	Cepas de <i>Bacillus thuringiensis</i> analizadas en este estudio.....	16
V	Lista de líneas celulares del estudio.....	18
VI	Componentes para los ensayos de citotoxicidad.....	21
VII	Condiciones de corrida de cada cepa en Cromatografía de Intercambio Iónico	32
VIII	Concentraciones de prueba de las toxinas obtenidas.....	39

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Tinción simple con cristal violeta.....	25
2	Tinción diferencial de esporas con verde de malaquita.....	26
3	Gráfico de cinética de crecimiento de las cepas de estudio.....	28
4	Perfiles proteicos de los cristales de las cepas A1470, GM18, IB79 e IB84.....	30
5	Cromatograma del digerido obtenido de la cepa A1470.....	33
6	Cromatograma del digerido obtenido de la cepa IB79.....	35
7	Cromatograma del digerido obtenido de la cepa IB84.....	36
8	Cromatograma del digerido obtenido de la cepa GM18.....	38
9	Curva dosis-respuesta de las parasporinas sobre células en cultivo de la línea A431.....	41
10	Curva dosis-respuesta de las parasporinas sobre células en cultivo de la línea MOLT-4.....	43

NOMENCLATURA

α	Alfa
ATCC	American Culture Collection
β	Beta
CO ₂	Dióxido de carbono
δ	Delta
DMSO	Dimetil Sulfóxido
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
FCB	Facultad de Ciencias Biológicas
g	Fuerza G
h	Horas
HCl	Ácido clorhídrico
kDa	KiloDalton
M	Concentración molar
min	Minutos
mL	Mililitros
mM	Milimolar
Na ₂ CO ₃	Carbonato de sodio
NaOH	Hidróxido de sodio
nm	Nanómetros
PBS	Buffer fosfato salino
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PMSF	Fenil Metil Sulfonil Fluoruro
PS	Parasporina
rpm	Revoluciones por minuto
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
μ L	Microlitros
μ m	Micrometros

RESUMEN

En el año de 1996 comenzó una búsqueda para el descubrimiento de proteínas Cry con nuevas actividades biológicas adicionales a la entomopatógena. De este modo, se han encontrado proteínas con actividad hacia células cancerígenas humanas, las cuales se han denominado parasporinas. Las parasporinas (PS) representan una nueva clase de proteínas de los cristales de *Bacillus thuringiensis* con actividad biológica hacia células de cáncer de diversos orígenes. Se caracterizan por presentar baja o nula citotoxicidad hacia células normales, además de inducir la apoptosis o necrosis de las células blanco. En el presente trabajo fueron analizadas tres cepas de *Bacillus thuringiensis*, denominadas como IB79, IB84 y GM18, además de la cepa control A1470 productora de PS4. Las inclusiones paraesporales obtenidas fueron activadas mediante una reacción proteolítica con proteinasa K en medio alcalino y el digerido se purificó mediante Cromatografía de Intercambio Aniónico. Los péptidos obtenidos presentaron actividad citotóxica frente a células humanas de origen tumoral y de leucemia en cultivo.

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

Bacillus thuringiensis es una herramienta biotecnológica utilizada ampliamente en el campo de la agricultura como control de plagas, debido a que posee una toxina específica para órdenes de insectos en etapa de larva como Coleóptera, Díptera y Lepidóptera, entre otros, que le permite ser empleado como un bioinsecticida en una gran variedad de cultivos, entre ellos, maíz, algodón y arroz, y como control de vectores transmisores de enfermedades en humanos siendo seguro y amigable con el medio ambiente. Esta toxina, conocida como proteína *Cry*, pertenece a un grupo conocido como δ -endotoxinas, las cuales son producidas durante la fase de esporulación en forma de inclusiones paraesporales cristalinas. A esta clasificación también pertenecen las proteínas *Cyt*, las cuales son proteínas citolíticas que presentan toxicidad para insectos de la orden Díptera y un gran número de células eucariotas (Obeidat *et al.*, 2012)

B. thuringiensis es una bacteria perteneciente al Grupo de *Bacillus cereus* (Ohba *et al.*, 2009). Es un bacilo aerobio quimioheterotrófico gram positivo formador de endospora. Es autóctono de diversos ambientes y ha sido aislado de distintos hábitats alrededor del mundo, incluyendo suelo, insectos, polvo de productos en almacén, entre otros (Schnepf *et al.*, 1998). La formación de cuerpos paraesporales es la única característica que lo distingue de *Bacillus cereus*, especie cercanamente relacionada taxonómicamente (Ohba *et al.*, 2009). La producción de proteínas *Cry* responde a la presencia de genes codificados en plásmidos de alto peso molecular. El cristal puede llegar a representar hasta el

30% del peso seco de la célula (Márquez *et al.*, 2005). El proceso de caracterización de cepas de *B. thuringiensis* puede ser muy diverso, sin embargo, los criterios más utilizados son la observación morfológica del cuerpo parasporal y el perfil de proteínas obtenido por electroforesis en geles de poliacrilamida (Carreras *et al.*, 2008).

Además de las proteínas *Cry* y *Cyt*, *B. thuringiensis* produce otros tipos de proteínas que también son tóxicas para insectos. Algunas cepas secretan proteínas insecticidas vegetativas (Vips) durante la fase vegetativa de crecimiento. Hay dos clases de toxinas Vip, la primera está compuesta por un sistema binario conformado por dos proteínas, Vip1 (100 kDa) y Vip2 (52 kDa), con alta toxicidad hacia ciertas especies del orden Coleóptera. La segunda clase está conformada por la proteína Vip3 (82.5 kDa), la cual es activa contra un amplio espectro de insectos de la orden Lepidóptera. Estas dos clases de proteínas no presentan secuencia homóloga.

La proteína Cry1 I (también llamada CryV) es otra toxina secretada durante la fase estacionaria temprana y presenta toxicidad contra ciertas larvas de insectos de las órdenes Lepidóptera y Coleóptera.

La β -exotoxina I o thuringiensina es un análogo del nucleótido adenina. Se cree que inhibe la RNA polimerasa y presenta una alta toxicidad contra un amplio rango de especies de insectos. También presenta toxicidad hacia células de mamífero y es muy persistente en el medio ambiente, por lo que está prohibido su uso público de acuerdo a las recomendaciones de la Organización Mundial de la Salud. (Espinasse *et al.*, 2003).

Los aislamientos de cepas no insecticidas a menudo constituyen alrededor del 90% de la población natural del suelo y filoplanos, por lo que surgió el interés por saber si las proteínas *Cry* sintetizadas por cepas no insecticidas de *B. thuringiensis*, presentan algún tipo de actividad biológica. Esto condujo a comenzar una búsqueda, en el año de 1996, para el descubrimiento de proteínas *Cry* con nuevas actividades biológicas adicionales a la entomopatógena. De este modo, se ha encontrado proteínas *Cry* con actividad hacia células cancerígenas humanas y hacia protozoarios patógenos para humanos (Ohba *et al.*, 2009).

CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES

Bacillus thuringiensis fue aislado por primera vez en Japón de una larva enferma del gusano de seda *Bombyx mori*, como una bacteria entomopatógena (Ohba *et al.*, 2009). Las propiedades insecticidas de este bacilo fueron reconocidas en la década de 1930, pero no fue sino hasta la década de 1950 cuando la actividad entomopatógena fue atribuida a la inclusión paraesporal generada durante la esporulación. En los años 60s comenzó el uso comercial de *Bacillus thuringiensis* para el control de plagas, especialmente las especies del Orden Lepidóptera, tras el descubrimiento de la cepa HD-1 subespecie *kurstaki* por Howard Dulmage. Con el descubrimiento de la subespecie *israelensis*, tóxica para mosquitos, se inició el control de plagas y vectores de enfermedades para los seres humanos transmitidas por moscas mordedoras y mosquitos (Galán *et al.*, 1996).

2.1 Estructura y características de las δ -endotoxinas

Las proteínas *Cry* contienen residuos de cisteína bien conservados los cuales ayudan en la formación de puentes en las protoxinas mediante enlaces disulfuro intermoleculares, lo cual conduce a la formación del cristal (Nachimuthu *et al.*, 2004).

Las δ -endotoxinas son proteínas multidominio compuestas de tres dominios distintos. El Dominio I está compuesto por seis hélices (α -1, 2, 3, 4, 6, 7.) anfífilas y una hélice central hidrofóbica (α -5). El Dominio II está compuesto por tres láminas- β antiparalelas, orientadas paralelamente con las α -hélices del Dominio I y es el que brinda especificidad a las δ -endotoxinas. El Dominio III está compuesto por dos láminas- β antiparalelas dentro de una estructura de sándwich β . Se han identificado interacciones intermoleculares entre los dominios III y I mediante puentes salinos y puentes de hidrógeno por medio de estudios de cristalografía de rayos X. El bloque rico en arginina del Dominio III es llamado “*arg face*” (“cara *arg*”) con el cual el Dominio III entra en contacto con el Dominio I y regula la conductancia del canal iónico (Nachimuthu *et al.*, 2004). En la TABLA I se resumen las funciones principales de estos dominios en el efecto tóxico de las δ -endotoxinas.

TABLA I

Características estructurales y funcionales de los dominios de las δ -endotoxinas (Nachimuthu *et al.*, 2004).

Dominio	Secuencia de aminoácidos		Estructura secundaria	Función
	Cry1Aa	Cry3A		
I	33-252	58-290	Siete α -hélices	Formación de poros
II	265-461	291-500	Tres láminas- β antiparalelas dobladas en tres bucles	Unión al receptor y determinación de la especificidad
III	463-609	501-644	β -sándwich de 2 láminas- β antiparalelas	Unión al receptor, regulación de canales iónicos y especificidad con insectos.

2.2 Descubrimiento de las parasporinas

Mizuki *et al.*, fueron los primeros en realizar un muestreo a gran escala de cepas de *Bacillus thuringiensis* aislando un total de 1,744 cepas, de las cuales 1,700 provenían de la Universidad de Kyushu en Japón y 44 cepas de referencia del Instituto Pasteur en París. En un ensayo preliminar con eritrocitos de oveja, las proteínas parasporales obtenidas de 60 cepas indujeron una fuerte hemólisis. Las otras 1,684 cepas fueron examinadas para actividad citocida *in vitro* contra células MOLT-4 (Células T leucémicas humanas), con un resultado de 42 cepas positivas. Las cepas que dieron positivo eran cepas formadoras de cristales sin actividad insecticida (Ohba *et al.*, 2009).

En el año 2000, Mizuki *et al.*, obtuvieron de la cepa A1190 una proteína *Cry* anticáncer con un peso molecular de 81 kDa. Esto condujo a la creación de una nueva categoría de proteína, la parasporina, definida como una proteína paraesporal bacteriana que es capaz de matar células cancerosas discriminadamente. De acuerdo con el Comité de Clasificación y Nomenclatura de Parasporinas, la proteína de 81 kDa constituye la familia parasporina-1Aa (PS1Aa) en el actual esquema de clasificación (Mizuki *et al.*, 2000).

Las parasporinas son un conjunto heterogéneo de proteínas *Cry* sintetizadas por *Bacillus thuringiensis*. Tienen actividad citotóxica preferente por células humanas cancerígenas de diversos orígenes (Ohba *et al.*, 2009). Estas proteínas son activas sólo cuando son digeridas por proteasas. Investigaciones subsecuentes han establecido cinco familias adicionales de parasporinas: parasporina-2 (PS2) (Ito *et al.*, 2004), parasporina-3 (PS3) (Yamashita *et al.*,

2005), parasporina-4 (PS4) (Okumura *et al.*, 2004), parasporina-5 (PS5) (Ekino *et al.*, 2014) y parasporina-6 (PS6) (Nagamatsu *et al.*, 2010).

TABLA II

Espectro de citotoxicidad de las cuatro parasporinas (Ohba *et al.*, 2009).

Línea celular	Origen	Citotoxicidad			
		PS1Aa1	PS2Aa1	PS3Aa1	PS4Aa1
Humano					
HeLa	Cáncer cervicouterino	+++	-	-	-
Sawano	Adenocarcinoma endometrial	-	++++	-	+++
TCS	Cáncer cervicouterino	-	-	-	+++
UtSMC	Músculo liso uterino normal	-	++	-	-
MOLT-4	Leucemia linfoblástica aguda	++	++++	-	+++
HL-60	Leucemia promielocítica	+++	++++	++	+++
Jurkat	Leucemia de células-T	-	++++	-	-
Célula-T	Linfocito-T normal	-	+++	-	-
HepG2	Carcinoma hepatocelular	++	++++	++	++
HC	Hepatocito normal	-	-	-	-
A549	Adenocarcinoma de pulmón	-	+++	-	-
MRC5	Fibroblastos de pulmón fetal normal	-	+	-	-
Caco-2	Carcinoma colorectal	-	+	-	+++
Mono					
Vero	Riñón (mono verde africano)	-	NT	-	-
COS-7	Riñón (mono verde africano), SV-40 transformado.	-	NT	-	-
Roedor					
PC12	Feocromocitoma (rata)	NT	NT	NT	++
NIH3T3	Embrión (ratón)	-	NT	-	-
CHO	Ovario (hámster chino)	NT	NT	NT	-

Los niveles de citotoxicidad, basados en la concentración efectiva media (CE₅₀) en el ensayo de proliferación celular, fueron calificados de la siguiente forma: extremadamente alto (++++), alto (+++), moderado (++), bajo (+), y muy bajo/no tóxico (-). NT: No probado.

Las parasporinas están clasificadas dentro de dos grupos, de acuerdo a su masa molecular. El grupo de parasporinas de mayor masa molecular está conformado por las parasporinas PS1, PS3 y PS6. Estas parasporinas se expresan como precursores de proteínas con una masa molecular aproximada de 80 kDa y son procesadas a formas activas con un peso aproximado de 60 kDa. Estas proteínas tienen estructura de tres dominios. La parasporina-1 (PS1) fue la primera proteína en ser caracterizada y es la mejor estudiada. El precursor de PS1 tiene un peso molecular de 81 kDa y es procesado en una forma activa que consiste en un heterodímero de 15 y 56 kDa. Esta parasporina aparentemente presenta un mecanismo de citotoxicidad por apoptosis. La parasporina-3 (PS3) es estructuralmente similar a PS1, presentando una estructura de tres dominios. Su precursor proteico tiene un peso de 88 kDa y su forma activa se obtiene mediante procesamiento N-terminal y C-terminal con un peso molecular de 64 kDa. La parasporina-6 (PS6) presenta estructura similar a las parasporinas PS1 y PS3 y tiene un peso molecular de 84 kDa, siendo su forma activa un heterodímero de 14 y 59 kDa.

Por otro lado, el grupo de parasporinas de menor peso molecular está conformado por las parasporinas PS2, PS4 y PS5. Estas proteínas presentan precursores con un peso aproximado de 33-37 kDa y su forma activa presenta una masa molecular aproximada de 30 kDa. Este grupo de proteínas presenta una estructura no conservada de tres dominios. La parasporina-2 (PS2) tiene un peso molecular de 30 kDa en su forma activa, la cual proviene de un precursor con un peso molecular de 37 kDa. Esta parasporina es

estructuralmente similar a las β -toxinas tipo aerolisinas formadoras de poros (PFT's, por sus siglas en inglés). Esto sugiere que la PS2 presenta un mecanismo de toxicidad mediante formación de poros seguido de lisis celular. La PS2 forma oligómeros (>200 kDa) en presencia de proteínas de membrana del mismo modo que se ha observado en otras β -PFT's. La parasporina-4 (PS4) tiene un peso molecular aproximado de 27 kDa en su forma activa, la cual proviene de un precursor de 30 kDa que es procesado proteolíticamente en la región C-terminal. Algunos estudios sugieren que la PS4 podría tener un mecanismo de toxicidad de formación de poros similar al de la PS2.

En la TABLA III se enlistan las parasporinas registradas por el Comité de Nomenclatura y Clasificación de Parasporinas así como la referencia de cada estudio.

TABLA III

Lista de parasporinas reconocidas actualmente. (Okumura, S., Ohba, M., Mizuki, E., Crickmore, N., Côté, J.-C., Nagamatsu, Y., Kitada, S., Sakai, H., Harata, K. and Shin, T. "Parasporin nomenclature", 2010)

<http://parasporin.fitc.pref.fukuoka.jp/>

Nombre	Nomenclatura Cry	Gen	Pro-toxina KDa	Toxina(s) KDa	Autores	Año	Cepa de referencia	Referencia bibliográfica
PS1Aa1	Cry31Aa1	2169	81	15 y 56	Mizuki et al.	2000	A1190	Mizuki et al., 2000
PS1Aa2	Cry31Aa2	2226	83		Jung & Côté	2002	M15	Jung et al., 2007
PS1Aa3	Cry31Aa3	2169	81		Uemori et al.	2006	B195	Uemori et al., 2008
PS1Aa4	Cry31Aa4	2169	81		Yasutake et al.	2006	Bt 79-25	Yasutake et al., 2008
PS1Aa5	Cry31Aa5	2169	81		Yasutake et al.	2006	Bt 92-10	Yasutake et al., 2008
PS1Aa6	Cry31Aa6	2262	84	15 y 55	Nagamatsu et al.	2010	CP78A, M019	Nagamatsu et al., 2010
PS1Ab1	Cry31Ab1	2178	82		Uemori et al.	2006	B195	Uemori et al., 2008
PS1Ab2	Cry31Ab2	2178	82		Yasutake et al.	2006	Bt 31-5	Yasutake et al., 2008
PS1Ac1	Cry31Ac1	2331	87		Yasutake et al.	2006	Bt 87-29	Yasutake et al., 2008
PS1Ac2	Cry31Ac2	2331	87	15 y 60	Kuroda et al.	2012	B0462	Publicación pendiente
PS1Ad1	Cry31Ad1	2262	84	15 y 55	Nagamatsu et al.	2010	CP78B, M019	Nagamatsu et al., 2010
PS2Aa1	Cry46Aa1	1014	37	28	Ito & Kitada	2004	A1547	Ito et al., 2004
PS2Aa2	Cry46Aa2	1011	37	30	Ishikawa et al.	2008	A1470	Publicación pendiente
PS2Ab1	Cry46Ab1	912	33		Yamagiwa et al.	2004	TK-E6	Hayakawa et al., 2007
PS3Aa1	Cry41Aa1	2475	94	64	Yamashita et al.	2005	A1462	Yamashita et al., 2005
PS3Ab1	Cry41Ab1	2487	94		Yamashita et al.	2005	A1462	Yamashita et al., 2005
PS4Aa1	Cry45Aa1	2487	30	26.8	Okumura & Saitoh	2004	A1470	Okumura et al., 2004
PS5Aa1	Cry64Aa1	918	34	30	Ekino & Shin	2009	A1100	Ekino et al., 2014
PS6Aa1	Cry63Aa1	2559	85	14 y 59	Nagamatsu et al.	2010	CP84, M019	Nagamatsu et al., 2010

Con todo lo descrito anteriormente como antecedente a este trabajo de investigación, se plantea la obtención de péptidos derivados de parasporinas con actividad citotóxica, mismos que serán generados por digestión con proteasas a partir de cristales parasporales de *Bacillus thuringiensis*. Es de suma importancia señalar que dichas cepas son aislamientos de suelos nacionales, son clasificadas como no entomopatógenas y su estudio por PCR ha revelado el tipo de parasporina que son capaces de generar.

En los estudios realizados con anterioridad, y otros que siguen en curso en la actualidad con estas mismas cepas de *Bacillus thuringiensis*, se puede indicar que no se han obtenido las fracciones correspondientes generadas como péptido aislado en forma pura. Y que tampoco se han llevado a cabo ensayos de citotoxicidad con dichas fracciones. Siendo esto entonces, el aporte científico del presente trabajo de investigación.

CAPÍTULO 3. HIPÓTESIS

Los péptidos derivados de las parasporinas de cepas nativas de la bacteria *Bacillus thuringiensis* presentan actividad citotóxica sobre células de origen neoplásico in vitro.

CAPÍTULO 4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

- Obtener péptidos derivados de parasporinas con actividad citotóxica sobre células de origen neoplásico.

4.2 Objetivos específicos

- Obtener y purificar cristales parasporales de *Bacillus thuringiensis*
- Generar fracciones de cristales paraesporales mediante proteólisis.
- Purificar las fracciones de péptidos obtenidos
- Realizar ensayos de citotoxicidad de los péptidos sobre células neoplásicas.

CAPÍTULO 5. MÉTODOS

5.1 Material biológico

5.1.1 Cepas de *Bacillus thuringiensis*

Las cepas de *Bacillus thuringiensis* utilizadas en el presente estudio pertenecen a la colección de microorganismos entompatógenos del Instituto de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Biológicas. En la TABLA IV se muestra su denominación así como su lugar de procedencia. Del mismo modo, también se trabajó con la cepa de referencia denominada A1470 (PS2Aa2, PS4Aa1) la cual fue utilizada como control positivo de los experimentos llevados a cabo.

Todas las cepas fueron conservadas en refrigeración a 4° C a partir de cultivos completamente esporulados. La activación se llevó a cabo inoculando las cepas en Agar Nutritivo inclinado y Caldo Nutritivo incubando por 48 h a 30° C. La propagación se realizó empleando Agar LB en placa y Caldo LB con las mismas condiciones de incubación y agregando agitación de 150 rpm en medio líquido. Durante todo el proceso se empleó microscopía óptica para el monitoreo de las inclusiones parasporales mediante tinción de Gram, tinción diferencial de esporas con verde de malaquita y tinción simple con cristal violeta, empleando el microscopio óptico marca Leica a un aumento de 100X.

TABLA IV

Cepas de *Bacillus thuringiensis* analizadas en este estudio.

Denominación de la cepa	Lugar de aislamiento
IB79	San Luis Potosí, México
IB84	San Luis Potosí, México
GM18	Guanajuato, México
A1470*	Tokio, Japón

*Cepa de referencia (PS2, PS4)

5.1.1.1 Cinética de crecimiento

La cinética de crecimiento nos ayuda a establecer el tiempo exacto en el cual se inicia el proceso de esporulación de *B. thuringiensis* y la producción de las inclusiones paraesporales.

Se partió de un pre inóculo preparado a partir de una colonia aislada de cada cepa en 50 mL de caldo LB incubado por 13 h a 30° C y 150 rpm. Posteriormente se tomaron 15 mL del pre inóculo y se transfirieron a un matraz erlen meyer con 150 mL de caldo LB incubando por 72 h a 30° C y 150 rpm. Se midió la densidad óptica por triplicado a 600 nm en intervalos de 2 a 3 h. Durante todo el proceso se llevó a cabo un monitoreo mediante tinción de Gram y microscopía óptica.

5.1.2 Líneas celulares

La actividad biológica de las parasporinas purificadas fue evaluada sobre 2 líneas celulares, las cuales fueron adquiridas en la American Culture Collection (ATCC) y conservadas en criogenia a -70°C con 5% DMSO. Para su activación y propagación fueron utilizados los medios de cultivo recomendados por la ATCC y mantenidas en incubación a 37°C con 5% de CO_2 . En la TABLA V se resume la información sobre las líneas celulares empleadas en el presente estudio.

TABLA V

Lista de líneas celulares del estudio

No. ATCC	Nombre	Organismo	Morfología/Tejido	Propiedades	Enfermedad	Medio de cultivo^a
CRL-1555	A431	<i>Homo sapiens</i>	Epitelial/Piel	Adherente	Carcinoma epidermoide	DMEM
CRL-1582	MOLT-4	<i>Homo sapiens</i>	Linfoblasto/sangre	Suspensión	Leucemia linfoblástica aguda	RPMI-1640

^aTodos los medios de cultivo fueron suplementados con 10% de suero fetal bovino.

Abreviaciones. DMEM: Medio de Eagle Modificado de Dulbecco; RPMI: Medio del Instituto Roswell Park Memorial.

5.2 Activación de las inclusiones paraesporales

Los cristales paraesporales fueron obtenidos a partir de cultivos en medio líquido incubados por 120 h con agitación a 150 rpm y 30° C. Fueron recolectados y lavados por triplicado con agua destilada estéril a 10 000 x g y 4° C. Los *pellet* obtenidos fueron re-suspendidos en buffer de carbonatos a pH 10.0 (Na₂CO₃ 50 mM, EDTA 1mM, DTT 10 mM) e incubados por 60 min a 37° C con agitación a 150 rpm. La proteína solubilizada fue recuperada mediante centrifugación a 18 000 x g por 15 min y posteriormente ajustadas a pH 8.0 con HCl o NaOH. Las muestras fueron filtradas empleando un filtro de nitrocelulosa de 0.45 µm de diámetro para eliminar las esporas y restos celulares remanentes.

La activación de los cristales solubilizados se realizó mediante proteólisis con proteinasa K a una concentración final de 50 µg mL⁻¹ por 60 min a 37° C. Al término de la digestión se detuvo la reacción añadiendo PMSF 1mM.

La concentración de proteína fue estimada por el método de Bradford (Bradford, 1975) y las muestras fueron conservadas a -20° C hasta su uso

5.3 Análisis de los cristales paraesporales en geles de poliacrilamida

Las proteínas de los extractos solubilizados, activados y purificados fueron caracterizadas en geles de poliacrilamida para estimar el peso molecular y monitorear la correcta activación de las protoxinas.

Se realizó electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) y tinción con azul de Coomassie R-250 al 1% (Laemmli, 1970). Se emplearon alícuotas de 20 μ L de cada muestra y los geles fueron preparados a una concentración al 12 y 15% de poliacrilamida.

5.4 Purificación mediante Cromatografía de Intercambio Aniónico

Las muestras fueron diafiltradas antes de pasarlas por la columna empleando un filtro Amicon® Ultra-15 10K haciendo intercambio de buffer con Tris 20 mM pH 8.0.

La purificación se realizó con una columna HiTrap Q 1mL empleando Tris 20 mM pH 8.0 como buffer de inicio con flujo de 0.1 mL min⁻¹ para la muestra IB79 y 0.3 mL min⁻¹ para IB84, GM18 y A1470. La elución se realizó con gradiente de buffer Tris 20 mM y NaCl 500 mM y 1 M. Posteriormente se analizaron las fracciones obtenidas mediante SDS-PAGE 15%

5.5 Ensayos de citotoxicidad

Las proteínas purificadas fueron probadas contra las líneas celulares en placas de 96 pozos. Todas las placas fueron incubadas por 48 h a 37° C en incubadora con 5% de CO₂. Los ensayos fueron montados de acuerdo a la descripción proporcionada en la TABLA VI.

TABLA VI

Componentes para los ensayos de citotoxicidad

Componente	Control positivo	Control negativo	Tratamiento	Blanco
Suspensión de 2 x 10 ⁴ células/mL	90 µL	90 µL	90 µL	-
Cristales activados y purificados de nuestras cepas (diluciones seriadas)	-	-	10 µL	-
Cristales activados y purificados de la cepa de referencia (diluciones seriadas)	10 µL	-	-	-
Medio de cultivo sin células	-	-	-	90 µL
PBS 1X	-	10 µL	-	10 µL

5.5.1 Ensayo con Rojo Neutro

En el caso de las células adherentes, el conteo de las células viables fue mediante un sistema de coloración usando rojo neutro como colorante vital, para la diferenciación de las células vivas de las muertas. Este ensayo se basa en la detección de los daños que producen los compuestos tóxicos sobre la integridad de la membrana de los lisosomas de las células y sobre el control del flujo del colorante a través de la misma.

Bajo condiciones controladas debe asumirse que no hay salida de rojo neutro. La densidad óptica (D.O) obtenida a 540 nm se toma como índice de la cantidad original de rojo neutro presente en el cultivo. El cálculo del porcentaje (%) de inhibición del crecimiento celular se realizó utilizando la siguiente fórmula:

$$\%Inhibición = 100 \times \frac{D.O.tratamiento}{D.O.Control}$$

5.5.2 Ensayo con kit de citotoxicidad.

El segundo tipo de conteo de células viables para cultivo en suspensión fue hecho con el kit CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay (Promega) que cuantifica los niveles de deshidrogenasa láctica (LDH), una enzima citosólica estable que se libera una vez que se lisan las células. La LDH liberada en el sobrenadante del cultivo se mide con un ensayo enzimático acoplado de 30 minutos, lo que resulta en la conversión de una sal de tetrazolio (yodonitrotetrazolio violeta; INT) en un producto formazan rojo. La cantidad de color formado es proporcional al número de células lisadas. La lectura de absorbancia se mide a 490 nm mediante un lector de placas de 96 pocillos.

El porcentaje de citotoxicidad fue calculado con la siguiente ecuación:

$$\%Citotoxicidad = 100 \times \frac{LDH \text{ experimental}(DO_{490})}{M\acute{a}xima \text{ liberaci3n de LDH}(DO_{490})}$$

CAPÍTULO 6. RESULTADOS

6.1 Cepas de *Bacillus thuringiensis*

Las cepas proporcionadas por el Instituto de Biotecnología FCB-UANL fueron entregadas en placa con 24 h de incubación. Se realizaron resiembras en Agar y Caldo Nutritivo y se incubaron por 48 h. Posteriormente se realizaron frotis y se realizó tinción simple con cristal violeta (Figura 1) y tinción diferencial de esporas con verde de malaquita (Figura 2) para la identificación de las inclusiones paraesporales.

Las inclusiones paraesporales se observaron mayoritariamente unidas a la espora en un extremo. El grado de esporulación fue distinto entre cada una de las cepas estando en forma libre la mayoría de las esporas.

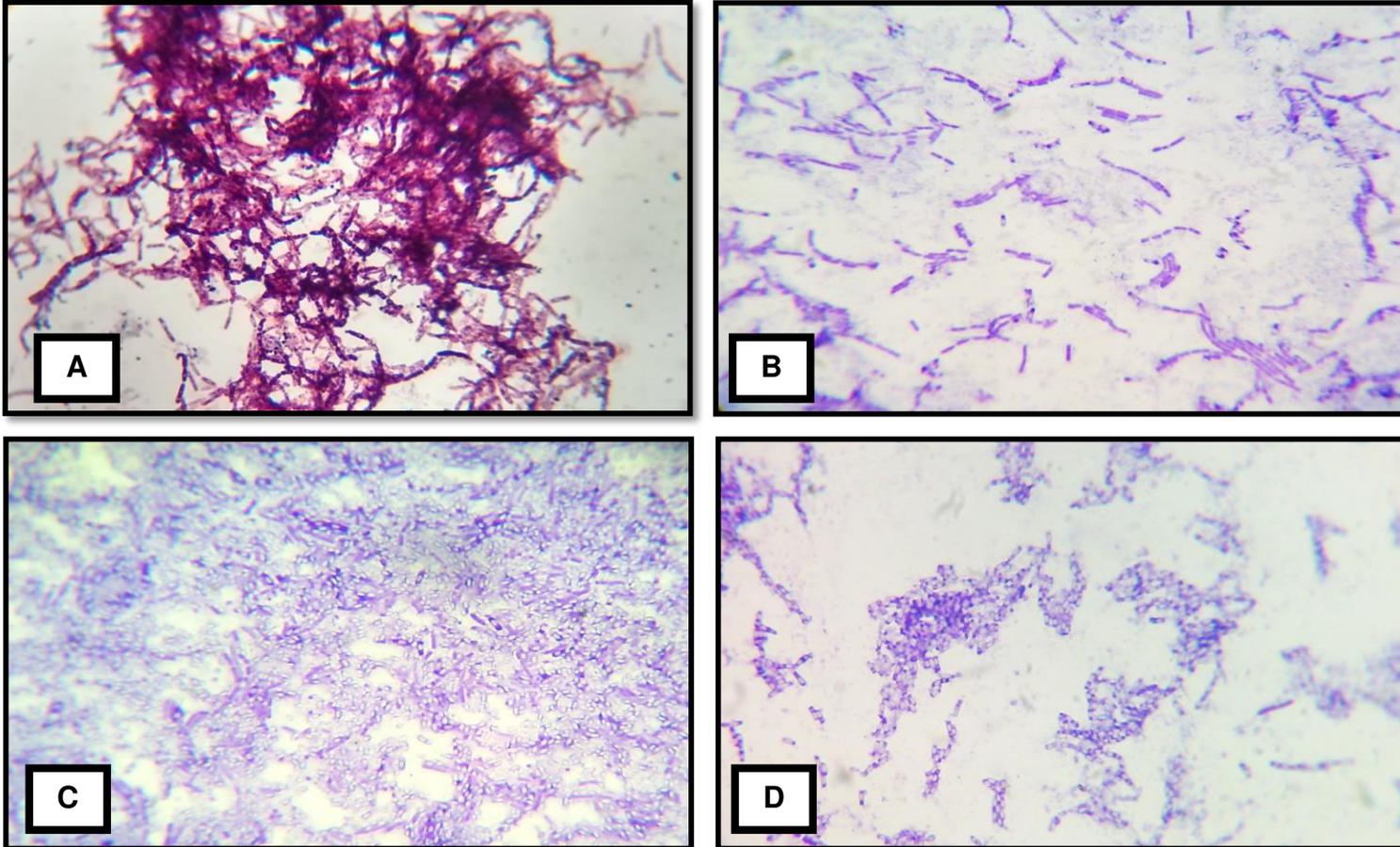


Figura 1. Tinción simple con cristal violeta. A, A1470; B, IB79; C, IB84; D, GM18. Las células y las inclusiones paraesporales aparecen teñidos de color morado. Las esporas se aprecian como pequeñas esferas incoloras.

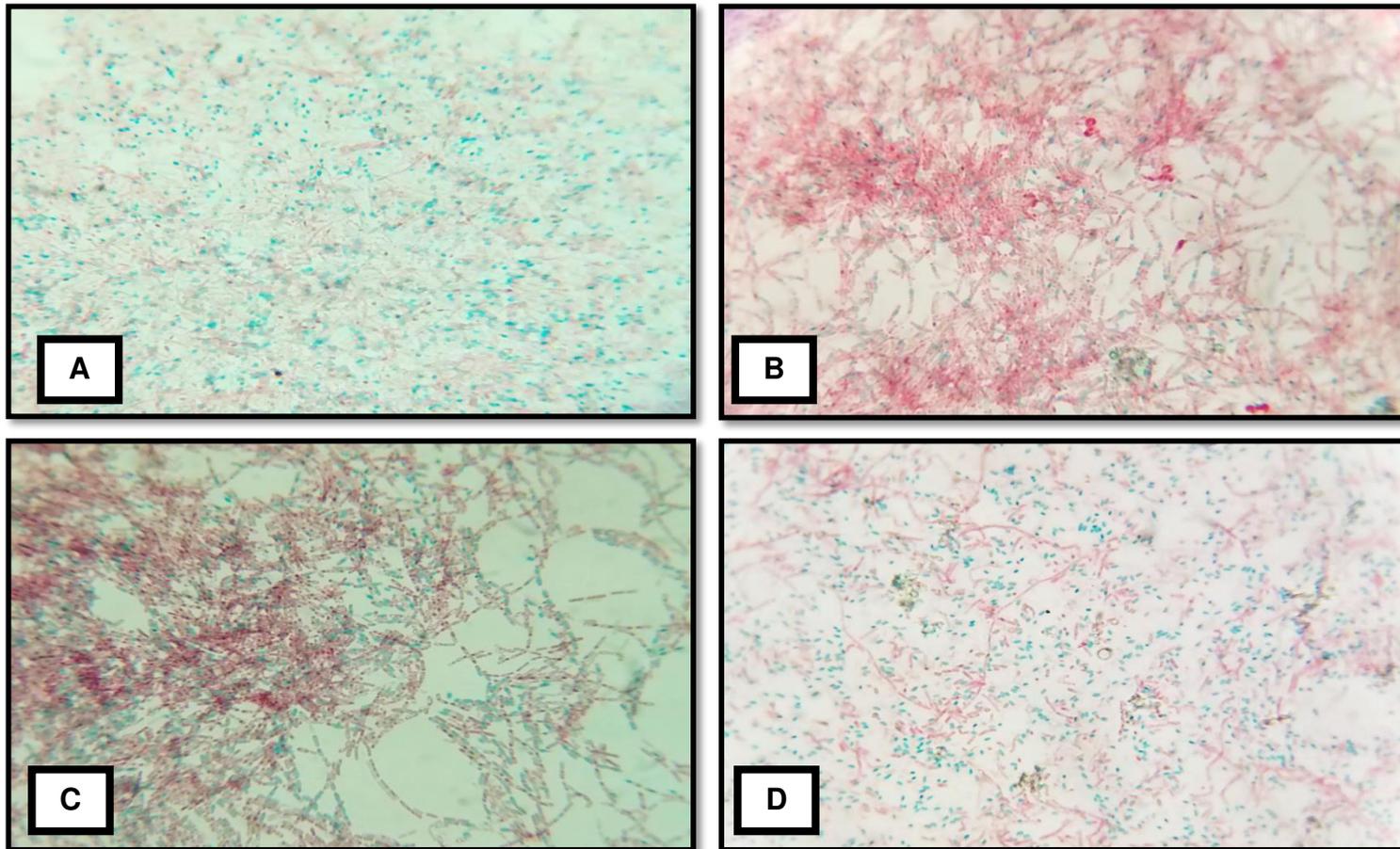


Figura 2 Tinción diferencial de esporas con verde de malaquita. A, A1470; B, IB79; C, IB84; D, GM18. Las células aparecen teñidas de color rosa-rojizo, las inclusiones paraesporales aparecen como pequeños puntos de color rosa oscuro y las esporas se aprecian teñidas de color verde.

6.1.1 Cinética de crecimiento

Las cepas tuvieron un periodo de adaptación de 6 a 7 horas. La fase exponencial tuvo una duración aproximada de 24 horas. A partir de las 33 horas de incubación se detectó la aparición de esporas, teniendo una esporulación y producción de inclusiones paraesporales completa a las 48 horas de incubación. Sólo la cepa IB84 mostró un comportamiento distinto teniendo una fase de crecimiento exponencial ligeramente mayor, lo cual se pudo detectar en el monitoreo mediante microscopía óptica. Sus características en cuanto a consistencia de biomasa fueron distintas con respecto a las demás, ya que hubo formación de agregados, lo que dificultó las lecturas de densidad óptica.

A pesar de que a las 48 horas de incubación se tenía un cultivo con esporulación completa y, por lo tanto, la producción de las inclusiones paraesporales, se decidió aumentar el tiempo de incubación hasta las 120 horas para asegurar una mayor lisis de células y tener una mayor cantidad del complejo espora-cristal en forma libre. Esto a su vez se vería favorecido con la agitación del medio del cultivo.

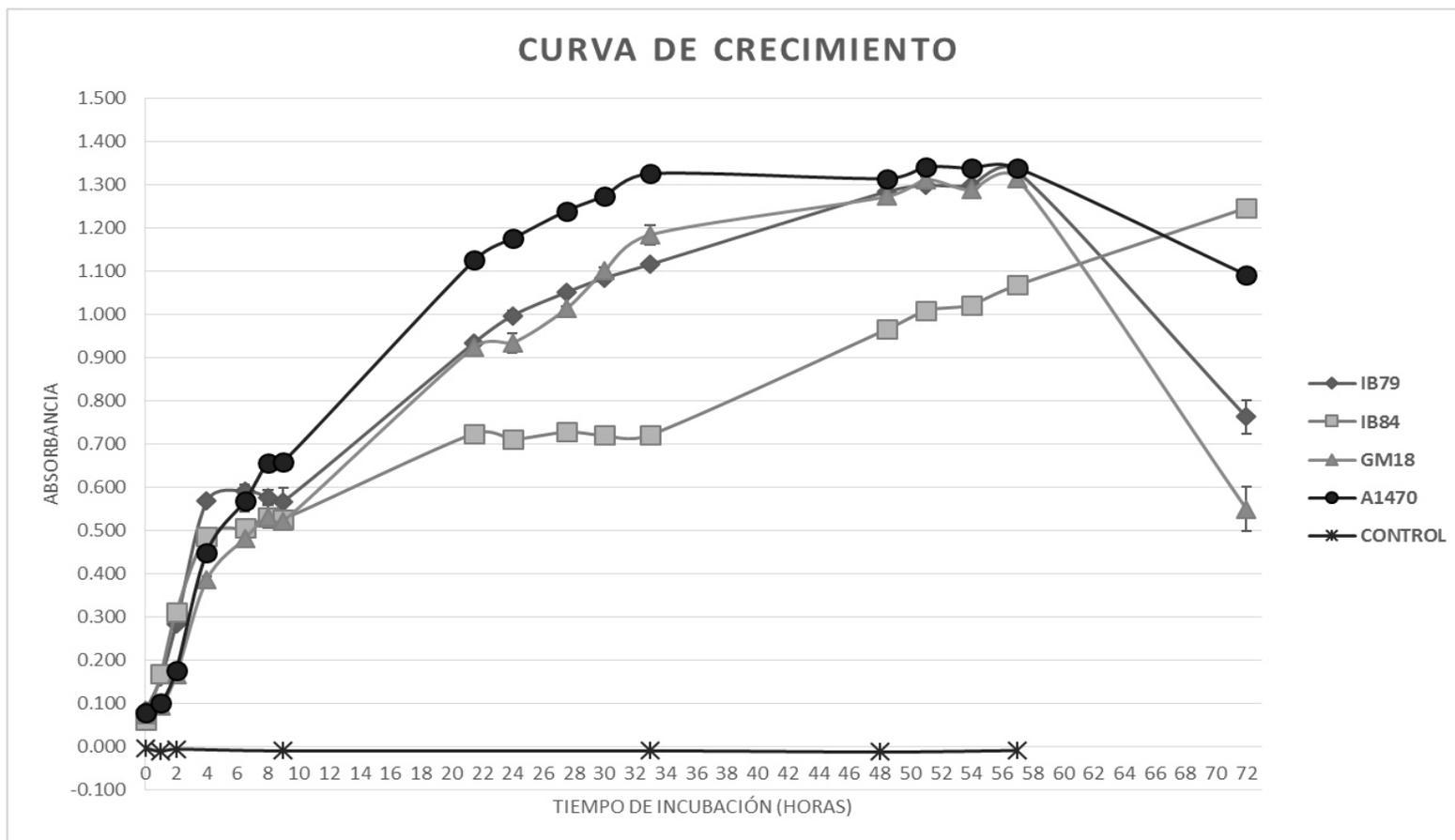


Figura 3 Gráfico de cinética de crecimiento de las cepas de estudio. Las lecturas de absorbancia fueron medidas a 600 nm. Cada lectura se realizó por triplicado. Se muestran las barras de desviación estándar por punto.

6.2 Activación de las inclusiones paraesporales y perfiles proteicos

El proceso de activación de las inclusiones paraesporales se confirmó a través de los perfiles proteicos en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE). En estudios previos (Espino, 2014) se reportaron toxinas con pesos de 26-28 KDa para las cepas IB79, IB84 y GM18, las cuales fueron resultado de la activación proteolítica con proteinasa K con una concentración final de $10 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$. En el presente estudio fue posible obtener patrones de bandas similares a los reportados previamente utilizando una concentración menor de enzima ($50 \mu\text{g/mL}$) durante la activación proteolítica (Figura 4).

Las cepas con mayor rendimiento de proteína fueron IB79 e IB84, el cual se vio mayoritariamente favorecido con la agitación durante la solubilización de la proteína. Las cepas A1470 y GM18 presentaron problemas de rendimiento y esto se vio reflejado en los perfiles proteicos en SDS-PAGE, ya que fue difícil una adecuada tinción de las bandas presentes debido a la menor concentración de proteína.

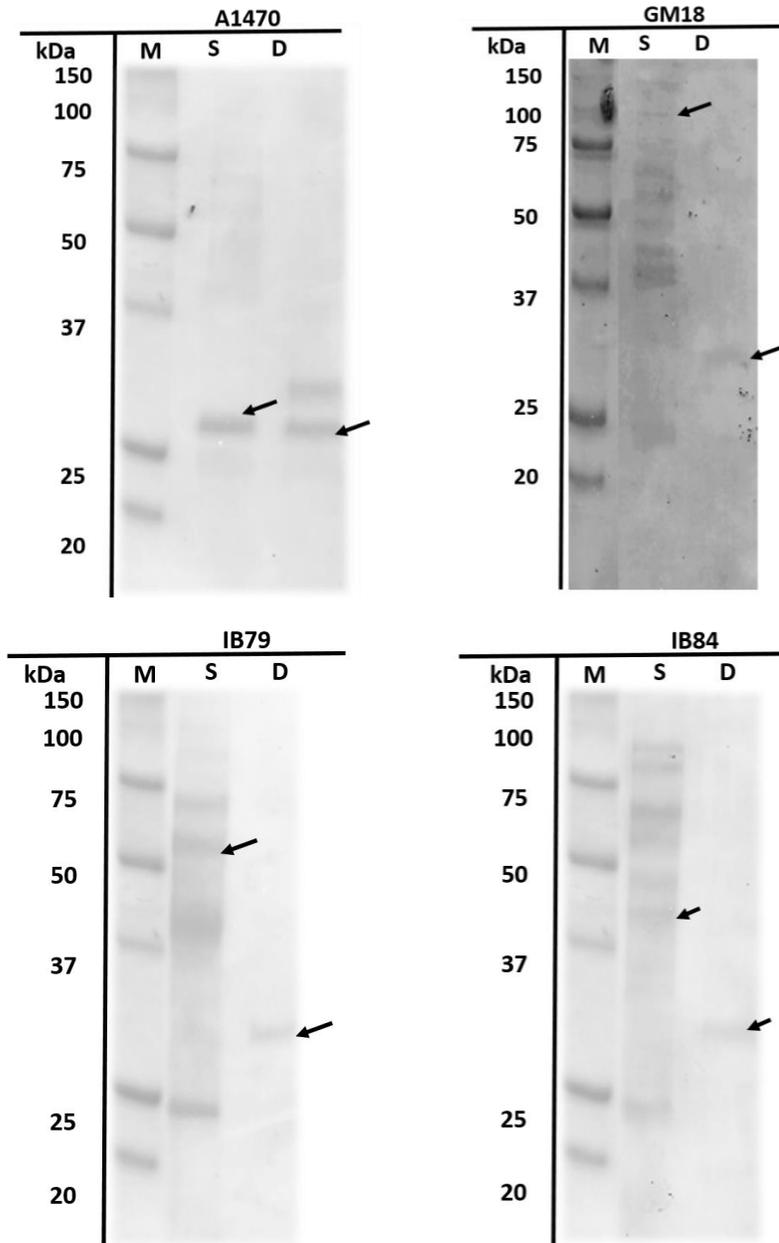


Figura 4. Perfiles proteicos de los cristales de las cepas A1470, GM18, IB79 e IB84. SDS-PAGE con 12% de acrilamida. M: marcador de peso molecular; S: proteína solubilizada; D: proteína digerida. Las flechas indican las protoxinas y toxinas correspondientes.

6.3 Purificación mediante Cromatografía de Intercambio Aniónico

Debido a que no se contaba con antecedentes con respecto a la purificación de las cepas de estudio pertenecientes a la colección del Instituto de Biotecnología FCB-UANL, se hicieron ajustes conforme se purificaba cada muestra, de acuerdo a lo reportado previamente en la literatura. La técnica de Cromatografía de Intercambio Aniónico permite la separación de las proteínas de acuerdo a su carga. Los puntos isoeléctricos de nuestras proteínas fueron reportados en un estudio previo (Espino, 2014), los cuales tienen valores de pH en el rango ácido de la escala. De esta forma, al trabajar con un pH=8.0 las proteínas tendrían una carga neta negativa, por lo que una columna de intercambio aniónico sería la adecuada para la separación. En cuanto a las condiciones iniciales se establecieron de acuerdo a lo sugerido por el método empleando la columna HiTrap Q HP, las cuales se ajustaron de acuerdo a las características de nuestras proteínas. El buffer de inicio empleado fue Tris-Cl 20 mM pH 8.0 y la elución se realizó con un gradiente de NaCl 500 mM y un flujo de 0.1 mL/min. En la TABLA VII se resumen las condiciones finales con las que fueron eluidas las parasporinas.

Los cromatogramas obtenidos muestran en general la presencia de diversas señales las cuales dan indicio de que pueda estar presente más de una proteína por pico, por lo que después del análisis mediante SDS-PAGE se seleccionará la fracción que contenga la parasporina pura para realizar las pruebas de citotoxicidad.

TABLA VII
Condiciones de corrida de cada cepa en Cromatografía de Intercambio
Iónico.

Cepa	Punto isoelectrico	Buffer de inicio	Buffer de elución	Flujo (mL/min)
A1470	5.9 (PS2) 6.1 (PS4)	Tris 20 mM	Tris 20 mM + NaCl 500 mM	0.3
IB79	4.5	Tris 20 mM	Tris 20 mM + NaCl 500 mM	0.1
IB84	7.7	Tris 20 mM	Tris 20 mM + NaCl 1 M	0.3
GM18	4.6	Tris 20 mM	Tris 20 mM + NaCl 1 M	0.3

Para la parasporina obtenida de la cepa de referencia A1490 se logró obtener la banda de la toxina activa con un peso aproximado de 26 KDa distribuida en las fracciones 42-48. Estas fracciones fueron recolectadas en una sola y se realizó intercambio de buffer para eliminar las sales del gradiente. La concentración final de la proteína purificada fue de 32 µg/mL (Figura 5)

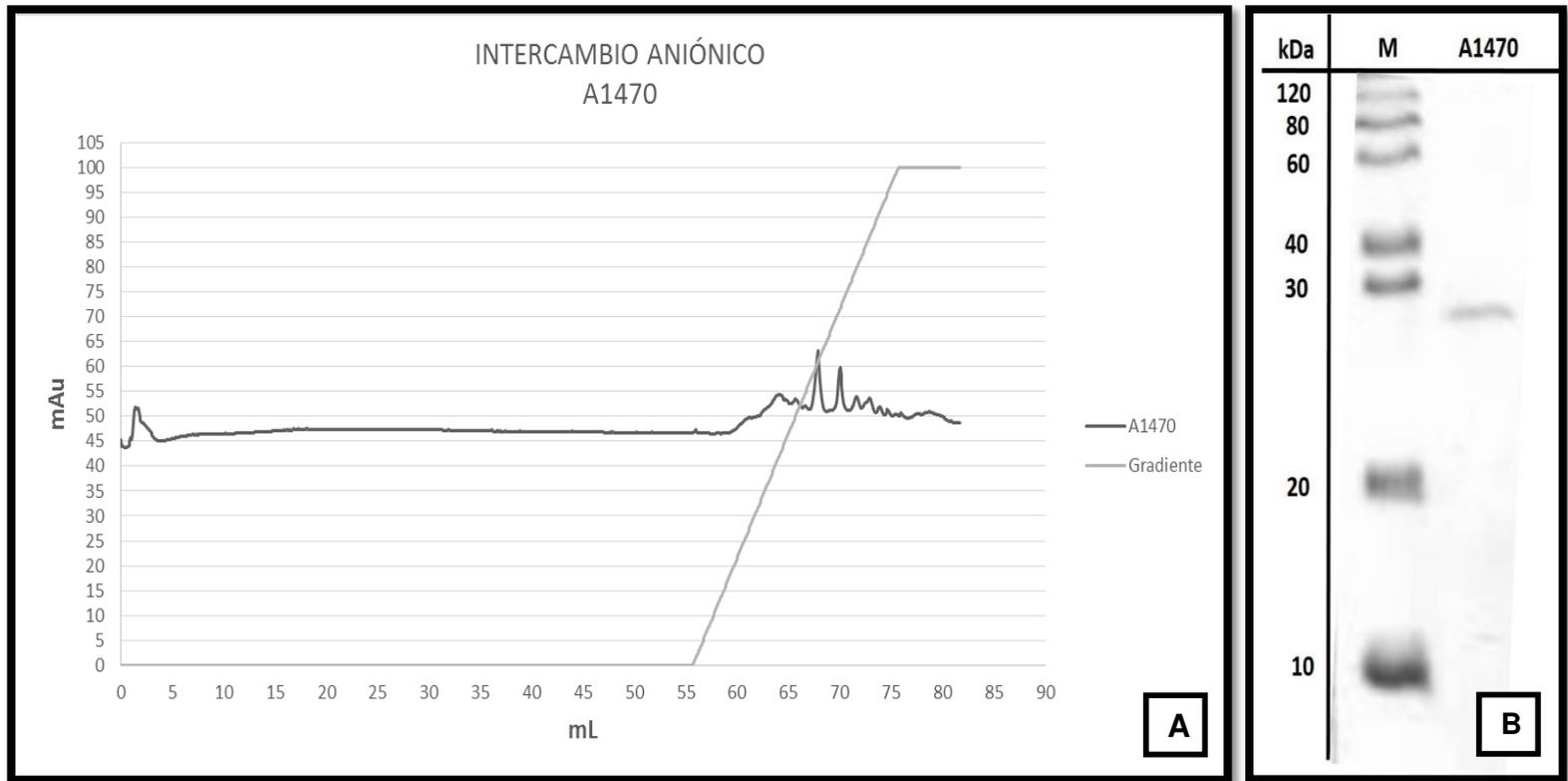


Figura 5. A. Cromatograma del digerido obtenido de la cepa A1470. **B.** SDS-PAGE 15% de la parasporina pura correspondiente a las fracciones 42-48.

De las cepas IB79 e IB84 se obtuvieron proteínas adicionales a las de interés las cuales salieron a lo largo de varias fracciones conforme iba corriendo el gradiente. Para la cepa IB79 se obtuvieron proteínas con pesos aproximados de 10, 15 y 25 KDa, las cuales probablemente poseen características similares lo que hace difícil la separación empleando sólo una técnica. Las proteínas obtenidas de la cepa IB79 fueron recolectadas en las fracciones 44-52 (Figura 6), las cuales se juntaron en una sola fracción y se eliminaron las sales para su uso posterior en los bioensayos. La concentración final cuantificada mediante técnica de Bradford fue de 330 $\mu\text{g/mL}$.

Para la cepa IB84 se obtuvieron proteínas con pesos aproximados de 15, 18 y 25 KDa y fueron recolectadas en las fracciones 48-55 (Figura 7), a las cuales también se juntaron en una sola fracción y se prepararon para su uso posterior en los bioensayos. La concentración final de proteína fue de 186 $\mu\text{g/mL}$.

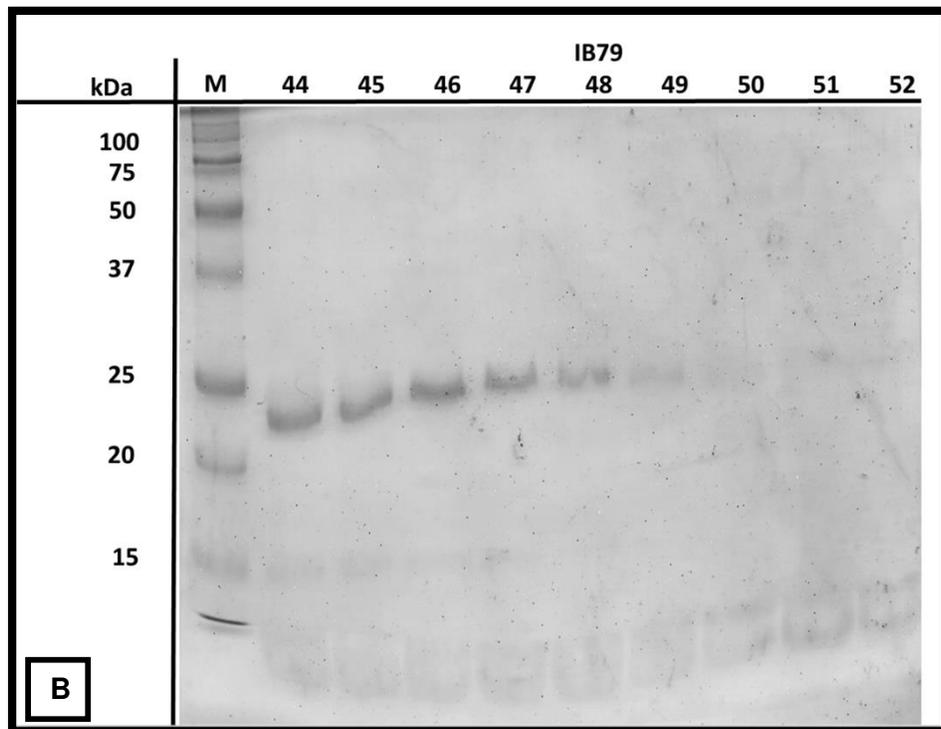
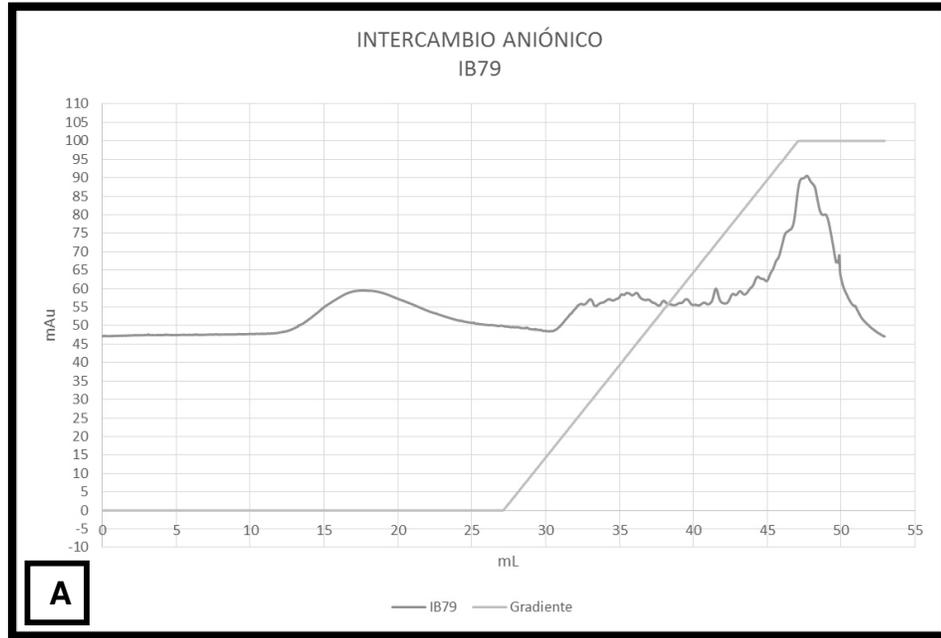


Figura 6. A. Cromatograma del digerido obtenido de la cepa IB79. **B.** SDS-PAGE 15% de las fracciones 44-52.

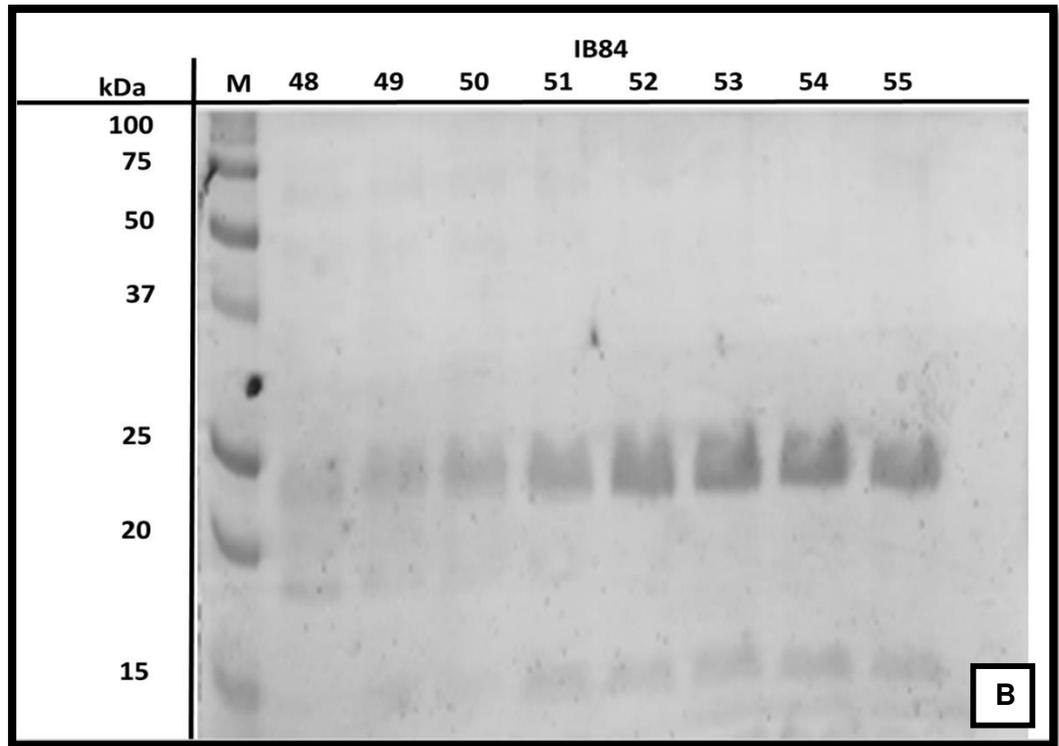
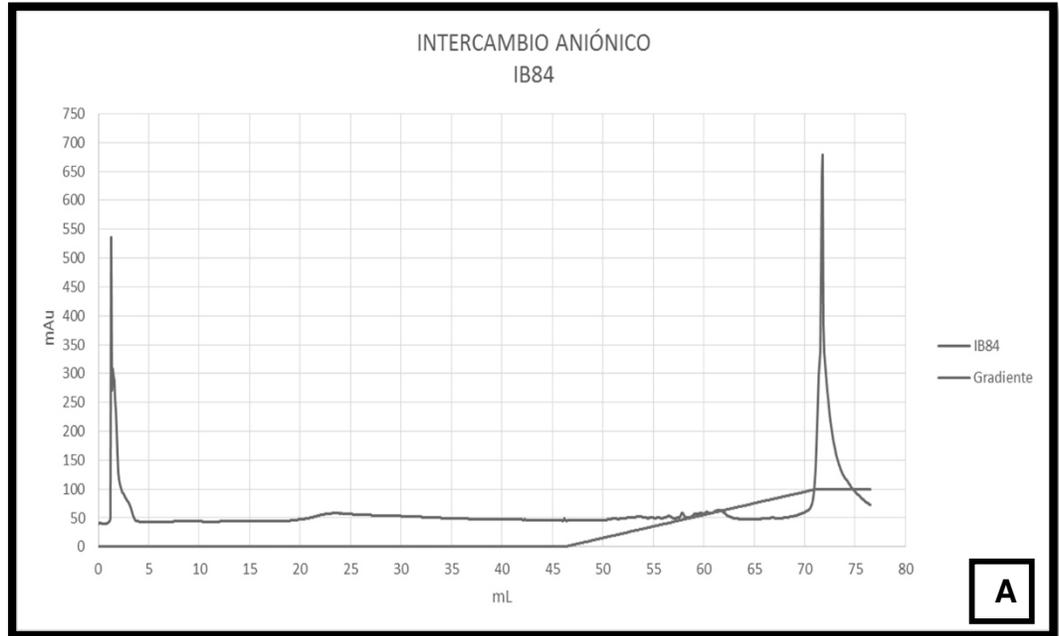


Figura 7. A. Cromatograma del digerido obtenido de la cepa IB84. **B.** SDS-PAGE 15% de las fracciones 48-55.

Debido al bajo rendimiento de la cepa GM18 se procedió a realizar un nuevo cultivo repitiendo todo el proceso de obtención de la parasporina. Posterior a la purificación mediante Intercambio Aniónico (Figura 8) se obtuvo en las fracciones 18-22 una proteína con un peso aproximado de 26 KDa y una con un peso aproximado de 38-40 KDa, las cual también se prepararon para su uso posterior en los bioensayos. La concentración final fue de 14 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

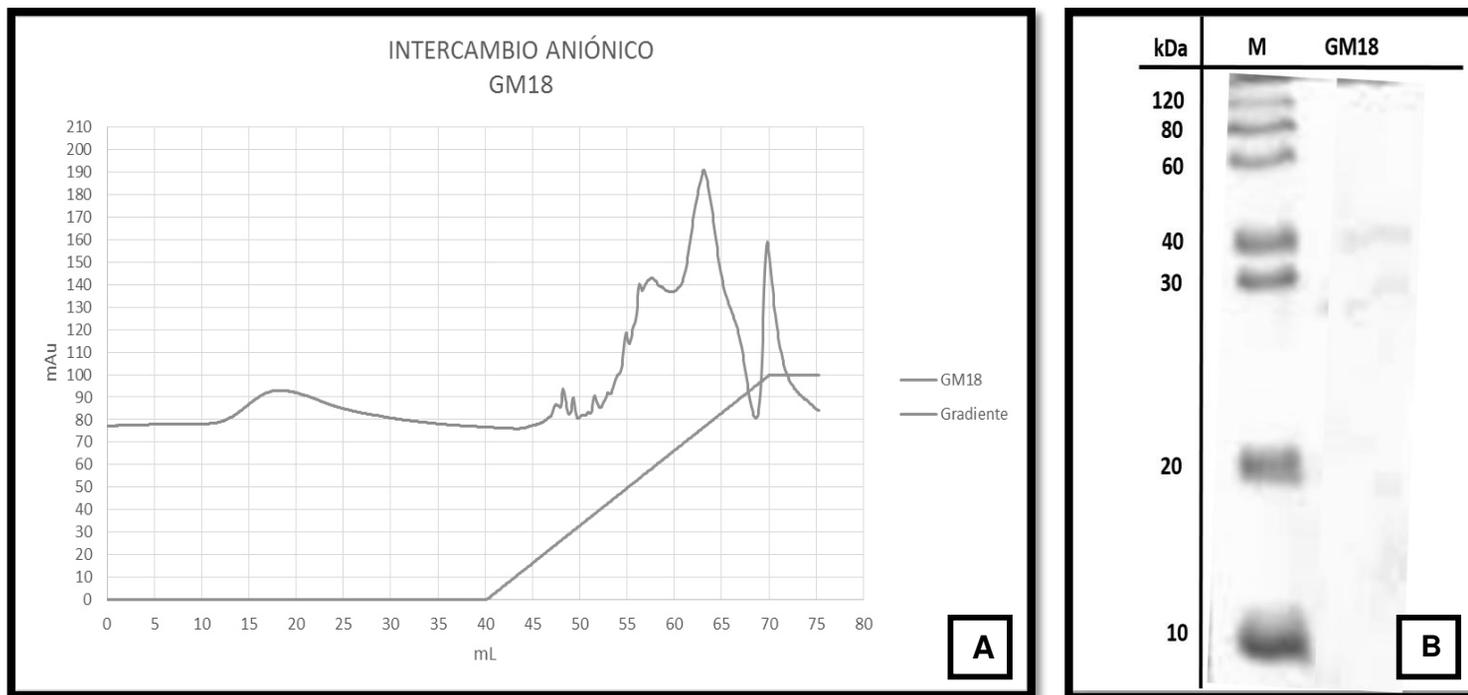


Figura 8. A. Cromatograma del digerido obtenido de la cepa GM18. **B.** SDS-PAGE 15% de la parasporina purificada correspondiente a las fracciones 18-22.

6.4 Ensayos de citotoxicidad

Las concentraciones de toxina empleada en los ensayos de citotoxicidad variaron de una cepa a otra ya que se partió de la concentración total cuantificada por método de Bradford y posteriormente se realizaron diluciones seriadas hasta obtener 5 concentraciones de prueba (TABLA VIII). Las diluciones se realizaron empleando PBS 1X.

TABLA VIII

Concentraciones de prueba de las toxinas obtenidas

Cepa	Concentración ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Dilución ($\mu\text{g}/\text{mL}$)			
		1	2	3	4
A1470	32	3.2	0.32	0.032	0.0032
IB84	186	18.6	1.86	0.186	0.0186
IB79	330	33.0	3.3	0.33	0.033
GM18	38	3.8	0.38	0.038	0.0038

6.4.1 Rojo neutro

Este método se utilizó para cuantificar citotoxicidad en células adherentes correspondientes a la línea A-431. Las parasporinas estuvieron en contacto con la toxina por 48 horas y posteriormente se utilizó el rojo neutro para medir la viabilidad celular.

Las parasporinas obtenidas de las cepas IB79 y GM18 fueron las que mostraron menor toxicidad hacia esta línea celular alcanzando un porcentaje de citotoxicidad máximo de 15% para IB79 y del 22% para GM18, siendo esta última más tóxica a una dosis más baja de toxina. Por otro lado, las parasporinas procedentes de las cepas IB84 y la cepa de referencia A1470 mostraron mayor citotoxicidad alcanzando porcentajes de citotoxicidad de 50% y 52% respectivamente siendo la cepa A1470 más tóxica a una dosis menor de toxina (Figura 9).

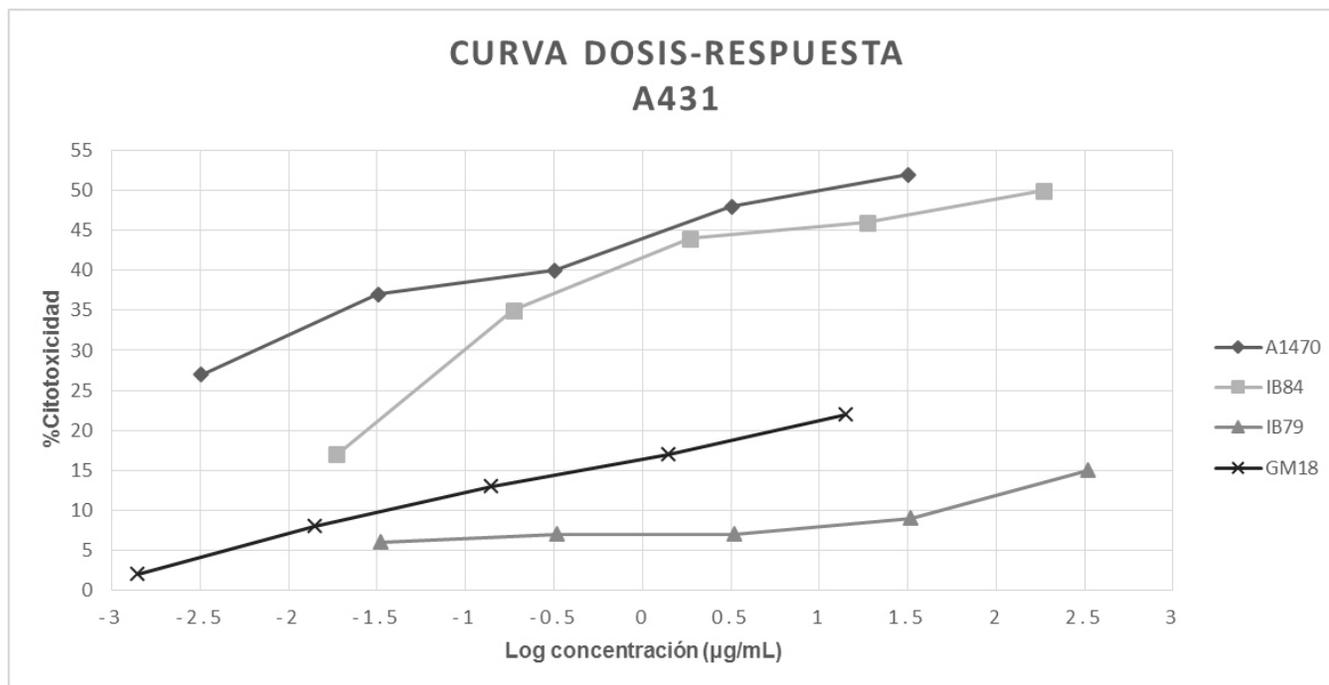


Figura 9. Curva dosis-respuesta de las parasporinas sobre células en cultivo de la línea A431.

6.4.2 Ensayo con kit de citotoxicidad

Este método se utilizó para cuantificar citotoxicidad en células en suspensión correspondientes a la línea MOLT-4. Las parasporinas estuvieron en contacto con la toxina por 48 horas y posteriormente se utilizó el kit CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay (Promega) para medir la viabilidad celular.

En la Figura 10 se muestra el gráfico correspondiente a la curva dosis-respuesta obtenido para este ensayo. La línea MOLT-4 fue más susceptible a las parasporinas que la línea A431, alcanzando porcentajes de citotoxicidad más altos cercanos al 90% en 48 horas. Las parasporinas obtenidas de las cepas A1470 y GM18 tuvieron mayor efecto citotóxico a dosis menores comparadas con las parasporinas procedentes de las cepas IB84 e IB79.

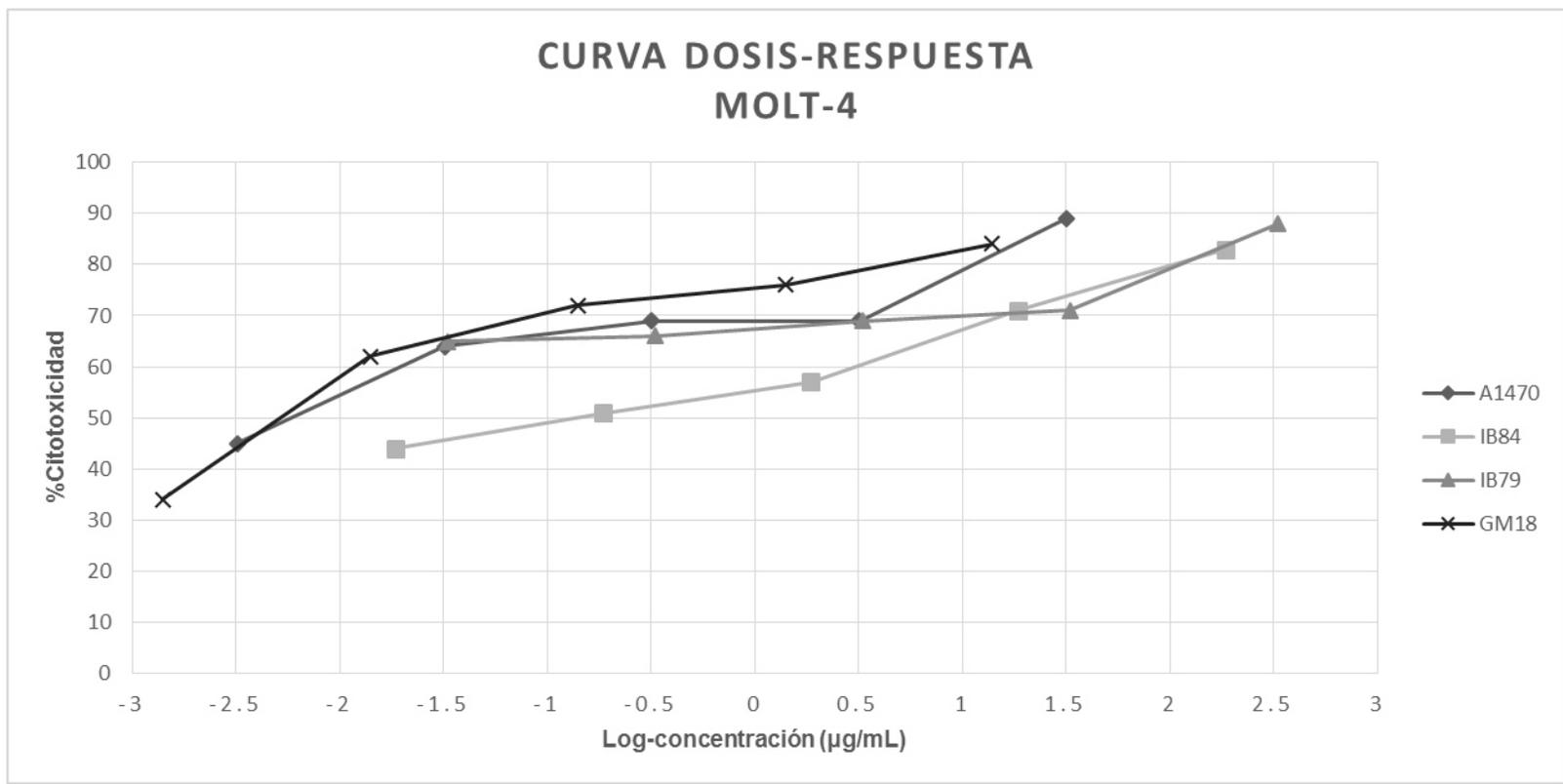


Figura 10. Curva dosis-respuesta de las parasporinas sobre células en cultivo de la línea MOLT-4.

CAPÍTULO 7. DISCUSIÓN

7.1 Obtención y activación de inclusiones paraesporales

La aplicación de una metodología para la pre-purificación de las inclusiones paraesporales y de este modo disminuir las proteínas adicionales presentes en la biomasa no cumplió con el objetivo propuesto. Las técnicas aplicadas cuyo objetivo era separar las esporas del complejo espора-cristal tuvieron poca respuesta. El monitoreo realizado por microscopía óptica evidenciaba la presencia no sólo de esporas sino de restos celulares con lo que se corría peligro de estar perdiendo inclusiones paraesporales. La técnica bifásica (Goodman *et al.*, 1967) ha sido aplicada con diversas parasporinas facilitando la activación y la purificación de las mismas, sin embargo en nuestro caso, sólo agregó etapas extras a nuestro proceso de obtención con el riesgo de perder las inclusiones paraesporales durante el mismo. La extracción con hexano (Rahbani *et al.*, 2014) es una técnica más sencilla y puede ser ejecutada en menos tiempo pero el resultado fue similar al de la técnica anterior.

Una de las modificaciones clave con respecto al estudio anterior (Espino, 2014) fue la solubilización de las inclusiones paraesporales, ya que se observó un aumento de concentración de proteína al agregar agitación. Las cepas de trabajo presentaron rendimientos bajos, por lo que se aplicaron técnicas adicionales para concentrar las muestras tales como precipitación con acetona, precipitación con NH_4SO_4 y diafiltración pero aparentemente las proteínas sufrían alteraciones en su estructura ya que en los geles se apreciaban bandas con

barridos o precipitaban en el mismo filtro. La agitación permitió aumentar la concentración de proteína, la cual fue suficiente para poder ser digerida proteolíticamente y obtener las fracciones tóxicas.

Los perfiles proteicos obtenidos fueron similares a los reportados previamente (Espino, 2014) a pesar de haber utilizado una concentración menor de proteinasa K, la cual fue suficiente para activar la fracción tóxica. Cabe destacar que esta concentración coincide con la empleada en otros estudios, los cuales manejan concentraciones desde 10-50 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

7.2 Cromatografía de Intercambio Aniónico

Se sabe que las cepas IB79, IB84 y GM18 producen algún tipo de parasporina pero al no presentar similitudes entre sus perfiles proteico y genético se necesita conocer más a fondo si se trata de una nueva familia o subfamilia de parasporinas.

Los cromatogramas presentaron un patrón de picos diversos. En general, se obtuvo más de un pico en una misma área lo cual nos daba indicio de una posible mezcla de proteínas. Esto lo pudimos observar más claramente mediante SDS-PAGE, donde pudimos visualizar la presencia de más de una banda a lo largo de varias fracciones obtenidas a lo largo del gradiente. Estas proteínas probablemente pertenecen a los fragmentos cortados por la enzima, los cuales, al no estar caracterizados podrían o no contribuir con la actividad de la toxina o tener algún tipo de interacción con el medio en el cual se encuentra el cultivo celular. Debido a la complejidad del estudio se necesitaría el uso de más de una técnica de purificación para aislar completamente estas porciones proteicas y poder conocer su estructura y posible actividad. Dentro de las técnicas de purificación más empleadas se encuentran la centrifugación por gradiente de sacarosa y la precipitación con sulfato de amonio. De acuerdo a la literatura referente a las parasporinas, la combinación de estas técnicas y las cromatográficas además de clonación en otros vectores bacterianos como *Escherichia coli* permite una purificación completa de las proteínas que presentan actividad citotóxica. Por el momento, lo que sigue como proyección a futuro es conocer las características fisicoquímicas de las fracciones obtenidas en

cromatografía de intercambio iónico, así como su secuenciación. De este modo, se podría caracterizar la o las proteínas generadas por cada cepa y estudiar su efecto citotóxico más a fondo en condiciones más controladas.

7.3 Pruebas de citotoxicidad

En cuanto a la actividad biológica, todas las cepas mostraron toxicidad *in vitro* contra células de origen neoplásico en cultivo, variando el grado de toxicidad de una cepa a otra.

Debido a la naturaleza heterogénea de los mismos cristales producidos por nuestras cepas, su actividad biológica podría estar subestimada ya que existe la posibilidad de que más de una proteína presente llegue a tener actividad anticancerígena. La caracterización completa de estas proteínas debe estar respaldada por técnicas moleculares más minuciosas para poder estudiar más a fondo la actividad biológica y conocer las posibles aplicaciones que pudieran tener a nivel farmacéutico. Para ello es necesario conocer principalmente su estructura y estabilidad en diversos ambientes, lo cual también serviría para seleccionar técnicas que sean compatibles y llevar a cabo una purificación más completa.

CAPÍTULO 8. CONCLUSIONES

1. Se obtuvieron las inclusiones paraesporales de cada cepa de estudio en un menor número de pasos al procedimiento previsto y con un rendimiento ligeramente mayor. Los perfiles proteicos correspondieron a los reportados previamente y se confirmó la presencia de las posibles pro-toxinas.
2. Se generó la fracción tóxica de cada proteína mediante digestión con proteinasa K. La visualización del digerido mediante SDS-PAGE evidenció la correcta activación de las parasporinas.
3. Se purificaron los péptidos obtenidos en el digerido completo mediante Cromatografía de Intercambio Aniónico.
4. Las parasporinas producidas por cepas aisladas de suelos nacionales tienen actividad citotóxica contra células de origen neoplásico *in vitro* teniendo un alto grado de toxicidad hacia la línea celular MOLT-4 y en menor grado hacia la línea celular A431.

LITERATURA CITADA

Michio Ohba, Eiichi Mizuki, Akiko Uemori, 2009. Parasporin, a New Anticancer Protein Group from *Bacillus thuringiensis*. *Anticancer Research* 29: 427-434

Nachimuthu Saraswathy, Polumetla Ananda Kumar, 2004. Protein engineering of δ -endotoxins of *Bacillus thuringiensis*. *Electronic Journal of Biotechnology* ISSN: 0717-3458 Vol.7 No.2

Teixeira Corrêa RF, Ardisson-Araújo DMP, Monnerat RG, Ribeiro BM, 2012. Cytotoxicity Analysis of Three *Bacillus thuringiensis* Subsp. israelensis δ -Endotoxins towards Insect and Mammalian Cells. *PLoS ONE* 7(9): e46121.

Márquez María Elena, Ibarra J.E., Basurto Regina, 2005. Morfología de los cristales parasporales en cepas Nematicidas de *Bacillus thuringiensis*. *Rev. Protección Veg.* Vol. 20 No. 1

E. Schnepf, N. Crickmore, J. Van Rie, D. Lereclus, J. Baum, J. Feitelson, D. R. Zeigler, D. H. Dean, 1998. *Bacillus thuringiensis* and Its Pesticidal Crystal Proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*.

Espino Vázquez Astrid Nalleli, 2014. Caracterización biológica de parasporinas en cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* (Tesis doctoral). Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Biológicas.

Jae Young Choi, Ming Shun Li, Jong Yul Roh, Hee Jin Shim, Kyung Saeng Boo, Yeon Ho Je J., 2003. Identification of Novel Insecticidal cry1-type Genes from *Bacillus thuringiensis* Strains Isolated in Korea. *Asia-Pacific Entomol.* 6(2): 229 - 233

Hideki Katayama, Haruo Yokota, Tetsuyuki Akao, Osamu Nakamura, Michio Ohba, Eisuke Mekada, Eiichi Mizuki, 2005. Parasporin-1, a Novel Cytotoxic Protein to Human Cells from Non-Insecticidal Parasporal Inclusions of *Bacillus thuringiensis*. *J. Biochem.* 137, 17–25 (2005) DOI:10.1093/jb/mvi003. Vol. 137, No. 1

Sarjeet S. Gill, Elizabeth A. Cowles, Patricia V. Pietrantonio, 1992. The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins. *Annu. Rev. Entomol.* 37:615-36

Bertha Carreras, Sandra Rodríguez, Odelsa Ancheta, Tania Valdés, Yahima Harvey, 2008. La morfología de los cuerpos paraesporales y su relación con la actividad biológica en cepas cubanas de *Bacillus thuringiensis*. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, Vol. 39, No. 2,

Meadows MP, Ellis DJ, Butt J, Jarrett P, Burges HD, Butt JOE. 1992. Distribution, frequency and diversity of *Bacillus thuringiensis* in an Animal Feed Mill. *Applied and Environmental Microbiology* 58:1344-1350

Chi-Yea Yang, Jen-Chieh Pang, Suey-Sheng Kao, Hau-Yang Tsen, 2003. Enterotoxigenicity and Cytotoxicity of *Bacillus thuringiensis* Strains and Development of a Process for Cry1Ac Production. *J. Agric. Food Chem.* 2003, 51, 100-105.

Shiro Okumura, Hiroyuki Saitoh, Tomoyuki Ishikawa, Naoya Wasano, Satoko Yamashita, Ken-Ichi Kusumoto, Tetsuyuki Akao, Eiichi Mizuki, Michio Ohba, Kuniyo Inouye, 2005. Identification of a Novel Cytotoxic Protein, Cry45Aa, from *Bacillus thuringiensis* A1470 and Its Selective Cytotoxic Activity against Various Mammalian Cell Lines. *J. Agric. Food Chem.*

Ichikawa M, Uemori A, Ohgushi A, Yasutake K, Kagoshima K, Mizuki E, Ohba M. 2007. Phenotypic and morphometric characterization of *Bacillus thuringiensis* parasporin–1 producers : A comparison with insecticidal Cry protein producers. *Journal of the Faculty of Agriculture Kyushu University* 52:307–313.

Herman Hofte, H. R. Whiteley, 1989. Insecticidal Crystal Proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiological Reviews* p. 242-255. Vol. 53. No. 2

Shiro Okumura, Hiroyuki Saitoh, Tomoyuki Ishikawa, Kuniyo Inouye, Eiichi Mizuki, 2010. Mode of action of parasporin-4, a cytotoxic protein from *Bacillus thuringiensis*. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1808 (2011) 1476-1482.

Langdon, Simon P. *Cancer Cell Culture Methods and Protocols*. Humana Press, 2004. ISSN 1543-1894. E-ISBN 1-59259-406-9.

Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72:248–254

Crickmore N, Zeigler DR, Feitelson J, Schnepf E, Rie V, Lereclus D, Dean DH. 1998. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62:807–813.

De Maagd RA, Bravo A, Crickmore N. 2001. How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. *Trends in Genetics* 17:193–199.

Espino-Vazquez A, Gomez-Treviño A, Galan-Wong L, Pereyra-Alferez B. 2012. Isolation of *Bacillus thuringiensis* strains with cytotoxic activity against MOLT-4, a leukemia cell line. In *Microbes in Applied Research: Current Advances and Challenges*, A. Mendez-Vilas (ed.), World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd. Málaga, España pp. 147–151.

Abe Y, Shimada H, Kitada S. 2008. Raft-targeting and oligomerization of parasporin-2, a *Bacillus thuringiensis* crystal protein with anti-tumor activity. *Journal of Biochemistry* 143:269–275.

Akiba T, Abe Y, Kitada S, Kusaka Y, Ito A, Ichimatsu T, Harata K. 2009. Crystal structure of the parasporin-2 *Bacillus thuringiensis* toxin that recognizes cancer cells. *Journal of Molecular Biology* 386:121–133.

Chan KK, Wong RSY, Mohamed SM., Ibrahim TAT, Abdulla M, Nadarajah VD. 2012. *Bacillus thuringiensis* parasporal proteins induce cell cycle arrest and caspase-dependant apoptosis cell death in leukemic cells. *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology* 31:75–86.

Gonzalez E, Granados JC, Short JD, Ammons DR, Rampersad J. 2011. Parasporins from a Caribbean island: Evidence for a globally dispersed *Bacillus thuringiensis* strain. *Current Microbiology* 62:1643–1648.

Kondo S, Mizuki E, Akao T, Ohba M. 2002. Antitrichomonal strains of *Bacillus thuringiensis*. *Parasitology Research* 88:1090–1092.

Nadarajah VD, Chai SH, Mohammed SM, Chan KK, Kanakeswary K. 2006. Malaysian mosquitocidal soil bacterium *Bacillus thuringiensis* strains with selective hemolytic and lectin activity against human and rat erythrocytes. *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health* 37:67–78.

Lee DW, Akao T, Yamashita S, Katayama H, Maeda M, Saitoh H, Ohba M. 2000. Noninsecticidal parasporal proteins of a *Bacillus thuringiensis* serovar *shandongiensis* isolate exhibit a preferential cytotoxicity against human leukemic T cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 272:218–223.

Ibarra JE, Rincón MC, Ordúz S, Noriega D, Benintende G, Monnerat R, Regis L, de Oliveira CMF, Lanz H, Rodriguez MH, Sánchez J, Peña G, Bravo A. 2003. Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains from Latin America with insecticidal activity against different mosquito species. *Applied and Environmental Microbiology* 69:5269–5274.

Okumura S, Ishikawa T, Saitoh H, Akao T, Mizuki E. 2013. Identification of a second cytotoxic protein produced by *Bacillus thuringiensis* A1470. *Biotechnology Letters* 35:1889–1894.

Yasutake K, Binh ND, Kagoshima K, Uemori A, Ohgushi A, Maeda M, Ohba M. 2006. Occurrence of parasporin-producing *Bacillus thuringiensis* in Vietnam. *Canadian Journal of Microbiology* 52:365–372.

Yasutake K, Uemori A, Binh ND, Mizuki E, Ohba M. 2008. Identification of parasporin genes in Vietnamese isolates of *Bacillus thuringiensis*. *Zeitschrift Für Naturforschung* 63c:139–143