

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LAS PARASPORINAS (PS)
PRESENTES EN *BACILLUS THURINGIENSIS* CEPAS IB84 Y GM18**

POR

JESÚS OSWALDO MEDINA LÓPEZ

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

NOVIEMBRE, 2017

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA



**Purificación y caracterización de las parasporinas (PS) presentes en
Bacillus thuringiensis cepas IB84 y GM18**

Por

Jesús Oswaldo Medina López

Como requisito parcial para obtener el grado de
Maestría en Ciencias con Orientación en Microbiología



Purificación y caracterización de las parasporinas (PS) presentes en
Bacillus thuringiensis cepas IB84 y GM18

Comité de Tesis

Dr. Benito Pereyra Alférez
Presidente

Dr. Hamlet Avilés Hurtado
Secretario

Dr. Luis Jesús Galán Wong
1 Vocal

Dra. Myriam Elías Santos
2 Vocal

Dr. Hugo Alberto Luna Olvera
3 Vocal



Purificación y caracterización de las parasporinas (PS) presentes en
Bacillus thuringiensis cepas IB84 y GM18

Dirección de Tesis

A handwritten signature in blue ink, consisting of a large, stylized 'B' followed by 'P' and 'A'.

Dr. Benito Pereyra Alferez

A handwritten signature in blue ink, consisting of a large, stylized 'J' followed by 'A', 'G', and 'T'.

Dr. Jesús Alberto Gómez Treviño
Asesor Externo

Purificación y caracterización de las parasporinas (PS) presentes en
Bacillus thuringiensis cepas IB84 y GM18



Este trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio L4 del Instituto de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Biológicas, UANL bajo la Dirección del Dr. Benito Pereyra Alférez y en la Facultad de Ciencias Químicas, UANL bajo la dirección del Dr. Jesús A. Gómez Treviño.

AGRADECIMIENTOS

A la Ciencia

Si no conozco una cosa, la investigaré.

Louis Pasteur (1822-1895) Químico y microbiólogo francés.

A los hombres les encanta maravillarse. Esto es la semilla de la ciencia.

Emerson (1803-1882) Poeta y pensador estadounidense.

Me has entregado tanto a cambio de solo mi atención y mi tiempo, no me parece un intercambio justo, pero prometo regresarte todo lo que mi capacidad pueda ofrecer y un poco más, el gusto de estudiar biología es algo que tratare de inculcar a cualquier persona que se cruce por mi camino.

Dr. Benito Pereyra Alférez

Doctor, muchas gracias por recibirme en su laboratorio. Muchas gracias por los consejos tanto académicos como para la vida diaria, por su confianza tomando en cuenta que llegue a este laboratorio con solo una idea para un proyecto de un concurso en licenciatura y termine deseando quedarme, y hasta la fecha aquí seguimos, que la frase "No queremos ser técnicos, queremos ser científicos", se ha impreso en mi mente como una ley, espero seguir trabajando con usted en el futuro. Tiene todo mi respeto y admiración.

Postgrado de la Facultad de Ciencias Biológicas

Gracias a la beca y los apoyos otorgados por CONACyT y Postgrado de la FCB, durante la realización de esta investigación así como a todas las facilidades académicas que se proporcionaron durante los años cursados.

A todos los integrantes del Laboratorio L4 del Instituto de Biotecnología, "No solo no hubiéramos sido nada sin ustedes, sino con toda la gente que estuvo a nuestro alrededor desde el comienzo, algunos siguen hasta hoy. GRACIAS... TOTALES!".

DEDICATORIA

A mis padres

A Irma y Jesús, porque gracias a su apoyo pude realizar mis deseos de estudiar la carrera de biología y continuar hasta la culminación con esta tesis, tal vez con algunas quejas de por medio pero aun así permitiéndome elegir mis propias decisiones. Todos mis éxitos de aquí en adelante estarán influenciados por ustedes.

A mi hermana

A Jessica, por su apoyo además de las bromas relacionadas acerca de mi carrera y la suya, por todos los momentos divertidos que hemos pasado juntos a través de los años, porque siempre serás una conexión con mi pasado, mi presente, y esperemos también mi futuro, porque posiblemente no leas esto al menos que te lo muestre (Es un hecho que tendré que mostrártelo para presumir mi tesis), gracias por todo.

A mis amigos

Mencionarlos a todos sería bastante problemático ya que puedo decir que cuento con una gran cantidad de amigos de los cuales conozco desde años, otros con menos tiempo de conocerlos pero de igual importancia, añadiendo que la mayoría de ustedes son bastante sensibles y se molestarían por una lista en orden alfabética, lo mejor será dejarlo con una clásica frase "Ustedes saben quiénes son", gracias por todos los momentos, los consejos, las risas, las pláticas profundas, las pláticas sin sentido que podemos llegar a tener, ustedes son parte de lo que soy ahora y agradezco bastante eso, gracias a todos.

A Mayra

Muchas gracias por los momentos alegres vividos y por los que seguramente vienen en el futuro, siempre apoyándome de la mejor manera en la que puedes hacerlo, lo cual en algunas ocasiones es comprándome comida que engorda...bastante, no tengo forma de recompensar todo el apoyo que me has brindado sin pedirme nada a cambio, me comprometo a regresarlo todo aumentado, ya puedes presumir que estas en una dedicatoria de tesis de Maestría.

INDICE DE CONTENIDO

Título	
Página	
1. RESUMEN.....	XIII
2. INTRODUCCION.....	1
3. ANTECEDENTES.....	2
3.1 Cáncer.....	2
3.1.1. Nuevas estrategias.....	3
3.2. <i>Bacillus thuringiensis</i>	4
3.2.1. Parasporinas.....	7
3.2.2. Parasporina 1.....	11
3.2.3. Parasporina 2.....	13
3.2.4. Parasporina 3.....	15
3.2.5. Parasporina 4.....	16
3.2.6. Parasporina 5.....	17
3.2.7. Parasporina 6.....	18
3.2.8. Parasporina de Malasia.....	19
3.2.9. Modo de acción.....	20
3.2.10. Receptores de membrana.....	20
3.2.11. Apoptosis.....	21
3.2.12. Necrosis.....	22
3.3. Ensayos de citotoxicidad.....	24
3.3.1. Primer estudio.....	24
3.3.2. Otros estudios.....	27
4. JUSTIFICACION.....	30
5. HIPOTESIS.....	31
6. OBJETIVOS.....	32
6.1. OBJETIVO GENERAL.....	32
6.2. OBJETIVOS PARTICULARES.....	32
7. MATERIALES Y METODOS.....	33

7.1. Material Biológico.....	33
7.1.1. Cepas de <i>Bacillus thuringiensis</i>	33
7.1.2. Activación de las inclusiones paraesporales.....	33
7.2. Geles de poliacrilamida.....	35
7.2.1. Geles de dos dimensiones.....	35
7.3. Inmunodetección.....	36
7.4. Cromatografía de intercambio iónico.....	37
7.4.1. Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC).....	37
7.4.2. Nano cromatografía líquida acoplada a espectrómetro de masas	38
en tándem (Nano LC-MS/MS) y MALDI-TOF/TOF.....	
7.5. Analisis de secuencias.....	38
7.6. Bioensayos.....	39
7.6.1. Línea celular.....	39
7.6.2. Ensayos de efecto citopático.....	39
7.6.3. Conteo Directo.....	40
8. RESULTADOS.....	41
8.1. Caracterización morfológica.....	41
8.2. Perfiles proteicos.....	43
8.2.1. Cuantificación proteica.....	43
8.2.2. SDS-PAGE.....	43
8.2.3. SDS-PAGE Bidimensional.....	48
8.3. Inmunodetección.....	50
8.4. Cromatografía.....	51
8.4.1. Cromatografía de intercambio aniónico.....	51
8.4.2. Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC).....	55
8.4.3. Nano cromatografía líquida acoplada a espectrómetro de masas	56
en tándem (Nano LC-MS/MS) y MALDI-TOF/TOF.....	
8.4.3.1. MALDI-TOF/TOF.....	56
8.4.3.2. NANO LC-MS/MS.....	58
8.5. Análisis de secuencias, determinación y modelaje de la estructura	59
terciaria y tridimensional.....	

8.5.1. Analisis de secuencias.....	59
8.5.2. Determinacion y modelaje de la estructura terciaria y tridimensional.....	62
8.6. Bioensayos.....	65
9. DISCUSION.....	68
9.1. Caracterización morfológica.....	68
9.2. Perfiles proteicos.....	69
9.3. Inmunodetección.....	71
9.4. Cromatografía.....	72
9.4.1. Cromatografía de intercambio aniónico.....	72
9.4.2. Cromatografía liquida de alta eficacia (HPLC).....	74
9.4.3. MALDI-TOF/TOF.....	74
9.4.4. Nano cromatografía liquida acoplada a espectrómetro de masas en tándem (Nano LC-MS/MS).....	75
9.5. Análisis de secuencias, determinación y modelaje de la estructura terciaria y tridimensional.....	76
9.6. Bioensayos.....	79
10. CONCLUSIONES.....	81
11. PERSPECTIVAS.....	83
12. BIBLIOGRAFIA.....	84
13. RESUMEN BIBLIOGRAFICO.....	93

INDICE DE TABLAS

Tabla	Título	Pág.
I	Características principales de las Parasporinas reportadas.	8
II	Espectro citotóxico de las principales Parasporinas.	26
III	Condiciones IEF.	36
IV	Información de la línea celular del estudio.	39
V	Componentes para los ensayos de citotoxicidad.	39
VI	Cuantificación de proteínas con absorbancia a 595 nm.	44
VII	Curva de calibración para la cuantificación de proteínas.	44
VIII	Secuencias en la banda superior de 38 kDa de GM18 61	61
IX	Secuencias en la banda inferior de 28 kDa de GM18 61	61
X	Secuencias en la banda inferior de 28 kDa de IB84 62	62

INDICE DE FIGURAS

Fig.	Título	Pág.
1	Dendrograma que muestra la relación filogenética de las diferentes PS.	9
2	Estructura y dominios típicos de las proteínas Cry.	10
3	Estructura de proteínas formadoras de poros representantes de la familia de las aerolisinas.	11
4	Predicción de la estructura tridimensional de la PS1 (PS1Aa1).	13
5	Predicción de la estructura tridimensional de la PS2 (PS2Aa1).	15
6	Predicción de la estructura tridimensional de la PS3 (PS3Aa1).	16
7	Predicción de la estructura tridimensional de la PS4 (PS4Aa1).	17
8	Predicción de la estructura tridimensional de la PS5 (PS5Aa1).	18
9	Predicción de la estructura tridimensional de la PS6 (PS6Aa1).	19
10	Representación de los fragmentos tóxicos de las principales Parasporinas.	19
11	Modo de acción de las Parasporina-1.	23
12	Modo de acción de las Parasporina-2.	24
13	Crecimiento en placa con agar nutritivo.	42
14	<i>Bacillus thuringiensis</i> .	42
15	Perfiles proteicos de los cristales de las cepas IB84 y GM18.	46
16	Proteína purificada de la cepa IB84.	46
17	Proteína purificada de la cepa GM18.	47
18	Gel 2D de las protoxinas de las cepas IB84 y GM18.	49
19	Muestras extraídas para el análisis Nano LC-MS/MS y MALDI-TOF/TOF.	49
20	Dot Blots con anticuerpos Anti-GM18 (S y A)	50
21	Cromatografía de intercambio aniónico de la cepa GM18.	52
22	Cromatografía de intercambio aniónico de la cepa IB84.	53
23	Cromatografía de intercambio aniónico de la cepa IB84 purificada (A) y cepa GM18 purificada (B).	54
24	Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) de la cepa GM18.	55
25	Análisis MALDI-TOF/TOF	57
26	Análisis Nano LC-MS/MS GM18	58
27	Análisis Nano LC-MS/MS IB84	59
28	Secuencia de aminoácidos (FASTA) de Cry1Jb	60
29	Secuencia de aminoácidos (FASTA) de Cry15Aa	61
30	Modelo de la Protoxina Cry1Jb con las secuencias de la Parasporina en la cepa GM18.	63
31	Modelo de la toxina Cry1Jb con las secuencias de la Parasporina en la cepa GM18.	64
32	Modelo de la toxina Cry15Aa con las secuencias de la Parasporina en la cepa IB84.	65
33	Ensayos de una sola dosis en la línea celular MOLT-4 a 24 h.	67
34	Ensayos de una sola dosis en la línea celular MOLT-4 a 48 h.	67

LISTA DE SIMBOLOS Y ABREVIATURAS

α	Alfa
ATP	Adenosín trifosfato
β -TPF Toxinas formadoras de poro beta	Toxinas formadoras de poro beta
δ Delta	Delta
ADN Ácido Desoxirribonucleico	Ácido Desoxirribonucleico
ADNc Ácido Desoxirribonucléico	Ácido Desoxirribonucléico
complementario	complementario
ATCC American Type Culture Collection	American Type Culture Collection
<i>Bacillus thuringiensis</i>	Bt
CE ₅₀	Concentración efectiva media
DMEM	Medio de Eagle Modificado de Dulbecco
DMSO	Dimetil Sulfóxido
DTT	Ditiotreitol
EC	Efecto citotóxico
EDTA	Dihidrato del Ácido Etilendiamino Tetraacético Disódico
M	Concentración Molar
mM	Milimolar
ml	Mililitros
mQ	Agua de grado molecular
N	Concentración Normal
NaCl	Cloruro de Sodio
NaOH	Hidróxido de Sodio
NCBI	National Center for Biotechnology Information
nM	Nanómetros
Parasporina	Ps
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
Rpm	Revoluciones por minuto
SDS Sodecilsulfato Sódico	Sodecilsulfato Sódico
SDS-	Electroforesis en gel de poliacrilamida con Sodecilsulfato Sódico
TBS Buffer Tris Salino	Buffer Tris Salino
TFP Toxinas Formadoras de Poros	Toxinas Formadoras de Poros
μ g Microgramos	Microgramos
μ l Micro litros	Micro litros
μ m Micrómetros	Micrómetros
μ M Micro Molar	Micro Molar

1. RESUMEN

Las Parasporinas (Ps) sintetizadas por *Bacillus thuringiensis* presentan actividad biológica específica contra algunos tipos de cáncer *in vitro* y tienen baja o nula actividad hacia células normales. Analizamos cepas de *B. thuringiensis* productoras de Parasporinas y purificamos las proteínas, a través de SDS-PAGE se realizaron perfiles proteicos, a su vez fueron realizadas inmunodetecciones por medio de DOT BLOT usando anticuerpos policlonales específicos hacia Parasporinas de la familia PS1 y familia PS4 y contra los cristales de nuestra cepa GM18. Las cepas han producido Parasporinas como se esperaba durante el proceso de esporulación, y estas se han purificado a través de diálisis por membrana con un poro de 30 kDa y 12 kDa dependiendo de la cepa tratada, filtraciones con membranas de nitrocelulosa con un diámetro de poro de 0.45 y 0.22 μm , y cromatografía de intercambio aniónico en un gradiente de NaCl de 0.0 a 1 M a 4°C, dando patrones característicos para cada cepa, GM18 presentando dos señales altas de proteínas en la fracción 27 (13.5 min, 202 mM NaCl) y fracción 46 (23 min, 690 mM NaCl), siendo la fracción 27 (13.5 min, 202 mM NaCl) la que contiene la proteína de interés, e IB84 presentando tres señales altas de proteínas en la fracción 26 (13 min, 195 mM NaCl), fracción 42 (21 min, 630 mM NaCl) y fracción 48 (24 min, 949 mM NaCl), la proteína se encuentra presente en la fracción 26. El perfil proteico muestra a GM18 produciendo una Parasporina de alrededor de 110 kDa en su estado como protoxina y dos fragmentos de 38 kDa y 26 kDa cuando es activada, IB84 presenta una Parasporina de alrededor de 36 kDa en su estado como protoxina y 26 kDa en su estado activo. El análisis en base a Nano LC-MS/MS presento similitudes entre la Parasporina de la cepa GM18 y la Toxina Cry1Jb y la Parasporina de la cepa IB84 con la Toxina Cry15Aa. El análisis de las secuencias y modelaje de las proteínas genero una proteína parecida a las características toxinas Cry convencionales y las Parasporina-1 y -3 para la cepa GM18 en base al modelo Cry1Jb y una proteína parecida a las Parasporinas-2 y -4 y las aerolisinas para la cepa IB84 en base al modelo Cry15Aa. Se demostró el efecto citotóxico de las Parasporinas purificadas de las cepas IB84 y GM18 sobre la línea celular MOLT-4 con un porcentaje de supervivencia de 54.60% (GM18) y 61.84% (IB84) después de 48 h.

1. ABSTRACT

The parasporins (Ps) synthesized by *Bacillus thuringiensis* have specific biological activity against some types of cancer in vitro and have low or no activity toward normal cells. We analyzed *B. thuringiensis* strains PS producers and purified those proteins, via SDS-PAGE, protein profiles were performed, successively We performed immunodetections by DOT BLOT using polyclonal antibodies specific to PS1 and PS4 parasporins family and against crystal proteins of our GM18 strain. Our Strains produced parasporins as expected during sporulation, and these were purified through dialysis membrane with a pore 30 kDa and 12 kDa depending on the treated strain, filtrations through nitrocellulose membranes with a pore diameter 0.45 and 0.22 μm , and anion exchange chromatography in a gradient of NaCl from 0.0 to 1 M at 4 ° C, giving characteristic patterns for each strains, GM18 presenting two high signals proteins in fraction 27 (13.5 min, 202 mM NaCl) and fraction 46 (23 min, 690 mM NaCl), the fraction 27 (13.5 min, 202 mM NaCl) which contains the protein of interest, and IB84 presenting three high signals proteins in fraction 26 (13 min, 195 mM NaCl), fraction 42 (21 min, 630 mM NaCl) and fraction 48 (24 min, 949 mM NaCl), the protein is present in fraction 26. the protein profile shows GM18 producing a parasporin of 110 kDa in its status as protoxin and two fragments of 38 and 26 kDa when it were activated, IB84 has a parasporin of about 36 kDa in its status as protoxin and 26 kDa in activated state. The Nano LC-MS / MS analysis showed similarities between GM18 Parasporin and Cry1Jb toxin and IB84 Parasporin with Cry15Aa Toxin. Sequence analysis and protein modeling generated a protein similar to the conventional Cry toxins and Parasporin-1 and -3 for the GM18 strain based on the Cry1Jb model and a Parasporin-2 and -4 like protein for IB84 strain based on the Cry15Aa model. The cytotoxic effect of purified Parasporins from IB84 and GM18 strains was demonstrated on the MOLT-4 cell line with a survival rate of 54.60% (GM18) and 61.84% (IB84) after 48 h.

2. INTRODUCCION

Bacillus thuringiensis (Bt) es una bacteria Gram positiva, facultativa y ubicua ya que se ha aislado de todas partes del mundo y de diversos ecosistemas como suelo, agua, hojas, insectos, etc. Es un miembro del grupo de *Bacillus cereus*, el cual incluye otras cinco especies: *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus Pseudomycoide* y *Bacillus weihenstephanensi* (Soufiane y Côté 2013). Bt se diferencia del resto de los miembros del grupo por sintetizar un cuerpo paraesporal de naturaleza proteica, conocido como cristal. El cristal está constituido por proteínas denominadas δ -endotoxinas también conocidas como proteínas Cry (altamente específicas) y Cyt (hemolíticas e inespecíficas) (Schnepf *et al.* 1998). Se han encontrado δ -endotoxinas letales contra lepidópteros, coleópteros, dípteros, himenópteros, ácaros y también contra otros invertebrados como nematodos, gusanos planos y tricomonas (Kondo *et al.* 2002).

En años recientes, se demostró que algunas proteínas Cry no presentan características tóxicas contra insectos, nematodos o protozoarios pero sí actividades biológicas interesantes, como son las lactinas (Akao *et al.* 1999), o anti-cancerígenas (Mizuki *et al.* 2000) en condiciones artificiales. A estas proteínas con alta capacidad citotóxica hacia las células cancerígenas e inocuas hacia las células normales, se les denominó Parasporinas (PS) (Kim *et al.* 2003). Las PS muestran un espectro de actividad muy heterogéneo, modo de acción y secuencias aminoacídicas entre las diferentes familias en las que se clasifican (Committe of Parasporin Classification and Nomenclature 2010). No obstante, todas tienen en común ciertos aspectos: i) No poseen actividad insecticida conocida (Lee *et al.* 2000); ii) deben ser digeridas por proteólisis para su activación (Okumura *et al.* 2006); iii) presentan una alta toxicidad a células humanas de cáncer; iv) baja o nula hacia células normales (Ohba *et al.* 2009); y v) tienen poca similitud con otras proteínas Cry (Ichikawa *et al.* 2007).

En el presente estudio se pretende purificar las Parasporinas presentes en nuestras cepas IB84 y GM18 para ser utilizadas en bioensayos en una línea celular de cáncer.

3. ANTECEDENTES

3.1 Cáncer

El cáncer es un término genérico que designa un amplio grupo de enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del organismo. Inicia con la transformación de una sola célula que se divide de manera descontrolada hasta convertirse en una masa tumoral, y en procesos más avanzados, llegar a invadir partes adyacentes del cuerpo o propagarse a otros órganos. Su complejidad radica en que no se trata de una sola enfermedad, sino que engloba más de 200 tipos de padecimientos. Además, su desarrollo implica una gran cantidad de factores, desde genéticos hasta medio ambientales (Wong 2012).

En la actualidad, el cáncer es una de las primeras causas de muerte a nivel mundial, tan solo en el 2012 se le atribuyeron 8,2 millones de muertes (OMS 2012); en donde los de mayor incidencia se encuentran el cáncer de pulmón, seno y colorectal (Ferlay *et al.* 2013). También representa una de las enfermedades más costosas. En 2008 se invirtió 20% más en el tratamiento del cáncer que en otras enfermedades mayores (American Cancer Society and Livestrong 2010). En los Estados Unidos, el costo en gastos médicos relacionados al cáncer fue de \$201.5 y ocasionó cerca de \$124 billones en pérdidas de productividad debido a muertes prematuras (Luo *et al.* 2013). No obstante, en la actualidad más gente sobrevive al cáncer que en el pasado. Para el 2012 hubo casi 2 millones más de sobreviviente de lo estimado, superando las expectativas de sobrevivencia calculadas desde el 2008 para ese año. Esto, en gran medida como resultado de la inversión en investigación enfocada en el estudio, prevención y tratamiento de los diferentes tipos de cáncer (Siegel *et al.* 2013).

3.1.1 Nuevas estrategias terapéuticas

Los principales procedimientos para la erradicación de los diferentes tipos de cáncer son la quimioterapia, radioterapia y la cirugía; que resultan muy invasivos y con un gran número de efectos secundarios o secuelas. Recientemente, nuevos métodos de detección, diagnóstico y tratamiento del cáncer, han surgido gracias a décadas de investigación. Entre las más prometedoras tecnologías se encuentran: i) la inmunoterapia, que utiliza moléculas que estimulan el sistema inmune para la destrucción de cierto tipo de tumores (Clynes *et al.* 2000); ii) terapias moleculares, dirigidas hacia tipos específicos de células cancerosas, bloqueando su crecimiento anormal por interferencia en la señalización intracelular (Verma *et al.* 2012) y iii) nanotecnología, para la implementación de fármacos por medio de nano partículas (Socinski *et al.* 2012).

Dentro del desarrollo en investigación de nuevos fármacos, existe una rama dedicada al descubrimiento e implementación de compuestos de origen natural para el combate de células cancerosas. Específicamente, compuestos con actividades anti-cancerígena producidos por microorganismos, como las bacterias, presentan algunas ventajas sobre otras fuentes naturales. Una muy evidente, es su alta tasa de crecimiento, que favorece a una acelerada producción de compuestos, al igual que su versatilidad para crecer en medios de cultivo preparados a partir de residuos agroindustriales, lo que reduce costos de producción, sin dejar de lado su amplia biodiversidad, que aumenta el potencial para la búsqueda de nuevos compuestos. Adicionalmente, las bacterias pueden manipularse fácilmente e incluso modificarse genéticamente, para una incalculable cantidad de aplicaciones biotecnológicas (Harvey 2008).

3.2. *Bacillus thuringiensis*

En 1911, Berliner describió por primera vez una nueva cepa de bacilo, *Bacillus thuringiensis*, aislada de la polilla mediterránea *Anagastakuehniella* (Berliner 1911). Lo nombró después de la provincia de Turingia, en Alemania, donde se encontró la polilla infectada. Roh *et al.* (2007) señaló que la cepa apareció por primera vez bajo este nombre, pero fue aislado en 1901 por el científico japonés Ishiwata Shigetane como el agente causante de una enfermedad que afecta a los gusanos de seda.

La cepa bacteriana se pensó por primera vez como una amenaza para los gusanos de seda, pero más tarde se utilizó como agente insecticida. La primera producción comercial del agente como pesticida fue en Francia en 1938 bajo el nombre de "Sporeine" (Lambert y Peferoen 1992). Luego, en 1956 el microbiólogo canadiense Angus demostró que las inclusiones de proteínas cristalinas formadas en el curso de la esporulación eran responsables de la acción insecticida (Angus 1956).

Posteriormente, los científicos americanos (Gonzalez *et al.* 1982) encontraron que los genes que codifican las proteínas de cristal (Cry) se localizaron en plásmidos transmisibles, utilizando una técnica de extracción de plásmidos.

Schnepf y Whiteley (1981) primero clonaron y caracterizaron los genes que codifican las proteínas Cry que tenían toxicidad a las larvas del gusano cornudo del tabaco, a partir del ADN plasmídico de *B. thuringiensis*, subpps. Kurstaki HD-1. Esta primera clonación fue seguida rápidamente por la clonación de muchos otros genes Cry y condujo eventualmente al desarrollo de plantas transgénicas de *B. thuringiensis*. En la década de 1980, varios científicos demostraron sucesivamente que las plantas pueden ser genéticamente modificadas, y finalmente, el algodón de *B. thuringiensis* llegó al mercado en 1996 (Roh *et al.* 2007; Shelton *et al.* 2002).

La bacteria insecticida *B. thuringiensis* es una bacteria gram-positiva productora de esporas que produce inclusiones proteínáceas durante la esporulación (Roh *et al.* 2007). Estas inclusiones se pueden distinguir como cristales de forma distintiva por microscopía de contraste de fase. Las inclusiones están compuestas de proteínas conocidas como proteínas Cry, o δ -endotoxinas, que son altamente tóxicas para una amplia variedad de insectos agrícolas y de salud importantes, así como otros

invertebrados (en su mayoría específicos para insectos y nemátodos) (Roh *et al.* 2007). Debido a su alta especificidad y su seguridad para el medio ambiente, las proteínas Cry son una alternativa valiosa a los plaguicidas químicos para el control de plagas de insectos en la agricultura y la silvicultura y en el hogar. Se ha propuesto que el uso racional de las toxinas Bt proporcionará una variedad de alternativas para el control de los insectos y para superar el problema de la resistencia de los insectos a los plaguicidas (Roh *et al.* 2007). Es bien conocido ahora que la actividad insecticida de las proteínas Cry es inducida por su unión específica al receptor localizado en la membrana plasmática de las células epiteliales del intestino medio de los insectos susceptibles (Ohba *et al.* 2009). Esta propiedad hace de *B. thuringiensis* un agente microbiano ambientalmente seguro y ecológicamente sano en el control de las plagas de insectos agrícolas (Ohba *et al.* 2009).

B. thuringiensis parece ser autóctono a diversos ambientes. Las cepas de este bacilo se aislaron en todo el mundo a partir de suelo, insectos, polvo almacenado y hojas caducifolias y coníferas (Roh *et al.* 2007; Jensen *et al.* 2003). *B. thuringiensis* pertenece a la familia Bacillaceae y está estrechamente relacionado con *B. cereus* (Jensen *et al.* 2003), la única diferencia fenotípica notable entre estas dos especies de bacilos es la producción de uno o más cristales insecticidas. Sin embargo, existen muchas cepas productoras de cristal de *B. thuringiensis* sin actividades insecticidas conocidas. Además, se han descrito muchas cepas cristalizadoras y se pueden obtener fácilmente por mutagénesis química o por extracción con plásmido, dando como resultado células que no se pueden distinguir de *B. cereus*. Por otra parte, estudios recientes de una serie de marcadores moleculares en un gran conjunto de cepas han indicado que *B. thuringiensis* y *B. cereus* deben considerarse como una especie (Roh *et al.* 2007).

El bacilo también se ha utilizado con éxito para suprimir los niveles de población de plagas dípteras médicamente importantes. Los ejemplos incluyen los mosquitos vectores de la malaria, las enfermedades víricas (incluyendo la fiebre hemorrágica del dengue y la fiebre del Nilo Occidental) y la filariasis linfática, y la mosca negra que transmite la oncocercosis (Ohba *et al.* 2009). De particular interés en los hallazgos recientes es que

una actividad terapéutica contra el parásito de la anquilostoma humana y animal está asociada con una única proteina Cry de *B. thuringiensis* (Capello *et al.* 2006).

Dado que el bacilo puede matar a los parásitos, se estudió por su actividad contra *Trichomonas vaginalis* (Kondo *et al.* 2002) una infección de transmisión sexual que afecta a 170 millones de personas en todo el mundo (Sobel *et al.* 2001). Kondo *et al.* (2002) estudiaron las proteínas de inclusión parasporal de un total de 816 cepas de *B. thuringiensis* aisladas en Japón para actividad antitrichomonal contra *T. vaginalis*. Diez cepas de *B. thuringiensis* inhibieron el crecimiento de *T. vaginalis* en cultivos de 48 h. Además, dos cepas, B622 y B626, mostraron claramente efectos tricomonociales contra *T. vaginalis*. Los serotipos de antígeno H de ambas cepas se identificaron como H13 / 29 (*pakistani / amagiensis*)

Se esperaba que la Ley de Protección de la Calidad de los Alimentos de los Estados Unidos y las Directivas del Consejo Económico Europeo destinadas a reducir el uso de los insecticidas carbamato y organofosfato aumentaran el uso de compuestos "blandos", como el *B. thuringiensis* (Whalon y Wingerd 2003).

En el aspecto general Bt es una bacteria Gram positiva formadora de esporas, la cual ha sido ampliamente utilizada como bioinsecticida por las ventajas que representa su uso en campo. Produce una toxina cristalizada (Cry) que al solubilizarse e incrustarse de manera específica en la membrana celular del intestino medio del insecto hospedero genera poros que ocasionan la lisis celular, lo que a su vez conduce con la muerte del insecto, dicha acción es (por lo general) específica para insectos plaga (Roh *et al.* 2007).

3.2.1. Parasporinas

Las Parasporinas son definidas como un nuevo grupo de proteínas Cry sintetizadas por *B. thuringiensis* o bacterias relacionadas, que presentan actividad biológica específica contra células de cáncer y tienen baja o nula actividad hacia células normales (Mizuki *et al.* 2000).

Hasta la fecha se han establecido 6 familias de Parasporinas PS1 (Cry31), PS2 (Cry46), PS3 (Cry41), PS4 (Cry45), PS5 (Cry64) y PS6 (Cry63) por el Comité para la Clasificación y Nomenclatura de Parasporinas (Committe of Parasporin Classification and Nomenclature 2010). Las PS fueron comparadas en diversos indicadores tales como, talla molecular (kDa), punto isoeléctrico (pI) y país de origen (Tabla I). En esta comparación se demuestra que, aunque los países asiáticos muestran un mayor número de PS, las cepas de Bt con estas características se encuentran de manera global. Tal es el caso de los reportes para Canadá y las islas del Caribe. Con respecto al pI, a pH cercano a 6.0 la solubilidad de todas las proteínas paraesporales es cero, razón por la cual al solubilizar los cristales paraesporales llevamos el pH 10.0 y, posteriormente, a pH 8.0 en cuanto comienza la digestión proteolítica (Peña 2004).

Tabla I. Características principales de las Parasporinas reportadas

Parasporina	No. Cry	Cepa	Gen (pb)	Protoxina kDa	Punto isoelectrico	Toxina(s) kDa	País-Región	Referencia
PS1Aa1	Cry31Aa1	A1190	2,169	81	5.95	15 y 56	Japón	(Mizuki <i>et al.</i> 2000)
PS1Aa2	Cry31Aa2	M15	2,226	83	5.93		Canadá	(Jung <i>et al.</i> 2007)
PS1Aa3	Cry31Aa3	B195	2,169	81	5.95		Japón	(Uemori <i>et al.</i> 2008)
PS1Aa4	Cry31Aa4	Bt 79-25	2,169	81	5.95		Vietnam	(Yasutake <i>et al.</i> 2008)
PS1Aa5	Cry31Aa5	Bt 92-10 64-1-94,	2,169	81	5.95		Vietnam	(Yasutake <i>et al.</i> 2008)
PS1Aa6	Cry31Aa6	M019	2,262	84	5.97	15 y 55	Japón, Caribe, Canadá	(Nagamatsu <i>et al.</i> 2010)
PS1Ab1	Cry31Ab1	B195	2,178	82	5.97		Japón	(Uemori <i>et al.</i> 2008)
PS1Ab2	Cry31Ab2	Bt 31-5	2,178	82	5.97		Vietnam	(Yasutake <i>et al.</i> 2008)
PS1Ac1	Cry31Ac1	Bt 87-29	2,331	87	5.92		Vietnam	(Yasutake <i>et al.</i> 2008)
PS1Ac2	Cry31Ac2	B0462 64-1-94,	2,331	87	5.96	15 y 60	Japón	(Kuroda <i>et al.</i> 2013)
PS1Ad1	Cry31Ad1	M019	2,262	84	5.92	15 y 55	Japón,Caribe, Canadá	(Nagamatsu <i>et al.</i> 2010)
PS1Ad2	Cry31Ad1	64-1-94*	2,277	85	5.92		Caribe	(GenBank AGO57767.1)
PS2Aa1	Cry46Aa1	A1547	1,014	37	5.91	28	Japón	(Ito <i>et al.</i> 2004)
PS2Aa2	Cry46Aa2	A1470	1,011	37	5.90	30	Japón	(Okumura <i>et al.</i> 2013)
PS2Ab1	Cry46Ab1	TK-E6	912	33	5.91		Japón	(Hayakawa <i>et al.</i> 2007)
PS3Aa1	Cry41Aa1	A1462	2,475	94	6.00	64	Japón	(Yamashita <i>et al.</i> 2005)
PS3Ab1	Cry41Ab1	A1462	2,487	94	6.00		Japón	(Yamashita <i>et al.</i> 2005)
PS4Aa1	Cry45Aa1	A1470, T98*	2,487	30	5.99	26.8	Japón	(Okumura <i>et al.</i> 2004)
PS5Aa1	Cry64Aa1	A1100* 64-1-94,	918	34	5.79		Japón	(GenBank AB555650.1)
PS6Aa1	Cry63Aa1	M019	2,259	85	5.98	14 y 59	Japón,Caribe, Canadá	(Nagamatsu <i>et al.</i> 2010)

* Datos no publicados

Al realizar la comparación de la estructura primaria de las diversas PS, se encontró una relación filogenética importante. El orden de jerarquía es: i) número arábigo (1, 2, 3, 4, etc.) para una similitud de al menos 45%; ii) letra mayúscula y minúscula que denota una similitud de 78%; y iii) letra minúscula una similitud de hasta el 95% y iv) número que indica homología mayor que 95%. De esta manera, las PS se han clasificado en 6 clases, PS1-PS6 y en cada clase varios miembros (Fig. 1). Ésta clasificación es la misma propuesta para proteínas Cry de Crickmore *et al.* en 1998.

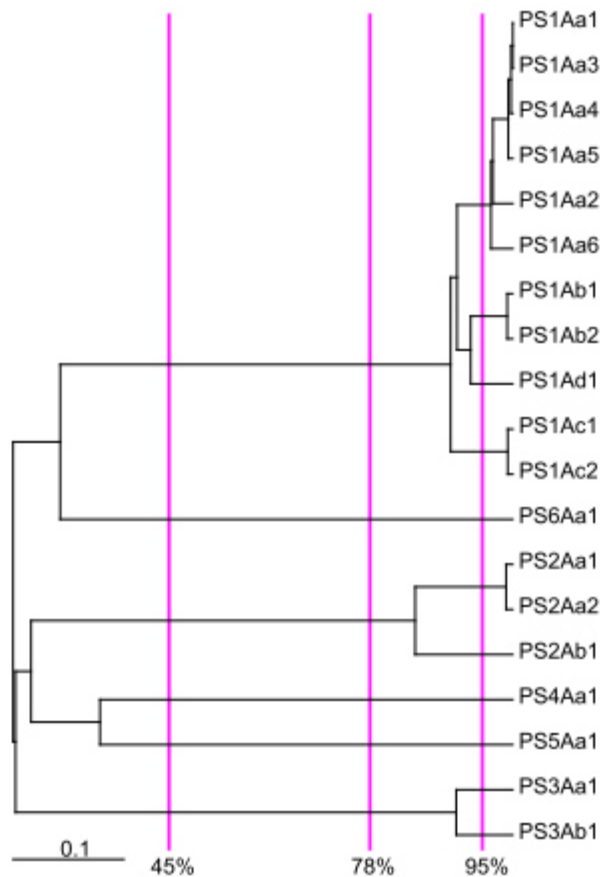


Figura 1. Dendrograma que muestra la relación filogenética de las diferentes PS.

Como ya se mencionó, las PS son sintetizadas como protoxinas y para adquirir su conformación tóxica primero se deben solubilizar a pH alcalino o ácido (Okumura *et al.* 2006) y posteriormente ser digeridas por serín proteasas, como la proteinasa K (Ohba *et al.* 2009). Como se verá a lo largo del proyecto, es relevante activar sus fragmentos

tóxicos para estimar la unión antígeno-anticuerpo, en todas las etapas de la digestión proteolítica.

Con respecto a su conformación tridimensional, los estudios sobre las estructuras proteínicas secundarias y terciarias de las proteínas Cry insecticidas señalan 3 dominios (I, II y III, de amino a carboxilo terminal), característicos que son los que le dan su actividad citotóxica, donde el dominio I, formado por 7 α -hélices, es el responsable de formar el poro en la membrana celular; dominios II y III, formados por β -plegadas, están implicados en el reconocimiento al receptor. Por tanto, confieren la especificidad (Fig. 2). Si bien, estos mismos dominios son observados en las PS1, PS3 y PS6; pero no en PS2 y PS4. Estas últimas no presentan la estructura típica de tres dominios y han sido más relacionadas a otras toxinas formadoras de poros (TFP's) con las aerolisinas (Fig. 3) (Akiba *et al.* 2004; Xu *et al.* 2014).

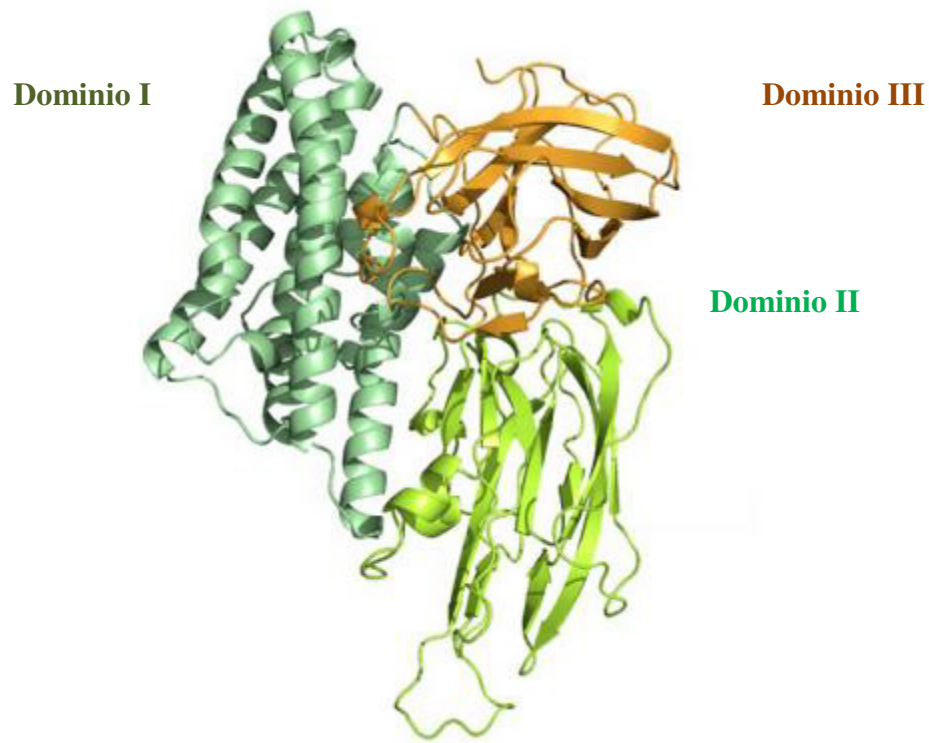


Figura 2. Estructura y dominios típicos de las proteínas Cry.

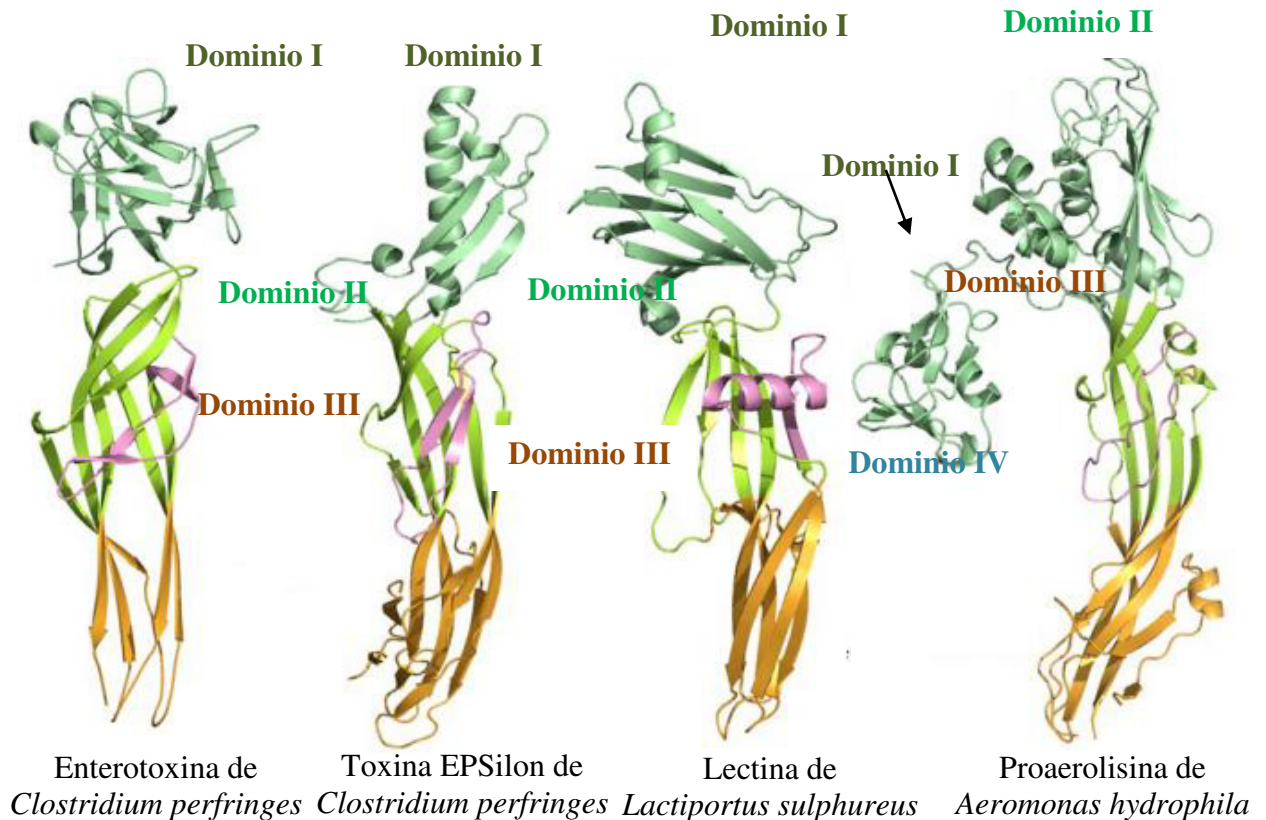


Figura 3. Estructura de proteínas formadoras de poros representantes de la familia de las aerolisinas. La unión N-dominio es color verde pálido. Las regiones de inserción de membrana y formación de poros son de color verde limón y naranja brillante. El color rosa indica la sección anfipática β -horquilla y sugiere ser la responsable de la formación de poros (Xu *et al.* 2014).

3.2.2. Parasporina 1

Según el Comité de Parasporina Clasificación y Nomenclatura (<http://parasporin.fitc.pref.fukuoka.jp/>), la proteína de 81 kDa constituye la familia Parasporina -1Aa (PS1Aa) (Fig. 4). En el actual esquema de clasificación (contiene proteína Cry de tres dominios, activada por digestión en N-terminal) (Ohba *et al.* 2009). Esta proteína PS1Aa1, correspondiente a Cry31Aa1, es un polipéptido de 723 aminoácidos con un peso molecular de 81.045. El gen tiene 2,169 pb de largo. Esta proteína tiene una estructura del tipo de tres dominios, cuya secuencia de aminoácidos contiene cinco bloques conservados comúnmente conservados en proteínas Cry insecticidas (Ohba *et al.* 2009; Mizuki *et al.* 1999, 2000). La primera Parasporina 1

descubierta se aisló de la cepa A1190 de *B. thuringiensis* (anteriormente 84-HS-1-11) (Mizuki *et al.* 2000; Katayama *et al.* 2005). En el grupo de Parasporinas 1, PS1Aa1 consiste en fragmentos de 15- y 56-kDa (Fig. 10) y se genera por activación con tripsina de la protoxina pro-PS1Aa1 de 81 kDa (Mizuki *et al.* 1999). Estos dos fragmentos están estrechamente asociados entre sí como un complejo activo, que no podría separarse incluso en presencia de agentes detergentes desnaturizantes. Según el análisis estructural, los fragmentos de 15 y 56 kDa podrían disponerse en un heterodímero en una proporción de 1: 1 (Katayama *et al.* 2005).

PS1Aa1 presenta una fuerte pero específica citotoxicidad frente a HeLa, MOLT-4 (células T Leucémicas), células HL60 (células promielocíticas), con una CL50 de 0,12, 2,2 y 0,32 $\mu\text{g} / \text{mL}$, respectivamente. El análisis de la membrana celular mediante el ensayo de fugas de LDH ha demostrado que la Parasporina-1 no afecta a la permeabilidad de la membrana. Además, en células HeLa, los cambios limitados de concentración de fluorescencia después de ser tratadas con Parasporina-1 han demostrado que la Parasporina-1 puede no formar poros en la membrana.

De otra manera, la Parasporina-1 podría promover la afluencia de Ca^{2+} del buffer extracelular, y el inhibidor de la proteína G, suramina, puede suprimir la afluencia de Ca^{2+} y la citotoxicidad de la Parasporina-1 (Katayama *et al.* 2005, 2007). Por lo tanto, se propuso que en lugar de formar poros en la membrana, la Parasporina-1 induce la muerte celular por una vía apoptótica con un único mecanismo citotóxico (Katayama *et al.* 2007; Ohba *et al.* 2009). Curiosamente, se informó que la Parasporina-1 podría unirse al receptor Beclina 1 en la membrana celular (Katayama *et al.* 2011).

En mamíferos, Beclina 1 existe en líneas de células de carcinoma epitelial de mama humano con expresión limitada, pero abundante en el epitelio de mama normal (Liang *et al.* 1999), juega un papel clave en los procesos de autofagia y es crucial en varias vías en todas las especies eucarióticas (Wirawan *et al.* 2012). La interacción de la Parasporina-1 con Beclina 1 y su mecanismo de citotoxicidad están a la espera de ser aclarado. Varias conclusiones se extrajeron del estudio respecto a PS1: 1) es citotóxica contra células HeLa y MOLT-4; 2) aumenta la afluencia de Ca^{2+} el cual no se relacionó con canales de Ca^{2+} extracelular pero sí con canales de Ca^{2+} intracelular; 3) Las

proteínas G o las proteínas G acopladas a receptores están implicadas en la actividad de la Parasporina-1 y por tanto la afluencia de Ca^{2+} intracelular; 4) no forma poros (TFP); y 5) el modo de acción más probable es por apoptosis (Wong, 2010).

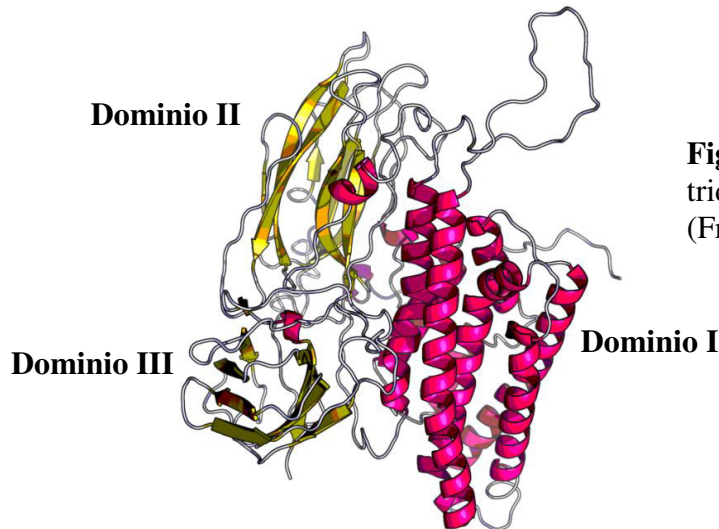


Figura 4. Predicción de la estructura tridimensional de la PS1 (PS1Aa1) (Franco 2015).

3.2.3 Parasporina 2

La Parasporina-2 (Fig. 5) se descubrió por primera vez en la cepa A1547 (anteriormente 94-F-45-14), que pertenece a *B. thuringiensis* serovar *dakota* (H15) (Mizuki *et al.* 1999; Kim *et al.* 2000). La protoxina pro-PS2Aa1 inactiva es de aproximadamente 37 kDa y tiene una similitud limitada con la mayoría de las proteínas Cry o Cyt establecidas, pero comparte una identidad de secuencia de 23,5% con Cry15Aa, que pertenece a las toxinas tipo MTX de *L. sphaericus* (Ito *et al.* 2004; Akiba *et al.* 2009). La protoxina pro-PS2Aa1 digerida por proteínasa K genera una forma activa de 30 kDa después de la proteólisis en ambos N- y C-terminal (Ohba *et al.* 2009; Kitada *et al.* 2006; Ito *et al.* 2004). La toxina activada muestra alta citotoxicidad a MOLT-4, Jurkat (célula T Leucémica), Sawano (célula de cáncer de útero) y HepG2 (célula de cáncer de hepatocitos humanos) con la CL50 entre 10-40 ng / mL. El estudio inicial propuso que la Parasporina-2 es específicamente dirigida a las proteínas receptoras en la membrana e induce daño celular (Ito *et al.* 2004). Más tarde, se reveló que la Parasporina-2 podría vincularse selectivamente a colesterol en la membrana de la

célula de cáncer humano (Kitada *et al.* 2006; Abe *et al.* 2008). Los experimentos han demostrado que la delección del colesterol puede estar relacionada con una reducción en la eficacia de la oligomerización.

Estos resultados sugirieron que la Parasporina-2 puede ser una toxina dirigida a la balsas lipídicas y podría transformarse en una conformación hidrófoba por oligomerización, lo que induciría la formación de poros (Abe *et al.* 2008). Entre los candidatos como receptores, la Parasporina-2 muestra una ligera dependencia del colesterol, pero un requisito obvio es las proteínas ancladas a GPI, que se encuentran principalmente en el colesterol y esfingolípidos (Legler *et al.* 2004; Lingwood *et al.* 2009; Kitada *et al.* 2009). Es posible que la región de glicano de GPI también puede ayudar a la Parasporina-2 uniéndola a la superficie y luego montándola en la membrana (Kitada *et al.* 2009). En consecuencia, se ha presentado un modelo de mecanismo de múltiples etapas: al principio, la parasporina-2 se uniría a los receptores anclados en GPI u otras proteínas en la membrana; entonces, cuando la toxina se concentra y se oligomeriza, se forman los poros transmembranales, lo que daña la permeabilidad de la membrana (Kitada *et al.* 2009).

La PS2Aa1 ya digerida proteolíticamente es una TFP que causa aumento de la permeabilidad a las células susceptibles. Kitada *et al.* (2005), también demostraron que al contrario de la PS1, el modo de acción es dado por lisis celular. Se encontró que PS2Aa1 se distribuyó en la periferia de la célula y la inmunotinción patrón era la misma que la distribución nativa de cadherina, una proteína de adhesión célula-célula en la membrana plasmática. Este hallazgo concuerda con el trabajo de Wong *et al.* (2010), que demostró que la proteína paraesporal del aislado de Bt de Malasia, también está ligado a un sitio de unión en la superficie celular, lo que sugiere la posibilidad de un receptor específico de la superficie celular. Investigaciones sobre la estructura cristalina de PS2 por Akiba y colaboradores, sugiere que la proteína mostró similitud estructural con las TFP- β tipo aerolisina, que apoyaron la conclusión anterior de Kitada *et al.* (2005) que la PS2 es una proteína formadora de poros (Akiba *et al.* 2009).

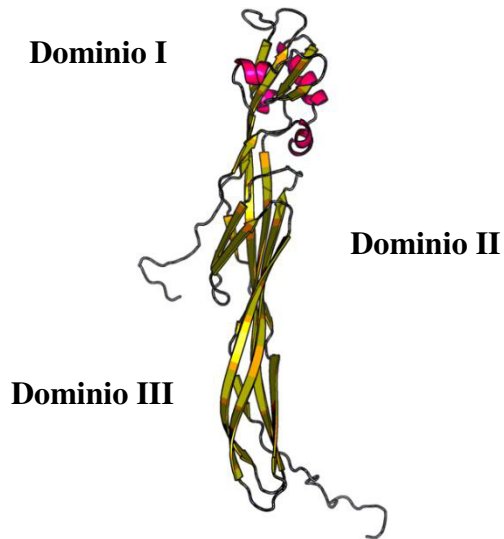


Figura 5. Predicción de la estructura tridimensional de la PS2 (PS2Aa1) (Franco 2015).

3.2.4. Parasporina 3

PS3Aa1 (Cry14Aa1) y PS3Ab1 (Cry41Ab1) (Fig. 6) son Parasporinas-3 de la cepa A1462 (anteriormente 89-T-26-17) de *B. thuringiensis* con un peso molecular alrededor de 88 kDa (Mizuki *et al.* 1999; Yamashita *et al.* 2000). Cuando se trataron con proteinasa K, ambas proteínas de 88 kDa se degradaron en el extremo N para producir las formas activadas de 64 kDa (Fig. 10). Estas dos proteínas activadas de 64 kDa tienen estrechos espectros de citotoxicidad hacia HL60 y HepG2 y podría aumentar la permeabilidad de la membrana celular de HepG2 (Yamashita *et al.* 2005). El análisis de la secuencia primaria reveló que estaban codificados por los genes orf2a y orf2b respectivamente y compartieron una secuencia de alta homología de 88%, por lo tanto las proteínas ORF2a y ORF2b se diseñaron correspondientemente como PS3Aa1 y PS3Ab1. Vale la pena mencionar que, aunque la Parasporina-3 tiene una similitud de secuencia muy baja con las toxinas Cry o Cyt, las cinco regiones conservadas de bloque típicas de la toxina Cry de tres dominios existen dentro de este grupo (Yamashita *et al.* 2005). Sobre la base de esto, La Parasporina-3 probablemente sigue el modelo similar de receptor vinculante en las células objetivo (Yamashita *et al.* 2005; Ohba *et al.* 2009).

Se piensa que la PS3 es formadora de poros por el incremento en la permeabilidad de la membrana celular de las células de cáncer (Yamashita *et al.* 2005).

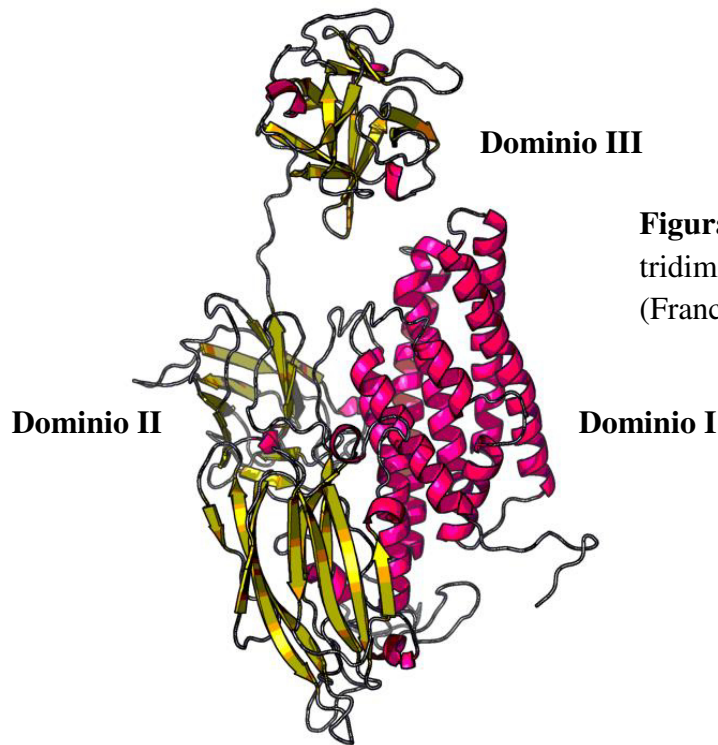


Figura 6. Predicción de la estructura tridimensional de la PS3 (PS3Aa1) (Franco 2015).

3.2.5. Parasporina 4

La Parasporina-4 (Fig. 7) se aisló a partir de la cepa A1470 (anteriormente 89-T-34-22) de *B. thuringiensis* perteneciente al serovar *shandongiensis* (Lee *et al.* 2000,2001). Cuando se digirió con proteinasa K, se aisló una proteína activada de 27 kDa y mostró una fuerte citotoxicidad contra células de cáncer humanas in vitro, tales como MOLT-4, CACO-2 (cáncer de colon humano), Sawano, TCS (cáncer de cuello uterino humano) y células HL60 (Lee *et al.* 2000,2001; Okumura *et al.* 2005, 2008,2014; Saitoh *et al.* 2006). La investigación ha revelado que la Parasporina-4 se une inespecíficamente al plasma membranal, formando un complejo oligomérico de poro en células diana. Durante este proceso, muestra una actividad independiente del colesterol, que es distinta de la Parasporina-2 que requiere colesterol para la actividad citotóxica (Kitada *et al.* 2009; Okumura *et al.* 2011). Por otra parte, los resultados de la búsqueda de PSI-BLAST han presentado que la Parasporina-4 comparte homologías con Cry15Aa, α -toxina, aerolisina y ϵ -toxina en las identidades de secuencia del 24%, 15%, 10% y 21%, respectivamente.

Un espectro de CD de la parasporin-4 reveló que contiene 51% de β -estructura. Por lo tanto, la Parasporina-4 podría ser una única β -TFP independiente del colesterol, mientras que la identificación del receptor específico y su mecanismo transmembranal deben ser abordados (Okumura *et al.* 2011).

La PS4Aa1 (Cry45Aa1) (Fig.7) es producida por la cepa A1470 y es una proteína de 30 kDa en su forma nativa y de 27 kDa en su forma tóxica como se aprecia en la Fig. 10 (Okumura *et al.* 2004). El gen es 828 pb de largo y carece de los cinco bloques de secuencias, comúnmente conservados en la mayoría de las proteínas Cry. (Ohba *et al.* 2009).

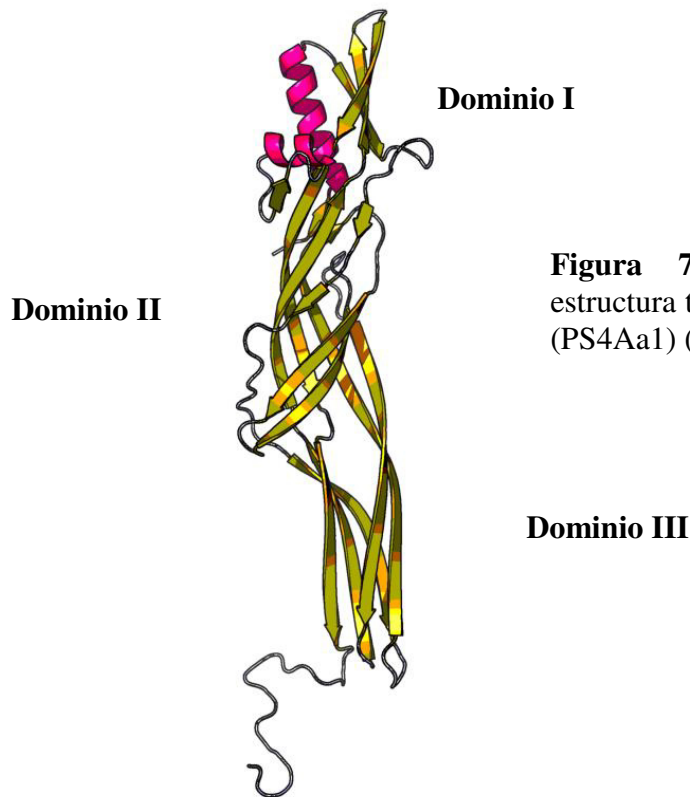


Figura 7. Predicción de la estructura tridimensional de la PS4 (PS4Aa1) (Franco 2015).

3.2.6. Parasporina 5

PS5Aa1 (Fig. 8) se purificó a partir de Bt A1100 con base en su actividad citotóxica contra las células T leucémicas humanas (MOLT-4). PS5Aa1 se expresó como una proteína precursora inactiva 33,8 kDa y exhibe actividad citotóxica sólo cuando se degrada por proteasas en el extremo C-terminal en moléculas más pequeñas

de 29,8 kDa (Ekino *et al.* 2014). Aunque la PS5 no mostró ninguna similitud significativa con otras Parasporinas, sí muestra una similitud no sólo con algunas toxinas Cry de Bt sino también para toxinas formadoras de poros tipo β (TFP- β). La proteína recombinante PS5Aa1 se pudo obtener como una proteína activa sólo cuando se expresó en un precursor seguido por el procesamiento con Proteinasa K (Ekino *et al.* 2014).

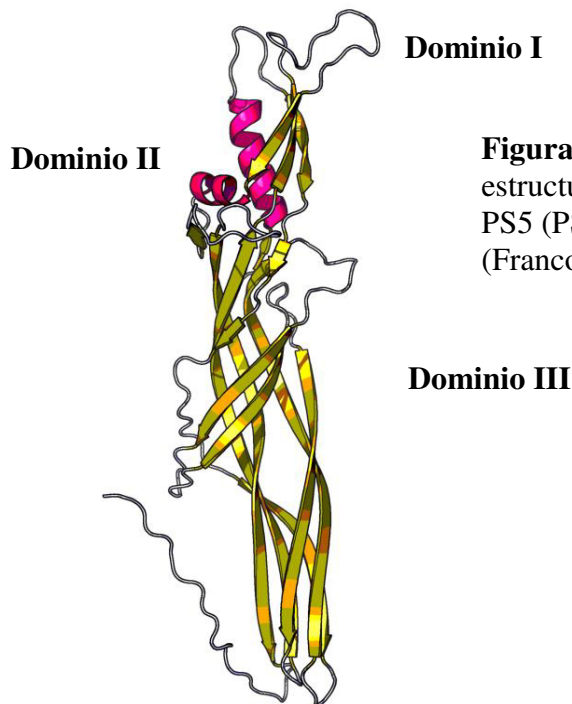


Figura 8. Predicción de la estructura tridimensional de la PS5 (PS5Aa1) (Franco 2015).

3.2.7. Parasporina 6

Solo se cuenta con un miembro correspondiente: PS6Aa1 (Fig. 9). Es una proteína relacionada con la PS1 en varios aspectos. Las protoxinas de PS1 y PS6 comparten una secuencia conservada en sus primeros 50 aminoácidos y al ser activadas por proteólisis, dos de sus tres péptidos generados, conforman un heterodímero tóxico (Fig. 10). Además la PS6 posee los tres dominios conservados de Cry y la toxina presenta un 56.4% de identidad con las proteínas insecticidas (Nagamatsu *et al.* 2010). Se aisló la Parasporina-6 (toxina CP84) a partir de la cepa M019 de *B. thuringiensis*, puede tener regiones peptídicas adicionales en el tercer dominio. La Parasporina-6 muestra citotoxicidad preferencial hacia las células HepG2 y HeLa, con CL50 a 2,3 $\mu\text{g} / \text{mL}$ y 7,2 $\mu\text{g} / \text{mL}$, respectivamente, que son menores que las concentraciones de la

Parasporina-1 y la Parasporina-2 contra sus correspondientes células humanas cancerosas (Nagamatsu *et al.* 2010; Katayama *et al.* 2005; Ito *et al.* 2004).

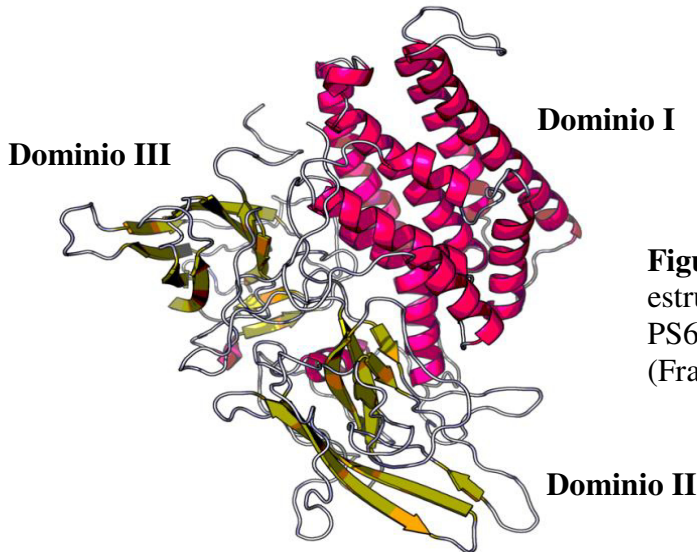


Figura 9. Predicción de la estructura tridimensional de la PS6 (PS6Aa1) (Franco 2015).

3.2.8. Parasporina de Malasia

LA cepa de Bt 18 originaria de Malasia es productora de proteínas con actividad preferencial hacia células de cáncer y también tiene actividad contra *Aedes aegypti* (Chan *et al.* 2007; Nadarajah *et al.* 2006). No cuenta con numeración de PS o Cry ya que se desconoce su secuencia aminoacídica.

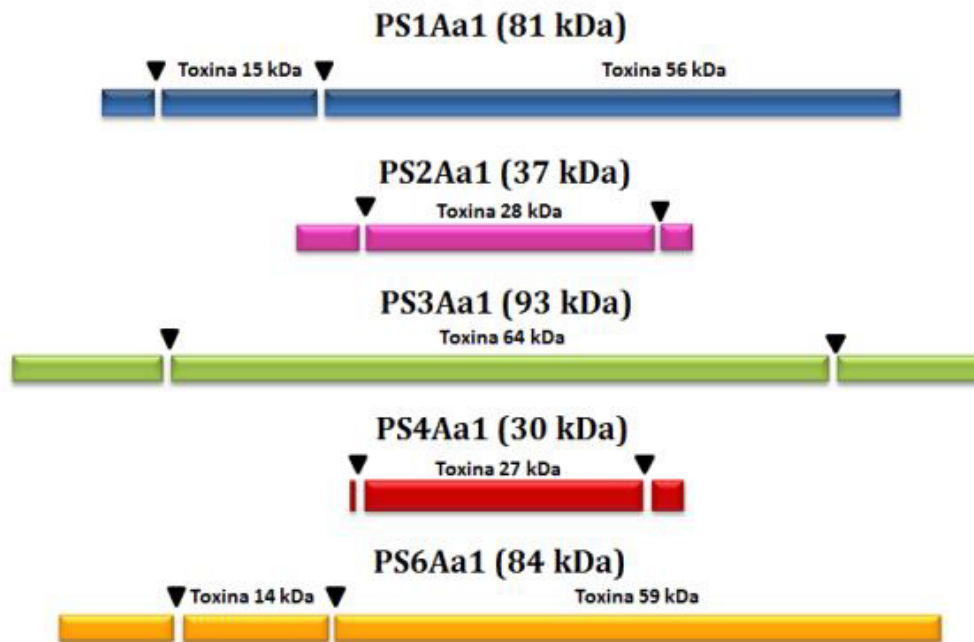


Figura 10. Representación de los fragmentos tóxicos de las principales Parasporinas.

3.2.9. Modo de acción

El modo de acción de las Parasporinas ha sido un tema en discusión a través de los años, aunque existe una cantidad variada de literatura al respecto la información con la que se cuenta actualmente evidencia que no todas las Parasporinas tienen el mismo método de acción sobre las células cancerígenas susceptibles.

3.2.10. Receptores de membrana

La alta especificidad hacia un solo tipo de célula blanco, parece ser un comportamiento típico de las proteínas Cry. Esta característica ha sido ampliamente estudiada en Cry plaguicidas y es determinada por la interacción de las toxinas con un receptor de membrana específico. El receptor es definido como una molécula, generalmente una proteína, que se encuentra en la superficie celular y actúa en el primer paso de reconocimiento y unión de la toxina Cry a su célula blanco (Pigott y Ellar 2007). La identificación de receptores ha sido un punto poco estudiado en las PS, pero se cree que al igual que las Cry plaguicidas, existe una interacción específica de PS-Receptor que confiere la especificidad hacia las células de cáncer.

Para la PS1Aa1, la molécula que actúa como receptor ha sido identificada y patentada para su uso como marcador de células susceptibles (Katayama *et al.* 2011). Esta molécula es la beclina-1, que es una proteína que en células normales actúa intracelularmente en procesos como la autofagia, desarrollo y apoptosis; pero en las células HeLa, fue localizada extracelularmente y es reconocida de manera específica por la PS1Aa1 (Zhong *et al.* 2009; Katayama *et al.* 2011).

De igual manera, el receptor para la PS de Malasia fue identificado en células de leucemia CEM-SS. Inicialmente se demostró la adhesión y alta afinidad del fragmento de 68 kDa hacia la superficie de estas células por marcaje con biotina (Wong *et al.* 2010) y un año después, fue identificado el Gliceraldehído 3-Fosfato Deshidrogenasa (GADPH) como la proteína de unión o receptor para esta Parasporina. El GADPH es una enzima altamente estudiada, de gran importancia en el metabolismo celular, que en años más recientes, también ha sido asociada a procesos de cáncer y muerte celular por apoptosis (Tsuchiya *et al.* 2005).

Aunque se desconoce el porqué de la localización de estas moléculas en la membrana de las células blanco, y si aún conservan alguna función biológica en este estado, su ausencia o baja proporción en la superficie de las células normales, es la razón de la poca actividad de las Parasporinas sobre estas.

3.2.11. Apoptosis

Históricamente las proteínas Cry generan la lisis de las células blanco; sin embargo un nuevo mecanismo de acción ha sido descrito para algunas de las Cry anti-cancerígenas. Este es el caso de la PS1Aa1 y la PS de malasia, en donde es observada la inducción de apoptosis en líneas celulares HeLa y CEM-SS (Chan *et al.* 2007; Katayama *et al.* 2007).

El modo de acción de la PS1 en células HeLa (Fig. 11) comienza por la unión al receptor (beclina 1), seguido por un aumento del Ca²⁺ intracelular desde los primeros minutos de exposición y en consecuencia una disminución de la síntesis global de DNA y proteínas. La muerte celular programada es puesta en evidencia a las 8 h por la activación de pro-Caspasa 3 y poli (ADP-ribosa) polimerasa (PARP). En este proceso, el Ca²⁺ parece ser un factor importante en el modo de acción, ya que tanto la inhibición de Caspasa 3, como del Ca²⁺ por agentes quelantes o eliminación del medio de cultivo, disminuyen considerablemente la actividad de la PS1Aa1 (Katayama *et al.* 2007, 2011). Adicionalmente, en ningún punto fueron detectados cambios en el potencial de membrana (Katayama *et al.* 2007).

Para la PS de Malasia, la muerte apoptótica inicialmente fue detectada por un aumento de células en la fase S, indicando el arresto del ciclo celular. Posteriormente, fue confirmada mediante ensayos de Caspasa 3 y estudios morfológicos por microscopía electrónica; en donde la activación de Caspasa 3 alcanzó su mayor índice a las 72 h y fueron observados los cambios morfológicos típicos de la apoptosis en las células de leucemia susceptibles a esta PS (Chan *et al.* 2012).

3.2.12. Necrosis

El segundo modelo de acción propuesto para las Parasporinas es la necrosis, que es resultado de daños irreparables en la membrana plasmática. Este es el clásico mecanismo descrito para las proteínas Cry catalogadas como TFP, que en insectos y nematodos, lisan las células epiteliales del intestino medio (de Maagd *et al.* 2003).

Típicamente, la formación de poros es llevada a cabo mediante los siguientes pasos: 1) unión de la toxina monomérica a receptor(es) de membrana específicos, 2) segunda unión (irreversible) a receptor(es) y activación del monómero, 3) oligomerización de las toxinas, 4) inserción de los oligómeros y formación de los poros en la membrana plasmática y finalmente 5) desequilibrio osmótico que da paso a la muerte celular (González *et al.* 2008).

Para las Parasporinas 2 y 4, se propone la muerte celular por necrosis (Fig. 12), apoyada en parte por su estructura tridimensional, altamente similar a β -TFP como la aerolisina o citolisina y sustentada por la evidencia experimental (Akiba *et al.* 2004; Mahalakshmi y Shenbagarathai 2010; Okumura *et al.* 2011). Los datos que se tienen sobre la PS2Aa1 en células HepG2, es que se une a la superficie celular en presencia de proteínas de membrana, la bicapa lipídica y el colesterol. Posteriormente, forma oligómeros resistentes a dodecilsulfato sódico (SDS), de 200 kDa, de manera dependiente de la temperatura. Esta oligomerización, no se lleva a cabo en la membrana citoplasmática de células poco susceptibles como HeLa o en membranas mitocondriales y del retículo endoplásmico (Abe *et al.* 2005, 2008). Los cambios morfológicos para células adherentes HepG2, son la formación de “ampollas” en la periferia celular, dentro de los primeros minutos de exposición; hinchamiento a las 2 h; desprendimiento y lisis, a partir de las 4 h. Para las células en flotación MOLT-4, los cambios consistieron en hinchamiento y vacuolización, sin formación de ampollas. Adicionalmente, estas células expuestas a altas dosis de la PS2, no tuvieron activación de Caspasa 3/7 ni fragmentación del DNA cromosómico (Ito *et al.* 2004; Kitada *et al.* 2006).

En cuanto al mecanismo de la PS4Aa1, se ha demostrado su unión en membrana lipídica, aunque sin presencia de colesterol (Okumura *et al.* 2011). Al igual que en la PS2, hay formación oligómeros resistentes a SDS, de 90–200 kDa, de forma exclusiva en la membrana de células susceptibles. Los cambios morfológicos inducidos en MOLT-4 y CACO-2, también comienzan desde los primeros minutos. En los primeros 10 min se observó condensación nuclear, la cual llegó a su máximo punto 1 h después; posteriormente ocurre el hinchamiento de las células a las 2 h aproximadamente, y la lisis dentro de las 24 h de exposición (Okumura *et al.* 2005). Además, para las MOLT-4 también se han descrito encogimiento nuclear, formación de ampollas en la periferia celular y nuclear. Como evidencia sobre la necrosis como modo de acción, se demostró la permeabilización de la membrana en las susceptibles mediante la liberación de lactato deshidrogenasa (LDH) y la internalización de dextranos de diferentes pesos moleculares. Así mismo, no hubo activación considerable de Caspasas 3/7 (Okumura *et al.* 2011).

Finalmente, para la PS3, también se sugiere que una muerte necrótica por la formación de poros de membrana, dada su estructura y gran relación a las proteínas Cry insecticidas. Como evidencia también fue observada una progresiva liberación de LDH, que fue inversamente proporcional a la tasa de sobrevivencia de células HepG2 (Yamashita *et al.* 2005).

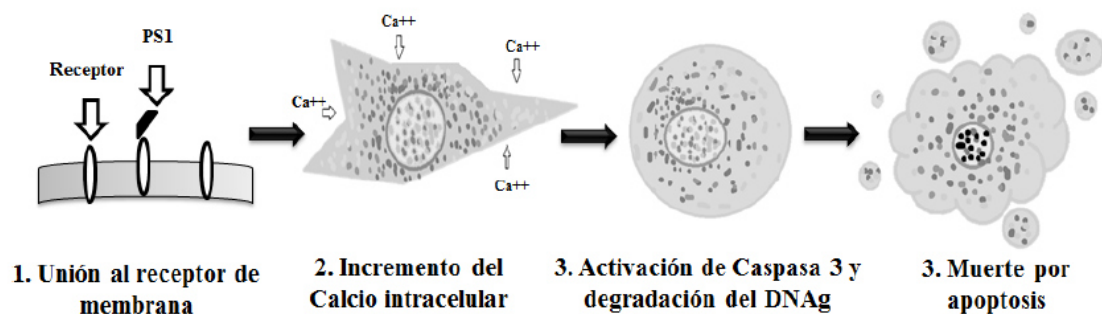


Figura 11. Modo de acción de las Parasporina-1 (Imagen de Espino-Vázquez 2014).

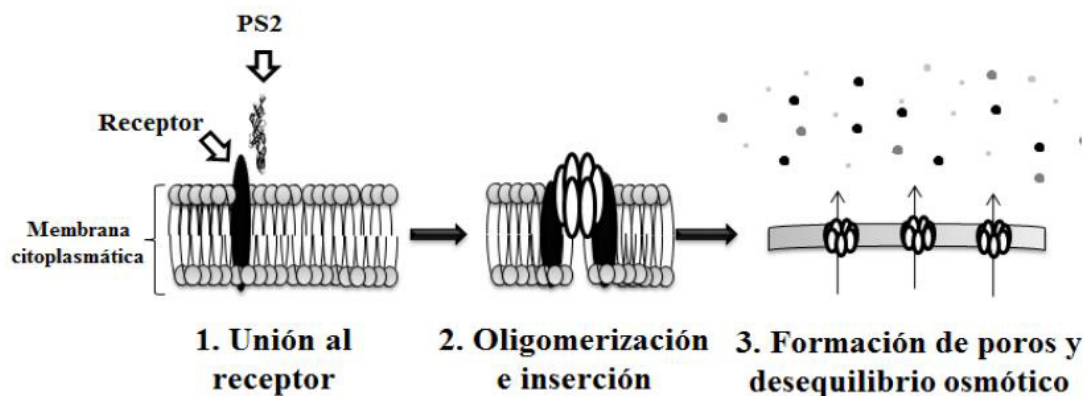


Figura 12. Modo de acción de las Parasporina-2
(Imagen de Espino-Vázquez 2014).

3.3. Ensayos de citotoxicidad

Diversos estudios se han realizado para demostrar el efecto de las Parasporinas sobre células de cáncer, utilizando una variedad de diferentes Parasporinas provenientes de distintas cepas de *Bacillus thuringiensis*, así mismo escogiendo líneas celulares de cáncer con diferentes patrones de comportamiento, demostrando el efecto de las Parasporinas sobre dichas células, ya que se ha demostrado que la concentración de Parasporina necesaria para un efecto citotóxico en una línea celular en particular, difiere acorde a la Parasporina, y a su vez las líneas celulares reaccionan de manera diferente a la misma Parasporina (Mizuki *et al.* 2000), por ello, se requiere un análisis comparativo entre diferentes cepas productoras de Parasporinas y su efecto sobre las líneas celulares con cáncer.

3.3.1. Primer estudio

El primer estudio exhaustivo para demostrar el efecto sobre células de cáncer se realizó por Mizuki *et al.* (1999) donde las inclusiones parasporales de un total de 1.744 cepas de *Bacillus thuringiensis*, que constaron de 1.700 aislamientos japoneses y 44 cepas de tipo de referencia de los serovares existentes, se seleccionaron para la actividad citocida contra células T de leucemia humana y actividad hemolítica contra eritrocitos de oveja. De 1684 cepas de *B. thuringiensis* que no demostraron actividad hemolítica, 42 mostraron citotoxicidad *in vitro* contra Células T de leucemia. Estas cepas no

hemolíticas pero tóxicas para las células leucémicas pertenecían a distintos serovares incluyendo *dakota*, *neoleonensis*, *shandongiensis*, *coreanensis* y otros serogrupos no identificados.

Dentro de este estudio se enfocaron aún más en las inclusiones parasporales purificadas de tres cepas seleccionadas, denominadas 84-HS-1-11, 89-T-26-17 y 90-F-45-14, las cuales no exhibieron actividad hemolítica ni actividad insecticida contra insectos dípteros y lepidópteros como suelen actuar las toxinas Cry regulares de *Bacillus thuringiensis*, pero eran altamente citotóxicas contra células T leucémicas y otras células cancerosas humanas, mostrando diferentes espectros de toxicidad y niveles de actividad variados.

Además, las proteínas de 84-HS-1-11 y 89-T-26-17 fueron capaces de discriminar entre células T normales y leucemia, matando específicamente las células anteriores. Estos hallazgos condujeron a la posibilidad del uso de proteínas de inclusión de *B. thuringiensis* con fines médicos.

Una propiedad inusual, la actividad de reconocimiento de células leucémicas humanas, una proteína no insecticida asociada con inclusiones parasporales de un aislamiento del suelo de *Bacillus thuringiensis* (denominada Parasporina en este estudio por primera vez) responsable de la actividad fue clonada. La Parasporina, codificada por un gen 2,169 pb de largo, fue un Polipéptido de 723 residuos de aminoácidos con un peso molecular previsto de 81.045 kDa. La secuencia de la Parasporina contenía los cinco bloques conservados comúnmente encontrados en las proteínas Cry de *B. thuringiensis*; Sin embargo, sólo compartiendo una homología muy baja (<25%) entre Parasporinas y las clases existentes de proteínas Cry y Cyt se detectaron. La Parasporina exhibió actividad citocida sólo cuando se degrada por proteasas en moléculas más pequeñas de 40 a 60 kDa. La tripsina y la proteinasa K activaron la Parasporina, mientras que la quimotripsina no, la Parasporina activada mostró actividad citocida fuerte contra células T humanas leucémicas (MOLT-4) y células de cáncer de útero uterino humano (HeLa), pero no contra las células T normales (Mizuki *et al.* 2000) (Tabla II).

Tabla II. Espectro citotóxico de las principales Parasporinas

Línea celular	Descripción	PS1Aa1		PS2Aa1		PS3Aa1		PS4Aa1		PS6Aa1		PS Malasia	
		CE ₅₀	EC	CE ₅₀	EC	CE ₅₀	EC	CE ₅₀	EC	CE ₅₀	EC	CE ₅₀	EC
Células normales de humano													
Linfocitos T	Células T	>10.0	-	0.148	+++	>10.0	-	>2.0	-	Nd		>32.0	-
HC	Células hepáticas	>10.0	-	>10.0	-	>10.0	-	>2.0	-	>10.0	-	Nd	
UtSMC	Células de útero	>10.0	-	9.28	-	>10.0	-	>2.0	-	Nd		Nd	
MRC-5	Células de pulmón	>10.0	-	7.15	-	>10.0	-	>2.0	-	Nd		Nd	
Células de cáncer humano													
MOLT-4	Leucemia	2.2	+	0.044	++++	>10.0	-	0.47	++	Nd		Nd	
Jurkat	Leucemia	>10.0	-	0.015	++++	>10.0	-	>2.0	-	Nd		Nd	
HL-60	Leucemia	0.32	++	0.066	++++	1.32	+	0.73	+	Nd		Nd	
CEM-SS	Leucemia	Nd		Nd		Nd		Nd		Nd		0.122	+++
U-937-DE4	Linfoma	Nd		Nd		Nd		0.98	+	Nd		Nd	
K562	Leucemia	Nd		Nd		Nd		>2.0	-	Nd		Nd	
HepG2	Cáncer hepático	3.0	-	0.023	++++	2.8	+	1.9	+	2.3	+	Nd	
HeLa	Cáncer cervical	0.12	+++	>10.0	-	>10.0	-	>2.0	-	7.2	-	>0.5	++
Sawano	Cáncer endometrial	>10.0	-	0.041	++++	>10.0	-	0.25	++	nd		Nd	
TCS	Cáncer cervical	Nd		>10.0	-	>10.0	-	0.72	+	nd		Nd	
A549	Cáncer pulmonar	>10.0	-	>10.0	-	>10.0	-	>2.0	-	nd		Nd	
CACO-2	Cáncer de colon	>10.0	-	4.86	-	>10.0	-	0.12	+++	>10	-	Nd	

CE₅₀, Concentración efectiva media ($\mu\text{g ml}^{-1}$); EC, Efecto citotóxico basado en las CE₅₀ (Mizuki *et al.*, 2000), en donde: +++++, extremadamente tóxico; +++, altamente tóxico; ++, moderadamente tóxico; +, poco tóxico; -, no tóxico. Nd: no determinado.

3.3.2. Otros estudios

Lee *et al.* (2000) conociendo las actividades insecticidas regulares de *B. thuringiensis* y en comparación con el análisis masivo de Mizuki *et al.* (1999) encontraron en un aislado de *Bacillus thuringiensis* denominado 89-T-34-22, perteneciente al serovar shandongiensis (H22) una producción de proteínas no insecticidas y no hemolíticas que cristalizan en inclusiones parasporales de forma irregular. Las proteínas mostraron citotoxicidad in vitro a las células humanas, células cancerosas, sólo cuando son activadas por un tratamiento con proteasas. En este estudio de las líneas celulares analizadas las células T (MOLT-4) leucémicas humanas fueron > 100 veces más susceptible que HeLa y Celulas T normales a las proteínas de 89-T-34-22. La citotoxicidad fue dependiente de la dosis y la concentración efectiva media para el MOLT-4 fue de 3,5 mg / ml. La citopatía inducida por las proteínas 89-T-34-22 se caracterizó por la notable condensación del núcleo y células balonizadas. Cinco principales proteínas parasporales de 89-T-34-22, con masas moleculares en el intervalo de 16-160 kDa, compartieron ninguna similitud con las proteínas previamente informadas en términos de la secuencia N-terminal, cuyo hallazgo demuestra la posible diferencia de las Parasporinas con las toxinas Cry.

Continuando en esta línea de investigación Lee *et al.* (2001) purificaron una proteína de 28 kDa que exhibe actividad citocida específica para células T (MOLT-4) leucémicas humanas a partir de una inclusión parasporal digerida con proteinasa K de un aislado de *Bacillus thuringiensis* serovar *shandongiensis* denominado 89-T-34-22.. La secuencia N-terminal de la proteína era idéntica a la de la proteína de 32 kDa, considerada como protoxina, de las proteínas de inclusión. La concentración efectiva de esta proteína fue de 0,23 µg / ml frente a las células MOLT-4 y su actividad específica fue 7,9 veces mayor que el de la totalidad de las proteínas de inclusión. La proteína de 28 kDa indujo citotoxicidad similar a la necrosis frente a células MOLT-4 y el efecto citopático con el paso del tiempo se caracterizó por hinchazón celular, aislamiento de la membrana nuclear y condensación de la cromatina.

Posteriormente se demostró que dicha cepa de *B. thuringiensis* produce al menos dos proteínas con efecto citotóxico contra células de cáncer (Okumura *et al.* 2004).

Okumura *et al.* (2005) un año después analizó la cepa A1470 de *Bacillus thuringiensis* encontrando que las proteínas de inclusión parasporales producidas presentan una fuerte citotoxicidad contra las células T leucémicas humanas cuando se activan por tratamiento con proteasa. Una de las proteínas citotóxicas se separó por cromatografía de intercambio aniónico y cromatografía de filtración en gel y se designó como Cry45Aa. Su gen se expresó entonces en una *Escherichia coli* recombinante, en el que el precursor Cry45Aa se acumuló en un cuerpo de inclusión. Se solubilizó en buffer de carbonato de sodio y se procesó con proteinasa K, la actividad citotóxica de la proteína contra diversas líneas celulares de mamífero fue evaluada utilizando el ensayo de bromuro de 3- (4,5-dimetil-2-tiazolil) -2,5-difenil-2H tetrazolio. La proteína exhibió una alta actividad citotóxica contra células CACO-2, Sawano, MOLT-4, TCS y HL60 y actividad moderada contra células U-937 DE-4, PC12 y HepG2. Por otro lado, los valores de CE50 frente a Jurkat, K562, HeLa, A549, Vero, COS-7, NIH3T3, CHO, y cuatro células de tejido normales células de hepatocitos primarios, UtSMC, MRC-5 y células T normales fueron $> 2 \mu\text{g} / \text{mL}$.

Numerosos estudios se han realizado sobre el tema del análisis de las Parasporinas producidas por *B. thuringiensis*, su efecto citotóxico (Namba *et al.* 2003; Katayama *et al.* 2005; Yamashita *et al.* 2005; Kitada *et al.* 2005; Saitoh *et al.* 2006; Uemori *et al.* 2008; Nagamatsu *et al.* 2010), su aislamiento, clonación y caracterización (Jung *et al.* 2007; Ekino *et al.* 2014) así como de su estructura, modo de acción y efecto (Katayama *et al.* 2007; Kitada *et al.* 2009; Okumura *et al.* 2011,2014; Xu *et al.* 2014; Brasseur *et al.* 2015) por lo cual la información presente en el estudio de las Parasporinas aporta bases sólidas para su continuación.

En años recientes Espino-Vázquez (2014) hizo un estudio utilizando 103 cepas de *B. thuringiensis* de la colección de microorganismos entomopatógenos del Instituto de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL. Paralelamente, también fueron incluidas las cepas de referencia A1190 (PS1Aa1), A1547 (PS2Aa1), A1462 (PS3Aa1, PS3Ab1) y A1740 (PS2Aa2, PS4Aa1), como controles positivos de los experimentos. En dicho estudio la actividad biológica de los cristales fue evaluada sobre 7 líneas celulares para demostrar su efecto citotóxico. En este trabajo fueron detectadas

siete cepas de *B. thuringiensis* productoras de PS, por medio de ensayos de *in vitro* de citotoxicidad y amplificación génica por PCR múltiple. Todas desplegaron actividad preferencial contra las diversas líneas celulares de cáncer y baja citotoxicidad hacia células normales de piel. Como resultado de la caracterización de las proteínas paraesporales, fueron identificadas las siguientes Parasporinas: PS1 (cepas CL9-1, CL9-3, IB79), PS2 (IB88, CL9-21), PS3 (CL9-21), PS4 (IB84, IB79, CL9-21). Únicamente no fue posible la caracterización del tipo de PS presente para la cepa GM18, ya que las proteínas de su cristal no mostraron relación con las PS de referencia en ninguna de las técnicas empleadas. Con respecto al modo de acción, la evidencia experimental sobre los cristales de GM18, CL9-1 y CL9-3 apunta a la inducción de apoptosis en las células de leucemia MOLT-4. Mientras que para las cepas restantes, se propone la muerte por necrosis, producida por pérdida de la integridad de membrana. Adicionalmente, por medio de microarreglos de ADN, se llevó a cabo un estudio más detallado del efecto de los cristales de IB84 en células MOLT-4. Mismo que reveló la activación de numerosas rutas implicadas en la respuesta celular a toxinas formadoras de poros (TFP). Entre las principales figura la proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK), señalización por calcio, endocitosis e hipoxia. La validación reiteró la regulación de genes de importancia en dichas rutas que codifican para ciertos receptores y moléculas de membrana, así como algunos ligandos y moléculas de señalización intracelular. Estos resultados confirman la presencia de Parasporinas, así como la importancia de proceder al aislamiento y caracterización de dichas Parasporinas para análisis más detallados de secuenciación y ensayos de proteínas purificadas en líneas celulares de cáncer.

4. JUSTIFICACION

Dentro de la carrera en la investigación contra el cáncer, las PS producidas por *Bacillus thuringiensis* muestran tener un futuro aprovechable en esta línea de investigación, sin embargo para el aprovechamiento de estas proteínas se requiere la identificación de los diferentes tipos de Parasporinas presentes, su poder citotóxico, su modo de acción y su extracción eficiente libre de contaminantes, este trabajo se enfoca en una identificación rápida de las PS presentes en cepas de *Bacillus thuringiensis* así como su extracción y purificación para poder ser utilizadas en ensayos en líneas celulares cancerosas sin riesgo de contaminación, permitiendo en un futuro estandarizar el protocolo y promover el uso de las PS en los estudios contra el cáncer.

5. HIPOTESIS

Las cepas IB84 y GM18 de *Bacillus thuringiensis* producen algún tipo de Parasporinas que pueden ser identificadas, extraídas y purificadas para su caracterización.

Los cristales parasporales de las cepas IB84 y GM18 generan PS con actividad biológica contra cáncer humano in vitro.

6. OBJETIVOS

6.1. OBJETIVO GENERAL

Identificar, purificar y caracterizar las PS presentes en cepas de *Bacillus thuringiensis* IB84 y GM18.

6.2. OBJETIVOS PARTICULARES

- Obtener, solubilizar y activar los cristales paraesporales de las cepas seleccionadas de la colección de *Bacillus thuringiensis* del Instituto de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Biológicas-UANL.
- Detectar las posibles PS presentes en los extractos crudos, solubilizados y digeridos, usando anticuerpos anti-PS1, anti-PS4 y anti-GM18.
- Obtener las fracciones donde se presenten las Ps con efecto citotóxico en la línea celular con cáncer MOLT-4.
- Caracterizar los perfiles proteicos de los cristales paraesporales de las cepas seleccionadas.
- Probar las PS en la línea celular MOLT-4.

7. MATERIALES Y METODOS

7.1. Material Biológico

7.1.1. Cepas de *Bacillus thuringiensis*

Fueron analizadas dos cepas pertenecientes a la colección de *Bacillus thuringiensis* del Instituto de Biotecnología Facultad de Ciencias Biológicas-UANL, mas 2 cepas de control positivo. Para su activación fueron incubadas en agar nutritivo o caldo nutritivo durante 72-96 h a 30°C. La producción de cristal se monitoreo por observaciones al microscopio óptico. Al detectar la esporulación (>95%) los cultivos fueron “raspados” (cajas Petri con agar nutritivo) con 2 ml de agua bidestilada estéril, lavados y transferidos a tubos limpios y mantenidos a 4°C hasta su uso, en el caso de caldo nutritivo, centrifugación a 13,000 rpm por 4 minutos a 4°C, transferidos a agua bidestilada estéril, lavados dos veces y transferidos a tubos limpios y mantenidos a 4°C hasta su uso. Aquellas muestras que no se usaron inmediatamente fueron puestas a refrigeración a -20°C.

Las cepas fueron conservadas en criogenia a -20°C con 10% de glicerol (Sambrook y Russell 2006). Para su monitoreo por microscopio se llevó a cabo frotis bacterianos teñidos con cristal violeta y vistos en un aumento de 1,000X en el microscopio óptico marca Leica.

7.1.2. Activación de las inclusiones paraesporales

Los cristales paraesporales fueron solubilizados y digeridos proteolíticamente para su posterior utilización. La solubilización parte de cultivos esporulados en placa o matraces con caldo nutritivo, colectados y lavados con agua bidestilada dos veces (en este paso se tomaron muestras para la inmunodeteccion) y re-suspendidos en buffer de carbonatos pH 10.0 (50 mM NaCO₃; 10 mM DTT; 1 mM EDTA pH 8.0). Las muestras fueron incubadas 60 min a 37 °C y, posteriormente, se llevó a pH 8.0 con HCl o NaOH 1N (se tomaron alícuotas nuevamente en este paso).

De manera paralela, se procedió a utilizar un protocolo de purificación de cristales de *Bacillus thuringiensis* mediante la implementación de hexano, acorde a lo expuesto por Mounsef *et al.* (2014), dicho protocolo toma ventaja de las características hidrofóbicas de las esporas de Bt para poder separarlas de los cristales parasporales y restos celulares, de manera general se inició con el cultivo de la cepa deseada hasta observar la autólisis y la consecuente aparición de esporas en los frotis realizados, después de esto se centrifugo a 10000 rpm a 4 °C por 10 minutos para recuperar todo el producto suspendido en el medio, se lavó el pellet con una solución de 5 mL de NaCl 1 M conteniendo 0.01% de Triton X-100, después del lavado el pellet se suspendió en 5 mL de una solución salina (NaCl 3%) con el fin de aumentar las interacciones hidrofóbicas de la espora y el solvente orgánico, después de este punto, se adiciono el solvente orgánico Hexano (Éter etílico o diclorometano también son opciones viables) en un radio de menos o igual al 10% (133 µL de hexano/mL de suspensión celular) para minimizar el riesgo de alterar los cristales, esta suspensión se sónico a 100W por 10 minutos para disipar los aglomerados, posteriormente la solución se centrifugo nuevamente a 10000 rpm a 4 °C por 10 minutos, el resultado de esta centrifugación es la creación de dos fases liquidas visibles, en el fondo del recipiente se encuentran los cristales parasporales y en la unión de las dos fases, estan las esporas y el resto de materia celular, se extrajo este contenido y se decantó la solución, procurando eliminar la mayor cantidad de esporas y restos celulares en el proceso, el pellet se resuspendio en solución salina (NaCl 3%) y se adiciono de nuevo el solvente orgánico, con su subsecuente sonicacion, este procedimiento se repitió de tres a cuatro veces hasta no encontrar más restos celulares y esporas en la separación de fases de la solución y los cristales paraesporales se concentran en el fondo, el pellet resultando se lavó dos veces con agua destilada fría (4 °C) y transferidos a tubos limpios y mantenidos a 4°C hasta su uso. Aquellas muestras que no se usaron inmediatamente fueron puestas a refrigeración a -20°C.

La activación consistió en digerir las muestras solubilizadas con 10 µg/µl de proteinasa K (Sigma-Aldrich) incubadas 120 min a 37 °C. La reacción fue detenida con Floruro de fenilmetrilsulfonilo (PMSF) 1 mM. Las esporas contenidas en cada uno de

los extractos fueron eliminadas por centrifugación a 12,000 rpm por 30 min, a través de membranas de nitrocelulosa con tamaños de poro de 0.45 μm y 0.2 μm y diálisis en membrana con tamaño de poro de 30 kDa o 12 kDa dependiendo la cepa (Se tomaron igualmente alícuotas en este paso para la detección con anticuerpos). Todas las muestras finales se concentraron hasta alcanzar una concentración de 1 mg/ml en un concentrador CentriVap Benchtop Vacuum a 40°C.

La determinación de la concentración de proteína se llevó a cabo de acuerdo a lo descrito por Bradford (1976). Las muestras se guardaron hasta su uso a -20°C rotulados en tubos Corning.

7.2. Geles de poliacrilamida

El perfil de proteínas paraesporales fue verificado en geles de poliacrilamida al 10% en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) (Laemli 1971). Los geles fueron teñidos con azul de Coomassie R-250 (Biorad) y desteñidos durante la noche con agua bidestilada o durante una hora con solución de destincion.

Los geles fueron fotodocumentados en un densitómetro GS-800 (Biorad) y las imágenes analizadas usando el programa QuantityOne (Biorad). A partir de estos geles se tomaron muestras para su posterior análisis y secuenciación.

7.2.1. Geles de dos dimensiones

Para el perfil de proteínas parasporales en geles de dos dimensiones, las condiciones IEF (Tabla III) fueron las siguientes: Muestra de la cepa IB84 (75 μg) y GM18 (100 μg) precipitadas con 3V acetona y resuspendidas en 130ul de buffer rehidratación desnaturizante con 0.4ul de buffer IPG 3-10. La hidratación activa se hizo en tiras ReadyStrip™ IPG (Biorad) de 7 cm, con las muestras se colocaron en el buffer de equilibrio por 30 minutos, para el equilibrio se realizaron las siguientes indicaciones: 15 minutos de equilibrio con DTT (5 ml del buffer de equilibrio y 0.1 g de DTT), se enjuago con agua miliQ, después 15 minutos con buffer de equilibrio y iodoacetato (5 ml de buffer de equilibrio y 0.12 gramos de iodoacetato) se enjuago con agua miliQ varias veces y se colocó en geles de poliacrilamida al 12% copolimerizado con gelatina al 0.2%, estos geles se corrieron a 60 mAmp a 4° C, al final se tiñeron con

azul de Coomassie R-250 y desteñidos durante la noche con agua bidestilada o durante una hora con solución de destincion. Los geles fueron fotodocumentados en un densitómetro GS-800 (Biorad) y las imágenes analizadas usando el programa QuantityOne (Biorad). A partir de estos geles se tomaron muestras para su posterior análisis y secuenciación.

Tabla III. Condiciones IEF.

Fase	V	tiempo	V/h	Rampa
1	250	20min	-	Lineal
2	4000	2h	-	Lineal
3	4000	-	10000	Rapida

Rehidratación: 15h/ pasiva/ 10°C

7.3. Inmunodetección

Se inició la inmunodetección por “Dot Blot”, con los anticuerpos proporcionados por el Dr. Shiro Okumura del Biotechnology and Food Research Institute, Fukuoka Industrial Technology Center y los anticuerpos policlonales anti-GM18 levantados en conejo, proporcionados por la Dra. María Magdalena Iracheta del Instituto de Biotecnología. Los anticuerpos policlonales de conejo anti-PS1 y anti-PS4, fueron levantados contra los cristales solubilizados de la cepa A1190 (protoxina PS1) y los cristales digeridos y purificados de la cepa A1470 (toxina PS4).

El "Dot Blot" se realizó como alternativa rápida al inmunoensayo por "Western Blot". El procedimiento es el mismo que el de la técnica en gel, la diferencia radica en que en la muestra se coloca directamente sobre la membrana (nitrocelulosa) y no se requiere gel de poliacrilamida ni su transferencia. Para esto, se colocaron las muestras con una concentración de $\geq 1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ en las membranas de nitrocelulosa. Se dejaron secar las membranas aproximadamente 30 min. Las membranas fueron bloqueadas con TBST 20 al 2% por 15 min, después lavadas dos veces con TBS por 5 min en agitación. Los anticuerpos fueron agregados en diferentes disoluciones e

incubados por 1 h a temperatura ambiente en agitación. Posteriormente, se lavaron dos veces con TBST al 0.05% por 5 min cada una. Agregamos el conjugado Anti-IgG de conejo acoplado con fosfatasa alcalina a una disolución 1:1000 (Sigma-Aldrich, A3812) e incubamos por 1 h a temperatura ambiente en agitación. Posteriormente, retiramos el conjugado y las membranas fueron lavadas con Buffer TBST dos veces cada una de 5 min. Se dejaron escurrir las membranas para retirar el exceso de buffer de lavado y se agregó la solución cromogénica NBT-BCIP (Sigma B3804). Por último, el resultado positivo da una señal visualizando círculos de color morado. Para detener la reacción se añadió agua bidestilada.

7.4. Cromatografía de intercambio aniónico

Para el buffer de intercambio, una muestra de solución de las inclusiones paraesporales de *B. thuringiensis* tratadas con proteinasa K fue pasada a través de una columna de agarosa contra un buffer de Tris-HCl 50 mM (pH 9.0) con EDTA al 1 mM. La muestra fue después clarificada por centrifugación a 15000g a 4 °C por 10 min. El precipitado fue sujeto a una cromatografía de intercambio aniónico en una columna HiTrap Q FF (1 ml, 7 × 25 mm) y HiTrap Q XL (1 ml, 7 × 25 mm) (GE Healthcare Life Sciences) a un radio de flujo de 2 mL/min a 4 °C. La proteína fue eluida con un gradiente en incremento de NaCl en una concentración de 0 a 1.0 M en el mismo buffer que fue descrito anteriormente, los datos fueron analizados con el BioLogic LP (Bio-Rad), 1 mL de cada fracción fue recolectada con el 2110 Fraction collector para su posterior caracterización.

7.4.1. Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)

La muestra de solución de las inclusiones parasporales de *B. thuringiensis* (cepa Gm18) después de haber sido filtrada con una membrana de 0.2 µm fue cuantificada en el equipo NanoDrop 2000c y 100 µl fueron ingresados en el equipo HPLC AGILENT 1200SERIES-1100SERIES/C. Gases Agilent 7890 acoplado a una columna c18 300SB, se utilizaron las siguientes fases para la separación de proteínas; Fase A: TFA/CH₃CN/H₂O (0.1/10/90), y Fase B: TFA/CH₃CN/H₂O (0.1/90/10) posteriormente

las fracciones donde se observó señal fueron extraídas y corridas en geles de poliacrilamida para su caracterización.

7.4.2. Nano cromatografía líquida acoplada a espectrómetro de masas en tándem (Nano LC-MS/MS) y MALDI-TOF/TOF

Muestras de las proteínas activadas fueron extraídas de bandas provenientes de geles de poliacrilimida y transferidas a tubos Ependorf con 50 ul de agua grado proteomica para su análisis en NANO LC-MS/MS y MALDI-TOF/TOF servicio prestado por Applied Biomics.

Como resultado se obtiene un informe detallado del análisis de las muestras comparado contra la base de datos de *Bacillus thuringiensis*, en el cual se obtienen datos como la clave de la proteína en la base de datos, el peso molecular, el puntaje de la proteína, el número de emparejamientos con secuencias en nuestra muestra, el valor de iones idénticos, así como el péptido encontrado y su secuencia en aminoácidos.

7.5. Análisis de secuencias, determinación y modelaje de la estructura terciaria y tridimensional

A partir de las secuencias de aminoácidos encontradas, se procedió a realizar un análisis comparativo con otras proteínas Cry o Parasporinas así como la determinación y el modelaje de la estructura de las proteínas en sus formas nativas y activas, para ello se utilizó el servidor de PredicProtein (Yachdav *et al.* 2014), RaptorX (Peng y Xu 2011a, 2011b; Ma *et al.* 2013; Kallberg *et al.* 2012) y el programa UCSF Chimera (Pettersen *et al.* 2004).

7.6 Bioensayos

7.6.1 Línea celular

La actividad biológica de los cristales fue evaluada sobre la línea celular MOLT-4, la cual fue adquirida de la American Type Culture Collection (ATCC) y conservada en criogenia a -70°C con 5% de DMSO (Tabla IV). Para su activación y propagación fueron utilizados los medios de cultivo recomendados por la ATCC y mantenida en incubación a 37°C con 5% de CO_2 .

Tabla IV. Información de la línea celular del estudio.

No. ATCC	Nombre	Organismo	Morfología/ Tejido	Propiedades	Enfermedad	Medio de cultivo ^a
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. RPMI: Medio del Instituto Roswell Park Memorial.

7.6.2. Ensayos de efecto citopático

Las proteínas activadas fueron probadas contra la línea celular en placas de 96 pozos, incluyendo los respectivos controles como se describe en la tabla V. Todas las placas de los ensayos fueron incubadas por 24 h o 48 h a 37°C en incubadora con 5% de CO_2 .

Tabla V. Componentes para los ensayos de citotoxicidad.

Componente	Células (En medio RPMI)	Medio con cristales (RPMI, MEM 2X)
Células sin tratamiento	200 μl	0 μl
Células + Cristales activados de nuestras cepas (5 μg)	100 μl	100 μl
Medio de cultivo sin células		200 μl

7.6.3. Conteo Directo

El conteo de las células viables fue directo en cámara de Neubauer, usando el azul de tripano como colorante vital, para la diferenciación de las células vivas de las muertas. Para el cálculo del número de células fue empleada la ecuación 1. Mientras que el porcentaje de sobrevivencia fue estimado en base al conteo de células sin tratamiento (testigos) como el 100 %, con la ecuación 2.

Ecuación 1 Células ml⁻¹ = $\frac{[\text{Sumatoria de células en 4 cuadrantes}][10^4]}{4}$

Ecuación 2 % Sobrevivencia: $\frac{[\text{No. de células tratadas con PS}] * 100}{(\text{No. de células sin Tratamiento})}$

8. RESULTADOS

8.1. Caracterización morfológica

La producción de cristales paraesporales fue constantemente monitoreada en los cultivos de las cepas seleccionadas desde su inoculación hasta la liberación del cristal paraesporal. Las muestras de la cepa IB84 y GM18 sintetizaron el cristal paraesporal a las 48 horas y 72 horas respectivamente.

Las características morfológicas externas de las cepas crecidas en agar nutritivo obtenidas en la presente investigación determina que las colonias tienen forma circular, con borde irregular, perfil plano y color marfil claro o crema, su textura es seca y cerosa, apreciándose en colonias maduras donde su círculo central posee una superficie de apariencia más brillante y lisa que el halo externo, debido probablemente a la esporulación de las células centrales, más adelantadas en el ciclo de crecimiento (Fig. 13).

Al microscopio se observó el cristal de forma irregular para las cepas IB84 y GM18, con esto se reafirma lo reportado por Espino-Vázquez (2014), un bacilo esporulado que durante el proceso de esporulación produce una inclusión paraesporal formada por uno o más cuerpos cristalinos de naturaleza proteica. El cristal de la cepa IB84 fue difícil de caracterizar debido al tamaño y baja proporción con respecto a la cantidad de esporas.

Los cristales vistos al microscopio óptico tuvieron formas irregulares muy pequeñas, frecuentemente se encuentran adheridos a uno de los polos de la spora. En el caso de la cepa IB84, Espino-Vázquez (2014) apoyándose de microscopía electrónica reveló cristales irregulares ligeramente alargados, igualmente, localizados hacia un polo de la spora (Fig. 14). Aunque esta cepa se cree codifica para la PS4, sus cristales fueron muy diferentes a los de la cepa de referencia A1470, que en la literatura también están reportados como irregulares (Lee *et al.* 2000).

Por otra parte, los cristales de la cepa GM18 fueron más peculiares. Mientras que al microscopio óptico, los cristales de la cepa GM18 mostraban formaciones como de gotas de agua de tamaño medio; por microscopía electrónica de barrido, los cristales revelaron formas cóncavas irregulares (Fig. 14) una morfología cercana a la piramidal.

Se hace mención además que para esta cepa los cristales han sido reportados como triangulares, vistos por microscopía electrónica de transmisión (Rodríguez-Padilla *et al.* 1990), sin embargo se puede apreciar la forma piramidal cóncava en las imágenes por microscopía electrónica de barrido.

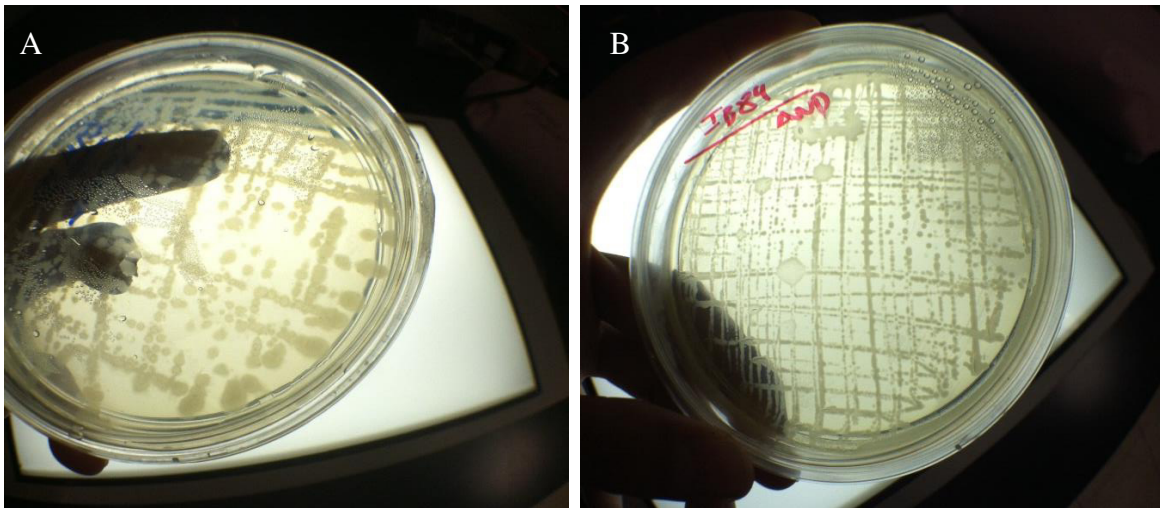


Figura 13. Crecimiento en placa con agar nutritivo. Ceba GM18(A), Ceba IB84 (B).

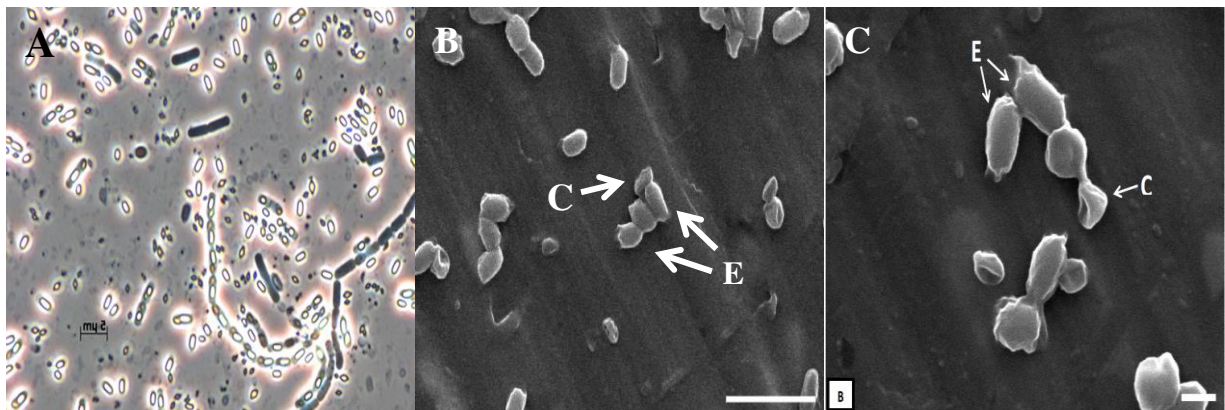


Figura 14. A) *Bacillus thuringiensis* (células vegetativas, células esporuladas y esporas libres) (B y C, Imagen tomada de Espino-Vázquez, 2014). B) Ceba IB84 en microscopía electrónica de barrido, C: Cristal, E: Espora. C) Ceba GM18 en microscopía electrónica de barrido, C: Cristal, E: Espora.

8.2. Perfiles proteicos.

El análisis de los perfiles proteicos de los cristales paraesporales fue llevado con las siguientes objetivos en mente: 1) monitorear la correcta activación de los cristales, para garantizar su actividad en los ensayos de citotoxicidad, 2) la caracterización de los perfiles de las proteínas mayoritarias solubilizadas y activadas, para definir sus tamaños moleculares y 3) análisis comparativo con las PS de referencia.

8.2.1. Cuantificación proteica.

El método que se utilizó durante esta investigación fue a través de Bradford el cual se basa en este principio: se emplea un colorante hidrofóbico cuyas disoluciones acuosas en presencia de ácido Fosfórico tienen un color pardo y que, al encontrarse en el entorno hidrofóbico del interior de una proteína, origina un color azul intenso que se puede medir fácilmente. Este método depende, pues de la interacción relativamente inespecífica entre un colorante hidrofóbico y las proteínas, por lo que es relativamente sensible a la presencia de contaminantes tales como restos de detergente y líquidos orgánicos como el metanol (Bradford 1976). Su principal ventaja es que resulta más rápido y fácil de emplear que otros métodos alternativos, y más sensible que la medida de absorbancia a 280 nm.

Durante la realización de las cuantificaciones los resultados abordaban amplios rangos desde 0.2 mg/ml hasta 6 mg/ml dependiendo sobre la cantidad de inóculo inicial, si la muestra provenía de caja Petri o matraz así como los diferentes procesos de purificación (Tabla VI), por lo cual se decidió estandarizar todas las muestras a 1 mg/ml de proteína y de ahí partir para todos los análisis correspondientes.

8.2.2. SDS-PAGE

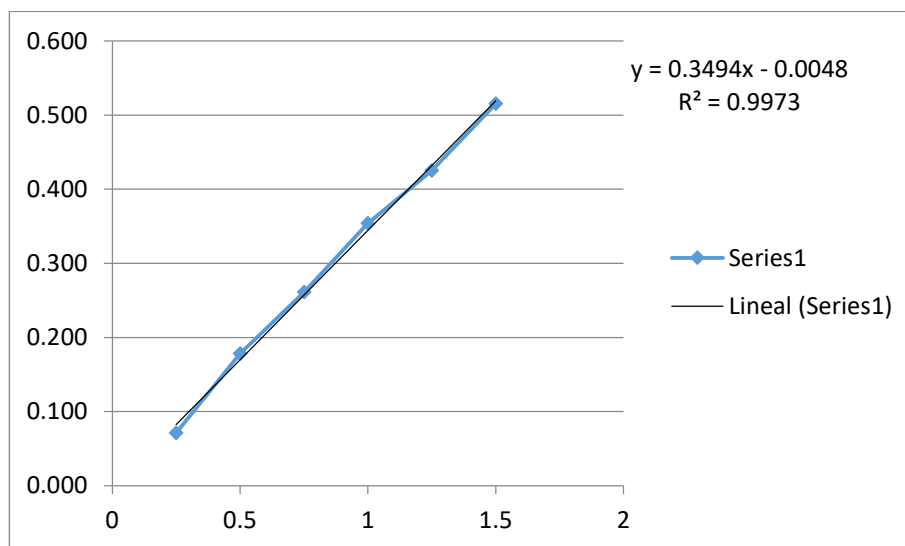
El proceso de solubilización y activación de nuestro estudio fue comparado con los perfiles proteicos de los cristales solubilizados y digeridos reportados en la literatura (Kim *et al.* 2000, Lee *et al.* 2000, Mizuki *et al.* 2000, Yamashita *et al.* 2000). Básicamente fueron observados si bien patrones y pesos moleculares parecidos a la PS4

en la Parasporina presente en la cepa IB84 aún se encuentra en controversia acerca de si es o no la misma Parasporina (Espino-Vázquez 2014, Ruiz-García 2015).

Tabla VI. Cuantificación de proteínas con absorbancia a 595 nm.

BSA mg/mL	A595 _{nm}			PROMEDIO	[mg/mL]
Blanco	0.000	0.000	0.000	0.000	0.201
0.25	0.070	0.075	0.068	0.071	0.215
0.5	0.182	0.173	0.180	0.178	0.522
0.75	0.258	0.254	0.271	0.261	0.759
1	0.343	0.351	0.368	0.354	1.026
1.25	0.428	0.438	0.410	0.425	1.230
1.5	0.559	0.508	0.480	0.516	1.489
muestra1	0.066	0.061	0.085	0.071	0.214
muestra2	0.087	0.067	0.085	0.080	0.240
muestra3	0.081	0.078	0.054	0.071	0.215

Tabla VII. Curva de calibración para la cuantificación de proteínas.



Por otra parte la Parasporina presente en la cepa GM18 no parece tener relación aparente con otras Parasporinas debido a su peso como protoxina. Aunque se observaron una mayor cantidad de bandas minoritarias en los extractos crudos y solubilizados estos fueron eliminados por los procesos de purificación resultando en una solución con las

PS purificadas. En la Figura 15 se resaltan los fragmentos tóxicos de las toxinas activas y sus respectivos pesos moleculares (GM18 e IB84).

La cepa IB84 expuso proteínas de tamaños cercanos a los esperados para la protoxina y PS4 activa; sin embargo, no se igualó a la cepa A1470, ya que esta cepa además de la PS4Aa1, también sintetiza PS2Aa2 (Espino-Vázquez 2014).

En cuanto a la cepa GM18, cuyo tipo de PS no ha sido establecido, presento patrones de proteínas nativas y solubilizadas que no se pudieron relacionar a ninguna de las PS reportadas. Por otra parte, los perfiles en estado activo tuvieron dos bandas principales de 38 y 26 kDa, que pudiera compararse con otras Parasporinas. En la Figura 15 puede observarse en ambos casos las bandas de proteínas, cuya densidad y peso molecular también pudiera estar relacionado a algún tipo de PS.

En la Figura 15, se puede observar que las soluciones de extractos crudos y solubilizados suelen tener otras bandas minoritarias de proteínas, el proceso de purificación erradica estas bandas de proteínas no deseadas y permite tener la certeza que al realizar los bioensayos, será la Parasporina y solo la Parasporina la que interaccionara con las células y provocara el efecto citotóxico, en las Figuras 16 (IB84) y 17 (GM18) es mostrado las Parasporinas tanto de la cepa GM18 como de la cepa IB84 en su estado purificado.

Se hace hincapié en las diferencias en rendimientos de proteína total obtenidas al final de la activación de nuestras cepas y las de referencia. Como recomendación del Dr. Eiichi Mizuki, la activación se hizo a partir de cultivos esporulados en medio sólido, crecidos en cajas Petri de 100 x 15 mm. La cepa GM18 mostro rendimientos de 1 mg de proteína total a partir de 3 cajas Petri. Mientras que en la cepa IB84, donde se requirió hasta 10 cajas para lograr la concentración de 1 mg, debido a esto se optó por cambiar de cajas Petri a matraces de 1 litro con 250 ml de caldo nutritivo para cada cepa y de ahí obtener las proteínas que posteriormente serian purificadas para los experimentos posteriores. El rendimiento observado para las cepas, incluidas las de referencia estuvo estrechamente relacionado al tamaño de los cristales paraesporales, ya que las cepas de menor rendimiento también fueron las productoras de los cristales más pequeños,

mientras que las que tuvieron los cristales más grandes fueron con las que se recuperó la mayor cantidad de proteína final.

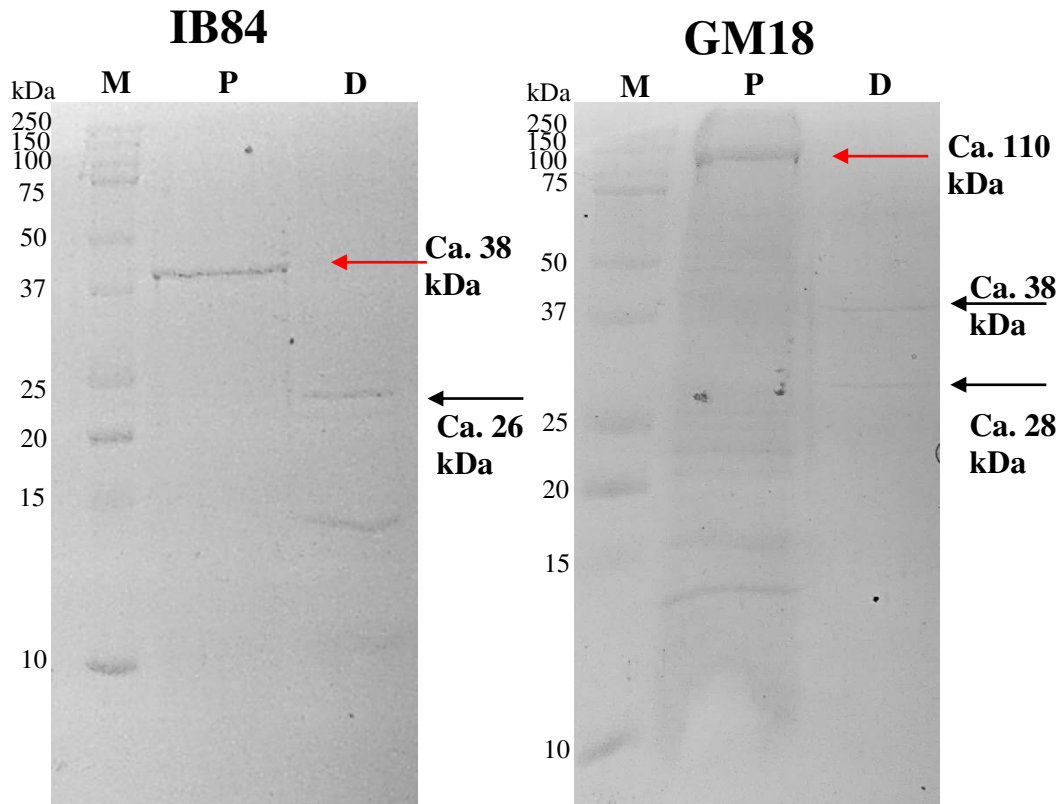


Figura 15. Perfiles proteicos de los cristales de las cepas IB84 y GM18. M: marcador de peso molecular (225-10 kDa); P: Protoxina; D: proteínas activadas. Las flechas rojas señalan las protoxinas y las negras los posibles fragmentos tóxicos.

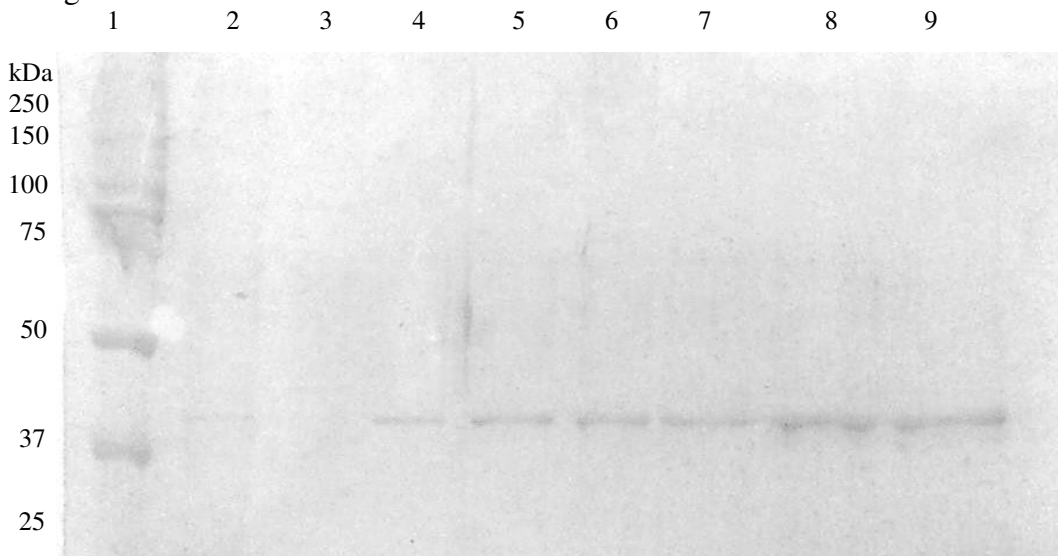


Figura 16. Proteína purificada de la cepa IB84. Carril 1: marcador de peso molecular Carril 4-9: Protoxina purificada de la cepa IB84.

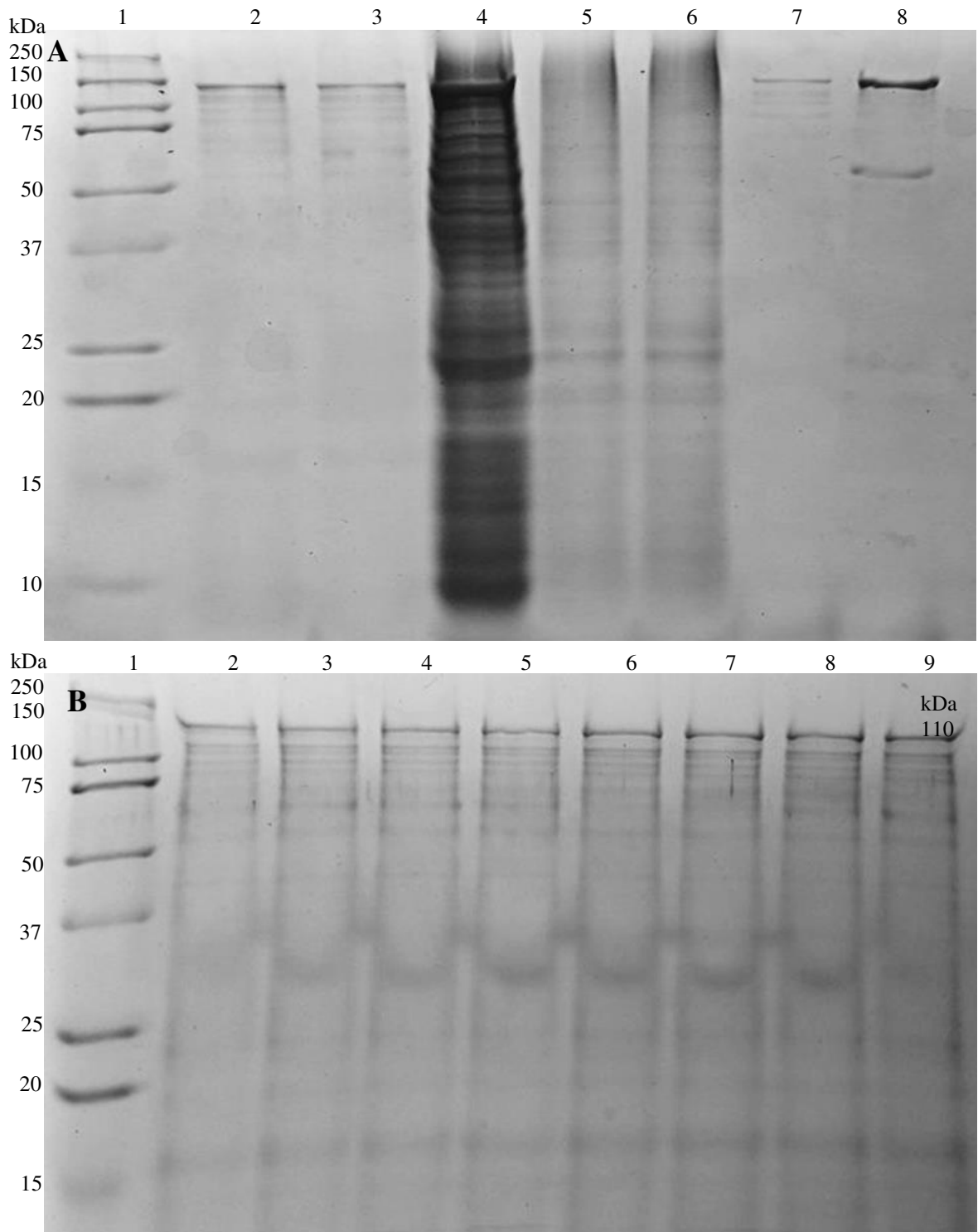


Figura 17. Proteína purificada de la cepa GM18.

A) Carril 1: marcador de peso molecular, Carril 2 y 3: Proteína pura de la cepa GM18, Carriles 4-6: Proteínas totales de la cepa GM18, Carril 7 y 8: Proteína pura de la cepa GM18

B) Carril 1: marcador de peso molecular Carriles 2-9: Protoxina GM18.

8.2.3. SDS-PAGE Bidimensional (2D)

Los geles bidimensionales se corrieron para los cristales solubilizados de las cepas IB84 y GM18. Al ser muestras separadas por peso molecular anteriormente, se encontraron spots particulares al menos concernientes a esta característica, sin embargo se encontraron muchas proteínas del mismo peso molecular y diferente punto isoeléctrico (pI).

La visualización y conteo de los “spots” (puntos o manchas de proteínas) para las proteínas de las cepas IB84 y GM18, dieron los siguientes resultados. Para los cristales solubilizados de la cepa GM18, hubo un spot mayoritario entre los 150 y 100 kDa con un pI estimado de 4.7 (Fig. 18). La protoxina de GM18 tiene un peso de alrededor de 110 kDa (Espino-Vázquez 2014) es claro que este spot mayoritario contiene la protoxina de interés y otras proteínas.

Por otra parte, el perfil de los cristales de IB84 muestra un spot mayoritario entre los 50 y 37 kDa con un pI estimado de 5.5, la protoxina de IB84 esta reportada con un peso alrededor de los 38 kDa por lo cual este spot tiene una alta probabilidad de contenerla, dicha Parasporina comparte atributos similares a los de la PS4, en su forma de protoxina y toxina activa (Fig. 18). Como se mencionó anteriormente, en las proteínas solubilizadas se apreciaron varios spots consecutivos con los mismos pesos moleculares pero distintos pI (Fig. 18).

De acuerdo a la literatura, la protoxina correspondería al spot de pH 5.9. Sin embargo no se descartan las demás proteínas con el mismo peso molecular pero diferente pI como protoxina, debido a que a lo largo de la caracterización de los cristales de IB84, hemos encontrado diferencias importantes con la cepa de referencia y la evidencia experimental apunta hacia la presencia de una PS4 distinta a la reportada.

Tanto de los geles de una dimensión como de los de dos dimensiones se cortaron secciones del gel donde se contenían tanto las proteínas activadas (Fig. 19A) así como las protoxinas (Fig 19B) para su análisis por medio de Nano cromatografía líquida acoplada a espectrómetro de masas en tándem (Nano LC-MS/MS) para las toxinas activas y MALDI-TOF/TOF en el caso de las protoxinas.

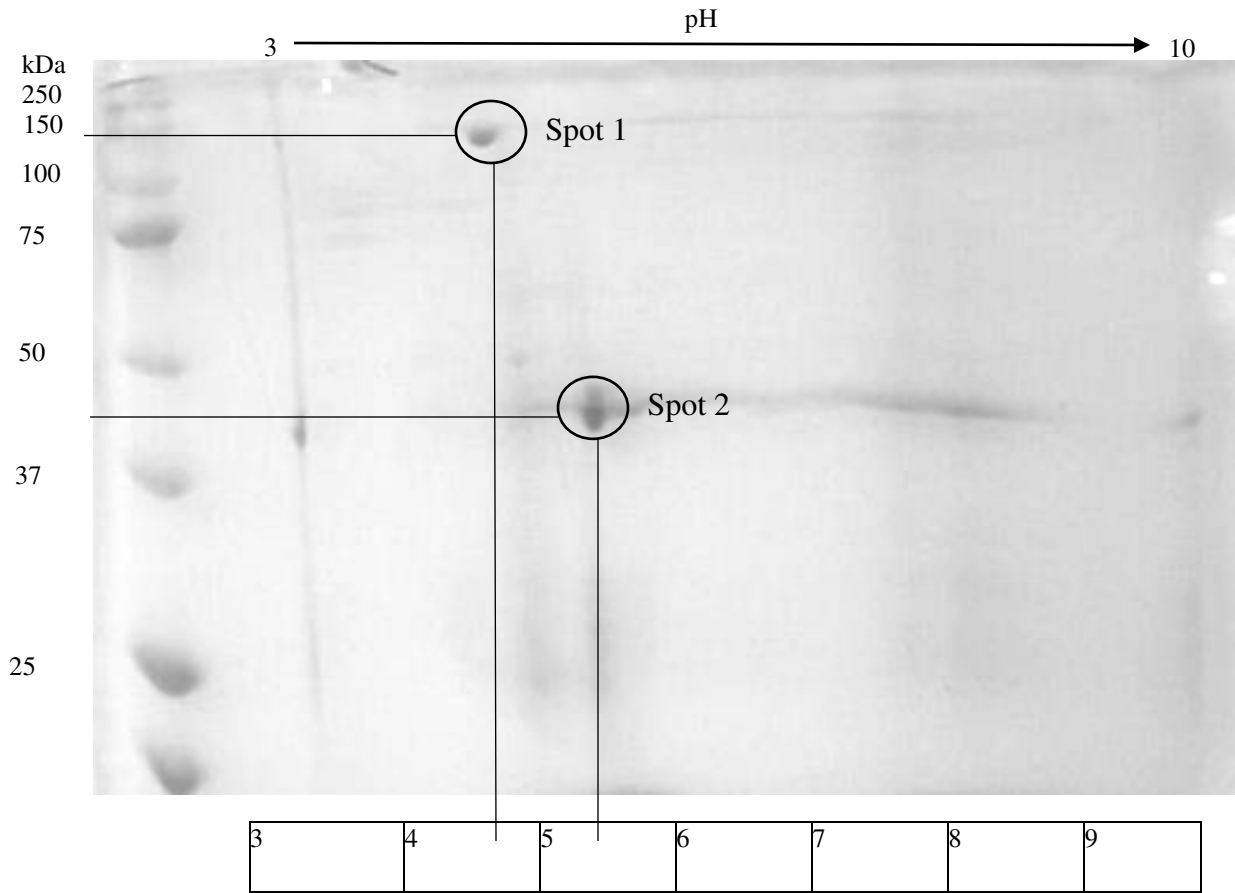


Figura 18. Gel 2D de las protoxinas de las cepas IB84 y GM18.
 Spot 1: Protoxina GM18, Pm: 110 kDa, pI: 4.7
 Spot 2: Protoxina IB81, Pm: 38 kDa, pI: 5.5

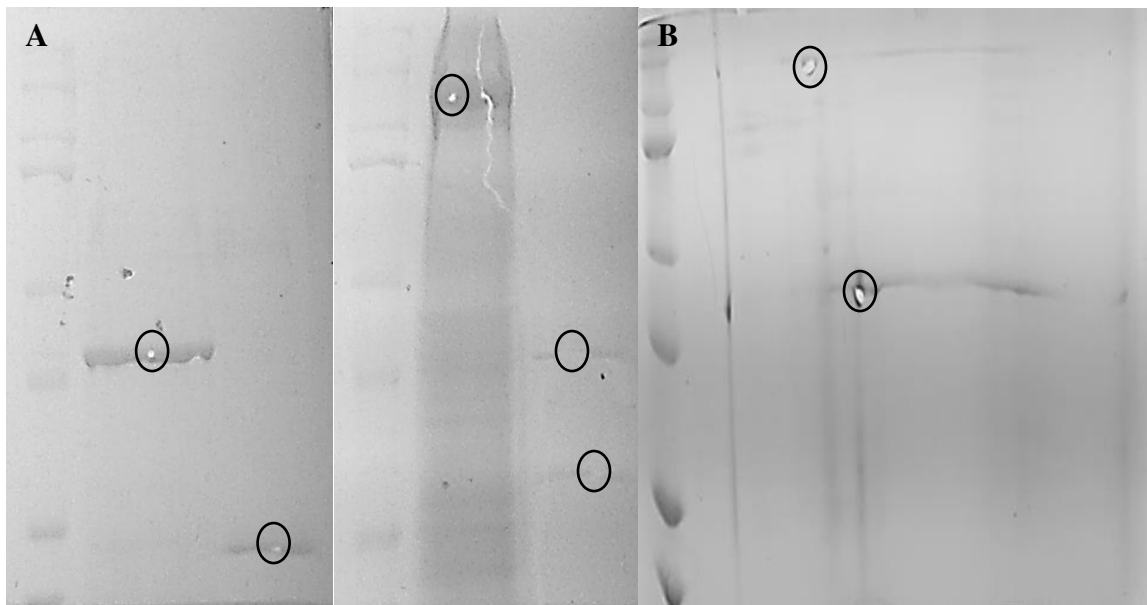


Figura 19. Muestras extraídas para el análisis Nano LC-MS/MS y MALDI-TOF/TOF.

- A) Proteínas para análisis Nano LC-MS/MS
- B) Proteínas para análisis MALDI-TOF/TOF

8.3. Inmunodetección

Para la técnica en gota fue empleada a una concentración de 5µg por muestra. La cepa a analizar junto a su cepa de referencia se sometió contra anti-PS1 y anti-PS4 por separado.

Se realizaron Dot Blots con muestras en concentraciones de 1 a 5 µg de la misma cepa para determinar las concentraciones mínimas en las que el anticuerpo puede seguir detectando. Para el antisuero anti-PS1 se usó una disolución 1:10,000 y para el anti-PS4 de 1:5,000.

El método confirmativo para el mantenimiento de la toxina a través de todos sus procesos de purificación se realizó sobre la cepa GM18 de la cual se tienen anticuerpos policlonales hacia la protoxina, se realizaron toma de muestras en extractos crudos, solubilizados, purificados y digeridos para confirmar la señalización de la proteína durante la purificación, en cuales los resultados dieron positivos para todos los pasos. (Fig. 20).

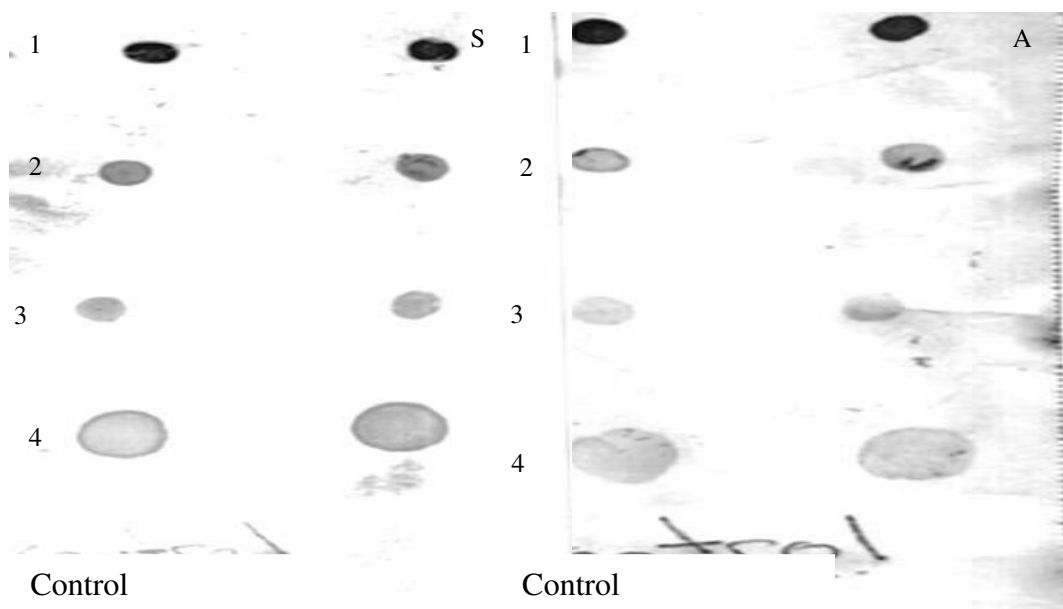


Figura 20. Dot Blots con anticuerpos Anti-GM18 (S y A) sobre las muestras de la cepa GM18 durante su purificación. 1: Extracto crudo, 2: Extracto solubilizado, 3: Extracto purificado, 4: Extracto digerido. Control: Extracto de la cepa IB84 y BSA.

8.4. Cromatografía

El análisis cromatográfico se llevó a cabo con las soluciones solubilizadas de las muestras debido a que se deseaba observar los patrones iniciales de señalización de proteínas de la cepa antes de la purificación y posteriormente se analizó el patrón reflejado en las muestras donde se encontraba únicamente la Parasporina de interés.

8.4.1. Cromatografía de intercambio aniónico.

Las proteínas fueron pasadas a través de una columna de intercambio aniónico Hi Trap Q FF (1 ml, 7 × 25 mm) o Hi Trap Q XL (1 ml, 7 × 25 mm) contra un buffer de Tris-HCl 50 mM (pH 9.0) con EDTA al 1 mM a un radio de flujo de 2.0 mL/min a 4 °C. La proteína fue eluida con un gradiente en incremento de NaCl en una concentración de 0 a 1.0 M en el mismo buffer que fue descrito anteriormente, 1 mL de cada fracción fue recolectada para su posterior caracterización.

La muestra proveniente de la cepa GM18 presenta un patrón característico de dos señales altas de proteínas independientemente de la muestra ingresada o la concentración en la que se encuentra, estas dos señales se ubican en la fracción 27 (Tiempo: 13.5 min, Concentración: 202 mM NaCl) y fracción 46 (Tiempo: 23 min, Concentración: 690 mM NaCl) (Fig. 21).

Al realizar la posterior caracterización en geles de poliacrilamida se confirma que la fracción 27 (Tiempo: 13.5 min, Concentración: 202 mM NaCl) es la que contiene la proteína de interés (Fig. 24B).

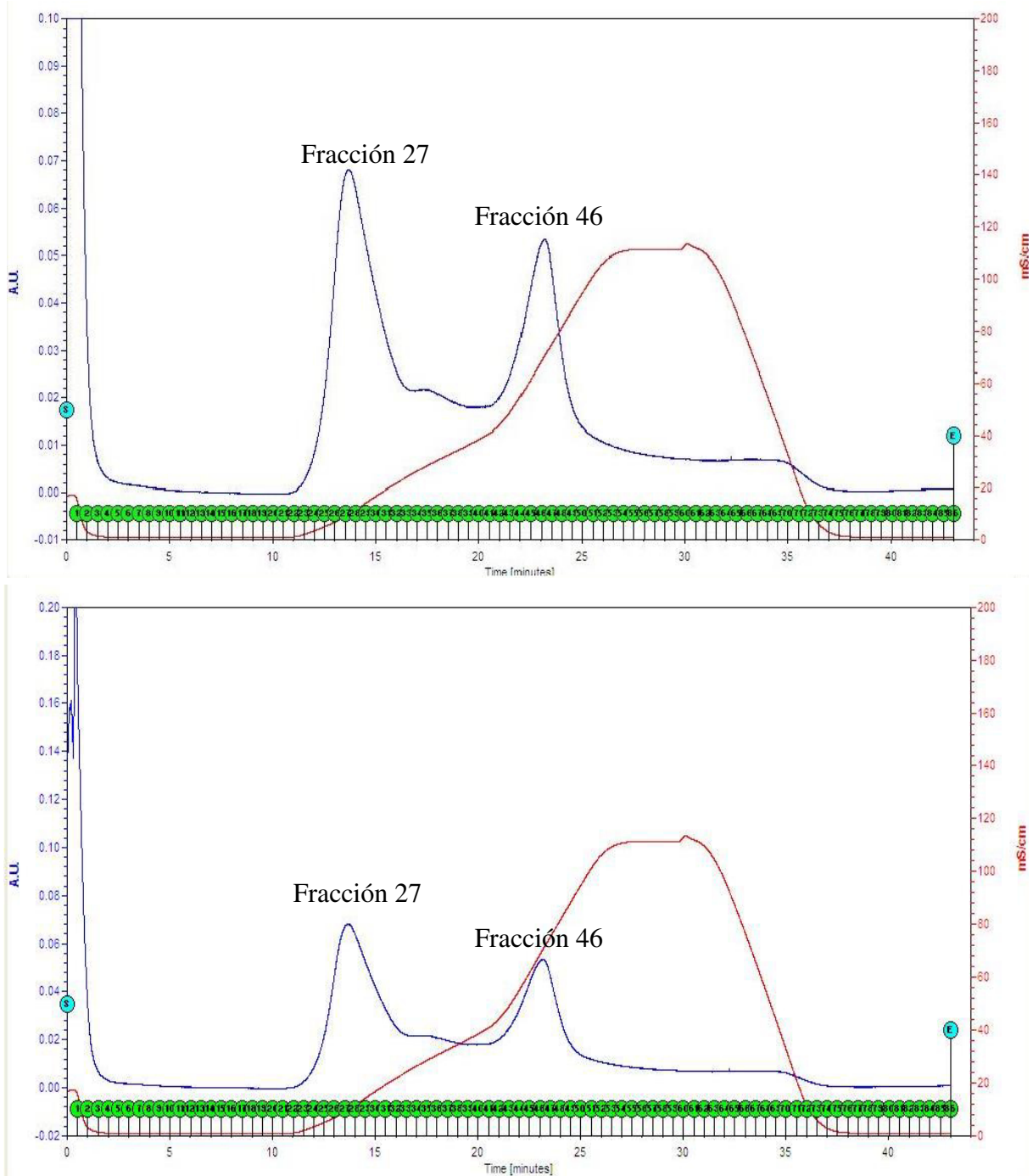


Figura 21. Cromatografía de intercambio aniónico de la cepa GM18.

Eje X: Tiempo y Fracciones recolectadas.

Eje Y izquierdo: Absorbancia a 280 nm.

Eje Y derecho: Conductividad (milisiemens/centímetro).

Línea azul: Señal de proteínas. Línea roja: gradiente de NaCl.

En el caso de la cepa IB84 esta presente tres señales altas de proteínas; fracción 26 (Tiempo: 13 min, Concentración: 195 mM NaCl), fracción 42 (Tiempo: 21 min, Concentración: 630 mM NaCl) y fracción 48 (Tiempo: 24 min, Concentración: 949 mM NaCl), la proteína de interés en esta cepa se encuentra presente en la fracción 26 (Fig. 22).

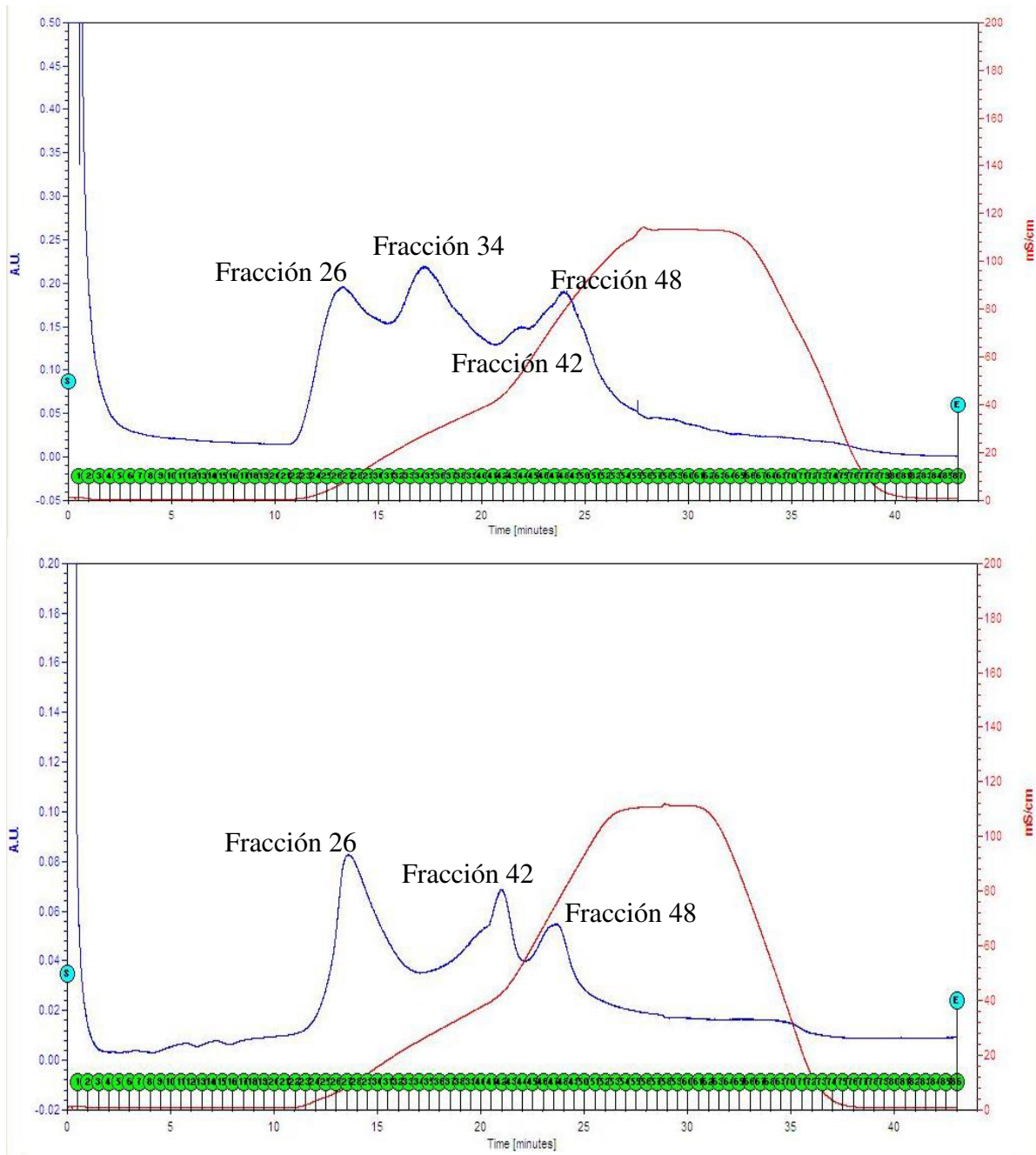


Figura 22. Cromatografía de intercambio aniónico de la cepa IB84.

Eje X: Tiempo y Fracciones recolectadas.

Eje Y izquierdo: Absorbancia a 280 nm.

Eje Y derecho: Conductividad (milisiemens/centímetro).

Línea azul: Señal de proteínas. Línea roja: gradiente de NaCl.

Después de los procesos de extracción y purificación, muestras de la protoxina fueron analizadas en el cromatógrafo para confirmar la fracción de interés así como observar las diferencias de patrones en comparación con la solución de proteínas totales, estos resultados pueden observarse en la Fig. 23.

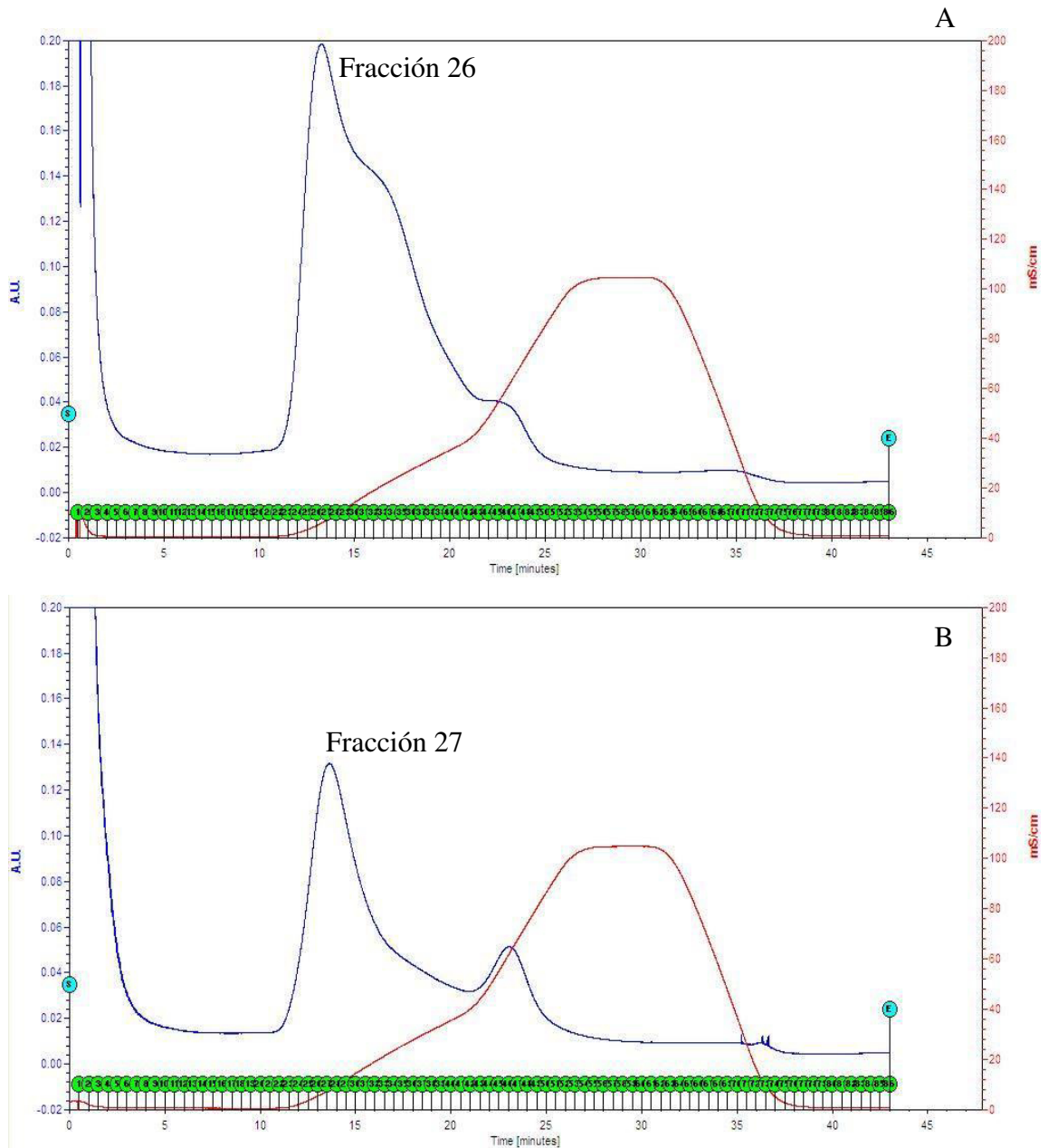


Figura 23. Cromatografía de intercambio aniónico de la cepa IB84 purificada (A) y cepa GM18 purificada (B).

Eje X: Tiempo y Fracciones recolectadas.

Eje Y izquierdo: Absorbancia a 280 nm.

Eje Y derecho: Conductividad (milisiemens/centímetro).

8.4.2. Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)

El análisis por HPLC fue realizado en el Centro de Biotecnología Genómica, del Instituto Politécnico Nacional en Reynosa, Tamaulipas. 15 corridas en total de 100 μ l de muestra de la cepa GM18 por corrida fueron comparadas entre si utilizando BSA (albumina sérica bovina) como control, sin embargo los tiempos de retención se registraron en un tiempo muy corto (Tiempos de retención: Pico 1:1.66 min., Pico 2:1.84 min., Pico 3: 2.26 min., Pico 4: 9.10 min., Pico 5: 14.9 min. y Pico 6: 22.51 min., Control: BSA Pico 4: 9.10 min.) (Fig. 24), por lo cual las señales de proteínas se encuentran muy cerca unas de otras lo no se puede considerar una separación correcta, ya que al realizar la caracterización de los picos por geles de poliacrilamida se observó que nuestra proteína de interés se encuentra en el pico 2 (1.84 min) junto con otras proteínas de la solución.

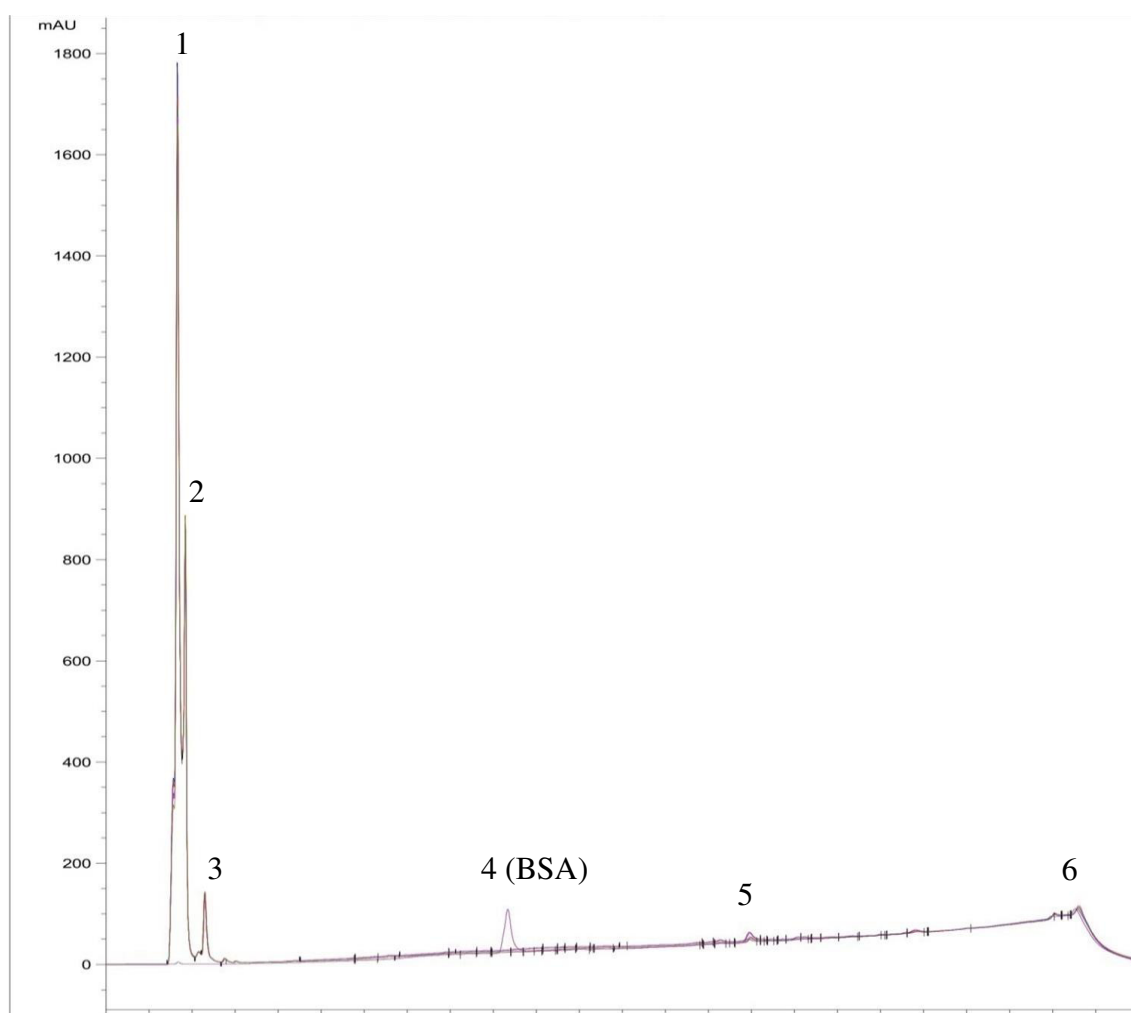


Figura 24. Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) de la cepa GM18. 55
Eje X: Tiempo, Eje Y: Absorbancia a 280 nm.
Tiempos de retención: Pico 1:1.66 min., Pico 2:1.84 min., Pico 3: 2.26 min.,
Pico 4: 9.10 min., Pico 5: 14.9 min. y Pico 6: 22.51 min., Control: BSA Pico 4: 9.10

8.4.3. Nano cromatografía líquida acoplada a espectrómetro de masas en tándem (Nano LC-MS/MS) y MALDI-TOF/TOF

8.4.3.1. MALDI-TOF/TOF

Los resultados del análisis de MALDI-TOF/TOF exponen un listado de 10 proteínas con similitud de secuencias en comparación a las encontradas en la muestra problema, la proteína listada con el número 1, es aquella que demostró tener una mayoría de características iguales al de la muestra problema, en el caso de la muestras extraídas a partir del gel bidimensional en el cual se corrieron las protoxinas de las cepas IB84 y GM18 se obtuvieron resultados alejados a los esperados.

La muestra de la cepa GM18 caracterizo para una dehidratasa del ácido amino levulínico de *Bacillus thuringiensis* (Fig. 25A) con un peso aproximado de 20 kDa y un pI de 5.0, además de un calidad de emparejamiento con nulo grado de confianza, características completamente diferentes a lo esperado para la protoxina de 110 kDa.

En el caso de la muestra de la cepa IB84 caracterizo para una quitosanasasa (Fig. 25B) con un peso aproximado de 50 kDa, un pI de 8.5 y una calidad de emparejamiento de alto grado de confianza, de igual forma, propiedades no esperadas para la protoxina de 38 kDa. El spot mayoritario del cual se tomó la muestra se encuentra algo extendido entre la sección de 50 kDa y 37 kDa en el gel de poliacrilamida, este pudo ser uno de los factores que pudo afectar el análisis de la muestra, de igual forma se ha demostrado que la cepa IB84 contiene proteínas del mismo peso molecular de 38 kDa comparadas con la protoxina y en las cuales lo que difiere es su pI.

Gel Idx/Pos	178/H5	Instr./Gel Origin	BA2060/170407A	Process Status	Analysis Succeeded	A					
Plate [#] Name	[1] 31598	Instrument Sample Name		Spectra	11						
Rank	Protein Name	Accession No.	Protein MW	Protein PI	Pep. Count	Protein Score	Protein Score	Total Ion Score	Total Ion C. I. %		
1	delta-aminolevulinic acid dehydratase [Bacillus thuringiensis]	gi 1154374701	20255	5.01	6	39	0				
Peptide Information											
Calc. Mass	Obsrv. Mass	\pm da	\pm ppm	Start	End	Sequence	Ion λ . I. %	Modification	Rank	Result Type	
				Seq.	Seq.	Seq.	Score				
1013.505	1013.4851	-0.0199	-20	21	29	ASLEYFGAR				Mascot	
2149.0818	2149.0386	-0.0432	-20	98	117	LHNTHIVNSGCTLGECLAK				Mascot	
2206.085	2206.0195	-0.0655	-30	126	145	SYIGSIDYVDGNAALMFTIR				Mascot	
2213.1865	2213.0352	-0.1513	-68	21	39	ASLEYFGARVITYWIGRPK				Mascot	
3049.5088	3049.2971	-0.2117	-69	118	145	SFLHSGAKSYIGSIDYVDGNAALMFTIR		Oxidation (M)[24]		Mascot	
3049.5088	3049.2971	-0.2117	-69	118	145	SFLHSGAKSYIGSIDYVDGNAALMFTIR		Oxidation (M)[24]		Mascot	
3494.7227	3494.4268	-0.2959	-85	146	175	LFYGVINHGKTLLEAFQELASLIDEETHFR				Mascot	
3494.7227	3494.4268	-0.2959	-85	146	175	LFYGVINHGKTLLEAFQELASLIDEETHFR				Mascot	
Gel Idx/Pos	179/H6	Instr./Gel Origin	BA2060/170407A	Process Status	Analysis Succeeded	B					
Plate [#] Name	[1] 31598	Instrument Sample Name		Spectra	11						
Rank	Protein Name	Accession No.	Protein MW	Protein PI	Pep. Count	Protein Score	Protein Score	Total Ion Score	Total Ion C. I. %		
1	MULTISPECIES chitosanase [Bacillus cereus group]	gi 1041573264	50686.9	8.47	8	257	100	227	100		
Peptide Information											
Calc. Mass	Obsrv. Mass	\pm da	\pm ppm	Start	End	Sequence	Ion λ . I. %	Modification	Rank	Result Type	
Calc. Mass	Obsrv. Mass	\pm da	\pm ppm	Seq.	Seq.	Sequence	Score	λ . I. %	Modification	Rank	Result Type
1077.4000	1077.4255	-0.0633	-59	255	263	AFYEFTGDK				Mascot	
1319.6011	1319.5219	-0.0792	-60	327	337	IYMDYAMYGEK				Mascot	
1412.7056	1412.6243	-0.0813	-58	93	105	NDLSSLPGGYVK				Mascot	
1475.7021	1475.6698	-0.0323	-22	327	338	IYMDYAMYGEKR				Mascot	
1858.8453	1858.8083	0.023	12	438	453	KTQNLTDIAHYEGYDN				Mascot	
1918.8899	1918.8669	-0.023	-12	239	254	SSLDRPSDWMMSHLR				Mascot	
1918.8899	1919.1298	0.2399	125	239	254	SSLDRPSDWMMSHLR				Mascot	
1934.8848	1934.8118	-0.073	-38	239	254	SSLDRPSDWMMSHLR		Oxidation (M)[11]		Mascot	
1934.8848	1935.1615	0.2767	143	239	254	SSLDRPSDWMMSHLR		Oxidation (M)[11]		Mascot	
2283.1074	2283.0537	-0.0537	-24	198	217	QWGSNCTVNLKEAGDITK				Mascot	
2558.2522	2558.1182	-0.134	-52	174	197	AQGHFDSATDGLDIAYSLLLAK				Mascot	
2558.2522	2558.1182	-0.134	-52	174	197	AQGHFDSATDGLDIAYSLLLAK	227	100		Mascot	

Figura 25. Análisis MALDI-TOF/TOF

A) Muestra de la cepa GM18

B) Muestra de la cepa IB84

8.4.3.2. Nano LC-MS/MS

Parecido al análisis por MALDI-TOF/TOF los resultados del análisis por Nano LC-MS/MS se exponen como un listado con de proteínas con secuencias idénticas a las encontradas en la muestra problema, el tamaño de la proteína, el número de secuencias idénticas y los aminoácidos que las conforman.

De las proteínas listadas para la muestra de 38 kDa de la cepa GM18, aquella que tuvo mayor cantidad de secuencias idénticas, únicas para la proteína y de primer rango fue la proteína insecticida Cry1Jb de *Bacillus thuringiensis* con 5 secuencias idénticas en ambas proteínas (Fig. 26A), aunado a esto, en la muestra de 28 kDa de la cepa GM18, la proteína que obtuvo mayor cantidad de secuencias idénticas con nuestra toxina activada también fue Cry1Jb con 6 secuencias idénticas (Fig. 26B), debido a estos resultados optamos por utilizar los datos presentes hasta la actualidad de la toxina Cry1Jb para su comparación con nuestra Parasporina.

CR1JB_BACTU Mass: 133470 Score: 15 Matches: 5(1) Sequences: 5(1) emPAI: 0.04											A
Pesticidal crystal protein Cry1Jb OS=Bacillus thuringiensis GN=cry1Jb PE=2 SV=1											
Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	ppm	Miss	Score	Expect	Rank	Unique	Peptide	
5	807.3635	806.3562	806.4399	-103.73	1	6	0.6	2	U	R.VTERFR.I	
86	995.4667	994.4594	994.4641	-4.70	0	4	0.77	2	U	K.TMSTGEELK.S	
113	1093.4580	1092.4507	1092.5598	-99.79	0	3	0.91	4	U	R.TSNGMVTLR.V	
149	1249.5472	1248.5399	1248.6609	-96.85	1	7	0.53	3	U	R.RTSNGMVTLR.V	
224	1586.6700	1585.6627	1585.8464	-115.81	0	15	0.055	1	U	R.IIDAQIEANIPSR.I	

CR1JB_BACTU Score: 16 Matches: 6(1) Sequences: 6(1) emPAI: 0.05											B
Pesticidal crystal protein Cry1Jb OS=Bacillus thuringiensis GN=cry1Jb PE=2 SV=1											
Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	ppm	Miss	Score	Expect	Rank	Unique	Peptide	
5	807.3573	806.3500	806.4399	-111.42	1	2	1.7	2	U	R.VTERFR.I	
117	1090.4557	1089.4484	1089.5414	-85.37	0	1	1.9	6	U	R.TLSVESQNGR.C	
118	1093.4486	1092.4416	1092.5598	-108.12	0	5	0.53	3	U	R.TSNGMVTLR.V	
205	1383.6246	1382.6173	1382.6837	-48.02	1	3	1.2	3	U	R.GSSHRLSHVTMR.N	
246	1586.6710	1585.6637	1585.8464	-115.18	0	16	0.041	2	U	R.IIDAQIEANIPSR.I	
295	1944.8613	1943.8540	1943.9701	-59.71	0	3	0.84	4	U	R.NLLQDPNFTSINGQLDR.G	

Figura 26. Análisis Nano LC-MS/MS GM18

A) Muestra de 38 kDa de la cepa GM18

B) Muestra de 28 kDa de la cepa GM18

Por otra parte, en los resultados del análisis en la muestra de 26 kDa de la cepa IB84, se encontró similitud con la toxina Cry15Aa con un peso de 38 kDa como protoxina y 4 secuencias idénticas con nuestra Parasporina (Fig. 27), teniendo esto en mente, la decisión fue utilizar a la toxina Cry15Aa para la comparación de las secuencias, su análisis y modelaje posterior.

C15AA_BACUT Mass: 37524 Score: 19 Matches: 4(2) Sequences: 4(2) emPAI: 0.36

Pesticidal crystal protein Cry15Aa OS=Bacillus thuringiensis subsp. thompsoni GN=cry15Aa PE=2 SV=1

Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	ppm	Miss	Score	Expect	Rank	Unique	Peptide
62	906.4067	905.3994	905.4818	-90.99	0	1	1.6	7	U	K.SGVTVSASAK.F
135	1107.4738	1106.4665	1106.6084	-128.22	0	19	0.031	3	U	R.VSQGLYSVVR.I
281	1649.7528	1648.7455	1648.8321	-52.52	0	1	1.3	2	U	R.ASNAYISNGVQAIWR.G
283	1657.7302	1656.7229	1656.7314	-5.13	1	15	0.038	1	U	K.EHICHQAEKYER.D

Figura 27. Análisis Nano LC-MS/MS IB84

8.5. Análisis de secuencias, determinación y modelaje de la estructura terciaria y tridimensional

8.5.1. Análisis de secuencias

A partir de las proteínas elegidas para la comparación con nuestras muestras, Cry1Jb en el caso de la cepa GM18 y Cry15Aa para la cepa IB84, se procedió a extraer la secuencia completa de aminoácidos con la base de datos del NCBI, los alineamientos de las secuencias con BLAST-Protein dan como resultado esperado, el emparejamiento con toxinas Cry de *Bacillus thuringiensis* y en específico con Cry1Jb y Cry15Aa.

Además se identificó la zona en las cuales nuestras secuencias se acoplan, tanto en la protoxina como en la toxina activada con la ayuda de los servidores PredictProtein, RaptorX y el programa UCSF Chimera.

En la Fig. 28 puede observarse la secuencia de aminoácidos de la protoxina Cry1Jb que consta de 1170 aminoácidos y un peso de 133 kDa (Fig. 28A), también se encuentra la toxina digerida de Cry1Jb de 548 aminoácidos (Fig. 28B), los números entre paréntesis y en rojo corresponden al orden de las secuencias, las secuencias en amarillo aquellas que se encuentran aisladas, y las secuencias en turquesa representan secuencias que se superponen en algunos aminoácidos con otra secuencia.

En las tablas VIII y IX, pueden observarse las secuencias de aminoácidos idénticas entre Cry1Jb y la Parasporina de la cepa GM18, su sitio en la proteína, estructura y dominio donde se presentan.

Cry1Jb (1170 aa) 133 kDa numero de acceso NCBI: Q45716

A)

Protoxina

```
MEINNQNQCIPYNCLSNPEEVLLDGERILPDIDPLEVSMSELLQFLLNNFVPGGGFISGLFDKIWGALRPSD
WELFLAQIEQLIDQRIEATVRAKAIAELEGGRSFQLYVEAFKEWEETPDNTAARS (1)RVTER (2)FRII
DAQIEANIPSFRI PGFEVPLLSVYAQAANLHLALLRDSVIFGERWGLTTTNDIYNRQVKRIHEYSDHCV
DTYKTELERLGFTSRAQWKIYNQFRRELTTLTVLDIVAVFPNYDGKLYPIQTKSELTREIYTSVPSEYYYGA
INNYNQNGIQTERQIRQPHLMDFNTMTMYTSYNRREYYWSGLEMTAYFTGFAGPQVSFPLAGTRGDAAPP
FNVRVNDGIYRILSAPFYSAPFLGTSVLGSRGEEFMFALNNISPPPSARYRNPPTVDSLVSIPPQDNSVP
PH (3)RGSSHRLSHVTMRN SSPIFWHTRSATTTNRINSDVITQIPMVKAYNLHAGATVVRGPGFTGGDIL
(4)R (5)RTSNGMVVTLRV DASAVRNQRYRIRFRYAATSNFYFVVRGNLGVNGREIM (6)KTMSTGEELK
SASFVLGEFIFPFNFFENQVPLQIEIQSLSPGGEVYLDKIEFIPADTTFEAEYDLERAQKAVNALFTSTNQ
RGLKTDVTDYHIDQVSNLVECLSDFECLDEKRELSEKVKHAKRLSDE (7)RNLLQDPNFTSINGQLDRGWR
GSTDITIQGGNDVFKENYVTLPGTFDECYPTYLYQKIDESKLLKAYTRYELRGYIEDSQDLEVYLIRYNAKH
ETLNVPGTDSL (8)RTLSVESQNGRC GELNRCMPHIKWNPDVDCSCRDGEKCAHSHHSLDIDVGCSDLQ
EDLGVVWVFKIKTQEGYARLGNLEFIEEKPLVGEALSRVKRAEKKWRDKREKLELETKRVYTEAKEAVDAL
FVDSQYDRLQADTNIGMIHAADKLVHRICETYLPELFPFIPGINAII FEELNRI STAFFLYEARNVINNGD
FNNGLTCWNVKGHV DVQQSHHRSVLVI PEWEAEVVSQKVRVC PGRGYILRV TAYKEGYGEGCVTIHEIEDNT
DELKFRNCEEEGDYSNDTGTCDY PASQGAAGCADVCNSRNVGYKDAYETNTSASVNYKPTYEEETYTDVR
EDNHCEYDRGYVNY PPLPAGYVTKELEYFPETDTVWIEIGETEGKFIVDSVELLLMEE .
```

B)

Toxina (548 aa).

```
FVPGGGFISGLFDKIWGALRPSDWELFLAQIEQLIDQRIEATVRAKAIAELEGGRSFQLYVEAFKEWEET
PDNTAARS (1)RVTER (2)FRIIDAQIEANIPSFRI PGFEVPLLSVYAQAANLHLALLRDSVIFGERWGLT
TTNNDIYNRQVKRIHEYSDHCVDTYKTELERLGFTSRAQWKIYNQFRRELTTLTVLDIVAVFPNYDGKLYP
IQTKSELTREIYTSVPSEYYYGAINNYNQNGIQTERQIRQPHLMDFNTMTMYTSYNRREYYWSGLEMTAY
FTGFAGPQVSFPLAGTRGDAAPPFNVRVNDGIYRILSAPFYSAPFLGTSVLGSRGEEFMFALNNISPPPS
ARYRNPPTVDSLVSIPPQDNSVPPH (3)RGSSHRLSHVTMRN SSPIFWHTRSATTTNRINSDVITQIPMV
KAYNLHAGATVVRGPGFTGGDIL (4)R (5)RTSNGMVVTLRV DASAVRNQRYRIRFRYAATSNFYFVVRGN
NLGVNGREIM (6)KTMSTGEELKSASFVLGEFIFPFNFFENQVPLQIEIQSLSPGGEVYLDKIEFIPAD
```

Figura 28. Secuencia de aminoácidos (FASTA) de Cry1Jb

A) Protoxina

B) Toxina

Tabla VIII. Secuencias en la banda superior de 38 kDa de GM18

No.	Secuencia del péptido	Sitio en la proteína	Estructura	Dominio
1	R.VTERFR.I	128-135	Helice	I
2	R.IIDAQIEANIPSFR.I	134-149	Helice+Loop	I
4	R.RTSNGMVVTLR.V	489-501	Beta plegada +Loop + Beta plegada	III
5	R.TSNGMVVTLR.V	490-501	Beta plegada +Loop + Beta plegada	III
6	K.TMSTGEELK.S	541-551	Beta plegada+ Loop	III

No.	Secuencia del péptido	Sitio en la proteína	Estructura	Dominio
1	R.VTERFR.I	128-135	Helice	I
2	R.IIDAQIEANIPSFR.I	134-149	Helice+Loop	I
3	R.GSSHRLSHVTMR.N	423-436	Helice+Beta plegada + Loop	II
5	R.TSNGMVVTLR.V	490-501	Beta plegada +Loop + Beta plegada	III
7	R.NLLQDPNFTSINGQLDR.G	669-687	Helice+Loop	Protoxina
8	R.TLSVESQNGR.C	772-783	Loop	Protoxina

Tabla IX. Secuencias en la banda inferior de 28 kDa de GM18

En comparación, la toxina Cry15Aa es más pequeña que la toxina Cry1Jb, cuenta únicamente con 340 aminoácidos y un peso aproximado de 38 kDa en su estado como protoxina, en la Fig. 39 y la tabla X, están representados los datos de dicha proteína junto con las secuencias de la Parasporina de la cepa IB84. Similar a la composición anterior los números entre paréntesis y en rojo corresponden al orden de las secuencias, las secuencias en amarillo aquellas pertenecientes a ambas proteínas, esta proteína no presenta secuencias sobrepuestas una con otras, por lo cual no se encuentran marcadas en turquesa.

Cry15Aa (340 aa) 38 kDa numero de acceso NCBI: Q45729

Protoxina

MAIMNDIAQDAARAWDIIAGPFIRPGTTPTNRQLFNQIGNIEVEPGNLNFSVVPPELDFSVSQDLFNNTSV
 QQSQTASFNESRTETTSTAVTHGV (1) KSGVTVSASAKFNAKILVKSIEQTITTTVSTEYNFSSTTTTRTNT
 VTRGWSIAQPVLVPPHSRVTATLQIYKGDFTVPVLLSLRVYQGTGLAGNPSFPSPLYAATYENTLLGRIRE
 HIAPPALF (2) RASNAYISNGVQAIWRGTATT (3) RVSQGLYSVVRIDERPLAGYSGETRYYLPVTLSNS
 SQILTPGSLGSEIPIINPVPNASCKKENSPIIIHHDREKHRERDYD (4) KEHICHDAQAEKYERYDKE

Figura 29. Secuencia de aminoácidos (FASTA) de Cry15Aa

Tabla X. Secuencias en la banda inferior de 28 kDa de IB84

No.	Secuencia del péptido	Sitio en la proteína	Estructura	Dominio
1	K.SGVTVSASAK.F	96-107	Beta plegada+Loop	II
2	R.ASNAYISNGVQAIWR.G	219-235	Beta plegada+Loop	I
3	R.VSQGLYSVVR.I	240-251	Beta plegada	III
4	K.EHICHDQAEKYER.D	322-336	Helice+Loop	III

8.5.2. Determinación y modelaje de la estructura terciaria y tridimensional

Obtuvimos las predicciones estructurales de las 2 Parasporinas como un ejercicio complementario mediante el uso del servidor Raptor X. Este servidor desarrolla un modelo para la estructura de proteínas y la predicción de funciones, es desarrollado por el grupo Xu, especializados en la predicción secundaria, terciaria y de contacto para secuencias de proteínas sin homólogos cercanos en el banco de datos de proteínas (PDB).

Dada una secuencia de aminoácidos, RaptorX predice sus estructuras secundarias y terciarias, así como mapas de contacto, accesibilidad a disolventes, regiones desordenadas y sitios de unión. RaptorX asigna las siguientes puntuaciones de confianza para indicar la calidad de un modelo 3D predicho: valor P para la calidad global relativa, GDT (prueba de distancia global) y uGDT (GDT no normalizado) para la calidad global absoluta y RMSD para el valor absoluto de calidad local de cada residuo en el modelo. RaptorX-Binding predice los sitios de unión de una secuencia de aminoácidos, basado en el modelo 3D predicho por RaptorX.

Una de las características del servidor, es acumular toda la información del modelo 3D en un archivo PDB el cual puede ser transferido a otros programas de visualización y modelaje de proteínas, como lo es USCF Chimera, en este programa se realizaron los modelajes presentados más adelante.

En el análisis de secuencias encontradas en la protoxina Cry1Jb nuestro modelo para la Parasporina de la cepa GM18, la cantidad final fueron 8 secuencias idénticas entre la sección de 38 kDa y 28 kDa provenientes de los geles de poliacrilamida (Fig. 15) como se hace constatar en la Fig. 30 la mayoría de estas secuencias se encuentran hacia el interior de la protoxina, por lo cual se puede deducir

que son de alta confiabilidad ya que no se encuentran en los extremos de la proteína donde podrían perderse en el proceso de activación con proteasas, de hecho, dos secuencias son eliminadas una vez la proteína es digerida, en la toxina activada son 6 de nuestras secuencias las que permanecen (Fig. 31).

Cabe destacar la conservación de los 5 bloques conservados, característicos de las toxinas Cry y la preservación de los 3 dominios tanto en la protoxina como en la toxina activada.

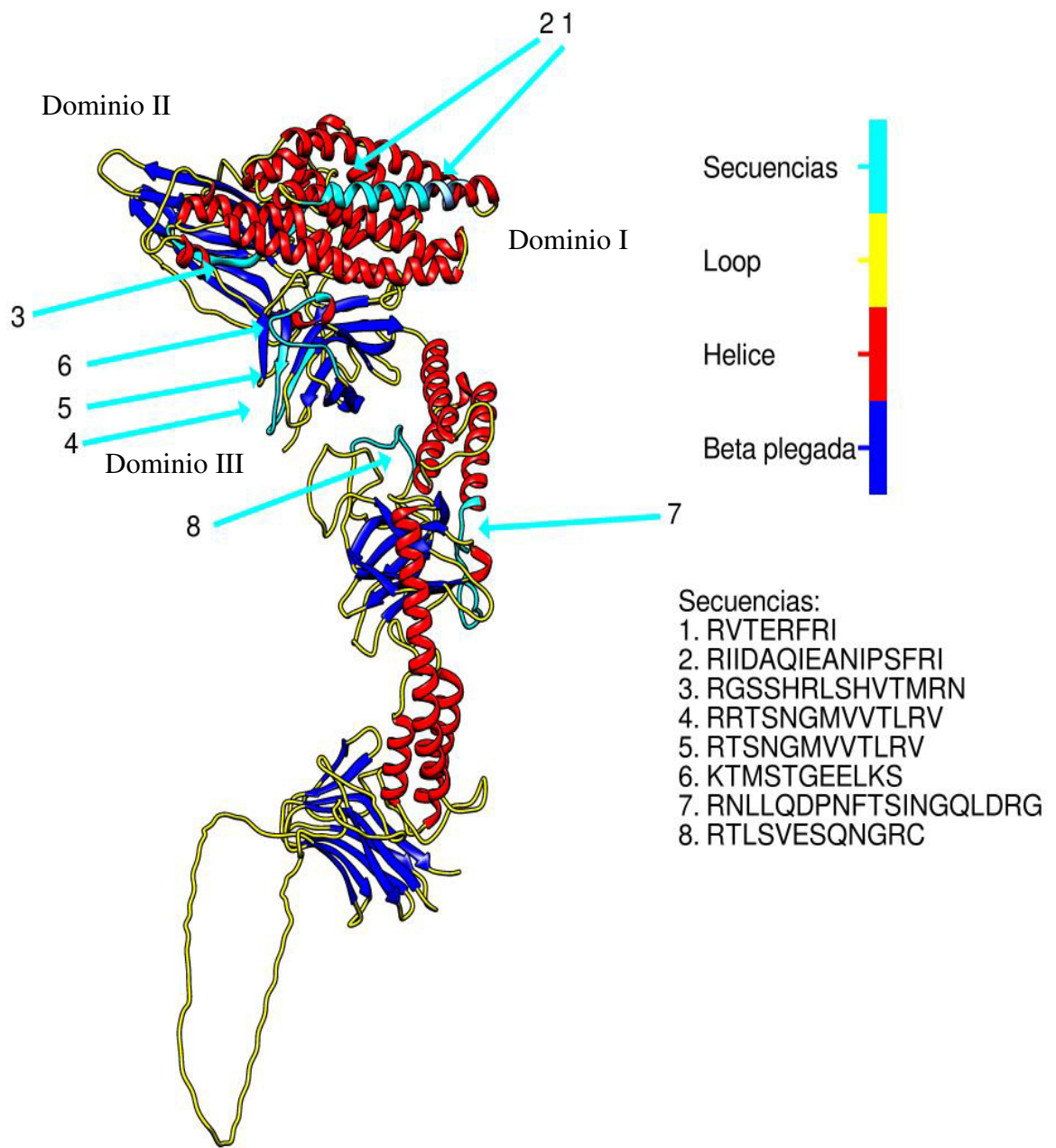


Figura 30. Modelo de la Protoxina Cry1Jb con las secuencias de la Parasporina en 63 la cepa GM18.

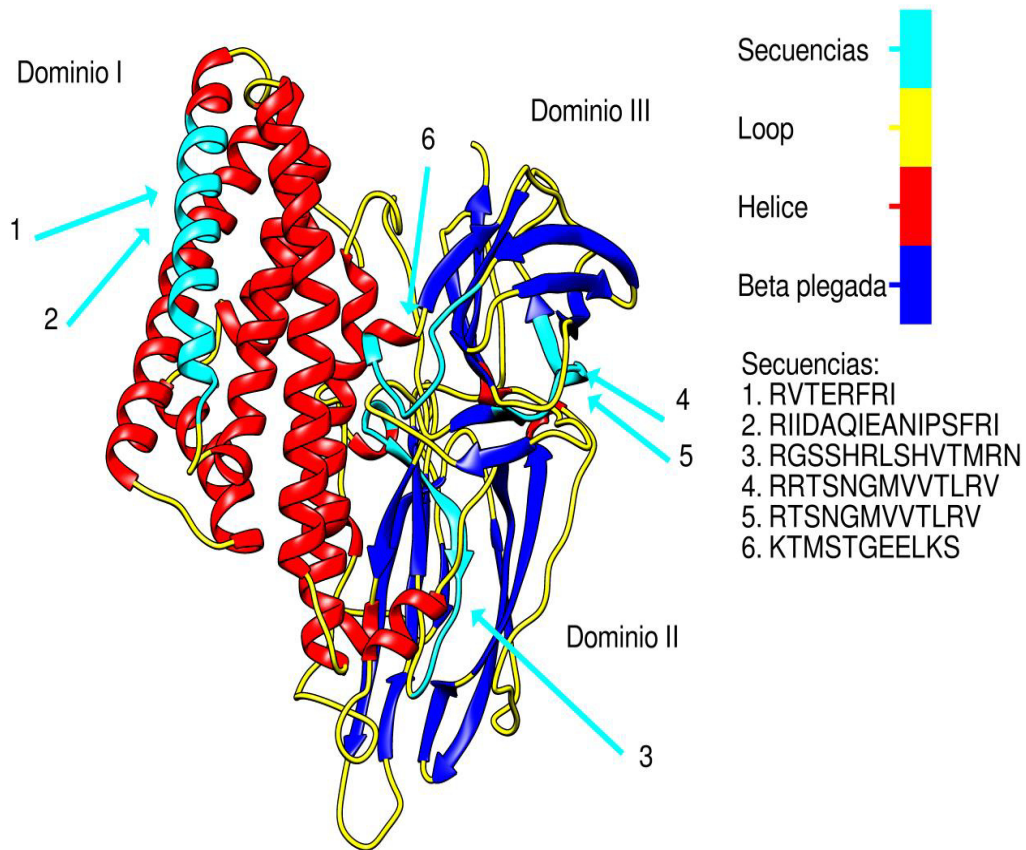


Figura 31. Modelo de la toxina Cry1Jb con las secuencias de la Parasporina en la cepa GM18.

En la sección de 26 kDa de la cepa IB84 se encontraron 4 secuencias idénticas a la toxina Cry15Aa como se observa en la Fig. 29 y Tabla X, en este caso los estudios realizados en el modelo, todos fueron sobre la secuencia de la protoxina, ya que al igual que nuestra cepa, la protoxina Cry15Aa tiene un peso de 38 kDa y el resultado de la digestión produce una toxina de alrededor de 25 kDa la cual no ha sido secuenciada aun (Naimov *et al.* 2008). La Fig. 32 demuestra el modelo de la toxina Cry15Aa con las secuencias de la Parasporina en la cepa IB84, curiosamente el modelo enseña una semejanza débil con las proteínas formadoras de poro de β -barril, tales como las aerolisinas de *Aeromonas hydrophila*, las citotoxinas de *Pseudomonas aeruginosa*, la toxina épsilon de *Clostridium perfringens*, así como la Parasporina-4 relacionada con nuestra cepa IB84.

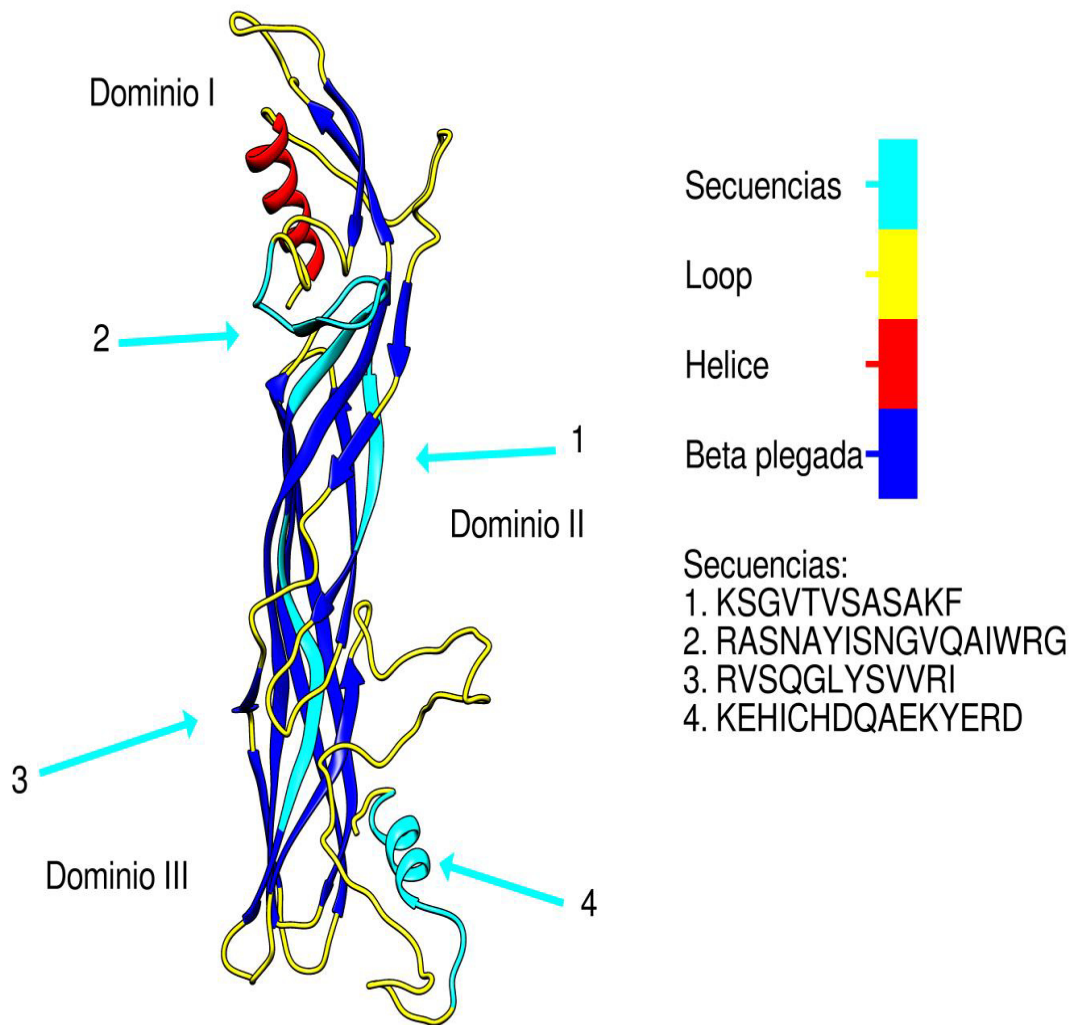


Figura 32. Modelo de la toxina Cry15Aa con las secuencias de la Parasporina en la cepa IB84.

8.6. Bioensayos

La actividad biológica fue puesta a prueba mediante ensayos de citotoxicidad contra la línea celular de leucemia linfoblástica aguda MOLT-4.

Los extractos activos de las cepas IB84 y GM18 fueron probados en ensayos de una sola dosis contra la línea MOLT-4. Las células de leucemia fueron susceptibles en mayor o menor medida ante los dos extractos.

El análisis observado desde el punto de vista de susceptibilidad, demostró que las células control no sufrieron daños que pudieran mermar su desarrollo, mientras que las

células que recibieron el tratamiento con Parasporinas tuvieron diversos grados de susceptibilidad.

La validación de los ensayos de citotoxicidad consistió en células de leucemia en suspensión MOLT-4 (200 μ l) expuestas con diferentes buffers (10 μ l), incluyendo el buffer de carbonatos con proteinasa K y PMSF con el que fueron activados los cristales paraesporales de todas las cepas. También fueron incluidas células (200 μ l) sin ninguna solución o buffer adicional y células adicionadas con agua estéril (10 μ l). De todos estos controles aquel que resulto en un efecto adverso, fue el buffer de carbonatos en solución, ya que este modifica las condiciones del medio provocando un estrés en las células y provocando su daño o muerte, por lo cual se decidió, transferir las muestras a suero y homogenizarlas con medio concentrado y medio normal antes de agregar el tratamiento a las células, y así reducir las interacciones que pudieran afectar la confiabilidad del ensayo, a pesar de esto, el resultado general fue que no hubo diferencias significativas en ninguna de las condiciones, descartando que los componentes usados para la activación de los cristales, interfirieran con la viabilidad de la línea celular.

Los resultados se analizaron a 24 y 48 h, para corroborar el efecto de los tratamientos a tiempo prolongado, bajo esta situación el efecto que cambio después de las 24 horas fue el de la cepa GM18 ya que redujo el porcentaje de sobrevivencia de 70.40% (Fig. 33) a 24 h hasta 54.60% en el análisis de 48 h (Fig. 35), a diferencia del porcentaje de sobrevivencia de la cepa IB84 ya que se mantuvo en un alrededor de 60% incluso después de las 24 horas (Fig. 33 y 34). En base a esto, el efecto visualizado a partir de las 24 h se deduce, es el estado óptimo de la concentración de Parasporinas y su acción sobre las células. También se confirma que las Parasporinas requieren una digestión con proteasas para generar la toxina activa, ya que las muestras con protoxinas no tuvieron efectos citotóxicos sobre las células de cáncer.

La línea MOLT-4 fue expuesta a 5 μ g de cada extracto. El porcentaje de sobrevivencia fue estimado en base a la concentración de células sin tratamiento como el 100 %, el valor exacto de sobrevivencia es dado en la parte superior de las barras.

Como dato adicional incluso después de las 48 h, se podía observar bajo el microscopio a varias células aun con efectos citopáticos (ECP) que eventualmente podrían desencadenar una reducción en el porcentaje de sobrevivencia.

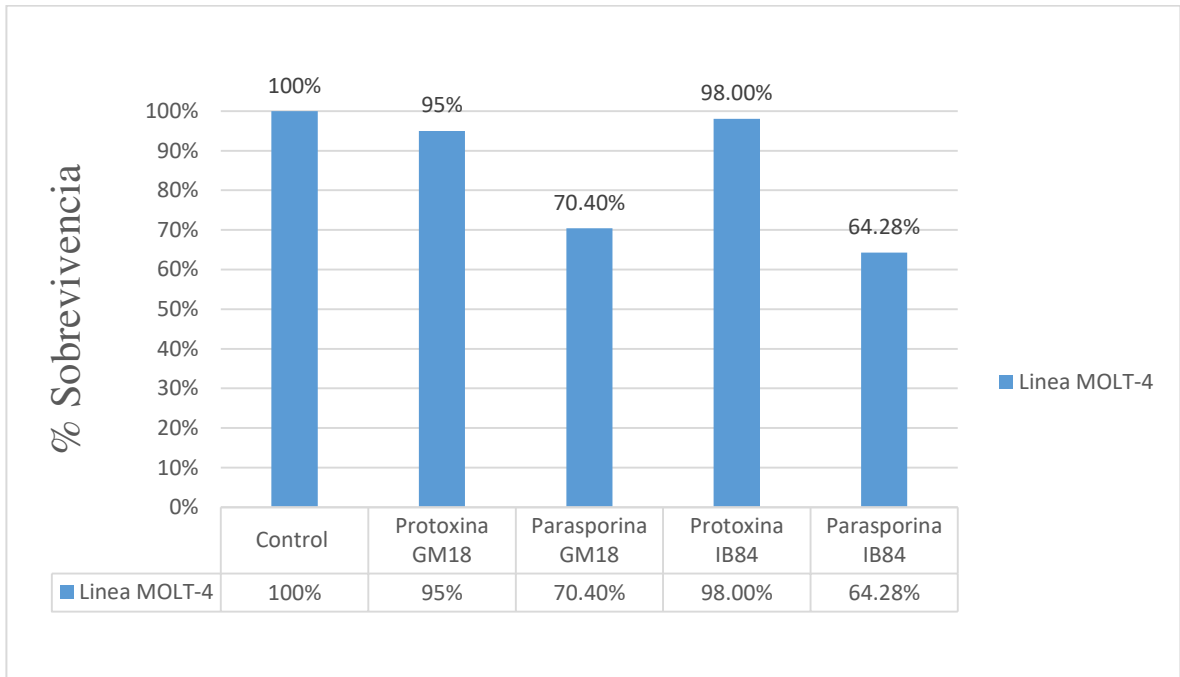


Figura 33. Ensayos de una sola dosis en la línea celular MOLT-4 a 24 h.

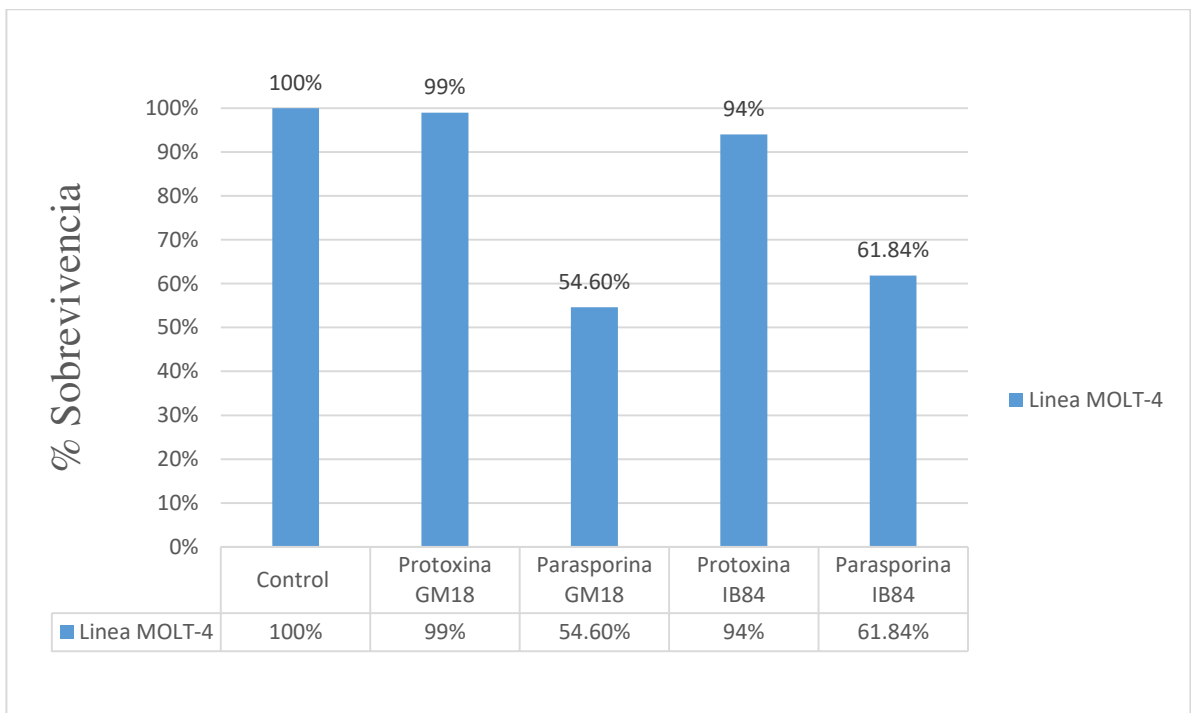


Figura 34. Ensayos de una sola dosis en la línea celular MOLT-4 a 48 h.

9. DISCUSION

9.1. Caracterización morfológica

Los cultivos de las cepas fueron constantemente monitoreados al microscopio óptico y también en estudios previos fueron vistos en microscopía electrónica de barrido (Espino-Vázquez 2014), los cristales de la cepa IB84 fueron los más difíciles de caracterizar debido al tamaño y baja proporción con respecto a la cantidad de esporas. Los cristales vistos al microscopio óptico tuvieron formas irregulares muy pequeñas, frecuentemente se encuentran adheridos a uno de los polos de la espora. En el caso de la cepa IB84, la microscopía electrónica reveló cristales irregulares ligeramente alargados, localizados hacia un polo de la espora. Aunque esta cepa se cree codifica para la PS4 (Espino-Vázquez 2014) sus cristales fueron muy diferentes a los de la cepa de referencia A1470, que en la literatura también están reportados como irregulares (Lee *et al.*, 2000).

La cepa GM18, que inicialmente fue aislada de muestras de suelo de Guanajuato y nombrada como subespecie *neoleonensis*. No presentó actividad biológica contra seis especies de insectos (Rodríguez-Padilla *et al.*, 1990), pero nueve años después fue reportada como tóxica contra células de leucemia e inocua para eritrocitos de oveja (Mizuki *et al.*, 1999). Los cristales de las cepas GM18 fueron los más peculiares. Mientras que al microscopio óptico, los cristales de GM18 mostraron figuras como de gotas de agua de tamaño medio; por microscopía electrónica de barrido, los cristales revelaron formas cóncavas irregulares, una morfología cercana a la piramidal (Fig. 14) (Espino-Vázquez 2014). Cabe señalar que para esta cepa los cristales han sido reportados como triangulares, vistos por microscopía electrónica de transmisión (Rodríguez-Padilla *et al.*, 1990), pero con los avances y la visualización en microscopía electrónica de barrido se observó una estructura tridimensional piramidal cóncava o irregular.

Se hace hincapié en el hecho que si bien las características de morfología clásica para ambas cepas son parecidas (Fig. 13), los tiempos que requieren cada una para llegar al máximo requerido de esporulación fueron diferentes (72-96 hrs), de igual forma la concentración de cristales y la morfología de los cristales por lo cual este tipo de perfil

previo antes de la producción de Parasporinas para su uso, siempre es necesario e importante para llevar una correcta estandarización del proceso.

9.2. Perfiles proteicos

Para poder caracterizar correctamente las proteínas presentes en las soluciones de proteínas totales, así como las soluciones purificadas se realizó el análisis los perfiles proteicos de los cristales solubilizados y digeridos de nuestro estudio y lo reportado en la literatura para comparar las diferencias entre cepas y Parasporinas (Kim *et al.* 2000; Lee *et al.* 2000; Mizuki *et al.* 2000; Yamashita *et al.* 2000; Espino-Vázquez 2014; Ruiz-García 2015). De forma general los patrones y pesos moleculares observados fueron similares, aunque con una mayor o menor cantidad de bandas minoritarias, ya que se trabajó con los extractos crudos y con las PS purificadas, lo cual es importante para corroborar que es la Parasporina presente y solo esta la que produce el efecto citotóxico sobre las líneas celulares de cáncer (Committe of Parasporin Classification and Nomenclature, 2016.)

La cepa IB84 (Fig. 15) expuso proteínas de tamaños cercanos a los esperados para la protoxina (38 kDa) y Parasporina activa (26 kDa) (Espino-Vázquez 2014); sin embargo, no se igualó a la cepa A1470, ya que esta cepa además de la PS4Aa1, también sintetiza PS2Aa2 (Okumura *et al.* 2014). Aun se tienen ciertas dudas acerca de la producción de Parasporinas por parte de la cepa IB84, se ha demostrado su efecto citotóxico y amplificación por pcr para iniciadores específicos de la PS4 (Espino-Vázquez 2014), sin embargo en estudios inmunológicos ha dado resultados negativos para la unión a anticuerpos antiPS4 (Ruiz-García 2015), como se mencionara posteriormente, estos resultados pueden significar una Parasporina-4 con un arreglo conformacional diferente.

En cuanto a la cepa GM18 (Fig. 15), cuyos tipos de PS no han sido establecidos, presento patrones de proteínas nativas y solubilizadas que no se pudieron relacionar a ninguna de las PS reportadas pero que tienen similitud con estudios previos sobre su caracterización en muestras nativas y muestras solubilizadas (Espino-Vázquez 2014; Ruiz García 2015) presentando una protoxina de aproximadamente 110 kDa, por otra

parte, el perfil en estado activo mostro dos bandas principales de 38 kDa y 26 kDa, que pudieran compararse tanto con PS2 como PS4 (Okumura *et al.* 2014).

Estas dos secciones de diferente peso surgieron por la metodología de purificación y activación de la protoxina, por lo cual es de importancia para el estudio, ya que por los análisis encontrados hasta la fecha, podría existir la posibilidad de dos fragmentos tóxicos pertenecientes a la misma protoxina, caso ya reportado con anterioridad (Mizuki *et al.* 2000).

Como dato adicional las diferencias en rendimientos de proteína total obtenidas al final de la activación de nuestras cepas y las de referencia. Como recomendación del Dr. Eiichi Mizuki, en la investigación de Espino-Vázquez (2014) la activación se hizo a partir de cultivos esporulados en medio sólido, crecidos en cajas Petri de 100 x 15 mm. En donde las cepas con mayor rendimiento fueron las A1190, A1547, A1462, IB88, CL9-1 y CL9-3, con las que fue posible alcanzar concentraciones de hasta 1 mg, a partir del cultivo esporulado de una sola caja Petri. En segundo plano fueron agrupadas las cepas A1470, IB79 y GM18, que mostraron rendimientos de 1 mg de proteína total a partir de 3 cajas Petri. Mientras que en último lugar quedaron las cepas IB84 y CL9-21, donde se requirieron hasta 10 cajas para lograr la concentración de 1 mg, por lo que invariablemente tuvieron que ser concentradas y dializadas lograr las concentraciones requeridas para los experimentos posteriores.

El rendimiento observado para todas las cepas, incluidas las de referencia estuvo estrechamente relacionado al tamaño de los cristales paraesporales, ya que las cepas de menor rendimiento también fueron las productoras de los cristales más pequeños en este caso la cepa IB84, mientras que las que tuvieron los cristales más grandes fueron con las que se recuperó la mayor cantidad de proteína final, tomando todo lo anterior en cuenta se tomó la decisión de pasar la producción de cristales hacia matraces con caldo nutritivo, esto para acceder a una mayor cantidad de Parasporina final, se comprende que las soluciones provenientes por parte de caldo nutritivo se encuentran en un estado más turbio, esto se puede eliminar con los procesos de purificación aplicados en esta

investigación, obteniendo como resultado una mayor cantidad de proteína de interés sin pasar por alto el estado libre de contaminantes de las proteínas.

9.3. Inmunodetección

Ruiz-García (2015) realizó estudios de Western Blot y Dot Blot en la cepa IB84 mostrando resultados negativos hacia los anticuerpos Anti-PS1 y anti-PS4, por lo cual se intuye que estas dos cepas producen Parasporinas un poco diferentes a las reportadas hasta ahora.

Así también se realizaron Dot Blots contra la Parasporinas de la cepa GM18 usando anticuerpos Anti-PS1 y anti-PS4, dando resultados negativos para ambos anticuerpos, confirmando que la protoxina presente en la cepa GM18 no presente relación con estas dos familias de Parasporinas al menos bajo estudios inmunológicos.

La Inmunodetección con los anticuerpos anti-PS1 fue positiva para los cristales solubilizados y digeridos de las cepas A1190 (control positivo) y CL9-1 con una clara señal de color en la membrana de nitrocelulosa (Ruiz-García 2015). Las dos cepas fueron positivas por PCR y este resultado confirma que si expresan la PS1 (Espino-Vázquez 2014). Es importante mencionar que los anticuerpos anti-PS1 fueron levantados sobre las proteínas solubilizadas de la cepa A1190, y por lo tanto, reconocen más de una sola banda.

Continuando con la detección de PS4, además de la muestra digerida de IB80-1, se obtuvo señal en control positivo, el cual consistió en los cristales solubilizados y digeridos de la cepa A1470 (Ruiz-García 2015). En estos experimentos, llama la atención que la cepa IB84, que fue positiva por PCR para la PS4 (Espino-Vázquez 2014), no dio señal en el Western Blot (Ruiz-García 2015) y tampoco para Dot Blot. Esto pudiera ser producto de la síntesis de un tipo diferente de PS4, con variantes importantes a la secuencia reportada, lo que daría pie a la presencia de epítopes diferentes a los que son reconocidos por los anticuerpos usados.

La cepa IB84 fue contemplada para este estudio porque codifica para PS4, que fue identificada por PCR y bioensayos contra células MOLT-4 (Espino-Vázquez 2014).

Sin embargo Ruiz-García (2015) demostró que durante la exposición contra los antisueros anti-PS1 y anti-PS4 no tuvo una señal visible en ninguna de las tres etapas de la activación a una concentración de 10 µg de proteína total. Podemos inferir que la cepa IB84, presenta alguna variedad no reportada de PS4 ya que tiene una citotoxicidad alta contra células MOLT-4 y genes conservados de la PS4 pero epítomos diferentes a los detectados por los antisueros anti-PS4. Esto es comprensible si consideramos que los anticuerpos fueron levantados contra la toxina, lo cual los hace más específico hacia el fragmento tóxico de la PS4 y de ésta manera, los anticuerpos no podrían reconocer los epítomos conservados en las proteínas nativas presente en los extractos crudos que se utilizaron.

A1190 y A1470 de acuerdo con Mizuki *et al.* (2000) constan del precursor de la fracción tóxica para la PS1Aa1 que es de 81 kDa y la forma activa está en dos polipéptidos, uno de 15 y otro de 56 kDa. Mientras que Okumura *et al.* (2005) señalaron que el precursor de la fracción tóxica de PS4aa1 es de 30 kDa y la forma activa de 27 kDa, estos patrones se conservan en la caracterización de dichas cepas como control en esta investigación.

Por último, para confirmar la presencia de la Parasporina en todos los pasos de purificación y extracción se procedió a utilizar los anticuerpos policlonales anti-GM18 levantados en conejo, proporcionados por la Dra. María Magdalena Iracheta del Instituto de Biotecnología, estos anticuerpos dan resultados positivos para las muestras nativas, solubilizadas, digeridas y purificadas (Fig. 20), por lo cual fueron de gran utilidad para el seguimiento de la conservación de la Parasporina de interés a través de todo el proceso de extracción y purificación hasta su punto final con la proteína completamente purificada (Fig. 16 y 17), la utilización de anticuerpos para diferentes metodologías (Kitada *et al.* 2006 y 2007; Okumura *et al.* 2004; Ruiz-García 2015; Espino-Vázquez 2014) ha demostrado ser de alta eficacia y discerniente para diferentes tipos de Parasporinas por lo cual su uso en esta investigación fue de un alto aprovechamiento.

9.4. Cromatografía

9.4.1. Cromatografía de intercambio aniónico

Las proteínas fueron pasadas a través de una columna de intercambio aniónico Hi Trap Q FF (1 ml, 7 × 25 mm) y Hi Trap Q XL (1 ml, 7 × 25 mm) contra un buffer de Tris-HCl 50 mM (pH 9.0) con EDTA al 1 mM a un radio de flujo de 2.0 mL/min a 4 °C. La proteína fue eluida con un gradiente en incremento de NaCl en una concentración de 0 a 1.0 M en el mismo buffer que fue descrito anteriormente, 1 mL de cada fracción fue recolectada para su posterior caracterización.

GM18 presenta dos señales altas de proteínas en la fracción 27 (13.5 min, 202 mM NaCl) y fracción 46 (23 min, 690 mM NaCl). Siendo la fracción 27 (13.5 min, 202 mM NaCl) la que contiene la proteína de interés.

IB84 presenta tres señales altas de proteínas; fracción 26 (13 min, 195 mM NaCl), fracción 42 (21 min, 630 mM NaCl) y fracción 48 (24 min, 949 mM NaCl). La proteína se encuentra presente en la fracción 26.

Actualmente investigaciones en la caracterización de las cepas IB84 y GM18 bajo la cromatografía de intercambio iónico no se encuentran publicadas, sin embargo se han hecho diferentes estudios y se pueden mostrar los beneficios de dicha metodología, que no solo sirve para la caracterización de la proteína sino que también tiene un importante uso para purificar la muestra y recolectar las fracciones en donde se encuentran las Parasporinas de interés (Lee *et al.* 2001).

Okumura *et al.* (2004 y 2006) demostraron como se obtenían entre las fracciones 15 a 25 proteínas de alrededor de 28 kDa que mostraban efectos citotóxicos sobre células MOLT-4, también en el 2006 (Okumura *et al.* 2006) este método se utilizó para purificar y aislar los cuerpos de inclusión producidos por una cepa de *E. coli* recombinante que producía un tipo específico de Parasporina, mostrando que incluso en otras cepas este método se anunciaba como prometedor para la extracción de las Parasporinas, además informa de la importancia de este tipo de purificación, ya que proteínas del mismo peso molecular pueden ser separadas gracias a su carga y encontrarse en diferentes fracciones recolectadas y de igual forma tener un efecto citotóxico sobre las células.

También se han realizado estudios sobre los dominios presentes en la proteína de interés producida por *Bacillus thuringiensis* y se llevó a cabo la caracterización por cromatografía de intercambio iónico (Nagamatsu *et al.* 2010) mostrando las fracciones importantes las cuales contenían proteínas con efecto sobre células HepG2, Hela, CACO-2 y HC.

Tomando toda la información en cuenta, se llega a la conclusión que el método de purificación por cromatografía de intercambio aniónico es fácil, rápido y relativamente sencillo una vez que se ha estandarizado el programa, y puede aplicarse a todas las muestras de diferentes cepas de *Bacillus thuringiensis* por lo cual resulta factible utilizar este método para la obtención de Parasporinas en un estado puro.

9.4.2. Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)

La proteína de interés de la cepa GM18 se encontró en el pico 2 (1.84 min) en un tiempo demasiado corto y junto a otros picos de proteínas que no pudieron diferenciarse entre sí de manera adecuada, si bien la separación de las proteínas, no se dio como se esperaba por HPLC (Fig. 24), esto se debió a las condiciones en las cuales se llevó a cabo el protocolo, debido a haber utilizado un protocolo estándar para proteínas como punto inicial de experimentación, el uso de HPLC para la separación de Parasporinas ya se encuentra registrado (Krishnan *et al.* 2010) por lo cual a un futuro se requerirá modificar el protocolo para obtener una separación adecuada de las fracciones y poder unir el HPLC a los demás métodos de separación de Parasporinas de nuestras cepas.

9.4.3. MALDI-TOF/TOF

La muestra de la cepa GM18 caracterizo para una dehidratasa del ácido amino levulínico de *Bacillus thuringiensis* (Fig. 25A) con un peso aproximado de 20 kDa y un pI de 5.0, además de un calidad de emparejamiento con nulo grado de confianza, características completamente diferentes a lo esperado para la protoxina de 110 kDa. Este resultado se cree sucedió por el compactamiento de varias proteínas en el spot mayoritario del cual fue obtenida la muestra del gel bidimensional, por lo cual la muestra se encuentra mezclada con diferentes proteínas pertenecientes a Bt, para

mejorar esto se debería correr geles en otra concentración de SDS, así como una concentración menor de muestra para no saturar el carril en el cual corren las proteínas, la separación por el punto isoelectrico fue cercana al esperado, por lo cual las tiras parecen tener las características adecuadas para el análisis.

En el caso de la muestra de la cepa IB84 caracterizo para una quitosanasa (Fig. 25B) con un peso aproximado de 50 kDa, un pI de 8.5 y una calidad de emparejamiento de alto grado de confianza, de igual forma, propiedades no esperadas para la protoxina de 38 kDa. El spot mayoritario del cual se tomó la muestra se encuentra algo extendido entre la sección de 50 kDa y 37 kDa en el gel de poliacrilamida, uno de los factores que pudo afectar el análisis de la muestra, de igual forma se ha demostrado que la cepa IB84 contiene proteínas del mismo peso molecular de 38 kDa comparadas con la protoxina y en las cuales lo que difiere es su pI, por lo cual es recomendable como en el suceso anterior otra concentración de SDS para permitir el traslado óptimo de las proteínas, algunas modificaciones a las condiciones de IEF, así como obtener varias muestras de diferentes pI para un análisis extenso hasta encontrar la sección de la proteína de interés.

Katayama *et al.* 2005 hicieron un estudio de la Parasporina-1, dentro de su metodología se encontraba la utilización de MALDI-TOF para el análisis del peso molecular de los fragmentos generados a partir de la Pro-Parasporina-1, con esto en mente, la explicación más sencilla para los resultados infructuosos deriva en una toma de muestra errónea más que en un error en el método de análisis. Espino-Vazquez (2014) menciona de igual forma ciertas condiciones y sugerencias para la realización de geles bidimensional y toma de muestra de estos, implicando una mejor separación de spots para su posterior análisis. Se tomaran en cuenta todos estos datos para en un futuro aplicarlo a la metodología existente y mejorarla.

9.4.4. Nano cromatografía líquida acoplada a espectrómetro de masas en tándem (Nano LC-MS/MS)

Con el surgir de la Nano LC-MS/MS para el estudio proteómico, los límites de que proteínas pueden ser separadas y analizadas individualmente recae en las habilidades de cada investigador, y se enfocan en que proteína o proteínas se busca

investigar, Nair y Dean en el 2015, investigaron el complejo prepro de la toxina Cry1Ab de *Bacillus thuringiensis* separando las proteínas con Nano LC-MS/MS, este estudio corrobora la factibilidad de utilizar este método para la separación de nuestras Parasporinas, y teniendo en cuenta los resultados positivos en los análisis que realizamos (Fig. 26 y Fig. 27), la cromatografía líquida acoplada a espectrómetro de masas en tándem se posiciona como una de las herramientas por excelencia en el estudio de proteínas.

9.5. Análisis de secuencias, determinación y modelaje de la estructura terciaria y tridimensional

El análisis de las secuencias, determinación y modelaje de las proteínas proporciona información importante acerca de la naturaleza de nuestras Parasporinas, se puede observar en la Fig. 31, como el modelo de la Parasporina GM18 bajo la plantilla de Cry1Jb, desarrolla una formación característica de las toxinas Cry convencionales, con 5 bloques conservados y 3 dominios, esta caracteriza se añade al hecho que en investigaciones anteriores se ha demostrado que la Parasporina de la cepa GM18 produce apoptosis sobre diversas líneas celulares de cáncer (Espino-Vázquez 2014), parecido al efecto que tiene la Parasporina-1 (Katayama *et al.* 2007, 2011), en la misma comparación la Parasporina 3 (PS3Aa1 y PS3Ba1) de *B. thuringiensis* cepa A1462 fue la primera toxina reportada con arquitectura típica de tres dominios y es citotóxica para las células cancerosas humanas (Yamashita *et al.* 2005).

La alineación de la secuencia muestra que la parasporina-3 tiene los mismos cinco bloques conservados que las toxinas Cry de tres dominios insecticidas. Se ha sugerido que la parasporina-3 podría tener un modo de acción similar con las toxinas Cry de tres dominios (Xu *et al.* 2014).

Bajo esta perspectiva analizamos las parasporinas reportadas hasta la fecha y su parentesco con las toxinas Cry así como su clasificación en dicha denominación, se puede observar en la Tabla I, como las Parasporinas 1 están asociadas a las toxinas Cry31, las Parasporinas 2 a Cry46, Parasporinas 3 a Cry41 y Parasporinas 4 a Cry45 (Okumura *et al.* 2010).

En el caso de las Parasporinas 1 y 3 que corresponden a las toxinas Cry31 y Cry41, estas últimas se encuentran en diferentes regiones en el dendograma de la clasificación común de los tres dominios de toxinas Cry (Crickmore *et al.* 2016), observando las secuencias entre las parasporinas 1 y 3 se muestra una similitud de menos del 45% entre ellas, sin embargo una vez que se analizan sus secuencias en comparación a otras toxinas, se puede observar como tienen similitudes con las toxinas Cry1A, Cry1B, Cry1D para la Parasporina 1 o Cry7 y Cry8 en el caso de la Parasporina 3, estas toxinas Cry de igual forma se encuentran en una región más cercana en el dendograma y comparten porcentajes de similitudes mayores, destacando dentro del grupo de las toxinas Cry1 (Cry1A-k tóxicas hacia lepidópteros) (Palma *et al.* 2014) la toxina Cry1Jb, de la cual resultaron las secuencias en común con nuestro análisis en la toxina de la cepa GM18, recabando y analizando toda la información obtenida llegamos a la conclusión, que la cepa GM18 tiene una Parasporina que presenta similitudes con la toxina Cry1Jb y a su vez con el grupo de las toxinas Cry1, Cry7 y Cry8 cuyas características son similares a las presentes en las toxinas Cry31 y Cry41 que corresponden a las actuales Parasporinas 1 y 3.

Por estas características se podría pensar que la Parasporina presente en la cepa GM18 comparte una estructura parecida a las Parasporinas-1 y -3, pero con una similitud en secuencia y modo de acción más cercano a la Parasporina-1 comenzando por la unión al receptor, seguido por un aumento del Ca²⁺ intracelular desde los primeros minutos de exposición y en consecuencia una disminución de la síntesis global de DNA y proteínas (Katayama *et al.* 2007, 2011).

Una estructura diferente surge del análisis de la cepa IB84, la Fig. 32 muestra que bajo la plantilla de Cry15Aa de la cual surgieron las similitudes entre secuencias de aminoácidos procedentes de las muestras de nuestra cepa IB84, se crea una formación más cercana hacia las Parasporinas 2 (toxinas Cry46), Parasporinas 4 (toxinas Cry45) y las aerolisinas, todas las anteriores conocidas por formar poros en la membrana (Xu *et al.* 2014) y provocar la muerte celular por necrosis (Akiba *et al.* 2004; Mahalakshmi y Shenbagarathai 2010; Okumura *et al.* 2011).

Añadiendo a lo anterior Cry15Aa de *B. thuringiensis* serovar *thompsoni* se encuentra en otra clasificación diferente a las toxinas Cry convencionales, en un dendograma de las toxinas que no muestran una estructura típica de 3 dominios como la mayoría de las toxinas Cry (Crickmore *et al.* 2016), es un miembro del grupo de tipo Mtx2/3, debido a su similitud con las proteínas mosquitocidas Mtx2 y Mtx3 de *Bacillus sphaericus*.

En el estudio de las Parasporinas se ha demostrado que la protoxina inactiva de PS2Aa1 es de aproximadamente 37 kDa y tiene una limitada similitud con la mayoría de las proteínas Cry y Cyt reportadas, pero comparte una similitud en la secuencia de 23.5% con Cry15Aa, la cual como se mencionó anteriormente pertenecerá a las toxinas MTX-like de *L. sphaericus* (formalmente conocida como *Bacillus sphaericus*) (Ito *et al.* 2004, Akiba *et al.* 2009). En la otra mano, tenemos resultados en la búsqueda con PSI-BLAST que han presentado homología entre la Parasporina 4 y la toxina Cry15Aa, α -toxinas, aerolisinas y ϵ -toxinas con secuencias idénticas de 24%, 15%, 10% y 21%, respectivamente (Xu *et al.* 2014). Otros miembros de este grupo, más parecidos a Cry15 que son Mtx2 y Mtx3, son las toxinas Cry23, -33, -38 y -45 de *B. thuringiensis*. Sus secuencias de aminoácidos muestran una semejanza débil con las toxinas formadoras de poro (TFP), tales como la aerolisina de *Aeromonas hydrophila*, la citotoxina de *Pseudomonas aeruginosa* y la toxina ϵ de *Clostridium perfringens* (Naimov *et al.* 2008).

La protoxina de Cry15Aa tiene un peso aproximado de 38 kDa y la toxina activada produce fragmentos difíciles de analizar, sin embargo tienden a encontrarse en un peso aproximado de 25 kDa (Naimov *et al.* 2008), todo esto muy parecido con las características de nuestra cepa IB84. Un análisis individual hacia la Parasporina de la cepa IB84 hecho por Espino-Vázquez (2014) demostró que tiene un modo de acción cercano a las Parasporinas-2 y 4, provocando la muerte celular por necrosis en diferentes líneas celulares, incluyendo toda la información anterior se ha especulado que la Parasporina presente en la cepa IB84 podría ser una Parasporina parecida a la familia de la Parasporina-4 con una estructura un poco diferente a las reportadas hasta la fecha.

Es importante mencionar que el modelaje de las proteínas, es una aproximación acorde a los datos actuales de investigaciones realizadas, y este pueden variar con el tiempo y con el incremento de información suministrada a las plantillas de proteínas actuales, sin embargo este proceso permite visualizar de una manera más detallada, la estructura y las posibles interacciones que suceden en nuestras proteínas de estudio (Yachdav *et al.* 2014; Peng y Xu 2011a, 2011b; Ma *et al.* 2013; Kallberg *et al.* 2012).

9.6. Bioensayos

Como se esperaba acorde a las investigaciones anteriores (Espino-Vázquez 2014) la cantidad de células viables disminuyó con la aplicación de los cristales de las cepas IB84 y GM18 (Fig. 33 y 34). En cuanto a la actividad biológica, las dos cepas mostraron toxicidad contra las células de cáncer MOLT-4. Debido a los análisis de una sola dosis realizados, no se realizaron concentraciones efectivas medias con las cuales comparar el efecto sobre la línea celular y la literatura, sin embargo la dosis de 5 µg provocó un porcentaje alrededor del 50% de sobrevivencia, esto señalaría un efecto moderadamente tóxico en base a los parámetros de Mizuki *et al.* (1999), ejemplificados de esta manera: >100 µg ml⁻¹ ningún efecto o muy baja citotoxicidad (-); <100-10 µg ml⁻¹, poca citotoxicidad (+); <10-1 µg ml⁻¹ citotoxicidad moderada (++); <1-0.1 µg ml⁻¹ citotoxicidad alta (+++); < 0.01 µg ml⁻¹ citotoxicidad extremadamente alta (++++).

Uno de los puntos relevantes acerca de la investigación es haber realizado los bioensayos con Parasporinas puras, el efecto demostrado para la Parasporina PS1Aa1 (Ohba *et al.* 2009) fue moderadamente tóxico (++) sobre la línea celular MOLT-4 al igual que nuestra cepa GM18 la cual se estima es parecida a la Parasporina-1.

Por otra parte, el efecto de la cepa IB84 fue menor al comparado con la Parasporina PS4Aa1 la cual parece compartir características con la Parasporina de nuestra cepa IB84, debido a que esta mostró un efecto moderadamente tóxico (++) mientras en la literatura se registra, al menos para la Parasporina-4 un efecto tóxico alto (+++) (Ohba *et al.* 2009), estas variaciones se podrían deber a diferentes razones entre

las cuales se encuentran; a) diferencias estructurales en nuestras Parasporinas, b) diferentes receptores en la célula blanco, c) la variable afinidad de las Parasporinas reportadas a la fecha, d) una concentración no precisa de parasporina en los bioensayos, bajo este punto, se hace mención de haber realizado la cuantificación de proteínas con el método de Bradford (Bradford 1976), que si bien es un método práctico y rápido para la cuantificación de proteínas, su precisión no es tan fiable como otras metodologías existentes, por esta razón en un futuro se podría cambiar a protocolos más precisos y así realizar una cuantificación adecuada de proteínas, esto reflejado de una manera confiable sobre las concentraciones medias efectivas.

Lamentablemente la concentración específica de las cepas IB84 y GM18 sobre la línea celular MOLT-4 no pudo compararse estrictamente con el estudio de Espino-Vázquez (2014), aun cuando sus resultados dieron cifras de CE_{50} de 6.058 (1.09-12.72) para los extractos de IB84 sobre MOLT-4 y de 1.309 (8.78-0.21) en el caso de GM18 con un grado del efecto de citotóxico (EC) moderadamente tóxico (++) parecidos a nuestros resultados, ya que en dicho trabajo se realizó con extractos crudos de las cepas, y nosotros utilizamos las Ps purificadas, además en la literatura se hace referencia al efecto obtenido con las PS purificadas.

Como último punto, es importante señalar que la actividad biológica de las Parasporinas pudiera estar subestimada por la naturaleza de los mismos cristales. Esto debido a que numerosas cepas de *B. thuringiensis* pueden sintetizar diferentes tipos de proteínas del cristal, y existe la posibilidad que más de una proteína presente en las cepas analizadas, llegue a tener actividad anti-cancerígena, además como se observado en la cepa GM18 existe la posibilidad de dos fragmentos tóxicos derivados del proceso de digestión de la Pro-Parasporina, por lo cual podría existir una interferencia en el análisis del efecto citotóxico, por lo cual la purificación y separación de fragmentos es una necesidad para el análisis del efecto citotóxico de las Parasporinas.

Por esto es necesario el aislamiento o purificación de las proteínas que contengan la actividad biológica, y en un futuro preferentemente purificarlas por expresión homóloga en *E. coli*, o heteróloga en cepas acristalíferas de *B. thuringiensis*.

10. CONCLUSIONES

- GM18 presenta una Parasporina en forma de protoxina de 110 kDa y dos fragmentos de 38 y 26 kDa cuando es activada, diferente al patrón de las Parasporinas reportadas hasta la fecha al menos en su forma de protoxina.
- IB84 presenta una Parasporina en forma de protoxina de 38 kDa y una toxina de 26 kDa cuando es activada, teniendo similitud con la Parasporina 4 reportada en la literatura.
- Los rendimientos de producción de Parasporinas entre las dos cepas difieren de lo reportado para las cepas de referencia por lo cual se requieren ajustes para su obtención.
- Los anticuerpos Anti-GM18 (S y A) confirman la presencia de la Parasporina durante los diferentes pasos del proceso de purificación, los anticuerpos Anti-PS1 y Anti-PS4 no se unieron a ninguna de las muestras de las cepas GM18 o IB84, aunque estudios anteriores asociaran a la cepa IB84 con la Parasporina 4.
- GM18 presenta dos señales altas de proteínas en la fracción 27 (13.5 min, 202 mM NaCl) y la fracción 46 (23 min, 690 mM NaCl). Siendo la fracción 27 (13.5 min, 202 mM NaCl) la que contiene la Parasporina de interés.
- IB84 presenta tres señales altas de proteínas; fracción 26 (13 min, 195 mM NaCl), fracción 42 (21 min, 630 mM NaCl) y fracción 48 (24 min, 949 mM NaCl). La proteína se encuentra presente en la fracción 26.
- El análisis en base a Nano LC-MS/MS presento similitudes entre la Parasporina de la cepa GM18 y la Toxina Cry1Jb y la Parasporina de la cepa IB84 con la Toxina Cry15Aa.

- El análisis de las secuencias y modelaje de las proteínas generó una proteína parecida a las características toxinas Cry convencionales y las Parasporina-1 y -3 para la cepa GM18 y una proteína parecida a las Parasporinas-2 y -4 y las aerolisinas para la cepa IB84.
- Se demostró el efecto citotóxico de las Parasporinas purificadas de las cepas IB84 y GM18 sobre la línea celular MOLT-4.

11. PERSPECTIVAS

- Mandar a analizar y secuenciar las protoxinas en estado puro que se obtuvieron para su clonación y expresión en cepas recombinantes.
- Analizar la secuencia de las protoxinas y compararlas con las que están registradas como Parasporinas conocidas a la fecha.
- Obtener anticuerpos para las 6 familias de Parasporinas que se tienen clasificadas para un análisis total de diferenciación en las cepas que se han analizado hasta ahora.

12. BIBLIOGRAFIA

- 1 Abe Y, Kitada S, Kuge O, Ohba M, Ito A. 2005. Oligomerization of parasporin-2, a new crystal protein from non-insecticidal *Bacillus thuringiensis*, in lipid rafts. 6th Pacific Rim Conference on the Biotechnology of *Bacillus thuringiensis* and its Environmental Impact 113–115 p. Montréal, Québec Octobre 30-Novembre 3.
- 2 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.
- 3 Akao T, Mizuki E, Yamashita S, Saitoh H, Ohba M. 1999. Lectin activity of *Bacillus thuringiensis* parasporal inclusion proteins. *FEMS Microbiology Letters* 179:415-421.
- 4 Akiba T, Abe Y, Kitada S, Kusaka Y, Ito A, Ichimatsu T, Harata K. 2004. Crystallization of parasporin-2, a *Bacillus thuringiensis* crystal protein with selective cytotoxic activity against human cells. *Acta Crystallographica* 60:2355-2357.
- 5 Akiba T, Abe Y, Kitada S, Kusaka Y, Ito A, Ichimatsu T, Katayama H, Akao T, Higuchi K, Mizuki E. 2009. Crystal structure of the parasporin-2 *Bacillus thuringiensis* toxin that recognizes cancer cells. *Journal of Molecular Biology* 386, 121–133.
- 6 Angus TA. 1956. Association of toxicity with protein-crystalline inclusions of *Bacillus sotto Ishiwata*. *Canadian Journal of Microbiology* 2:122-131.
- 7 American Cancer Society and Livestrong, 2010. The global economic cost of cancer. Atlanta GA (005444).
- 8 Berliner E. 1911. Über die schlafsucht der Mehlmottenraupe. *Zeitschrift für das Gesamte*; 252:3160- 3162.
- 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.
- 10 Brasseur K, Auger P, Asselin E, Parent S, Côté JC, Sirois M. 2015. Parasporin-2 from a new *Bacillus thuringiensis* 4R2 strain induces caspases activation and apoptosis in human cancer cells. *PLoS ONE* 108: e0135106.
- 11 Cappello M, Bungiro RD, Harrison LM. 2006. A purified *Bacillus thuringiensis* crystal protein with therapeutic activity against the hookworm parasite *Ancylostoma ceylanicum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103:15154-15159.

- 12 Chan K, Nadarajah VD, Mohammed SM, Karisnan K, Abdullah M. 2007. The effects of parasporal inclusions from Malaysian strains of *Bacillus thuringiensis* on leukaemic cell lines. *Malaysian Journal of Medical Sciences* 14:2-2.
- 13 Chan K, 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.
- 14 Clynes RA, Towers TL, Presta LG, Ravetch JV. 2000. Inhibitory Fc receptors modulate *in vitro* cytotoxicity against tumor targets. *Nature Medicine* 6:443–446.
- 15 Crickmore N, Zeigler D, Feitelson J, Schnepf E, Van Rie J, Lereclus D, Baum J, Dean D. 1998. Revision of the Nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62:807-813.
- 16 Crickmore N, Baum J, Bravo A, Lereclus D, Narva K, Sampson K, Schnepf E, Sun M, Zeigler DR. 2016. *Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature. Disponible en: <http://www.btnomenclature.info/>
- 17 de Maagd RA, Bravo A, Berry C, Crickmore N, Schnepf HE. 2003. Structure, diversity, and evolution of protein toxins from spore-forming entomopathogenic bacteria. *Annual Review of Genetics* 37:409–433.
- 18 Ekino K, Okumura S, Ishikawa T, Kitada S, Saitoh H, Akao T, Mizuki E. 2014. Cloning and characterization of a unique cytotoxic protein parasporin-5 produced by *Bacillus thuringiensis* A1100 strain. *Toxins* 6:1882-1895.
- 19 Espino-Vázquez AN. 2014. Caracterización biológica de Parasporinas en cepas nativas de *Bacillus thuringiensis*. Tesis de Doctorado. Universidad Autónoma de Nuevo León, México.
- 20 Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray, F. 2013. Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC Cancer Base No. 11 .Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2013. Disponible en el sitio de red: <http://globocan.iarc.fr>
- 21 Franco W. 2015. Clonación y caracterización de los genes que codifican para la Parasporina-1 en la cepa CL9-1 de *Bacillus thuringiensis*. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Nuevo León, México.
- 22 Gonzalez JM, Brown BJ, Carlton BC. 1982. Transfer of *Bacillus thuringiensis* plasmids coding for delta-endotoxin among strains of *B. thuringiensis* and *B. cereus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 79:6951-6955.

- 23 Harvey AL. 2008. Natural products in drug discovery. *Drug Discovery Today* 13:894–901.
- 24 Hayakawa T, Kanagawa R, Kotani Y, Kimura M, Yamagiwa M, Yamane Y, Knagawa R. 2007. Parasporin-2Ab, a newly isolated cytotoxic crystal protein from *Bacillus thuringiensis*. *Current Microbiology* 55:278-83
- 25 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.
- 26 Ito A, Sasaguri Y, Kitada S, Kusaka Y, Kuwano K, Masutomi K, Ohba M. 2004. A *Bacillus thuringiensis* crystal protein with selective cytotoxic action to human cells. *The Journal of Biological Chemistry* 279:21282-21286.
- 27 Jensen GB, Hansen BM, Eilenberg J, Mahillon J. 2003. The hidden lifestyles of *Bacillus cereus* and relatives. *Environmental Microbiology* 5:631-640.
- 28 Jung YC, Mizuki E, Akao T, Côté JC. 2007. Isolation and characterization of a novel *Bacillus thuringiensis* strain expressing a novel crystal protein with cytotoxic activity against human cancer cells. *Journal of Applied Microbiology* 103:65-79.
- 29 Källberg M, Wang H, Wang S, Peng J, Wang Z, Lu H, Xu J. 2012. Template-based protein structure modeling using the RaptorX web server. *Nature Protocols* 7, 1511-1522, 2012.
- 30 Katayama H, Kusaka Y, Mizuki E. 2011. Parasporin-1 receptor and use thereof. European Patent Application. 09727199.3. 2009-03-30. Fukuoka Prefectural Government.
- 31 Katayama H, Yokota H, Akao T, Nakamura O, Ohba M, Mekada E y Mizuki E. 2005. Parasporin-1, a novel cytotoxic protein to human cells from non-insecticidal parasporal inclusions of *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Biochemistry*. 137:17–25.
- 32 Katayama H, Kusaka Y, Yokota H, Akao T, Kojima M, Nakamura O, Mizuki E. 2007. Parasporin-1, a novel cytotoxic protein from *Bacillus thuringiensis*, induces Ca²⁺ influx and a sustained elevation of the cytoplasmic Ca²⁺ concentration in toxin-sensitive cells. *Journal of Biological Chemistry* 282:7742-7752.
- 33 Kim HS, Yamashita S, Akao T, Saitoh H, Higuchi K, Park YS, Ohba M. 2000. *In vitro* cytotoxicity of non-Cyt inclusion proteins of a *Bacillus thuringiensis* isolate against human cells, including cancer cells. *Journal of Applied Microbiology* 89:16–23.

- 34 Kim HS, Saitoh H, Yamashita S, Akao T, Park YS, Maeda M, Ohba M. 2003. Cloning and characterization of two novel crystal protein genes from a *Bacillus thuringiensis* serovar *dakota* strain. *Current Microbiology* 46:33-38.
- 35 Kitada S, Abe Y, Ito A, Kuge O, Akao T, Mizuki E, Schwartz J. 2007. Molecular identification and cytotoxic action of parasporin, a protein group of novel crystal toxins targeting human cancer cells. The Proceedings of the 6th Pacific Rim Conference on the biotechnology of *Bacillus thuringiensis* and its environmental impact, Victoria British Columbia, Canada October 30-November 5.
- 36 Kitada S, Abe Y, Shimada H, Kusaka Y, Matsuo Y, Katayama H, Ito A. 2006. Cytotoxic actions of parasporin-2, an anti-tumor crystal toxin from *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Biological Chemistry* 281:26350-26360.
- 37 Kitada S, Abe Y, Maeda T y Shimada H.2009. Parasporin-2 requires GPI-anchored proteins for the efficient cytotoxic action to human hepatoma cells. *Toxicology* 264:80–88.
- 38 Kondo S, Mizuki E, Akao T, Ohba M. 2002. Antitrichomonal strains of *Bacillus thuringiensis*. *Parasitology Research* 88:1090-1092.
- 39 Krishnan K, Er An Ker J, Mohammed SM, Nadarajah VD. 2010. Identification of Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) as a binding protein for a 68-kDa *Bacillus thuringiensis* parasporal protein cytotoxic against leukaemic cells. *Journal of Biomedical Science* 2010, 17:86
- 40 Kuroda S, Begum A, Saga M, Hirao A, Mizuki E, Sakai H, Hayakawa T. 2013. Parasporin 1Ac2, a novel cytotoxic crystal protein isolated from *Bacillus thuringiensis* B0462 strain. *Current Microbiology* 66:475–80.
- 41 Lambert B, Peferoen M. 1992. Insecticidal promise of *Bacillus thuringiensis*: Facts and mysteries about a successful biopesticide. *BioScience* 42:112-122.
- 42 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.
- 43 Lee, D., Katayama, H., Akao, T., Maeda, M., Tanaka, R., Yamashita, S., Saitoh, H., Mizuki, E. and Ohba, M. 2001. A 28 kDa protein of the *Bacillus thuringiensis* serovar *shandongiensis* isolate 89-T-34-22 induces a human leukemic cell-specific cytotoxicity. *Biochimica et Biophysica Acta* 1547:57–63.
- 44 Legler DF, Doucey MA, Schneider P, Chapatte L, Bender FC, Bron C. 2004. Differential insertion of GPI-anchored GFPs into lipid rafts of live cells. *Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 18:73–75.

- 45 Liang XH, Jackson S, Seaman M, Brown K, Kempkes B, Hibshoosh H, Levine B. 1999. Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature* 402: 672–676.
- 46 Lingwood D, Kaiser HJ, Levental I, Simons K. 2009. Lipid rafts as functional heterogeneity in cell membranes. *Biochemical Society Transactions* 37:955–960.
- 47 Luo J, Sands M, Wactawski-Wende J, Song Y, Margolis KL. 2013. Sleep disturbance and incidence of thyroid cancer in postmenopausal women the Women’s Health Initiative. *American Journal of Epidemiology* 177:42–49.
- 48 Ma J, Wang s, Zhao F, Xu J. 2013. Protein threading using context-specific alignment potential. *Intelligent Systems for Molecular Biology* 2913: 257-265.
- 49 Mahalakshmi A, Shenbagarathai R. 2010. *In silico* structural analysis of parasporin 2 protein sequences of non-toxic *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Biomedical Science and Engineering* 03:415–421.
- 50 Mizuki E, Ohba M, Akao T, Yamashita S, Saitoh H, Park YS. 1999. Unique activity associated with non-insecticidal *Bacillus thuringiensis* parasporal inclusions: *in vitro* cell-killing action on human cancer cells. *Journal of Applied Microbiology* 86:477–486.
- 51 Mizuki E, Park YS, Saitoh H, Yamashita S, Akao T, Higuchi K, Ohba M. 2000. Parasporin, a human leukemic cell-recognizing parasporal protein of *Bacillus thuringiensis*. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 7:625-634.
- 52 Mounsef JR, Salameh D, Awad MK, Chamy L, Brandama C, Lteif R. 2014. A simple method for the separation of *Bacillus thuringiensis* spores and crystals. *Journal of Microbiological Methods* 107: 147–149.
- 53 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. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health* 37:67-78.
- 54 Nagamatsu Y, Okamura S, Saitou H, Akao T, Mizuki E. 2010. Three Cry toxins in two types from *Bacillus thuringiensis* strain M019 preferentially kill human hepatocyte cancer and uterus cervix cancer cells. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 74:494-498.

- 55 Naimov S, Boncheva R, Karlova R, Dukiandjiev S, Minkov I, de Maagd RA. 2008. Solubilization, Activation, and insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* serovar *thompsoni* HD542 crystal proteins. *Applied and Environmental Microbiology* 74:7145–7151
- 56 Namba A, Yamagiwa M, Amano H, Akao T, Mizuki E, Ohba M, Sakai H. 2003. The cytotoxicity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *Coreanensis* A1519 strain against the human leukemic T cell. *Biochimica et Biophysica Acta* 1622: 29–35.
- 57 Nair M, Dean DH. 2015. Composition of the Putative Prepore Complex of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab Toxin. *Advances in Biological Chemistry* 5:179–188.
- 58 Ohba M, Mizuki E, Uemori A. 2009. Parasporin, a new anticancer protein group from *Bacillus thuringiensis*. *Anticancer Research* 29:427-433.
- 59 Okumura S, Akao T, Higuchi K, Saitoh H, Mizuki E, Ohba M, Inouye K. 2004. *Bacillus thuringiensis* serovar *shandongiensis* strain 89-T-34-22 produces multiple cytotoxic proteins with similar molecular masses against human cancer cells. *Letters in Applied Microbiology* 39:89-92.
- 60 Okumura S, Ohba M, Mizuki E, Crickmore N, Côté JC, Nagamatsu Y, Kitada S, Sakai H, Harata K, Shin T. 2010. Parasporin nomenclature [Online]. Disponible en: <http://parasporin.fitc.pref.fukuoka.jp/>
- 61 Okumura S, Koga H, Inouye K y Mizuki E. 2014. Toxicity of Parasporin-4 and health effects of Pro-parasporin-4 diet in mice. *Toxins* 6: 2115-2126.
- 62 Okumura S, Saitoh H, Ishikawa T, Mizuki E, Inouye K. 2008. Identification and characterization of a novel cytotoxic protein, parasporin-4, produced by *Bacillus thuringiensis* A1470 strain. *Biotechnology. Annual. Review* 14: 225–252.
- 63 Okumura S, Saitoh H, Ishikawa T, Inouye K, Mizuki E. 2011. Mode of action of parasporin-4, a cytotoxic protein from *Bacillus thuringiensis*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1808:1476-1482.
- 64 Okumura S, Saitoh H, Wasano N, Katayama H, Higuchi K, Mizuki E, Inouye K. 2006. Efficient solubilization, activation, and purification of recombinant Cry45Aa of *Bacillus thuringiensis* expressed as inclusion bodies in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification* 47:144-151.
- 65 Okumura S, Saitoh H, Ishikawa T, Wasano N, Yamashita S, Kusumoto KI, Inouye K. 2005. Identification of a novel cytotoxic protein, Cry45Aa, from *Bacillus thuringiensis* A1470 and its selective cytotoxic activity against various mammalian cell lines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53:6313-6318.

- 66 OMS. 2012. Latest world cancer statistics global cancer burden rises to 4.1 million new cases in 2012: Marked increase in breast cancers must be addressed. France (Press Release N° 223).
- 67 Palma L, Muñoz D, Berry C, Murillo J, Caballero P. 2014. *Bacillus thuringiensis* toxins: an overview of their biocidal activity. *Toxins* 6 3296-3325.
- 68 Peña A. 2004. Bioquímica. Propiedades ácido-base de las proteínas en solución. Segunda Edición. Editorial Lamusa pp. 95-97.
- 69 Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, Ferrin TE. 2004. UCSF Chimera a visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of Computational Chemistry* 13:1605-12. Graficas moleculares y análisis fueron realizados con el paquete UCSG Chimera. Chimera es desarrollado por The Resource for Biocomputing, Visualization and Informatics en la Universidad de California, San Francisco (Apoyado por NIGMS P41-GM103311).
- 70 Peng J y Xu J. 2011. A multiple-template approach to protein threading. *Proteins* 79:1930-9.
- 71 Peng J y Xu J. 2011. RaptorX: exploiting structure information for protein alignment by statistical inference. *Proteins* 79S10:161-171.
- 72 Pigott CR and Ellar DJ. 2007. Role of receptors in *Bacillus thuringiensis* crystal toxin activity. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 71: 255–281.
- 73 Rodriguez-Padilla C, Galan-Wong L, Barjac H, Roman-Calderon E, Tamez-Guerra R, Dulmage H. 1990. *Bacillus thuringiensis* Subspecies *neoleonensis*. *Journal of Invertebrate Pathology* 52:280–282.
- 74 Roh JY, Choi JY, Li MS, Jin BR, Je YH. 2007. *Bacillus thuringiensis* as a specific, safe, and effective tool for insect pest control. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 17:547-559.
- 75 Ruiz-García ZT. 2015. Relación inmunológica entre las Parasporinas PS1 y PS4. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Nuevo León, México.
- 76 Saitoh H, Okumura S, Ishikawa T, Akao T, Mizuki E y Ohba M. 2006. Investigation of a novel *Bacillus thuringiensis* gene encoding a parasporal protein, Parasporin-4, that preferentially kills human leukemic T cells. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 70:12 2935-2941,
- 77 Sambrook J, Russell DW. 2006. The condensed protocols from molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor, New York pp.1-800.

- 78 Shelton AM, Zhao JZ, Roush RT. 2002. Economic, ecological, food safety, and social consequences of the deployment of bt transgenic plants. *Annual Review of Entomology* 47:845-881.
- 79 Siegel R, Desantis C, Virgo K, Stein K, Mariotto A, Smith T, Fedewa S. 2013. Cancer treatment and survivorship statistics. *American Cancer Society* 62:220–241.
- 80 Sobel JD, Nyirjesy P, Brown W. 2001. Tinidazole therapy for metronidazole-resistant vaginal trichomoniasis. *Clinical Infectious Diseases* 33:1341-1346.
- 81 Soufiane B, Côté JC. 2013. *Bacillus weihenstephanensis* characteristics are present in *Bacillus cereus* and *Bacillus mycoides* strains. *FEMS Microbiology Letters* 3412:127-37.
- 82 Socinski MA, Bondarenko I, Karaseva NA, Makhson AM, Vynnychenko I, Okamoto I, Renschler MF. 2012. Weekly nab-paclitaxel in combination with carboplatin versus solvent-based paclitaxel plus carboplatin as first-line therapy in patients with advanced non-small-cell lung cancer: Final results of a phase III trial. *Journal of Clinical Oncology* 30:2055–2062.
- 83 Schnepf HE, Whiteley HR. 1981. Cloning and expression of the *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 78:2893- 2897.
- 84 Schnepf E, Crickmore N, Van Rie J, Lereclus D, Baum J, Feitelson J, Dean DH. 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62:775-806.
- 85 Tsuchiya K, Kawamura I, Takahashi A, Nomura T, Kohda C, Mitsuyama M. 2005. Listeriolysin O-induced membrane permeation mediates persistent interleukin-6 production in CaCo-2 cells during *Listeria monocytogenes* infection *in vitro*. *Infection and Immunity* 73:3869–3877.
- 86 Uemori A, Ohgushi A, Yasutake K, Maeda M, Mizuki E, Ohba M. 2008. Parasporin-1Ab, a novel *Bacillus thuringiensis* cytotoxin preferentially active on human cancer cells *in vitro*. *Anticancer Research* 28:91-95.
- 87 Verma S, Miles D, Gianni L, Krop IE, Welslau M, Baselga J, Blackwell K. 2012. Trastuzumab emtansine for HER2-positive advanced breast cancer. *The New England Journal of Medicine* 367:1783–1791.
- 88 Whalon ME, Wingerd BA. 2003. Bt: mode of action and use. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 54:200-211.

- 89 Wirawan E, Lippens S, Vanden Berghe T, Romagnoli A, Fimia GM, Piacentini M, Vandenabeele P. 2012. Beclin1: A role in membrane dynamics and beyond. *Autophagy* 8: 6–17.
- 90 Wong RSY, Mohamed SM, Nadarajah VD, Tengku IAT. 2010. Characterization of the binding properties of *Bacillus thuringiensis* 18 toxin on leukaemic cells. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 29:86-86.
- 91 Wong RSY. 2010. *Bacillus thuringiensis* parasporal proteins and their effect on human cancer cells: An overview. *International e-Journal of Science, Medicine & Education* 4:3-9.
- 92 Wong RSY, Mohamed SM, Nadarajah VD, Tengku IAT. 2010. Characterisation of the binding properties of *Bacillus thuringiensis* 18 toxin on leukaemic cells. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 29: 86–97.
- 93 Wong LJ. 2012. *Biotecnología contra el cáncer*. Ediciones Instituto de Biotecnología. UANL pp 3-44.
- 94 Xu C, Wang BC, Yu Z, Sun M. 2014. Structural insights into *Bacillus thuringiensis* Cry, Cyt and parasporin toxins. *Toxins* 6:2732-2770.
- 95 Yachdav G, Klopman E, Kajan L, Hecht M, Goldberg T, Hamp T, Hönigschmid P, Schafferhans A, Roos M, Bernhofer M. 2014 PredictProtein---an open resource for online prediction of protein structural and functional features. *Nucleic acids research*, gku366.
- 96 Yamashita S, Akao T, Mizuki E, Saitoh H, Higuchi K, Park YS, Ohba M. 2000. Characterization of the anti-cancer-cell parasporal proteins of a *Bacillus thuringiensis*. *Canadian Journal of Microbiology* 47:913–919.
- 97 Yamashita S, Katayama H, Saitoh H, Akao T, Park YS, Mizuki E, Ito A. 2005. Typical three-domain cry proteins of *Bacillus thuringiensis* strain A1462 exhibit cytotoxic activity on limited human cancer cells. *Biochemistry* 138:663-672.
- 98 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.
- 99 Zhong Y, Wang QJ, Li X, Yan Y, Backer JM, Chait BT, Heintz N, Yue Z. 2009. Distinct regulation of autophagic activity by Atg14L and Rubicon associated with Beclin 1-phosphatidylinositol 3-Kinase complex. *Nature Cell Biology* 11:468–476.

13. RESUMEN BIBLIOGRAFICO

Jesus Oswaldo Medina López

Candidato para el Grado de

Maestro en Ciencias con Orientación en Microbiología

Tesis: PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LAS PARASPORINAS (PS)
PRESENTES EN LAS CEPAS IB84 Y GM18 DE *Bacillus thuringiensis*.

Campo de Estudio: Biotecnología aplicada en ciencias de la salud.

Datos Personales: Nacido en Monterrey, N.L. el 30 de Noviembre de 1990, hijo de Irma Leticia López Torres y Jesus Medina Rodríguez.

Educación superior: Egresado en 2012 de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León con el grado de Biólogo.

Premios y distinciones: Premio a la mejor tesis de licenciatura UANL 2014 en el área de ciencias agropecuarias, otorgado por la Universidad Autónoma de Nuevo León.

Experiencia Profesional: Guía Científico en la exposición: "Túnel de la Ciencia" de la Sociedad Max Planck.