

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



OBTENCIÓN DE PARASPORINAS DE *Bacillus thuringiensis* CEPAS CL9-1, CL9-3 Y CL9-21 CON ACTIVIDAD CITOTÓXICA PARA CÉLULAS DE ORIGEN NEOPLÁSICO

POR

JULIO ALEJANDRO REYES PUENTES

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

DICIEMBRE, 2016

**OBTENCIÓN DE PARASPORINAS DE *Bacillus thuringiensis* CEPAS CL9-1,
CL9-3 Y CL9-21 CON ACTIVIDAD CITOTÓXICA PARA CÉLULAS DE ORIGEN
NEOPLÁSICO**

Revisión de la tesis:

Dr. Jesús Alberto Gómez Treviño
Director de Tesis

Dr. Benito Pereyra Alférez
Co-director de Tesis

Dr. Edgar Allan Blanco Gámez
Comité Tutorial

Dra. María Elena Cantú Cárdenas
Comité Tutorial

Dr. Xristo Zárate Kalfópulos
Comité Tutorial

**OBTENCIÓN DE PARASPORINAS DE *Bacillus thuringiensis* CEPAS CL9-1,
CL9-3 Y CL9-21 CON ACTIVIDAD CITOTÓXICA PARA CÉLULAS DE ORIGEN
NEOPLÁSICO**

Aprobación de la tesis:

Dr. Jesús Alberto Gómez Treviño
Director de Tesis

Dr. Benito Pereyra Alférez
Co-director de Tesis

Dra. María Elena Cantú Cárdenas
Coordinadora del Posgrado en Ciencias con Orientación en Microbiología Aplicada

Dra. Ma. Araceli Hernández Ramírez
Subdirectora de Estudios de Posgrado

CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1 <i>Bacillus thuringiensis</i>	3
2.2 Estructura principal de las δ -endotoxinas.....	8
2.3 Mecanismo de acción de las Parasporinas	11
3. HIPÓTESIS	16
4. OBJETIVOS.....	17
4.1 Objetivo General	17
4.2 Objetivos Específicos	17
5. JUSTIFICACIÓN	18
6. METODOLOGÍA DE TRABAJO	19
6.1 Material biológico.....	19
6.1.1 Cepas de <i>Bacillus thuringiensis</i>	19
6.1.2 Líneas celulares	20
6.2 Pre-purificación de la toxina	21
6.3 Solubilización y activación de las toxinas	22
6.4 Determinación de peso molecular.....	22
6.5 Purificación de las parasporinas mediante intercambio aniónico ...	24
6.6 Bioensayos	25

6.6.1 Ensayo de viabilidad celular Rojo Neutro	26
6.6.2 Cytotox 96 [®] non-radioactive citotoxicity assay	27
7. RESULTADOS.....	30
7.1 Obtención de las parasporinas a partir de las cepas de estudio.....	30
7.2 Pre-purificación con hexano	31
7.3 Perfiles Proteicos.....	34
7.4 Purificación De Parasporinas Mediante Cromatografía De Intercambio Aniónico.....	36
7.5 Actividad Citotóxica De Las Parasporinas	46
8. DISCUSIÓN	52
8.1 Obtención de parasporinas a partir de las cepas de estudio.....	52
8.2 Obtención y activación de las parasporinas	52
8.3 Cromatografía de intercambio aniónico	53
8.4 Bioensayos	54
9. CONCLUSIONES	55
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:.....	56

Índice de figuras

Figura 1. Micrografía de <i>Bacillus thuringiensis</i>	3
Figura 2. Mecanismo de acción de <i>Bacillus thuringiensis</i> en lepidóptera...5	
Figura 3. Diagrama conceptual de las actividades biológicas de <i>B. thuringiensis</i>	8
Figura 4. Estructura tridimensional de la proteína Cry.....	9
Figura 5. Estructura de la parasporina-2 (PS2) de <i>Bacillus thuringiensis</i>	11
Figura 6. Productos de PCR de las cepas CL9-1, CL9-3 y CL9-21.....	15
Figura 7. Perfiles proteicos de los cristales de las cepas CL9-1, CL9-3, CL9-21 y A1470.....	23
Figura 8. La LDH liberada de las células dañadas es medida por el suplemento de lactato, NAD ⁺ e INT como sustratos en presencia de diaforasa.....	28
Figura 9. Tinción con cristal violeta de las cepas: A, CL9-1; B, CL9-3; C, CL9-21; D, A1470.....	30
Figura 10. Muestra durante el tratamiento de pre-purificación.....	32
Figura 11. Separación de esporas, restos celulares y cristales mediante centrifugación.....	33

Figura 12. Microscopía de las muestras tras cada tratamiento con la técnica de hexano.....	33
Figura 13. SDS-PAGE 12%. Perfiles proteicos de las muestras solubilizadas.....	34
Figura 14. SDS-PAGE 12% Perfiles proteicos de las muestras después de ser digeridas con proteinasa K	35
Figura 15. SDS-PAGE 12% Perfil proteico de la cepa de referencia A1470.....	36
Figura 16. SDS-PAGE 15% de fracciones recolectadas de la purificación de las parasporinas de la cepa CL9-1	38
Figura 17. SDS-PAGE 15% de las fracciones recuperadas de la purificación de las parasporinas de la cepa CL9-3.....	40
Figura 18. SDS-PAGE 15% de las fracciones recuperadas de la purificación de las parasporinas de la cepa CL9-21.....	42
Figura 19. SDS-PAGE 15% de las fracciones recuperadas de la purificación de las parasporinas de la cepa A1470	44
Figura 20. Posicionamiento de las muestras de parasporinas (PS) de prueba en contacto con células tumorales MOLT-4 y controles en placa de 96 pocillos	46

Figura 21. Efecto de las parasporinas de las cepa CL9-1, CL9-3 I, CL9-3 II, CL9-21 y A1470 contra la línea celular MOLT-4.....48

Figura 22. Posicionamiento de las muestras de parasporinas (PS) en contacto con células tumorales A-431 y control en placa de 96 pocillos..49

Figura 23. Efecto de las parasporinas de las cepa CL9-1, CL9-3 I, CL9-3 II, CL9-21 y A1470 contra la línea celular A-431.....50

Lista de tablas

Tabla 1. Característica estructural-funcional de las δ -endotoxinas.....	10
Tabla 2. Comparación de citotoxicidad de las parasporinas en células tumorales humanas	13
Tabla 3. Familia de parasporina a la que pertenecen las cepas de estudio y pesos correspondientes de las pro-toxinas y las fracciones tóxica.....	14
Tabla 4. Cepas de <i>Bacillus thuringiensis</i> que fueron empleadas, denominación y procedencia.....	20
Tabla 5. Lista de líneas celulares de estudio.....	21
Tabla 6. Condiciones para la purificación de las parasporinas de estudio.....	24
Tabla 7. Concentraciones iniciales de trabajo de cada muestra y sus diluciones.....	26

Lista de gráficas

Gráfica 1. Cromatograma del comportamiento de la muestra CL9-1 durante la purificación	38
Gráfica 2. Cromatograma del comportamiento de la muestra CL9-3 durante la purificación	40
Gráfica 3. Cromatograma del comportamiento de la muestra CL9-21 durante la purificación	42
Gráfica 4. Cromatograma del comportamiento de la muestra A1470 durante la purificación	44
Gráfica 5. Porcentaje de citotoxicidad de las diferentes parasporinas contra la línea celular MOLT-4.....	47

AGRADECIMIENTOS

Al CONACyT por el financiamiento del proyecto de investigación y la beca otorgada.

A la Universidad Autónoma de Nuevo León y la Facultad de Ciencias Químicas por la formación académica brindada estos dos años de estancia.

Al Dr. Jesús Alberto Gómez Treviño por su asesoría, comprensión, apoyo y motivación que me brindó durante el proyecto, por compartir su experiencia, por sus consejos y amistad.

Al Dr. Benito Pereyra Alférez por proporcionar las cepas para realizar el proyecto y por el apoyo para utilizar su laboratorio.

A la M.C. Claudia Berenice López Alvarado por el apoyo y asesoría técnica para poder llevar a cabo algunos experimentos.

A mi comité tutorial: la Dra. María Elena Cantú Cárdenas por apoyo y buenos consejos durante mi estancia; al Dr. Xristo Zárate Kalfópulos por su asesoría y apoyo al proporcionar su equipo de laboratorio para avanzar con la parte experimental, al Dr. Edgar Allan Blanco Gámez, por sus observaciones y consejos.

A la M.C. Teresa Vargas Cortés por su paciencia y gran apoyo técnico, por compartir sus experiencias, por dar valiosos consejos y por su gran amistad.

A mis compañeros de maestría: Anail Viridiana Padrón Rocha, Daniel Alejandro Castañón Gaona, Cecilia Guadalupe Martínez Cobos, Jesús Augusto Vázquez Rodríguez, Verónica Melissa Suárez Treviño, Silvia María Aldana Salazar por su amistad y buenos momentos durante la maestría, por su apoyo, buenos consejos, por hacer mi estancia más llevadera.

DEDICATORIA

A Dios, por permitirme vivir esta experiencia y por conocer a tan increíbles personas durante mi estancia. Aprendí muchas cosas y me llevo más de lo que podría imaginar como experiencia.

A mis padres Alejandro Reyes Robledo y Manuela Puentes Arreola por apoyarme en todo momento, por su paciencia y por sus constantes palabras de ánimo. Gracias por permanecer firmes y constantes en todo momento, gracias por su guía, sus consejos y paciencia brindada, este logro también es de ustedes, los amo.

A mi hermano Ricardo Arturo Reyes Puentes por sus palabras de aliento, por su apoyo, por siempre estar al pendiente y nunca dejarme solo, lo aprecio mucho y le agradezco bastante, gracias por ayudarme a conseguir este logro, eres parte de él.

A mi esposa Mara Gisela Castillo Alvarez, por nunca dejar de creer en mí, por su increíble paciencia y sus constantes palabras de aliento. Gracias por aguantar los momentos de ausencia, por apoyarme en todo momento y levantarme cuando caía, este logro es de ambos, uno más de todos los que vendrán, TE AMO.

A mi suegra Julia Alvarez Jaime por sus palabras de aliento, por todo su apoyo brindado durante esta travesía y sus consejos, gracias.

A los M.C. Miguel Ángel Guerra Cossío y Loth Ivonne Rodríguez Barboza por su apoyo, comprensión y buenos consejos, por su valiosa amistad y su hospitalidad brindada, son unas personas increíbles, ¡GRACIAS!

A mi abuela Nina: *“El sauce llora hoy, una brisa a la distancia está llamando a tu nombre. Deja que el viento te lleve a casa, vuela muy lejos, que no te vuelvas a quebrantar”* – Myles Kennedy.

RESUMEN

El descubrimiento de las proteínas *Cry* con nuevas propiedades, que no son entomopatógenas ha tomado auge desde el año 2000. Se ha descubierto proteínas con actividad contra células cancerígenas humanas, a estas proteínas se les ha denominado como parasporinas. Las parasporinas (PS) son un nuevo grupo de proteínas sintetizadas por *Bacillus thuringiensis* que presentan actividad citotóxica contra células humanas de diversos orígenes. Se caracterizan por no poseer propiedades entomopatógenas, no son hemolíticas y presentan una baja o nula citotoxicidad hacia células normales.

Para el presente trabajo fueron estudiadas tres cepas de *Bacillus thuringiensis* aisladas de Nuevo León, denominadas CL9-1, CL9-3 y CL9-21, además se trabajó con la cepa de referencia A1470 que produce la Parasporina-4 (PS4). Se obtuvieron las inclusiones parasporales sintetizadas por *Bacillus thuringiensis* y fueron activadas usando proteinasa K en un ambiente alcalino. El digerido fue purificado mediante Cromatografía de Intercambio Aniónico y se rastrearon las parasporinas de interés de las fracciones recuperadas mediante el análisis de perfiles proteicos. Las parasporinas purificadas presentaron actividad citotóxica contra dos líneas celulares en las que fueron probadas: MOLT-4 y A-431 *in vitro*.

1. INTRODUCCIÓN

Bacillus thuringiensis es una bacteria Gram-positiva, aerobia estricta, que durante su ciclo de vida presenta dos fases principales: crecimiento vegetativo, donde la bacteria se duplica por bipartición, y esporulación, un programa de diferenciación de bacteria a espора [1]. Es una bacteria perteneciente al grupo de *Bacillus cereus*. Durante la fase de esporulación produce inclusiones parasporales cristalinas de naturaleza proteica. Esta es la única característica que lo discrimina taxonómicamente de la especie cercana, *Bacillus cereus* [2]. *B. thuringiensis* es considerada una bacteria ubicua, ya que se ha aislado de todas partes del mundo y de muy diversos sistemas, como suelo, agua, hojas de plantas, insectos muertos, telarañas, etc. [1].

La extremadamente alta patogenicidad del organismo se debe únicamente a la toxicidad oral del cristal (Cry), contenida en las inclusiones parasporales cristalinas, cuya actividad es altamente específica para los insectos y nemátodos [2]. Estos cristales parasporales pueden estar constituidos por la agregación de una o varias proteínas, denominadas proteínas Cry o δ -endotoxinas, que resultan tóxicas de forma selectiva al ser ingeridas por insectos susceptibles, entre los que se incluyen importantes plagas agrícolas [3].

Una vez que el insecto ha ingerido el cristal, éste se solubiliza en el intestino medio, liberando la proteína (δ -endotoxina). Estas proteínas son activadas por las proteasas del intestino medio; las toxinas activadas interactúan con el epitelio

del intestino medio de las larvas, causando una interrupción en la integridad de la membrana y en última instancia conduce a la muerte del insecto [4].

Algunas proteínas Cry de cepas de *B. thuringiensis*, que no tienen actividad insecticida, presentan actividad citotóxica contra varios tipos de células de vertebrados, incluso contra células humanas de origen neoplásico, así, el término de parasporinas se usa para describir a las proteínas Cry con actividad citotóxica en contra de células humanas cancerígenas y sin actividad entomopatógena [6].

Las proteínas de los cristales de *B. thuringiensis* han mostrado actividad sobre células de neoplasias de distintos tejidos, contra las variadas series de células de leucemias y contra protozoos de importancia médica como *Giardia lamblia* y *Plasmodium berghei* [5].

En particular debe destacarse que las proteínas de *B. thuringiensis* se les reconoce como no tóxicas para el hombre y otros mamíferos [6].

2. ANTECEDENTES

2.1 *Bacillus thuringiensis*

Bacillus thuringiensis es una bacteria perteneciente al grupo de *Bacillus cereus* [2]. Es una bacteria Gram-positiva, aerobia estricta. Presenta dos fases principales a lo largo de su ciclo de vida: 1) crecimiento vegetativo, que es la forma en la que la bacteria se duplica y 2) esporulación, que es un programa de diferenciación de bacteria a espora y le permite sobrevivir en ambientes adversos [1, 17].

Ésta es considerada una bacteria ubicua, ya que se ha aislado de todas partes del mundo y de muy diversos sistemas, como suelo, agua, hojas de plantas, insectos muertos, telarañas, etc. [1]. El microorganismo produce una inclusión parasporal cristalina durante la fase de esporulación (Fig. 1). Es la única característica que lo diferencia de la especie *B. cereus* [2].

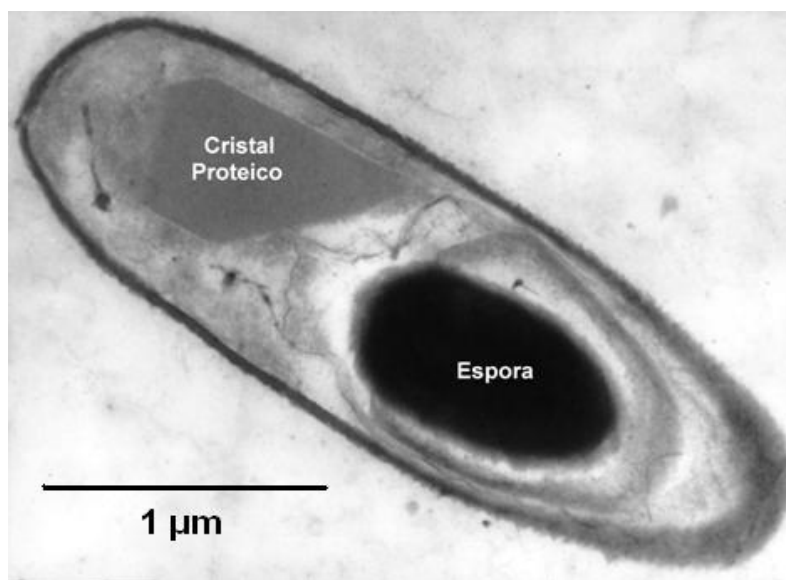


Fig. 1 Micrografía de *Bacillus thuringiensis*. [29]

Bacillus thuringiensis se aisló por primera vez en Japón, a partir de larvas enfermas de gusano de seda, *Bombyx mori*, como una bacteria con propiedades tóxicas contra insectos. La alta patogenicidad del organismo se debe a la ingesta oral del cristal protéico (proteína Cry), que se encuentran en las inclusiones parasporales, cuya actividad es altamente específica contra insectos y nemátodos [25]. Las inclusiones parasporales de muchas cepas de *B. thuringiensis* contienen proteínas únicas con alta y específica toxicidad contra insectos de diversas órdenes incluyendo lepidóptera, tricóptera, coleóptera y díptera [17]. Ahora es bien aceptado que la actividad insecticida de la proteína Cry es inducida por la unión específica al receptor localizado en la membrana plasmática de la célula epitelial del intestino medio de los insectos [2].

Las propiedades insecticidas que mostró este microorganismo fueron reconocidas durante las décadas 30-40's. En los años 50-60's, las propiedades tóxicas entomopatógenas fueron atribuidas a la diversidad de toxinas producidas durante la esporulación, haciendo referencia en el cristal parasporal ó δ -endotoxina [6].

En el año de 1989 Höfte y Whiteley propusieron una clasificación para las δ -endotoxinas. Para esta clasificación fueron distinguidas cuatro grandes clases de δ -endotoxinas (Cry-I, -II, -III, -IV). Las δ -endotoxinas pertenecientes a cada una de estas clases fueron agrupadas a su vez en sub-clases (A, B, C,...y a, b, c,...) de acuerdo a su secuencia genética [22].

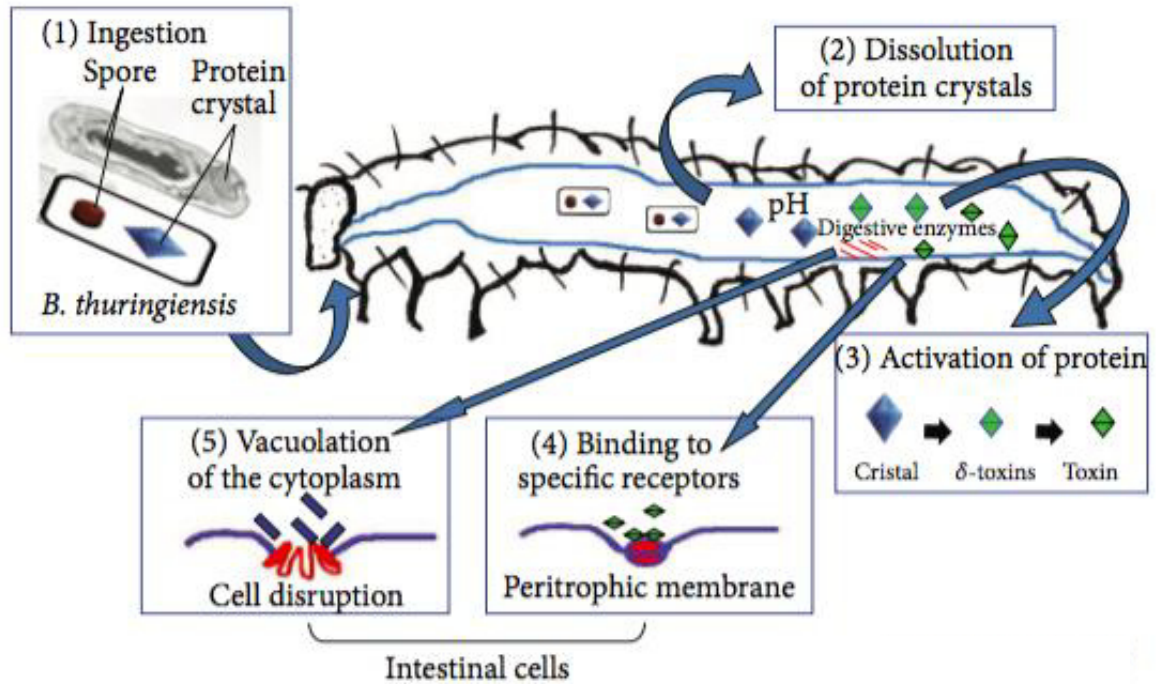


Fig. 2 Modo de acción de *Bacillus thuringiensis* en lepidóptera: la ingestión de bacterias (1); solubilización de los cristales (2); activación de proteína (3); unión de proteínas a los receptores (4); la formación de poros de la membrana y lisis celular (5). [36]

El mecanismo de acción de las proteínas Cry ha sido descrito principalmente con la proteína Cry1A. Después de la ingesta por parte de la larva, las inclusiones son primeramente disueltas bajo condiciones alcalinas en el intestino medio. Una vez generada la protoxina, ésta es convertida por medio de proteasas en toxinas activas que son capaces de interactuar con receptores específicos de las células del intestino medio de la larva (Fig. 2) [23, 24].

Muchas proteínas Cry son insecticidas con una elevada selectividad, pero décadas de investigación no han sido suficientes para caracterizar y buscar la

actividad biológica de las proteínas no-insecticidas, las cuales también predominan en la naturaleza [9].

Mizuki y colaboradores fueron los primeros en intentar un cribado a gran escala de cepas de *B. thuringiensis* cuyas proteínas de inclusión parasporal son no hemolíticas, sin embargo si fueron citotóxicas para las células cancerosas humanas. Para estas pruebas de detección, fueron involucradas las proteínas parasporales de 1,744 cepas de *Bacillus thuringiensis* digeridas con proteasas, las cepas para la detección constaron de: (i) 1,700 aislados japoneses de la colección de *Bacillus thuringiensis* de la Universidad Kyushu, y (ii) 44 cepas de referencia de *B. thuringiensis* serotipo H del Instituto Pasteur, Paris [2].

En la década del 2000, Mizuki y colaboradores obtuvieron de la cepa A1190 una proteína Cry que presentaba citotoxicidad contra células tumorales, con un peso molecular de 81 kDa y fue clasificada como una nueva clase de proteína Cry, dada la baja similitud de su secuencia aminoacídica con otras inclusiones proteicas insecticidas[2, 26]. Esto condujo a la creación de una nueva categoría de proteínas: la parasporina, definida como la proteína parasporal bacteriana que es capaz de matar las células neoplásicas de manera discriminada. Es decir, que entre las proteínas Cry con actividad no-insecticida, destacan las parasporinas, que son nuevas endotoxinas producidas por *B. thuringiensis* que tienen una actividad tóxica preferencial contra células humanas cancerígenas [2, 21].

Se han realizado estudios de las inclusiones parasporales no-insecticidas producidas por *B. thuringiensis*, las parasporinas (PS) con actividad citotóxica contra células-T de leucemia [14, 19]. Los resultados arrojados fueron que, la proteína mostró una fuerte actividad citotóxica contra células-T de leucemia (MOLT-4) y cáncer cervico-uterino (HeLa), sin embargo las células-T normales no resultaron afectadas [19].

Según el Comité de Clasificación y Nomenclatura de Parasporinas [10], la proteína obtenida de 81 kDa constituye la familia parasporina 1Aa (PS1Aa) en el actual sistema de clasificación. Las investigaciones posteriores han establecido tres familias adicionales de parasporinas: parasporina 2 (PS2), parasporina 3 (PS3), y parasporina 4 (PS4) [2].

Las principales características de las PS son: i) no presentan actividad insecticida conocida; ii) son sintetizadas como protoxinas, es decir, necesitan ser hidrolizadas por proteasas en puntos específicos para su activación; iii) tienen una alta toxicidad contra células humanas de origen neoplásico, pero una baja o nula hacia células sanas y iv) poseen bajos porcentajes de identidad con proteínas Cry insecticidas [8].

En años más recientes, el estudio de las proteínas *Cry* que no mostraban actividad insecticida, ha revelado nuevas propiedades, como se esquematiza en la figura 3. Tal es el caso de las lectinas, la actividad anti-tricomonas y la anti-cancerígena. Siendo esta última, la parte central de este estudio, ya que presenta un gran potencial terapéutico, mediante el uso de un nuevo grupo de proteínas *Cry* denominadas parasporinas, detalladas a continuación [8].

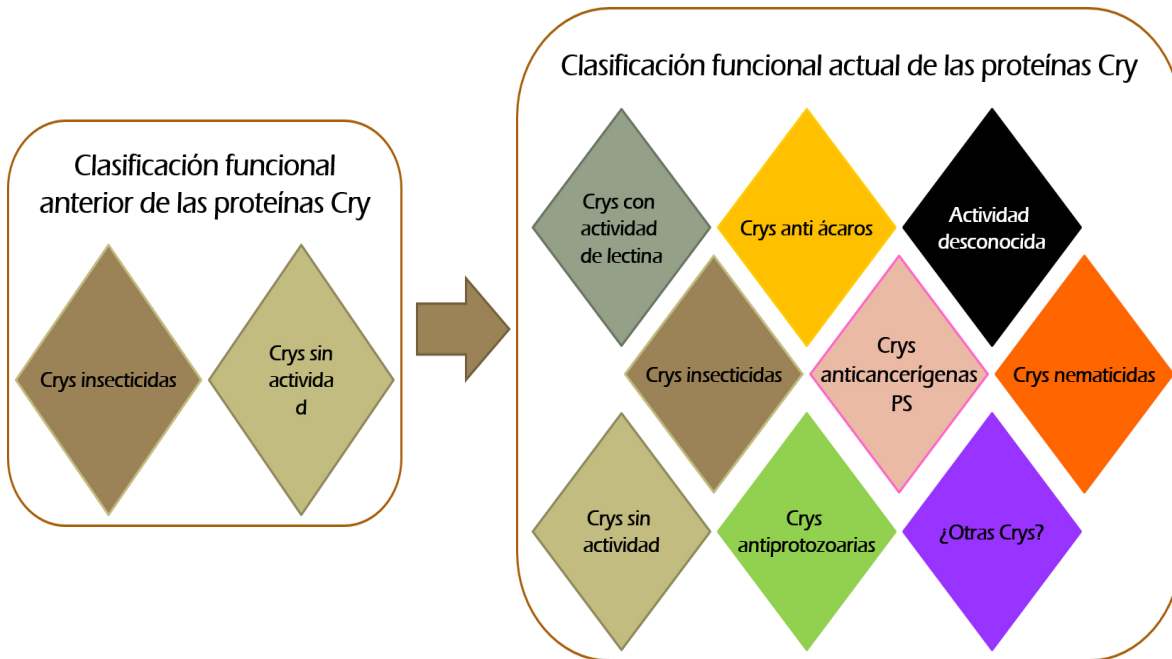


Fig. 3 Diagrama conceptual de las actividades biológicas de *B. thuringiensis* [8].

2.2 Estructura principal de las δ -endotoxinas.

Las δ -endotoxinas, son moléculas de proteínas globulares que se acumulan como protoxinas en forma cristalina durante la fase crónica de la esporulación. La protoxina contiene residuos de cisteína bien conservados, que ayudan en la reducción de las moléculas a través de enlaces disulfuro intermoleculares y con ello la formación de cristales [7].

Las δ -endotoxinas son proteínas multidominio y están compuestas de tres dominios distintos, cada uno de ellos aporta una función en particular. El Dominio I está compuesto por siete α hélices, de las cuales seis son anfipáticas (1, 2, 3, 4, 6, 7) y una hélice central hidrofóbica (α -5). El Dominio II está compuesto por tres

láminas- β antiparalelas, orientadas paralelamente con las α -hélice del Dominio I y es el que brinda especificidad a las δ -endotoxinas. El Dominio III está compuesto por dos láminas- β antiparalelas dentro de una estructura de sándwich β . El bloque rico en arginina del Dominio III es llamado “arg face” (“cara arg”) con el cual el Dominio III entra en contacto con el Dominio I y regula la conductancia del canal iónico (Fig. 4) [27, 7].

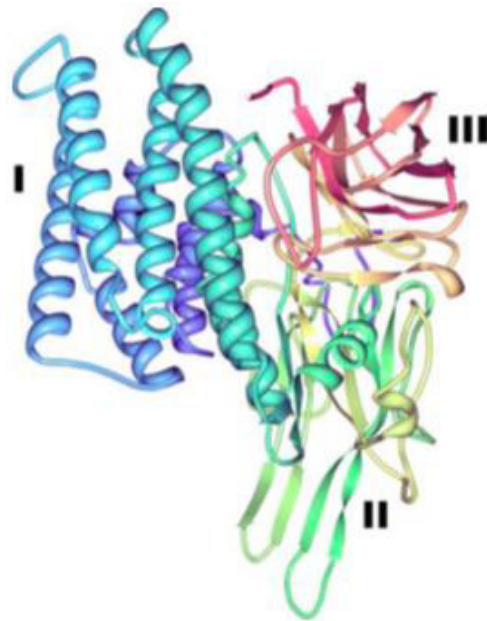


Fig. 4 Estructura tridimensional de la proteína Cry. [11]

El papel del dominio I, en la inserción de la membrana y la formación de poros en el epitelio del intestino medio del insecto, fue sugerido por la presencia de sus largas, hidrófobas y anfipáticas hélices. El dominio II está implicado en las interacciones proteína-receptor a través de los bucles expuestos en la superficie en los vértices de las tres hojas β . Debido a sus similitudes con los sitios de unión inmunoglobulina-antígeno, se presume que los bucles del dominio II

participan en la unión al receptor. La estructura β -sándwich del dominio III está relacionada también con la función de la unión al receptor y la unión a los restos de N-acetilgalactosamina en los receptores de proteínas [18]. En la tabla 1 se muestra de manera resumida la función de cada uno de los dominios así como la estructura y su secuencia aminoacídica.

Tabla 1.

Característica estructural-funcional de las δ -endotoxinas [7].

Dominio	Secuencia aminoácido		Estructuras secundarias	Funciones
	Cry1Aa	Cry3A		
Dominio I	33-252	58-290	Siete α -hélices	Formación de poros.
Dominio II	265-461	291-500	Tres láminas antiparalelas dobladas en tres bucles	Unión al receptor y determinación de la especificidad.
Dominio III	463-609	501-644	β -sándwich de dos láminas- β antiparalelas	Unión al receptor, regulación de canales iónicos y especificidad insecticida.

2.3 Mecanismo de acción de las Parasporinas

En la primera parasporina descrita, la PS1, los informes han mostrado que es la causante de la apoptosis en las células sensibles. Por otro lado, la PS2 (Fig. 5), es una toxina formadora de poros que se une a receptores proteínicos. La parasporina PS3, dada su relación a una proteína Cry insecticida, también se le considera una formadora de poros porque ésta aumenta la permeabilidad de las células diana. Finalmente, la PS4, es muy similar a la PS2 por su actividad tóxica y formadora de poros, pero tiene una gran diferencia, es una toxina colesterol-independiente, por lo que su unión a la membrana plasmática es inespecífica [9].



Fig. 5 Estructura de la parasporina-2 (PS2) de *Bacillus thuringiensis* [33].

Dieciocho parasporinas han sido identificadas; sin embargo, la mayoría de ellas no están bien caracterizadas. Las parasporinas, PS1Aa1, PS2Aa1, PS3Aa1 y PS4Aa1 son las mejores estudiadas y no se necesita un análisis profundo para

darse cuenta de que no hay una estructura general, un modo de acción o espectro de células objetivo que compartan todas las parasporinas, cada uno es único en al menos un sentido [9].

Diversas investigaciones han indicado que, las cuatro familias de parasporinas (PS1, PS2, PS3, PS4) han tenido un espectro de citotoxicidad contra 13 líneas celulares humanas procedentes de diversos tejidos, nueve tumorales, cuatro de tejidos normales y cinco de células de otra especie (dos de monos y tres líneas celulares de roedores). En general, las actividades citocidas de las parasporinas mostraron preferencia contra células cancerosas humanas. Los resultados de la investigación se muestran en la tabla 2 [2, 31, 32].

Tabla 2.

Comparación de citotoxicidad de las parasporinas en células tumorales humanas [2].

Línea Celular	Origen	Citotoxicidad			
		PSA1Aa1	PSA2Aa1	PSA3Aa1	PSA4Aa1
Humano					
HeLa	Cáncer cérvico-uterino	+++	-	-	-
Sawano	Adenocarcinoma endometrial	-	++++	-	+++
TSC	Cáncer cérvico-uterino	-	-	-	+++
UtSMC	Músculo liso uterino normal	-	++	-	-
MOLT-4	Leucemia linfoblástica aguda	++	++++	-	+++
HL-60	Leucemia promielocítica	+++	++++	++	+++
Jurkat	Leucemia células-T	-	++++	-	-
T-cell	Linfocitos-T normales	-	+++	-	-
HepG2	Carcinoma hepatocelular	++	++++	++	++

Prueba de citotoxicidad de las cuatro familias de parasporinas (PS) sobre diferentes líneas celulares. El espectro de citotoxicidad fue evaluado marcando cruces, siendo extremadamente alto (++++), alto (+++), moderado (++), bajo (+), muy bajo o no tóxico (-).

Para el presente estudio los pesos registrados de las pro-toxinas y los fragmentos tóxicos que se emplearon para los ensayos se pueden visualizar en la tabla 3. El perfil proteico de las cepas se puede observar en la figura 6.

Tabla 3.

Familia de parasporina a la que pertenecen las cepas de estudio y pesos correspondientes de las pro-toxinas y las fracciones tóxicas.

Cepa	Familia parasporina	Pro-toxina (kDa)	Fracción(es) tóxica(s) (kDa)
CL9-1	PS1	79	57 / 16
CL9-3	PS1	75	57 / 17
CL9-21	PS2	43	30
A1470	PS4	30	27

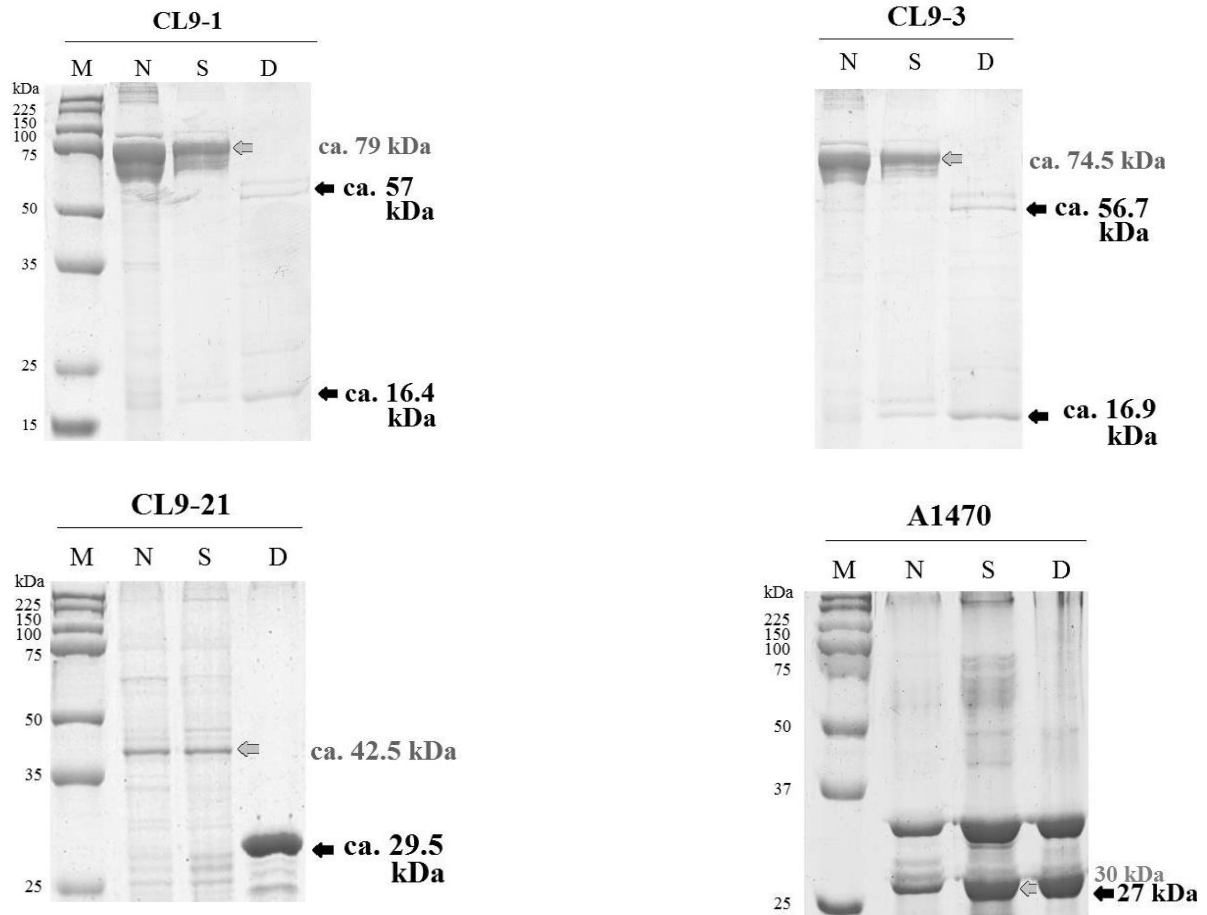


Fig. 6 Perfiles proteicos de los cristales de las cepas CL9-1, CL9-3, CL9-21 y A1470. En los carriles: M, marcador de peso molecular; N, proteínas nativas; S, proteínas solubilizadas; D, proteínas activadas. Las flechas grises señalan las protoxinas y las negras los fragmentos tóxicos [8].

3. HIPÓTESIS

Los péptidos obtenidos de las parasporinas de las cepas de *Bacillus thuringiensis*: CL9-1, CL9-3 y CL9-21, tienen un efecto citotóxico sobre células neoplásicas in vitro.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Obtener las fracciones proteicas derivadas de las parasporinas de *Bacillus thuringiensis* cepas: CL9-1, CL9-3 y CL9-21 con actividad citotóxica sobre células de origen neoplásico.

4.2 Objetivos Específicos

1. Obtener y purificar los cristales parasporales de las cepas CL9-1, CL9-3 y CL9-21.
2. Por medio de digestión con proteasas, generar las fracciones de los cristales parasporales.
3. Purificar las fracciones obtenidas de la digestión.
4. Realizar ensayos de citotoxicidad en células de origen neoplásico.

5. JUSTIFICACIÓN

El uso de las proteínas de *B. thuringiensis*, no solo como herramientas en el área de los insecticidas, sino también como agentes terapéuticos contra el cáncer, es un campo de desarrollo que lleva consigo un gran potencial no explorado, dado que existen diferentes tipos de cristales, siendo esta diferencia producto de la secuencia aminoacídica, existiendo por ende; mayor probabilidad de diferencias en su actividad.

Este trabajo pretende evaluar si las parasporinas obtenidas de las cepas de *B. thuringiensis* ya mencionadas tienen actividad citotóxica sobre células de origen neoplásico.

6. METODOLOGÍA DE TRABAJO

6.1 Material biológico

6.1.1 Cepas de *Bacillus thuringiensis*

Para este estudio fueron utilizadas las cepas *B. thuringiensis* CL9-1, CL9-2 y CL9-21 proporcionadas por el Instituto de Biotecnología de la FCB, UANL, que constaron de cultivos de esporas sembrados en agar LB y una cepa de referencia, A1470 proporcionada por el Dr. Eiichi Mizuki del Biotechnology and Food Research Institute, Fukuoka Industrial Technology Center. En la tabla 3 se muestra la procedencia de las cepas de estudio de *Bacillus thuringiensis* y la denominación que se les dio.

Para activar las cepas, fueron inoculadas (10% del volumen total) en caldo LB e incubadas a una temperatura de 30°C por un tiempo de 72 h en agitación a 150 rpm. El monitoreo de las inclusiones parasporales se llevó a cabo mediante tinción Gram y tinción simple con cristal violeta, vistos en un microscopio óptico a un aumento de 100X.

Los cultivos se vaciaron en tubos de 80 ml y se centrifugaron a 15,000g durante 10 minutos a 4°C para obtener un pellet al cual se le dio un tratamiento de pre-purificación.

Tabla 4.

Cepas de *Bacillus thuringiensis* que fueron empleadas, denominación y procedencia.

<i>Nombre de la cepa</i>	<i>Lugar de aislamiento</i>
CL9-1	Nuevo León
CL9-3	Nuevo León
CL9-21	Nuevo León
A1470	Tokio, Japón

6.1.2 Líneas celulares

La actividad biológica de los cristales fue evaluada en dos líneas celulares, las cuales fueron adquiridas de la American Type Culture Collection (ATCC) y fueron conservadas en criogenia a -70°C con 5% de DMSO (Tabla 5). Para su activación y propagación fueron utilizados los medios de cultivo recomendados por la ATCC y mantenidas en incubación a 37°C con 5% de CO_2 .

Tabla 5.

Líneas celulares en las que se evaluó la actividad biológica de las parasporinas obtenidas. [8]

No. ATCC	CRL-1555	CRL-1582
Nombre	A-431	MOLT-4
Organismo	<i>Homo sapiens</i>	<i>Homo sapiens</i>
Morfología/Tejido	Epitelial/Piel	Linfoblasto/Sangre
Propiedades	Adherente	Suspensión
Enfermedad	Carcinoma epidermoide	Leucemia linfoblástica aguda
Medio de Cultivo*	DMEM	RPMI-1640

*Abreviaciones: DMEM: Medio de Eagle Modificado de Dulbecco; RPMI: Medio del Instituto Roswell Park Memorial. A los medios de cultivo se les suplementó con 10% de Suero Fetal Bovino.

6.2 Pre-purificación de la toxina

Seguido de la obtención del pellet de los cultivos bacterianos, se realizó un tratamiento de pre-purificación mediante la técnica con hexano [13], que consiste en suspender el pellet obtenido en 10 ml de una solución que contiene 1 M NaCl y 0.01% Tritón X-100; a la suspensión se le añadió el 10% de hexano para tratar de disminuir el riesgo de alterar los cristales. Posteriormente la muestra fue sonicada a 100 W durante 15 minutos y centrifugada bajo las condiciones siguientes: 4°C, 6,000 rpm por 10 minutos.

El pellet obtenido fue resuspendido en la solución salina, el solvente fue añadido nuevamente y el procedimiento se repitió cuatro veces. Finalmente el pellet fue lavado tres veces con agua destilada fría.

6.3 Solubilización y activación de las toxinas

Teniendo el pellet resultante de la cosecha y el tratamiento con hexano, las muestras fueron solubilizadas en buffer de carbonatos que contiene 50 mM Na_2CO_3 , 1 mM EDTA y 10 mM 1,4-dithiothreitol (DTT), pH 10 [14] durante 14 horas. Posterior a esto, la protoxina fue recuperada centrifugando a 15,000g por 10 minutos a una temperatura de 25°C.

Una vez recuperada la proteína, se filtró a vacío utilizando un filtro de membrana de nylon de 0.45 μm [15,16] y se conservó a -20°C hasta su uso.

La muestra recolectada fue centrifugada utilizando centricones Amicon[®] Ultra-15 10K para eliminar posibles restos celulares y al mismo tiempo concentrar la muestra.

Para llevar a cabo la activación de la pro-toxina se digirió con Proteinasa K (P2308 Sigma-Aldrich). Se incubó la muestra a 37°C durante 50 minutos con la enzima en una concentración de 10 ppm. Se añadió 1 mM de fenilmetilsulfonil fluoruro (PMSF) para detener la proteólisis.

6.4 Determinación de peso molecular.

La determinación de los pesos moleculares fue llevada a cabo mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE), usando una concentración de 5% de “stacking” gel; 12% ó 15% para el

gel de resolución. Los pesos moleculares de las muestras fueron estimados usando un marcador de peso estándar (Bio-Rad Presicion Plus Protein Standards). Se compararon los pesos de las proteínas pre-purificadas y digeridas con la proteasa con los pesos moleculares obtenidos en un trabajo previo realizado por Espino-Vázquez Astrid, *et. al.* en el 2014, donde se realizó una detección de parasporina (PS) por medio de PCR múltiple (Fig. 7). De acuerdo a las amplificaciones obtenidas, las cepas CL9-1 y CL9-3 amplificaron productos correspondientes a los genes de las PS1 mientras que la tercera cepa de estudio, CL9-21 amplificó para PS2, PS3 y PS4.

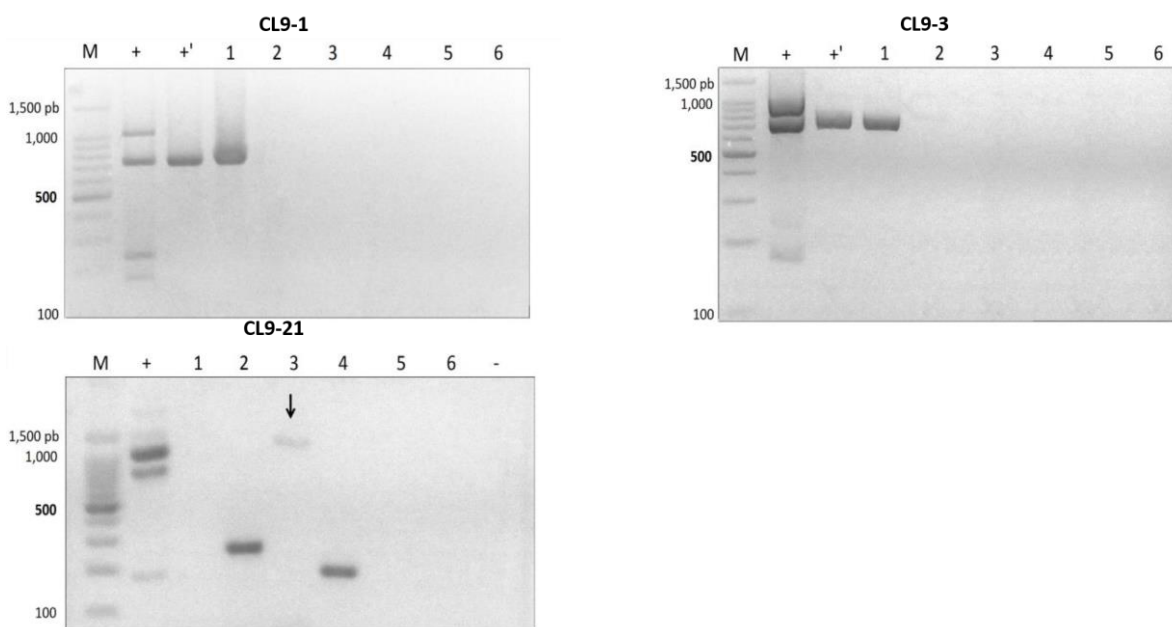


Fig. 7 Productos de PCR de las cepas CL9-1, CL9-3 y CL9-21. Para los carriles: M, marcador de peso; +, control positivo con PS1, PS2, PS3 y PS4; +', control positivo para PS1; 1-6 reacciones simplex con indicadores para PS1-PS6; -, control sin DNA. La flecha indica el producto de PCR con menor concentración.

6.5 Purificación de las parasporinas mediante intercambio aniónico

Para purificar las fracciones tóxicas se utilizó el equipo AKTA Prime plus de General Electric con una columna HiTrap Q HP.

Las condiciones a las cuales se llevó a cabo la purificación se detallan en la siguiente tabla:

Tabla 6.

Condiciones para la purificación de las parasporinas de estudio.

Cepa	Buffer de inicio	Buffer de elución	Flujo (mL/min)	pH
CL9-1	Tris 20 mM	Tris 20 mM + NaCl 1 M	0.3	8
CL9-3	Tris 20 mM	Tris 20 mM + NaCl 500 mM	0.3	8
CL9-21	Tris 20 mM	Tris 20 mM + NaCl 500 mM	0.3	8
A1470	Tris 20 mM	Tris 20 mM + NaCl 500 mM	0.3	8

Las fracciones fueron recuperadas en tubos eppendorf estériles con un volumen de 500 μ l por tubo y fueron almacenadas en congelación a -20°C hasta su uso.

Una vez obtenidas las fracciones correspondientes a cada muestra, se rastreó, por medio de SDS-PAGE al 15% la o las proteínas que corresponderían a las parasporinas que ya se habían reportado para cada cepa.

Después de tener ubicadas las fracciones que contenían la parasporina, se juntaron las muestras de cada una y se realizó un cambio de buffer, de Tris 20 mM + NaCl 500 mM y Tris 20 mM + NaCl 1 M a buffer Tris 20 mM utilizando Amicon® Ultra-15 10K centrifugando a 4000 g por 40 min. El volumen recuperado del cambio de buffer fue completado a 1 ml. La concentración de proteína de cada una de las parasporinas fue medida mediante la técnica de cuantificación de proteína de Bradford [12].

6.6 Bioensayos

Se hicieron diluciones de las muestras para ser dosificadas contra las dos líneas celulares de prueba A-431 y MOLT-4. En la siguiente tabla se describen las concentraciones iniciales de cada muestra así como las diluciones a las que se trabajó.

Tabla 7.

Concentraciones iniciales de trabajo de cada muestra y sus diluciones.

<i>Cepa de estudio</i>	<i>Concentración inicial [$\mu\text{g/ml}$]</i>	<i>Concentración de las diluciones [$\mu\text{g/ml}$]</i>			
CL9-1	3.2	0.32	0.032	0.0032	0.00032
CL9-3 I	4.1	0.41	0.41	0.0041	0.00041
CL9-3 II	3.1	0.31	0.031	0.0031	0.00031
CL9-21	2.8	0.28	0.028	0.0028	0.00028
A1470	32	3.2	0.32	0.032	0.0032

6.6.1 Ensayo de viabilidad celular Rojo Neutro

Está basado en la capacidad de las células viables para incorporar y ligar el colorante rojo neutro. Este colorante penetra débilmente las membranas celulares por difusión pasiva y es concentrado en los lisosomas, donde se une por enlaces electrostáticos hidrófobos y/o grupos fosfato de la matriz lisosomal.

Se preparó una solución de rojo neutro en etanol para tener una concentración de 5 mg/ml. Antes de realizar el ensayo fue diluida una alícuota de 500 μl de la solución preparada de rojo neutro en 50 ml de medio para cultivo celular (DMEM) y se incubó a 37°C.

Para realizar el ensayo se preparó una placa de 96 pocillos con la línea celular A-431. A las células preparadas en la placa se les aspiró el medio y se sustituyó por 35 μl medio DMEM no enriquecido con suero fetal bovino y se añadieron por triplicado 10 μl de los cristales activos de las cepas de estudio, el

procedimiento se realizó por triplicado y se dejó incubar a 37° por un lapso de 2 horas. Después se añadió medio DMEM enriquecido con suero fetal bovino para tener un volumen final de 100 μ l y se dejó incubar por un lapso de 48 horas.

Se aspiró el medio de cada pocillo de prueba y se sustituyó por 100 μ l de solución rojo neutro. A continuación la placa se incubó a 37°C durante una hora. Se retiró el colorante por medio de aspiración y se añadieron 100 μ l de PBS a cada pocillo. La placa permaneció en agitación constante por 10 min y se repitió el lavado con PBS una vez más.

Después de retirar el PBS se añadieron 100 μ l de solución de desteñido y la placa nuevamente fue agitada por un periodo de 10 min hasta que el rojo neutro ha sido extraído de las células y se haya formado una solución homogénea.

La lectura de la placa se llevó acabo por espectrofotometría a una densidad óptica de 540 nm.

Se realizó un cálculo de IC₅₀ utilizando el programa GraphPad Prism® 6.01.

6.6.2 Cytotox 96® non-radioactive cytotoxicity assay

El ensayo se basa en la medición cuantitativa de lactato deshidrogenasa (LDH), que es una enzima citosólica estable que es liberada tras la lisis celular. La LDH liberada en el sobrenadante del medio de cultivo es medida mediante un ensayo acoplado a una enzima, lo que resulta en la conversión de sal de tetrazolio (yodonitro-tetrazolio violeta; INT) a un producto de rojo formazán (Fig. 8). La cantidad de color formado es proporcional al número de células lisadas.

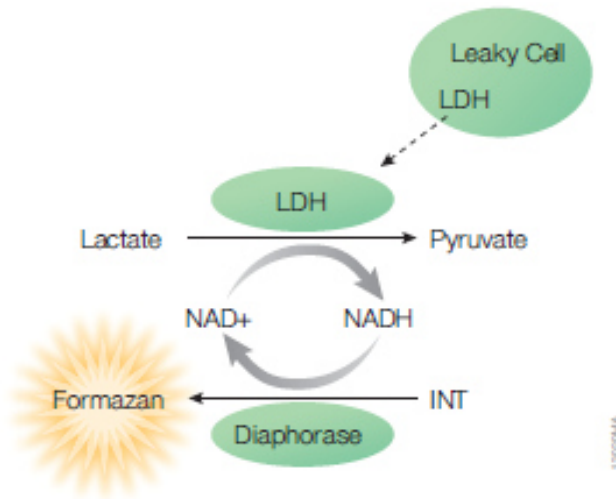


Fig. 8 La LDH liberada de las células dañadas es medida por el suplemento de lactato, NAD⁺ e INT como sustratos en presencia de diaforasa.

Para realizar el ensayo se utilizaron placas de 96 pocillos. Para las células MOLT-4 fueron depositados 90 μl de suspensión de células (8×10^4 células por pocillo) y fueron añadidos 10 μl de la muestra de cristales activos purificados de nuestras cepas para tener un volumen final de 100 μl ; posteriormente incubamos a 37°C por un periodo de tiempo de 48 horas bajo las siguientes condiciones: 37°C con 5% de CO₂.

Se transfirieron alícuotas de 50 μl de cada pocillo a una nueva placa a la cual fueron añadidos 50 μl de CytoTox 96[®] Reagent para los pocillos que contenían la muestra. Se protegió la placa de la luz y se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente. Se añadieron 50 μl de Stop Solution a cada pocillo, se reventaron los restos de burbujas y se leyó la placa a una densidad óptica de 490 nm.

La ecuación para calcular el porcentaje de citotoxicidad fue la siguiente:

$$\text{Porcentaje de citotoxicidad} = 100 \times \frac{\text{LDH Experimental liberado (OD 490)}}{\text{LDH M\u00e1ximo liberado (OD 490)}}$$

En donde el control de LDH M\u00e1ximo liberado se determin\u00f3 depositando en un pocillo (por triplicado) 10 μl de "10X Lysis Solution" por cada 100 μl de c\u00e9lulas tumorales sin a\u00f1adir el tratamiento, en este caso los cristales. Posteriormente se tom\u00f3 lectura a una densidad \u00f3ptica de 490 nm.

Se realiz\u00f3 un c\u00e1lculo de IC_{50} utilizando el programa GraphPad Prism[®] 6.01.

7. RESULTADOS

7.1 Obtención de las parasporinas a partir de las cepas de estudio

El monitoreo se llevó a cabo utilizando la técnica de tinción Gram cada 6 a 8 horas y las muestras fueron observadas con un microscopio óptico a un aumento de 100X.

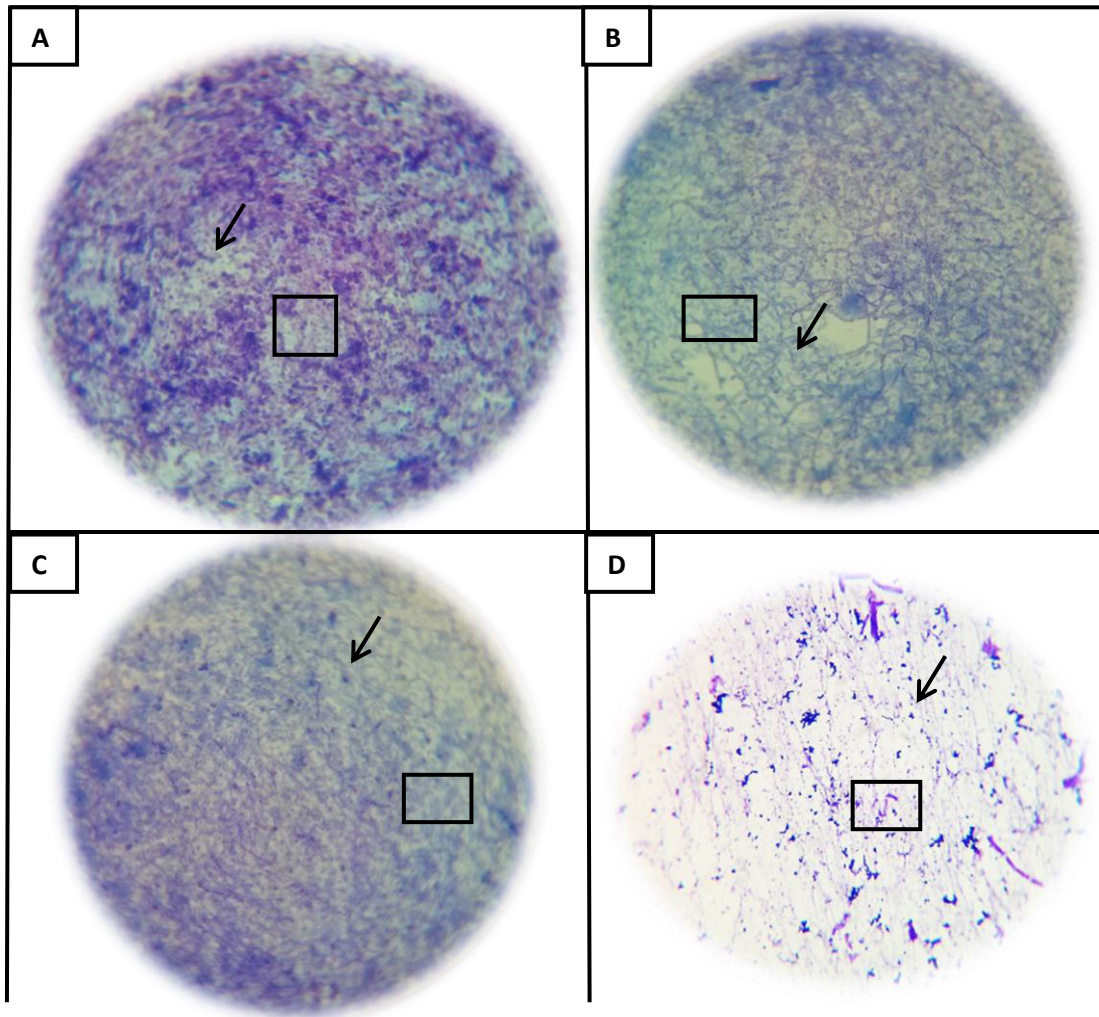


Fig. 9 Tinción con cristal violeta de las cepas: A, CL9-1; B, CL9-3; C, CL921; D, A1470. Las flechas indican el lugar donde se encuentra el cristal; el recuadro encierra la espora.

Los cultivos fueron dejados en incubación durante 72 horas a las condiciones establecidas y se observaron muestras esporuladas y con cristales liberados. Los restos de las esporas se observan con menor intensidad de color ya que sólo fue teñida la pared, permaneciendo el interior incoloro.

Los cristales teñidos fueron identificados como pequeños puntos de color morado/violeta, en ocasiones pegados a la espora o liberados completamente y aislados. Se obtuvo más crecimiento de las cepas de interés cultivándolas en caldo LB con agitación que llevando el cultivo en cajas Petri.

7.2 Pre-purificación con hexano

Se pudo observar que se formaba una bifase en la parte acuosa del tubo, separando las esporas en el hexano o la fase superior y los restos celulares quedaron atrapados en la fase inferior que contenía NaCl 1M + 0.01% Tritón X-100, tal como lo menciona Jihane *et. al.* [13]. Se presume que los cristales son acumulados en el fondo del tubo en forma de pellet (Fig. 10).

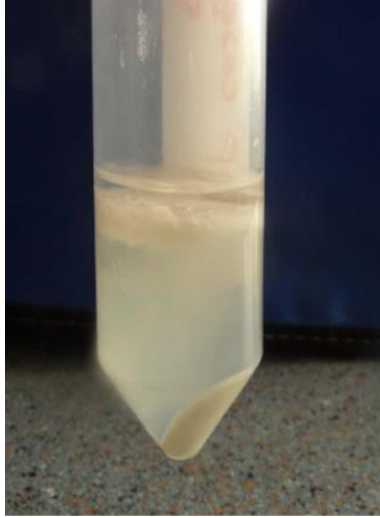


Fig. 10 Muestra durante el tratamiento de pre-purificación. Se puede observar el pellet que contiene los cristales y la parte acuosa bifásica [13].

Se pudo apreciar una mayor clarificación en la fase acuosa de la muestra en cada ciclo de tratamiento con hexano y se observó una similitud con lo reportado con anterioridad [13] como se muestra en la figura 11.

El que la fase acuosa parezca más transparente, supone que los restos celulares y de esporas están siendo eliminados.

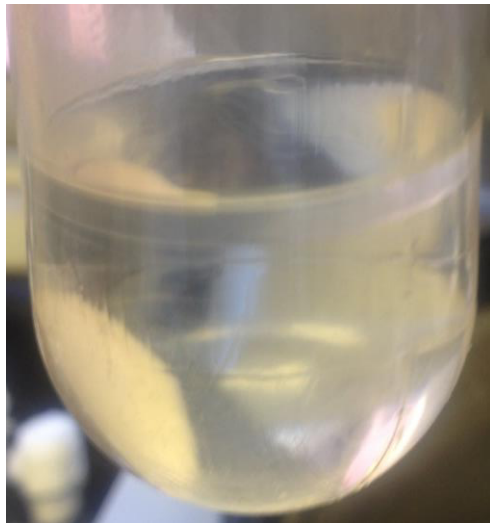


Fig. 11 Separación de esporas, restos celulares y de cristales mediante centrifugación.

Se realizó un monitoreo de la muestra después de cada ciclo de pre-purificación utilizando un microscopio óptico (Fig. 12). Los ciclos fueron repetidos hasta cuatro veces para evitar la alteración de los cristales.

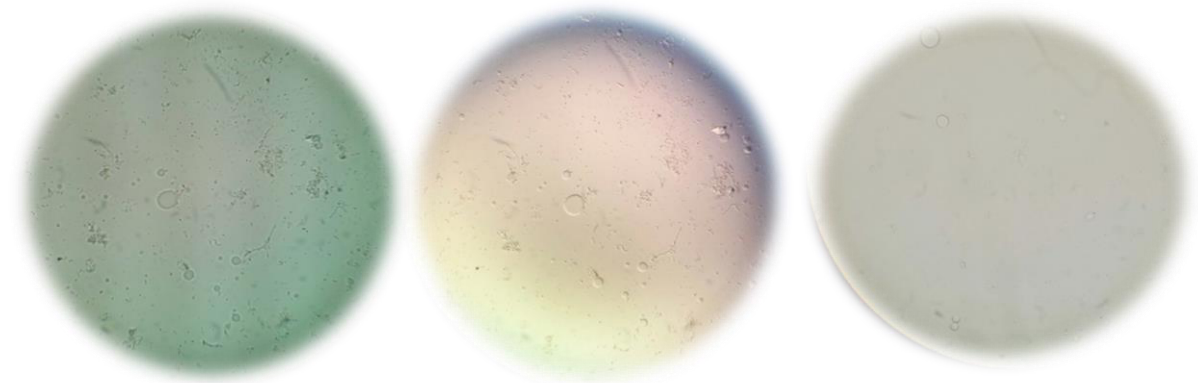


Fig. 12 Microscopía de las muestras tras cada tratamiento con la técnica de hexano. Se puede observar que disminuye la cantidad de restos celulares y esporas conforme se llevaron a cabo los lavados.

7.3 Perfiles Proteicos

Se pudieron identificar bandas que corresponden a las PS como pro-toxinas y en su forma tóxica después de la digestión con la proteasa.

En la siguiente figura se pueden apreciar, tenues, las bandas de las pro-toxinas de las cepas de estudio.

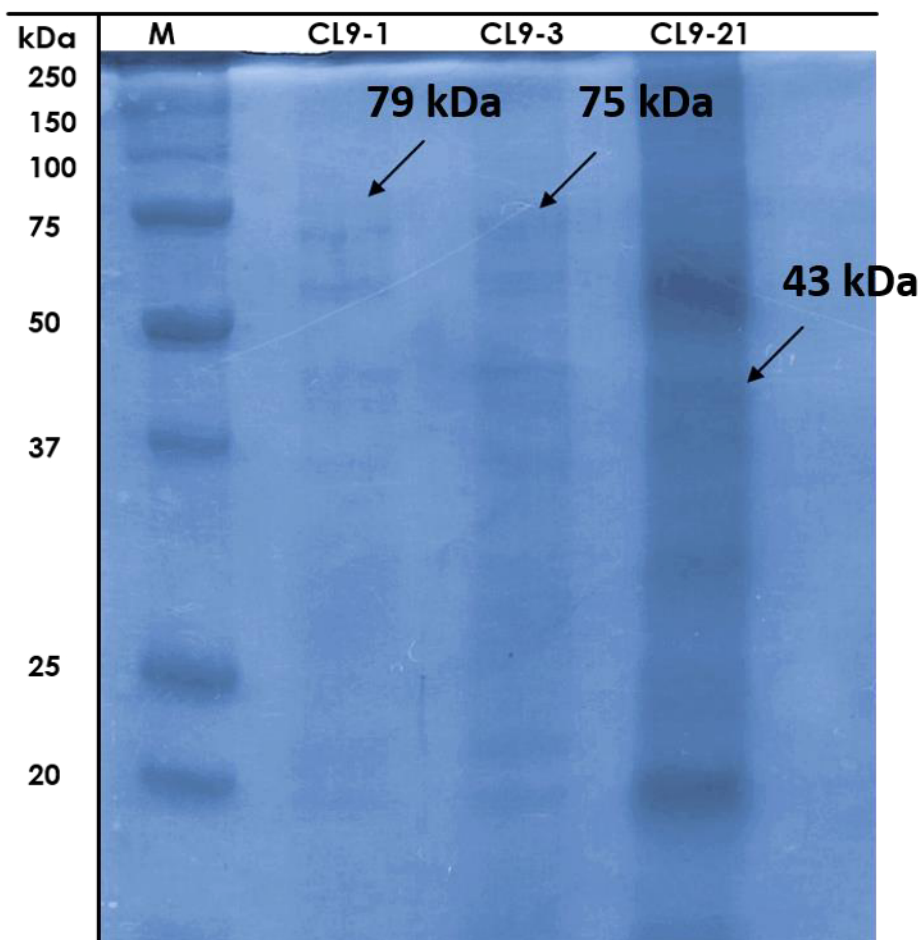


Fig. 13 SDS-PAGE 12%. Perfiles proteicos de las muestras solubilizadas. Las flechas indican la posición de la protoxina. M: Marcador de peso.

Las cepas CL9-1 y CL9-3 mostraron un mejor patrón de bandas y comportamiento en comparación de la cepa CL9-21. La tinción de las proteínas

no se vio muy favorecida debido a la baja concentración de proteína que se tenía.

Para las muestras, una vez tratadas con la proteasa proteinasa K para la activación de los cristales, se realizaron también perfiles proteicos mediante SDS-PAGE para rastrear las bandas de pesos similares a las reportadas para las parasporinas activas (Fig. 14).

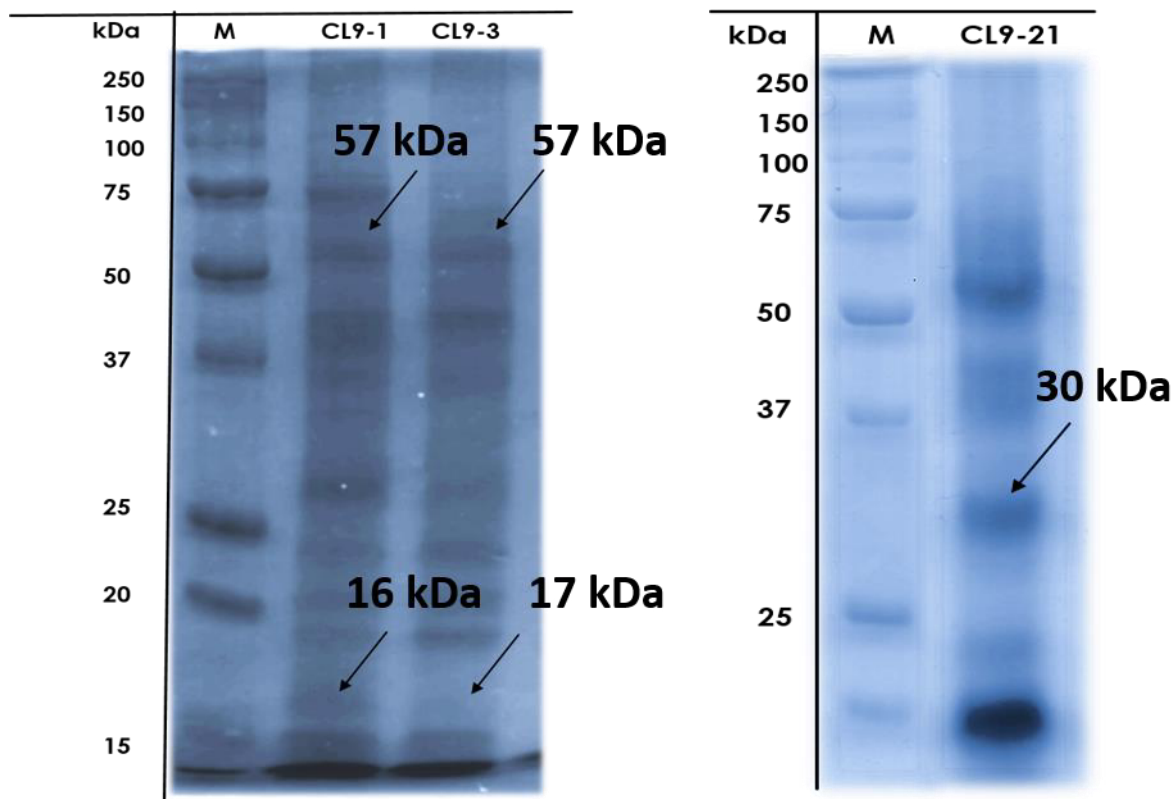


Fig. 14 SDS-PAGE 12% Perfiles proteicos de las muestras después de ser digeridas con proteinasa K. Las flechas indican la posición donde se encuentra la toxina. M: Marcador de peso.

Se trabajó aparte con la cepa de referencia A1470, productora de parasporina PS4, en la que se había reportado una pro-toxina de 30 kDa y una toxina de un peso de 27 kDa. Se sometió al mismo tratamiento que las cepas de estudio antes mencionadas y se buscaron mediante SDS-PAGE las bandas

correspondientes a la parasporina de interés (Fig. 15). Los resultados concuerdan con lo reportado por Espino-Vázquez Astrid en el 2014.

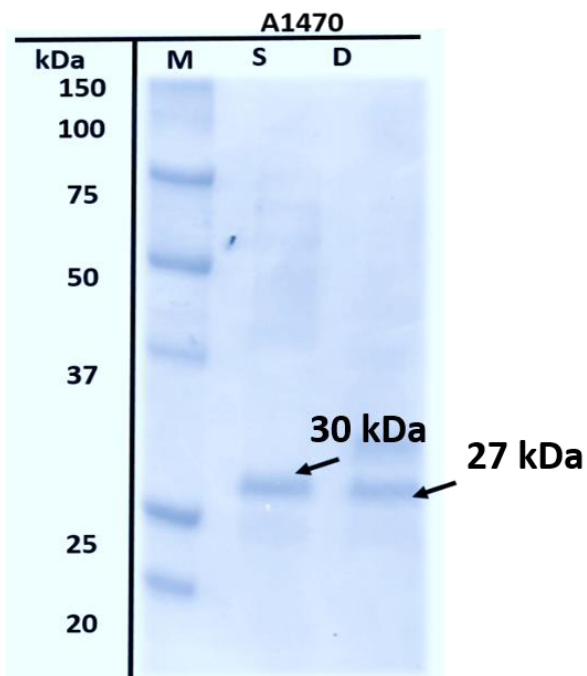


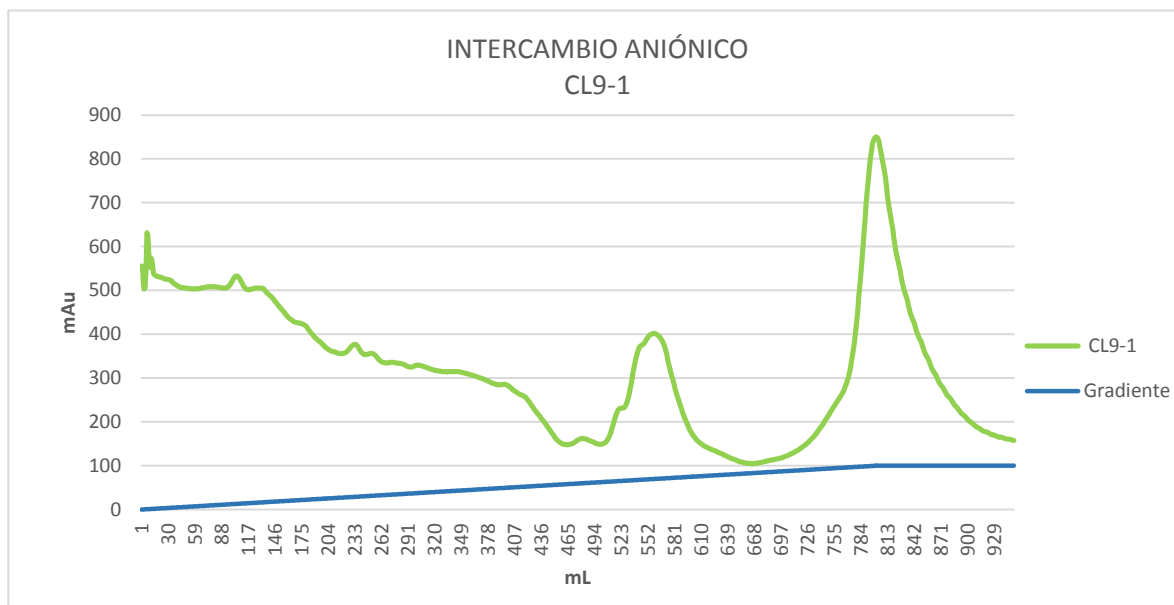
Fig. 15 SDS-PAGE 12% Perfil proteico de la cepa de referencia A1470. Las flechas indican la posición tanto de la pro-toxina como de la toxina. M: Marcador de peso; S: Muestra solubilizada; D: Muestra digerida.

7.4 Purificación De Parasporinas Mediante Cromatografía De Intercambio Aniónico

No se cuenta con un antecedente de empleo de una técnica de purificación para las cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* con las que se trabajaron, por lo que se tuvo que hacer un ajuste en las condiciones del cromatógrafo para purificar las proteínas de interés.

En los siguientes cromatogramas se muestran los picos que pertenecen a las señales obtenidas por medio de absorbancia, las cuales se interpretan como la

presencia de una o varias proteínas. Se realizó un análisis por medio de SDS-PAGE para seleccionar la fracción que contenía la parasporina pura para realizar los bioensayos posteriores.



Gráfica 1. Cromatograma del comportamiento de la muestra CL9-1 durante la purificación.

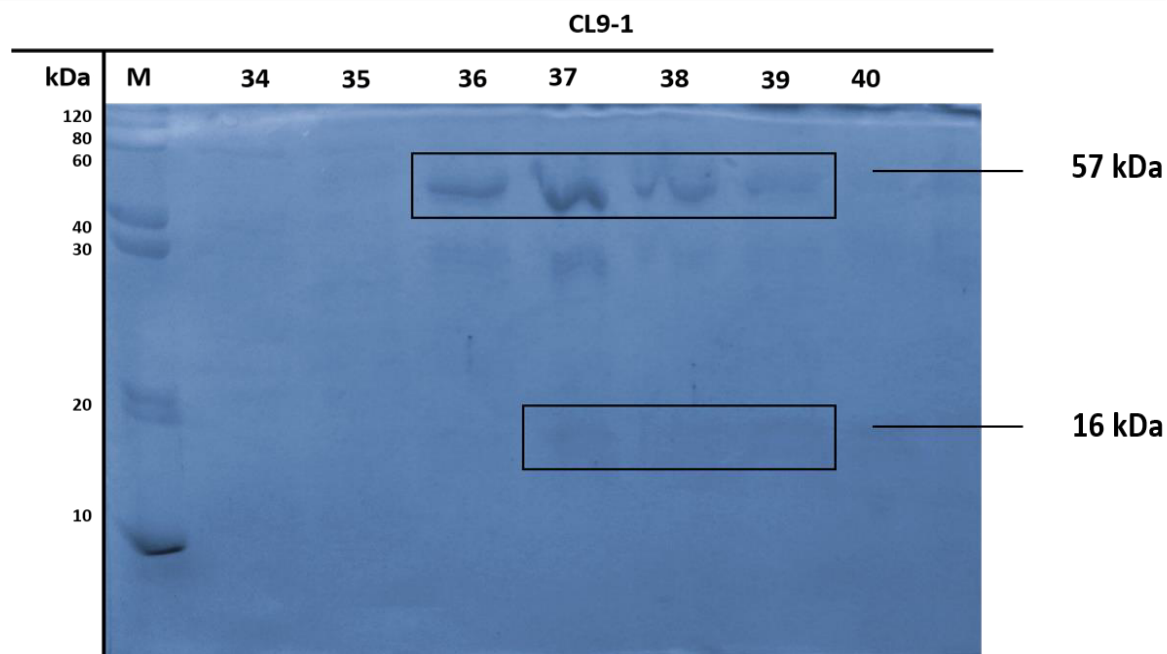
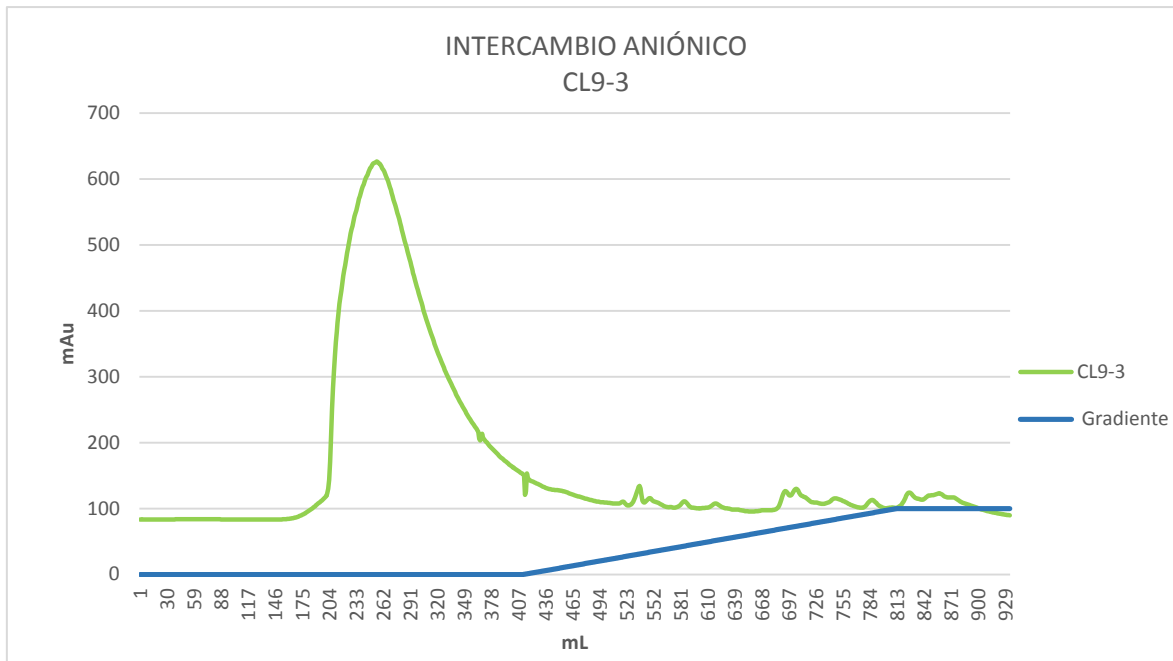


Fig. 16 SDS-PAGE 15% de fracciones recolectadas de la purificación de las parasporinas de la cepa CL9-1. M: Marcador de peso. Los recuadros marcan las bandas de las toxinas presentes en las fracciones numeradas en la parte superior del gel.

Se colectaron un total de 70 fracciones para la cepa CL9-1 resultantes de la purificación. En la figura 16 se muestra un patrón de bandas, encerradas en el recuadro, con un peso similar a la parasporina perteneciente a la familia PS1 que aparecieron en las fracciones 36, 37, 38 y 39, bandas con un peso de 57 kDa que van atenuándose conforme se llevó a cabo la elución. De igual manera, en la parte inferior se muestra un pequeño patrón de bandas que podemos relacionar con la toxina de menor peso molecular, es decir, la toxina de 17 kDa.

Lo que observamos de este gel fue que las dos parasporinas que produce la cepa aparecen en un mismo carril, siendo más tenues las de peso molecular más bajo (17 kDa).



Gráfica 2. Cromatograma del comportamiento de la muestra CL9-3 durante la purificación.

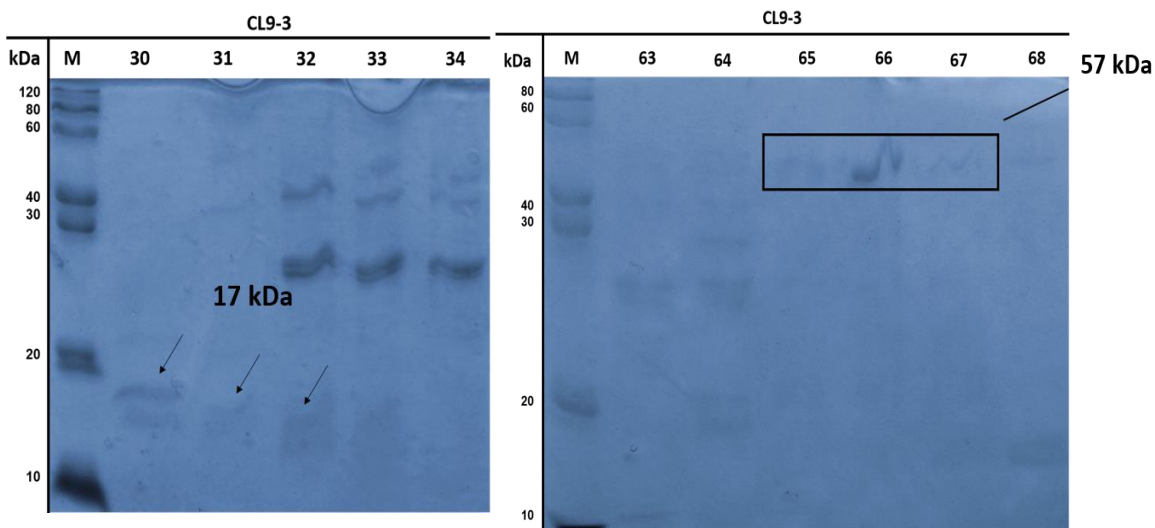


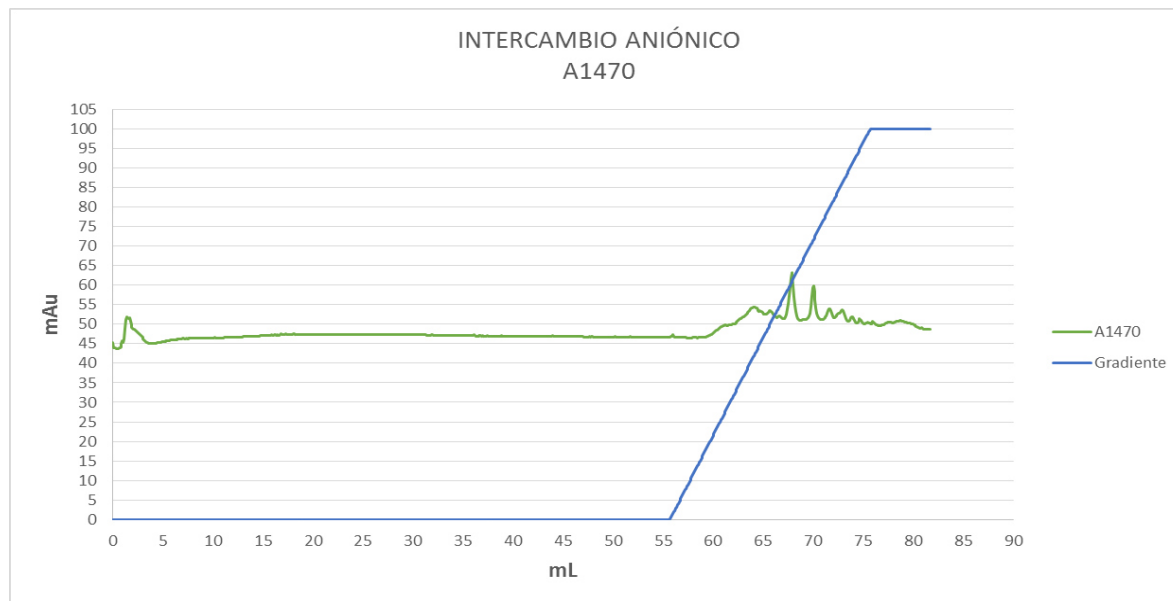
Fig. 17 SDS-PAGE 15% de las fracciones recuperadas de la purificación de las parasporinas de la cepa CL9-3. M: Marcador de peso. Las flechas y el recuadro marcan las bandas de las toxinas presentes en las fracciones numeradas en la parte superior del gel.

El total de fracciones recolectadas fue de 77. Se observaron bandas de interés cercanas al peso de la toxina pequeña (17 kDa) en las fracciones 30,31 y 32 con presencia de algunas bandas accesorias. Para la toxina grande (57 kDa), se observaron bandas en las fracciones 65, 66 y 67 (Fig. 17).

En la figura 17 el recuadro y las flechas señalan la posición de la proteína de interés. En el gel de la izquierda se señala las bandas para la toxina de 17 kDa mientras que en el gel de la derecha, el recuadro indica la posición de las bandas correspondientes a la toxina de 57 kDa.

Las toxinas se almacenaron por separado y se les denominó CL9-3 I para la toxina de 17 kDa y CL9-3 II para la toxina de 57 kDa

En la figura 18 es notoria la cantidad de bandas accesorias en la cepa CL9-21 después de ser purificada. Se observaron ambas con peso de 30 kDa en las fracciones 43, 44 y 45, se juntaron en una sola fracción y se almacenó en congelación hasta su uso-



Gráfica 4. Cromatograma del comportamiento de la muestra A1470 durante la purificación.

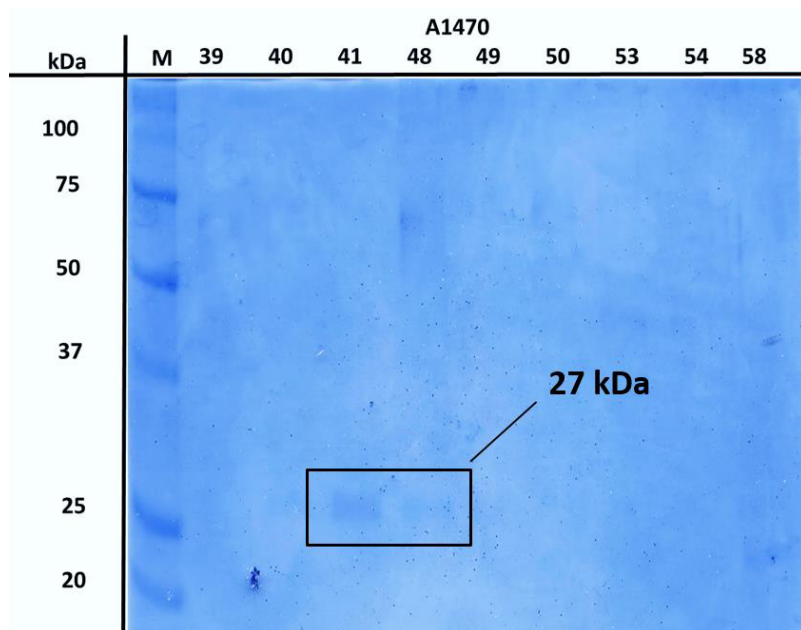


Fig. 19 SDS-PAGE 15% de las fracciones recuperadas de la purificación de las parasporinas de la cepa A1470. El recuadro indica la posición de la proteína de interés relacionada con el peso perteneciente a la parasporina activa de 27 kDa.

En el caso de la muestra de la cepa de referencia se observó un par de bandas aisladas con un peso molecular similar a la parasporina 4 (Fig. 19).

En el revelado de los geles de las muestras CL9-1, CL9-3 y CL9-21 es notable la presencia de bandas accesorias en los carriles donde se encuentra la proteína de interés, esto puede deberse a la concentración de sal del buffer utilizado, al pH o a las condiciones a las cuales se realizó la elución ya que al no contar con antecedentes de purificación es posible que las condiciones empleadas no sean las óptimas. El encontrar las condiciones adecuadas de purificación puede ser considerado para un trabajo posterior.

7.5 Actividad Citotóxica De Las Parasporinas

El acomodo de las muestras con sus controles para el bioensayo con la línea celular MOLT-4 se describe en la siguiente figura:

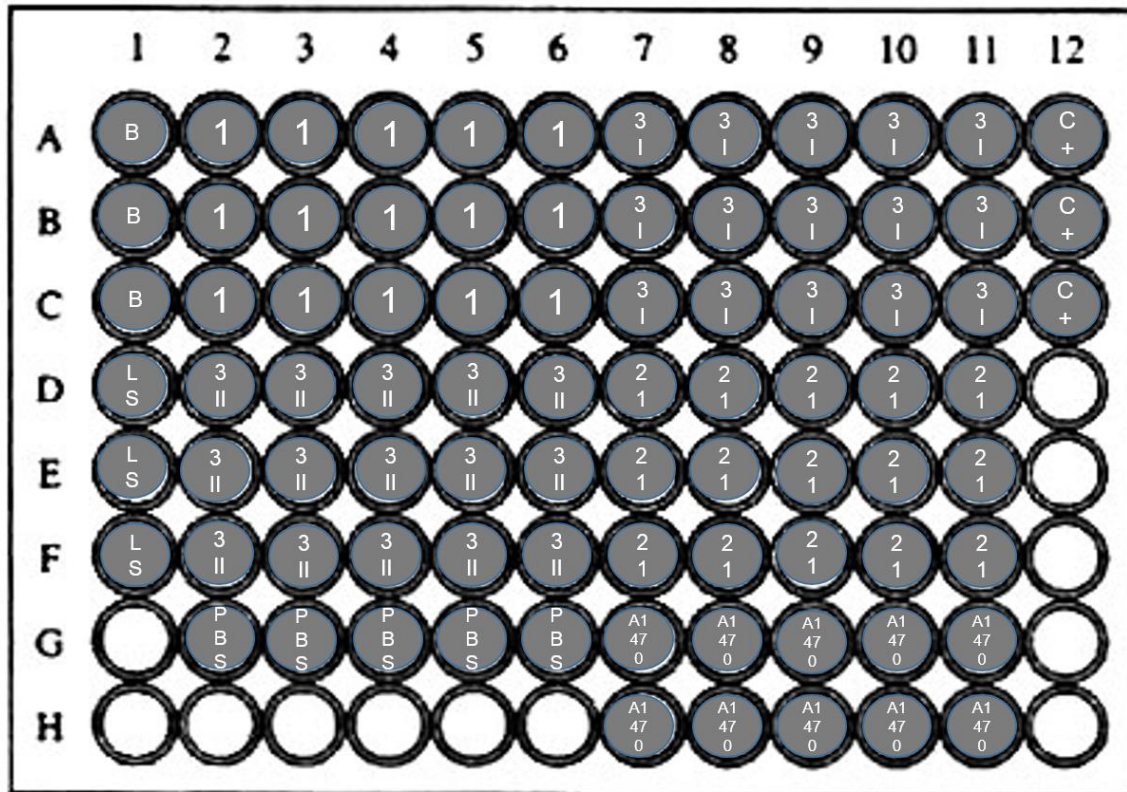
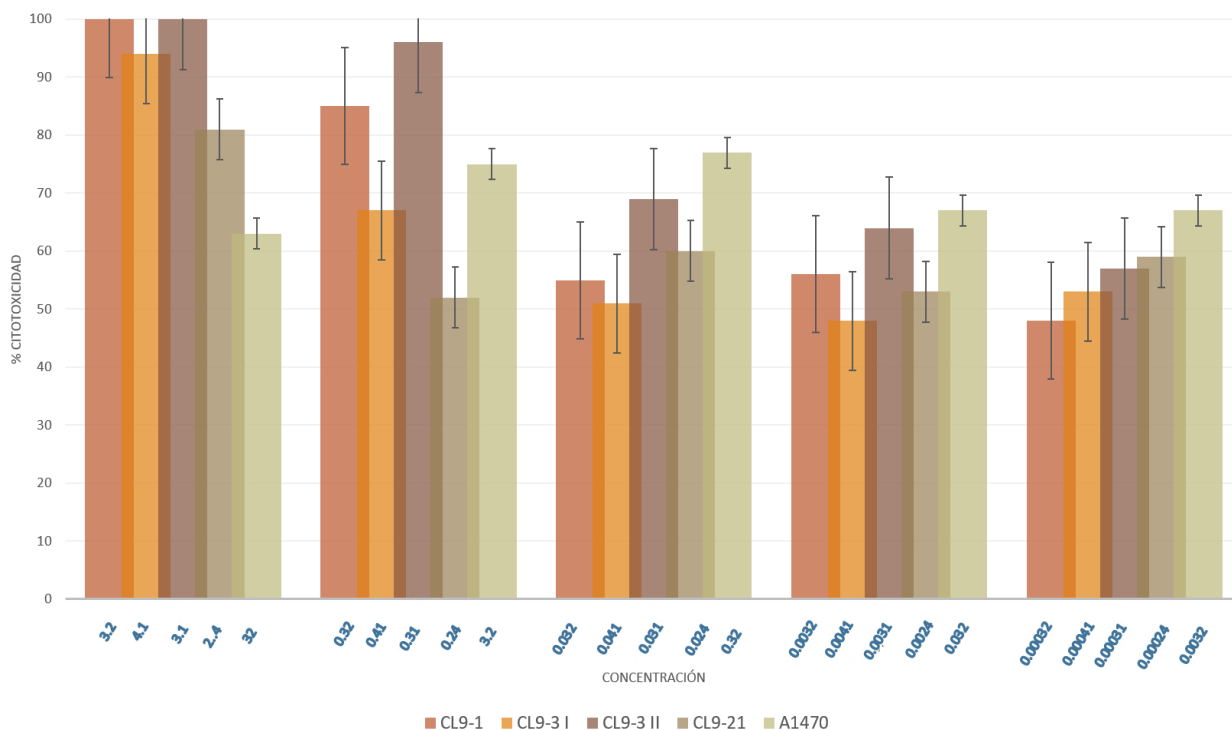


Fig. 20 Posicionamiento de las muestras de parasporinas (PS) de prueba en contacto con células tumorales MOLT-4 y controles en placa de 96 pocillos. Las letras y números significan: B, Blanco; C+, Control positivo, medio de cultivo con células MOLT-4 sin tratamiento; 1, PS CL9-1; 3 I, PS CL9-3 fracción uno; 3 II, PS CL9-3 fracción dos; 2 I, PS CL9-21; PBS, Buffer PBS; A1470, PS A1470; LS, Control de LDH libre total.

Todas las parasporinas mostraron actividad citotóxica contra la línea celular MOLT-4, algunas presentaron mayor toxicidad como el caso de las fracciones

uno y dos de la cepa CL9-3, las cuales contenían la parasporina de 17 kDa de peso y la de 57 kDa.

En la siguiente gráfica se presenta una relación de la concentración de las diluciones de las parasporinas obtenidas con el porcentaje de citotoxicidad.



Gráfica 5. Porcentaje de citotoxicidad de las diferentes parasporinas contra la línea celular MOLT-4.

El cálculo de la IC_{50} se realizó mediante el análisis estadístico ProBit y el programa Prism[®] versión 6.01. Los resultados arrojados se muestran en la siguiente figura:

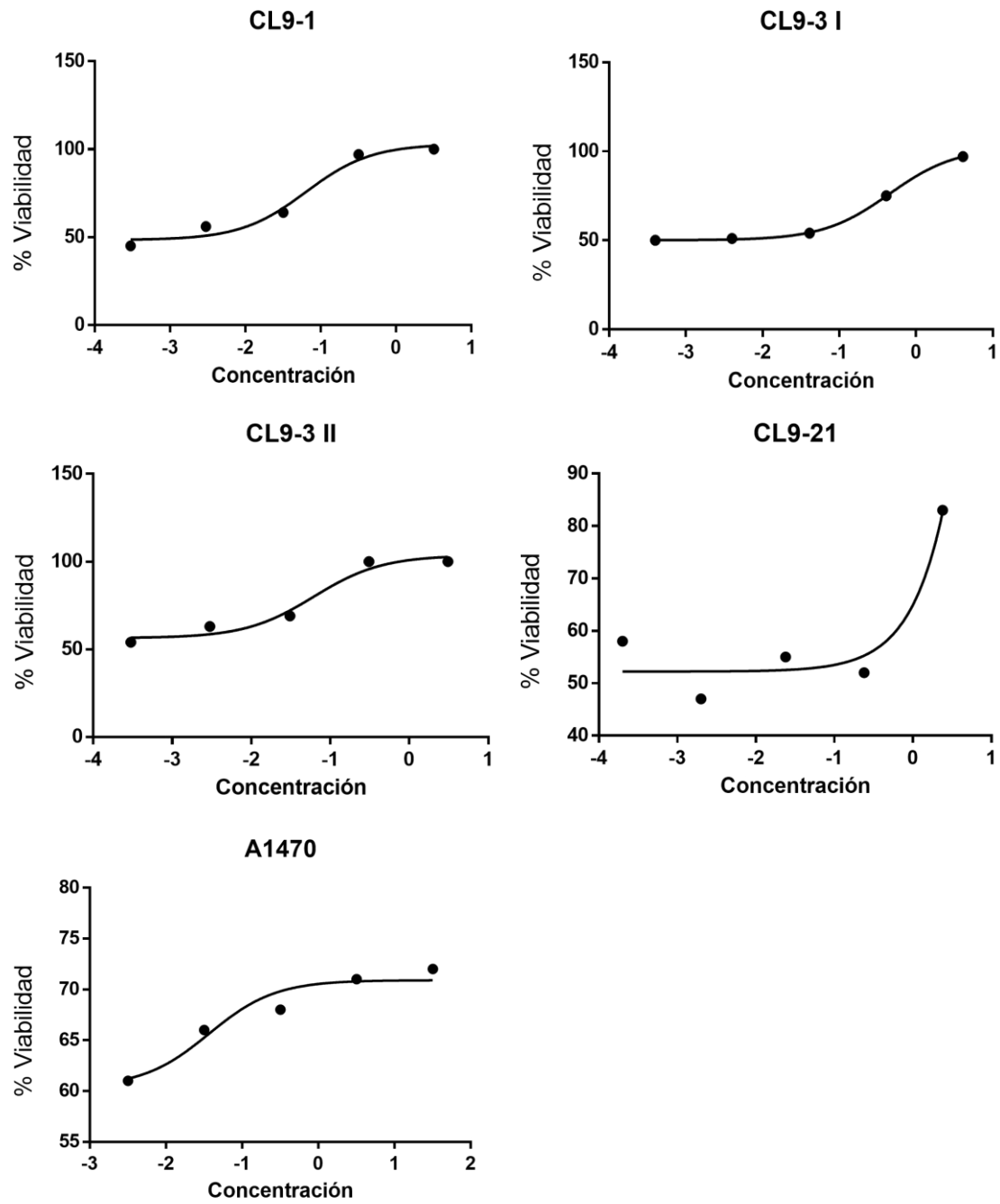


Fig. 21 Efecto de las parasporinas de las cepa CL9-1, CL9-3 I, CL9-3 II, CL9-21 y A1470 contra la línea celular MOLT-4.

Los resultados de IC₅₀ para las parasporinas de las cepas de estudio fueron: CL9-1, 0.063 µg/ml; CL9-3 I, 0.452 µg/ml; CL9-3 II, 0.061 µg/ml; para la cepa CL9-21, 0.098 µg/ml; en el caso de la cepa de referencia A1470, 0.036 µg/ml.

Se realizó un acomodo similar de las muestras para el bioensayo utilizando la línea celular A-431. En la siguiente figura se presenta el acomodo de las muestras para el ensayo.

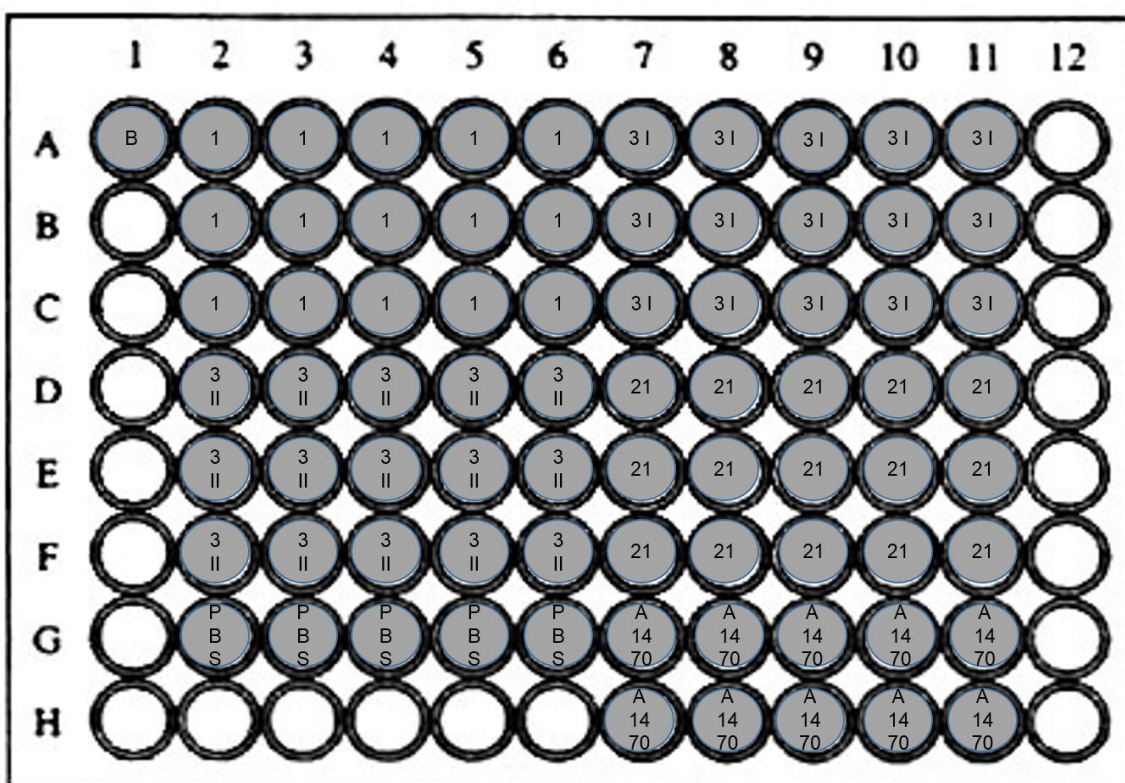


Fig. 22 Posicionamiento de las muestras de parasporinas (PS) en contacto con células tumorales A-431 y control en placa de 96 pocillos. Las letras y números significan: B, Blanco; 1, PS CL9-1; 3 I, PS CL9-3 fracción uno; 3 II, PS CL9-3 fracción dos; 21, PS CL9-21; PBS, Buffer PBS; A1470, PS A1470.

El bioensayo realizado para la PS de la cepa A1470 se realizó por duplicado por la poca muestra con la que se contaba.

Los resultados obtenidos del bioensayo empleando las parasporinas de las cepas de estudio se muestran en la siguiente figura:

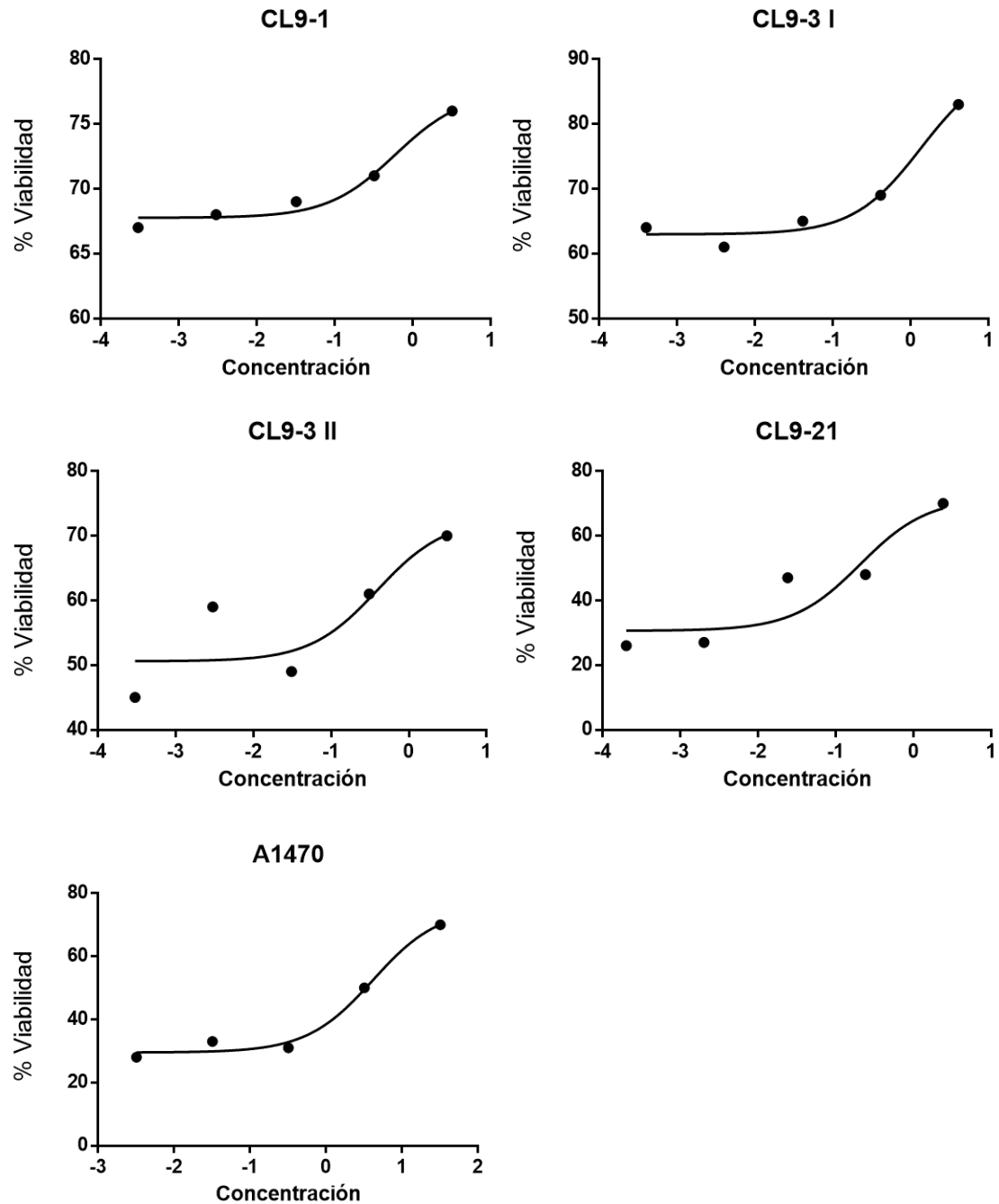


Fig. 23 Efecto de las parasporinas de las cepa CL9-1, CL9-3 I, CL9-3 II, CL9-21 y A1470 contra la línea celular A-431.

Los valores de IC_{50} para las parasporinas de las cepas de estudio fueron: CL9-1, 0.593 $\mu\text{g/ml}$; CL9-3 I, 1.350 $\mu\text{g/ml}$; CL9-3 II, 0.394 $\mu\text{g/ml}$; para el caso de la cepa CL9-21, 0.205 $\mu\text{g/ml}$; para la cepa de referencia A1470, 4.126 $\mu\text{g/ml}$.

. Todas las parasporinas utilizadas para este bioensayo mostraron actividad citotóxica contra la línea celular A-431. Sin embargo, la PS2 producida por la cepa CL9-21 tiene más actividad sobre las células de esta línea que las otras PS de prueba.

8. DISCUSIÓN

8.1 Obtención de parasporinas a partir de las cepas de estudio

Durante el proceso de cultivo se observó una mayor producción de biomasa inoculando en caldo LB que en cajas Petri, en adición, fue más fácil separar la biomasa del cultivo líquido que el cultivo sólido.

Además, el uso de agitación favoreció aún más el crecimiento celular, lo cual se traduce en obtención de más cristales parasporales.

8.2 Obtención y activación de las parasporinas

La técnica bifásica [37] ha sido utilizada para eliminar esporas y restos celulares en diversas parasporinas, para que de este modo sea más fácil la purificación de las mismas, en nuestro caso no tuvo un efecto positivo y solo retrasó las etapas de la fase experimental ya que se tuvo que re-plantear una metodología de separación utilizando otra técnica, lo que también nos condujo a un reacomodo en la calendarización que se había programado.

El propósito de aplicar una técnica de pre-purificación de las inclusiones parasporales mediante la técnica de extracción con hexano [13] para disminuir las proteínas adicionales y separar las esporas del complejo espора-cristal cumplió con su objetivo. Durante los ciclos a los que fue sometida la biomasa se realizó un monitoreo por microscopía óptica y se observó que, conforme fueron llevados a cabo los tratamientos, las esporas y restos celulares presentes en la muestra fueron disminuyendo.

En cuanto a la solubilización de las inclusiones parasporales, una de las modificaciones hechas al trabajo realizado por Espino-Vázquez Astrid [8] fue

aplicar agitación. Esto permitió que se pudiesen apreciar mejor las bandas en los geles de poliacrilamida al solubilizar mejor las proteínas y sirvió de pauta para realizar las digestiones con proteasa.

La proteólisis se realizó utilizando proteinasa K y los perfiles proteicos de las fracciones tóxicas fueron similares a los reportados en un estudio previo [8]. La concentración de enzima coincide con la reportada en otros estudios [14, 15, 17] siendo 10 $\mu\text{g/ml}$.

8.3 Cromatografía de intercambio aniónico

Los picos mostrados en los cromatogramas nos indican la presencia de una o más proteínas o una mezcla. En algunos casos se observaron más de un pico en un área y esto se pudo comprobar al momento de visualizar los geles de poliacrilamida. Había presencia de más de una banda en un solo carril y estas bandas continuaban presentes en más de una fracción.

El resultado de estas bandas accesorias posiblemente sea por el corte inespecífico que realiza la enzima de trabajo. La presencia de estas proteínas puede o no estar ligado con la actividad que tenga la toxina ya que no han sido caracterizadas. Por ello, el utilizar más de una técnica de purificación es una perspectiva que se tiene debido a la complejidad del proyecto, de este modo se podría aislar la fracción de interés y también las demás proteínas para así poder caracterizarlas y saber su posible función.

8.4 Bioensayos

Todas las parasporinas obtenidas de las cepas de estudio y de la cepa de referencia mostraron actividad citotóxica contra las dos líneas celulares *in vitro*.

La actividad citotóxica de las parasporinas de las cepas de estudio CL9-1, CL9-3 y CL9-21 ya antes había sido probada contra líneas celulares de cáncer humano y murino: A375 (melanoma maligno), 1c1c7 (hepatoma murino), BpRc1 (hepatoma murino). Así mismo, ya se contaba con un antecedente de la actividad citotóxica contra células normales de la piel: Jurkat (linfoblastos), Hs27 (fibroblastos) en las cuales se reportó una acción citotóxica nula. [8]

Cabe señalar que los cristales activos empleados para los ensayos de citotoxicidad reportados anteriormente por Espino-Vázquez [8] provenían de un digerido de la biomasa “cruda”, es decir, no se había llevado a cabo alguna técnica de pre-purificación o purificación previa al ensayo de citotoxicidad.

El espectro de citotoxicidad varió de una cepa a otra debido a la heterogeneidad de las mismas parasporinas. Cabe resaltar que el objetivo de este estudio fue evaluar la actividad citotóxica de cada una de las parasporinas. Se necesitaría realizar más técnicas de purificación y de caracterización sobre estas proteínas para conocer con más profundidad su actividad biológica y posteriormente realizar estudios farmacéuticos más homogéneos.

9. CONCLUSIONES

Se obtuvo más crecimiento de las cepas de interés cultivándolas en caldo LB con agitación.

Todas las parasporinas fueron activadas con proteinasa K a una concentración de 10 ppm con un tiempo de exposición de 50 minutos.

En los perfiles proteicos realizados de las muestras, antes y después de ser hidrolizadas, se aprecian bandas con pesos correspondientes a las pro-toxinas, así como también a las toxinas o parasporinas reportadas con anterioridad, de las cepas CL9-1 y CL9-3 para la familia de parasporina PS1, para la cepa CL9-21 la familia PS4 y para la cepa de referencia A1470 la parasporina PS2.

Los resultados de las IC_{50} de las parasporinas de estudio demostraron que éstas tienen actividad citotóxica contra las dos líneas celulares de prueba A-431 y MOLT-4. Los valores para cada cepa fueron, para la línea celular MOLT-4: CL9-1, 0.063 $\mu\text{g/ml}$; CL9-3 I, 0.452 $\mu\text{g/ml}$; CL9-3 II, 0.061 $\mu\text{g/ml}$; para el caso de la cepa CL9-21 no se obtuvo un resultado representativo ni aproximado; en el caso de la cepa de referencia A1470, 0.036 $\mu\text{g/ml}$. El resultado de cada cepa contra la línea celular A-431 fue: CL9-1, 0.593 $\mu\text{g/ml}$; CL9-3 I, 1.350 $\mu\text{g/ml}$; CL9-3 II, 0.394 $\mu\text{g/ml}$; para el caso de la cepa CL9-21, 0.205 $\mu\text{g/ml}$; en el caso de la cepa de referencia A1470 no se obtuvo una inhibición del 50% con la concentración más alta.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

1. Soberón Mario y Bravo Alejandra (2007), “Las toxinas Cry de *Bacillus thuringiensis*: modo de acción y consecuencias de su aplicación”; Biotecnología V14 CS3.indd 303.
2. Ohba Michio, et. al. (2009) “Parasporin, a New Anticancer Protein Group from *Bacillus thuringiensis*”; Anticancer Research 29: 427-434.
3. Ruiz de Escudero, I. Ibáñez, et. al. (2004) “Aislamiento y caracterización de nuevas cepas de *Bacillus thuringiensis* procedentes de muestras de tierra de Canarias”; Patología, Bol. San. Veg. Plagas, 30: p.p. 703-712.
4. Sarjeet S. Gill, Elizabeth A., et. al. (1992) “The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins”; Annu. Rev. Enlamal. 37; 615-36.
5. Carreras Bertha, Rodríguez Sandra, et. al. (2008) “La morfología de los cuerpos paraesporales y su relación con la actividad biológica en cepas cubanas de *Bacillus thuringiensis*”; Revista CENIC Ciencias Biológicas, Vol. 39, No. 2.
6. Arévalo-Niño Katiushka, Pereyra-Alfárez Benito, et. al. (1996), “Avances recientes en la biotecnología en *Bacillus thuringiensis*”, Primera edición, impreso en México.
7. Saraswathy Nachimuthu, Ananda Kumar Polumetla, (2004) “Protein engineering of δ -endotoxins of *Bacillus thuringiensis*” Electronic Journal of Biotechnology, Vol. 7 No. 2.
8. Espino-Vázquez Astrid Nalleli, (2014). “Caracterización biológica de parasporinas en cepas nativas de *Bacillus thuringiensis*” (Tesis doctoral). Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Biológicas.
9. Espino-Vázquez A., Gómez-Treviño A., et. al. (2012), “Isolation of *Bacillus thuringiensis* strains with cytotoxic activity against MOLT-4, a leukemia cell line”, Microbes In Applied Research: p.p. 147-151.

10. Okumura, S., Ohba, M., Mizuki, E., Crickmore, N., Côté, J.-C., Nagamatsu, Y., Kitada, S., Sakai, H., Harata, K. and Shin, T. "Parasporin nomenclature" (2010) <<http://parasporin.fitc.pref.fukuoka.jp/>> Committee of Parasporin Classification and Nomenclature [En línea]. Sitio web mantenido por Shiro Okumura. [Fecha de consulta: 06 de Octubre de 2016].
11. Palma Leopoldo, Muñoz Delia, et. al. (2014) "*Bacillus thuringiensis* Toxins: An Overview of Their Biocidal Activity", *Toxins* 2014, 6, p.p.3296-3325.
12. Bradford M. M. (1976) "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding", *Analytical biochemistry* 72, p.p. 248-254.
13. Jihane Rahbani Mounsef, Dominique Salameh, et. al. (2014) "A simple method for the separation of *Bacillus thuringiensis* spores and crystals" *Journal of Microbiological Methods* 107, p.p. 147–149.
14. Eiichi Mizuki, Yu Shin Park, et. al. (2000) "Parasporin, a human leukemic cell-recognizing parasporal protein of *Bacillus thuringiensis*" *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, p.p. 625-634.
15. Sakae Kitada, Yuichi Abe, et. al. (2006) "Cytocidal actions of parasporin-2, an anti-tumor crystal toxin from *Bacillus thuringiensis*" *The journal of biological chemistry* vol. 281, No. 36 p.p. 26350–26360.
16. T.P. Hung, L.V. Troung, et. al. (2016) "Persistence of detectable insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis* (Cry) and toxicity after adsorption on contrasting soils" *Environmental Pollution* 208, p.p. 318-325.
17. H.-S. Kim, S. Yamashita, et. al. (2000) "In vitro cytotoxicity of non-Cyt inclusion proteins of a *Bacillus thuringiensis* isolate against human cells, including cancer cells" *Journal of Applied Microbiology* 2000, 89, p.p. 16-23.
18. Benjamin R. Deist, Michael A. Rausch, et. al. (2014) "Bt toxin modification for enhanced efficacy" *Toxins*, 6, p.p. 3005-3027.

19. VD Nadarajah, D Ting, et. al. (2008) "Selective cytotoxic activity against leukemic cell lines from mosquitoicidal *Bacillus thuringiensis* parasporal inclusions" Southeast Asian j trop med public health, Vol. 39 No. 2.
20. Akio Ito, Yasuyuki Sasaguri, et. al. (2004) "A *Bacillus thuringiensis* crystal protein with selective cytotoxic action to human cells" The journal of biological chemistry Vol. 279, No. 20, p.p. 21282-21286.
21. Toshihiko Akiba, Ryuta Kanai, et. al. (2006) "Nontoxic crystal protein from *Bacillus thuringiensis* demonstrates a remarkable structural similarity to β -pore-forming toxins" Proteins: Structure, function, and bioinformatics 63: p.p. 243–248.
22. Hervé Agaisse, Didier Lereclus (1995) "How does *Bacillus thuringiensis* produce so much insecticidal crystal protein?" Journal of bacteriology, p.p. 6027-6032.
23. Jihen Elleuch, Samir Jaoua, et. al. (2015) "Cry4Ba and Cyt1Aa proteins from *Bacillus thuringiensis israelensis*: Interaction and toxicity mechanism against *Aedes aegypti*" Toxicon 104, p.p. 83-90
24. A. Bravo, I. Gómez, et. al. (2004) "Oligomerization triggers binding of a *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab pore-forming toxin to aminopeptidase N receptor leading to insertion into membrane microdomains" Biochimica et Biophysica Acta 1667, p.p. 38-46.
25. E. Mizuki, M. Ohba, et. al. (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, p.p. 477-486.
26. Hideki Katayama, Haruo Yokota, et. al. (2005) "Parasporin-1, a novel cytotoxic protein to human cells from non-insecticidal parasporal inclusions of *Bacillus thuringiensis*" The Japanese Biochemical Society, Vol. 137, No. 1, p.p. 17-25.

27. Velloorvalappil N.-Jisha, Robinson B.-Smitha, Sailas Benjamin (2013) "An overview on the crystal toxins from *Bacillus thuringiensis*" *Advances in Microbiology*, 3, p.p. 462-472.
28. Guillermo Repetto, Ana del Peso, Jorge L. Zurita, (2008) "Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity" *Nature protocols*, Vol. 3, No. 7, p.p. 1125-1131
29. Cruz-Nolasco Alain (2014) "Aislamiento e identificación de cepas de *Bacillus thuringiensis* productoras de proteína Cry" (Tesis de licenciatura) Universidad del Papaloapan, campus Tuxtepec, San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca.
30. Satoko Yamashita, Hideki Katayama, *et. al.* (2005) "Typical three-domain Cry proteins of *Bacillus thuringiensis* strain A1462 exhibit cytotoxic activity on limited human cancer cells" *The Japanese Biochemical Society*, Vol. 138, No. 6, p.p. 663-672.
31. Shiro Okumura, Hiroyuki Saitoh, *et. al.* (2005) "Identification of a novel cytotoxic protein, Cry45Aa, from *Bacillus thuringiensis* A1470 and its selective cytotoxic activity against various mammalian cell lines" *J. Agric. Food Chem.*, Vol. 53, No. 16, p.p. 6313-6318.
32. Y.-C- Jung, E. Mizuki, *et. al.* (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*, p.p. 65-79.
33. Shin Yee Rebecca Wong (2010) "*Bacillus thuringiensis* parasporal proteins and their effect on human cancer cells: an overview" (Review article) *leJSME* 2010: 4(2): 3-9.
34. Guilherme Guerra Alves (2013) "Mapeamento dos epitopos da toxina épsilon de *clostridium perfringens* tipo de produção de imunógenos de peptídeos sintéticos" (Tesis maestría), Universidad Federal de Minas Gerais, Escuela de Veterinaria.
35. Anon, (2016). [online] Available at: <https://worldwide.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-bulletins/0/cytotox-96->

nonradioactive-cytotoxicity-assay-protocol.pdf [Fecha de acceso 14 Oct. 2016].

36. Rogério Schünemann, Neiva Knaak, Fluzza Lidia Mariana, (2014) “Mode of action and specificity of *Bacillus thuringiensis* toxins in the control of caterpillars and stink bugs in soybean culture” (Review) ISRN Microbiology, 2014, p.p. 1-12
37. N. S. Goodman, R. J. Gottfried, M. H. Rogoff, (1967) “Biphasic system for separation of spores and crystals of *Bacillus thuringiensis*” Journal Of Bacteriology, p. 485