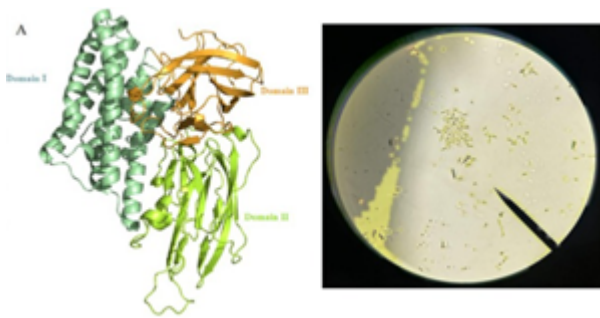


“Producción de cristales parasporales de *Bacillus thuringiensis* con potencial actividad anticancerígena”

“Production of parasporal crystals of *Bacillus thuringiensis* with potential anticancer activity”

Graphical Abstract (GA)

GA Figura:



GA Texto: Las parasporinas son proteínas producidas por *B. thuringiensis* a través de la formación de cristales parasporales. Están clasificadas en 6 familias PS1 a PS6, y presentan actividad sobre células cancerosas y no sobre las normales, por lo que pueden ser una alternativa para el tratamiento temprano de diferentes tipos de cáncer.

“Producción de cristales parasporales de *Bacillus thuringiensis* con potencial actividad anticancerígena”

“Production of parasporal crystals of *Bacillus thuringiensis* with potential anticancer activity”

ANGIE VIVIAN LÓPEZ QUIROZ

** Programa de Bioquímica. Facultad de Ciencias. Universidad Antonio Nariño.*

Dirigido por: Laura Inés Cuervo Soto

Resumen

Las especies del género *Bacillus* son bacterias Gram positivas y presentan gran capacidad de formar endosporas. *B. thuringiensis* es una de las especies más estudiadas por su potencial para producir proteínas cry con actividad citotóxica frente a insectos. Otro grupo de proteínas, parasporinas que se forman como inclusión parasporal, muestran actividad frente a células de cáncer, más no, sobre células normales. Se han identificado 19 parasporinas agrupadas en 6 familias (PS1, PS2, PS3, PS4, PS5 y PS6), con tamaños de 30 a 88 kDa, cuya actividad ha sido demostrada sobre diferentes líneas de cáncer en humanos. El cáncer de cérvix es un tipo de cáncer silencioso relacionado al virus del papiloma humano (VPH), para el cual los tratamientos existentes no logran ser del todo efectivos. Por ello, el propósito de este estudio fue obtener cristales parasporales de extractos celulares de cepas de *B. thuringiensis*, los cuales mostraron valores de proteínas de 8 a 115 µg/mL, concentración que puede ser considerada óptima para ensayos de citotoxicidad. Además se identificaron bandas de proteínas relacionadas a parasporinas mediante electroforesis SDS-PAGE, con tamaños aproximados de 30, 33, 37, 70 y 88 kDa que se pueden corresponder a parasporinas de todas las familias. Estos resultados indican que estas proteínas pueden ser probadas especialmente en células de cáncer de cérvix como alternativa para un tratamiento temprano y eficaz.

Abstract

The species of the genus *Bacillus* are Gram positive bacteria and have a great capacity to form endospores. *B. thuringiensis* is one of the most studied species for its potential to produce cry proteins with cytotoxic activity against insects. Another group of proteins, parasporins that are formed as parasporal inclusion, show activity against cancer cells, but not against normal cells. 19 parasporins have been identified grouped into 6 families (PS1, PS2, PS3, PS4, PS5 and PS6), with sizes

“Producción de cristales parasporales de *Bacillus thuringiensis* con potencial actividad anticancerígena”

“Production of parasporal crystals of *Bacillus thuringiensis* with potential anticancer activity”

from 30 to 88 kDa, whose activity has been demonstrated on different lines of cancer in humans. Cervical cancer is a type of silent cancer related to the human papillomavirus (HPV), for which existing treatments are not entirely effective. Therefore, the purpose of this study was to obtain parasporal crystals from cell extracts of *B. thuringiensis* strains, which showed protein values of 8 to 115 µg / mL, a concentration that can be considered optimal for cytotoxicity tests. In addition, bands of proteins related to parasporins were identified by SDS-PAGE electrophoresis, with approximate sizes of 30, 33, 37, 70 and 88 kDa that can correspond to parasporins of all families. These results indicate that these proteins can be tested especially in cervical cancer cells as an alternative for an early and effective treatment

Keywords: Parasporin, *B. thuringiensis*, human papillomavirus, cancer, PCR

Introducción

Las especies del género *Bacillus* son bacterias Gram positivas en forma de bastón, aerobias estrictas o facultativas, presentan movilidad por flagelos peritricos, catalasa positivos y presentan gran capacidad de formar endosporas (Thomson et al., 1999). Entre las especies más importantes y más estudiadas se encuentra *B. thuringiensis* (B.t), con un ciclo de vida de dos fases, en la fase de crecimiento las bacterias se duplican y en la de esporulación la bacteria forma la espora y además puede producir cristales que se componen de proteínas tóxicas con efecto sobre diferente tipo de células (Avignone and Mignone, 1995) Estas proteínas están clasificadas en cuatro familias proteicas: 1. Toxinas Cry de tres dominios presentando la mayor cantidad de toxinas producidas por *B. thuringiensis* (Adang et al., 2014). 2. La familia ETX/MTX, toxinas mosquitocidas, 3. Toxinas bin (binarias), estas son proteínas Cry que tienen toxicidad cuando se encuentran con otras proteínas Cry. 4. Toxinas Cyt con actividad hemolítica (Soberón et al., 2013). Las toxinas de B.t. comparten muchas características estructurales y funcionales con las proteínas formadoras de poro (pore-forming-toxin: α -PFT y β -PFT) (Akiba and Okumura. 2017). Los cristales a base de proteínas Cry presentan diferentes formas y tamaños, como circulares, bipiramidales, cuboidales, amorfos, entre otras (Figura 1), siendo estas mortales para algunos insectos del orden Lepidoptera, Diptera y Coleoptera plagas para algunos cultivos (Federici et al., 2010).

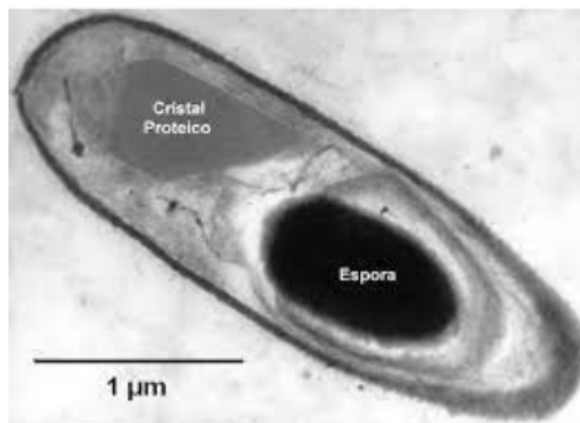


Figura 1. Micrografía de *Bacillus thuringiensis* (Tomado de Cruz Nolasco, A., 2014).

Los modelos de formación de poros y la transducción de señales son los dos mecanismos de acción ampliamente estudiados para las proteínas Cry y tienen en común, la solubilización del cristal, la activación por proteasas y la unión al primer receptor (Bravo et al., 2007). El modelo de formación de poros es el más aceptado y se refiere a la unión de la proteína Cry con el primer receptor que usualmente es cadherina que se conecta con los receptores de N-aminopeptidasas en las células del intestino medio lo que genera un cambio estructural de la proteína, facilitando su oligomerización y la formación de pre-poros que luego se unen a receptores secundarios transmembrana para finalmente formar el poro que afectan la integridad de la membrana y de su función. (Zhang et al., 2006) (Figura 2).

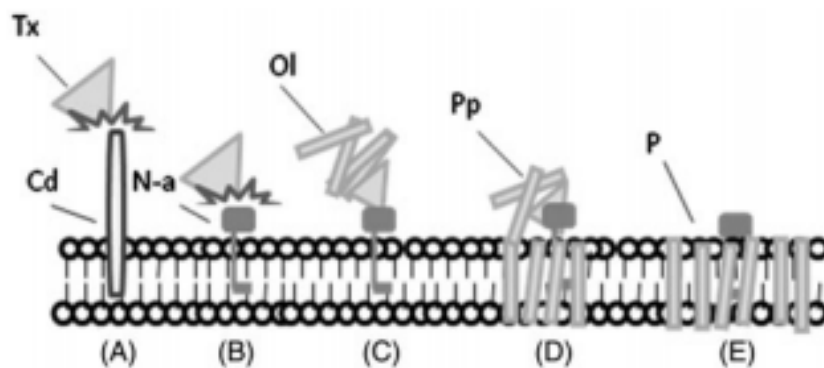


Figura 2. Mecanismo de acción de la toxina Cry en el modelo de formación de poros. Toxina Cry (TX), Cadherina (Cd), N-aminopeptidasas (N-a), oligomerización de la proteína (OI), pre-poros (Pp), poro (P).

(Tomado de André Luiz et al., 2014).

Por otro lado, el modelo de transducción de señales, se refiere a la interacción de la toxina Cry con el primer receptor donde se activa la proteína G, produciendo una cascada de señales; a diferencia del primer modelo, este modelo no abarca la interacción de la toxina Cry con los receptores secundarios (Gómez et al., 2007). Primero se da la unión de la toxina Cry a los receptores de cadherina en la

membrana plasmática, seguidamente se estimula la apoptosis con la activación de canales de iones y finalmente con el movimiento de iones de magnesio se procede a la muerte celular (Figura 3).

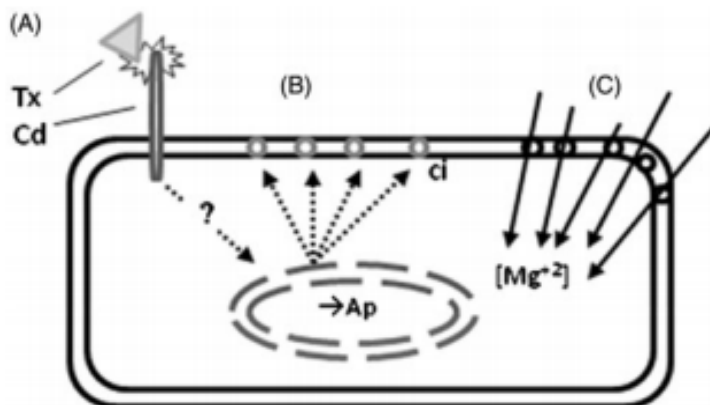


Figura 3. Mecanismo de acción de la toxina Cry en el modelo de transducción de señales. (A) Unión de toxina Cry a receptores de cadherina, (B) Estimulación de apoptosis con activación de canales de iones, © Movimiento de iones de Magnesio, Toxina Cry (TX), Cadherina (Cd), Apoptosis (Ap), Canales de iones (ci), (Tomado de André Luiz et al., 2014).

Las parasporinas son una clase nueva de proteínas citotóxicas que se forman como una inclusión parasporal de *B. thuringiensis* que presentan actividad biológica en células de cáncer y no presentan actividad insecticida (Akiba and Okumura. 2017). En el cristal parasporal se encuentran como protoxinas y son tóxicas cuando se solubilizan a un pH alcalino y después son digeridas por serín - proteasas, como la tripsina o la proteinasa K. Estas proteínas son potenciales en el tratamiento de cáncer por su baja o nula citotoxicidad hacia células normales y su alta citotoxicidad frente a líneas celulares del cáncer (Mizuki et al., 2000). Actualmente existen 19 parasporinas clasificadas según su taxonomía en 6 familias (PS1, PS2, PS3, PS4, PS5 y PS6) (Mendoza et al. 2020) (Tabla 1), nombradas conforme al Comité de clasificación y nomenclatura de parasporinas y definidas con el número de acceso en el GenBank del NCBI (National Center for Biotechnology Information) (Okumura et al., 2010).

La parasporina-1 (Cry31Aa1) fue la primera en ser identificada, es producida como una proteína de inclusión parasporal, como protoxina con un tamaño de 81 kDa por la cepa A1190 y en su secuencia aminoacídica presenta los 5 bloques conservados que la hacen parte de la familia de proteínas cry de tres dominios, activada por digestión del extremo N-terminal (Kuroda et al., 2012). En su forma activa es un heterodímero de 15 y 56 kDa cuando es proteolizada y tiene especificidad para líneas celulares HeLa, HL60 y MOLT-4 y no presenta actividad tóxica hacia células T de tejidos normales (Katayama, et al., 2011).

La parasporina-2, es parecida a la toxina aerolisina, reconocida como β -formadora de poros (TFP), como las cry46 y cry15Aa. Las cepas *B. thuringiensis* A1547 producen PS2Aa1 (cry46Aa1), no presenta estructura de los tres dominios de cry y es un polipéptido de 338 residuos de aminoácidos y la cepa A1470 (PS2Aa2) producen dos de las principales parasporinas-2, las cuales se diferencian en cuatro residuos de aminoácidos. Como protoxina tiene un tamaño de 37 kDa y cuando son atacadas por proteasas, se produce una fracción tóxica de 30 kDa (Kitada et al., 2009). Tiene citotoxicidad contra líneas celulares de Jurkat, HL60, MOLT-4, TCS (cáncer de cuello uterino) y poca actividad citotóxica para hepatocitos normales y HeLa. (Akiba et al., 2009).

La parasporina-3, es un tipo de toxina cry de los tres dominios por ejemplo cry41, PS3Aa1 tiene un tamaño de 88 kDa y es parecida a la hemaglutinina HA-33, es activada por digestión de los extremos C-terminal y N-terminal, se caracteriza por aumentar la permeabilidad de la membrana plasmática y es formadora de complejos que inducen respuesta inmunitaria en las células, tiene citotoxicidad para HL60 y HepG2 (Katayama et al., 2005).

La parasporina-4 es la proteína citotóxica que tiene homología de secuencias con la toxina aerolisina, y con épsilon (ETX). La PS4Aa1 es producida por la cepa A1470 y tiene un tamaño de 30 kDa y de 27 kDa en su forma tóxica cuando es digerida con proteinasa K, donde tiene actividad citotóxica

frente a líneas celulares humanas con cáncer como TCS, MOLT-4 (células T humanas con leucemia) y HL60 (Okumura et al., 2011).

La parasporina-5 es una proteína de la familia MTX similar a la toxina épsilon como la cry64. Como protoxina tiene un tamaño de 33 kDa y cuando se corta con proteinasa K genera una fracción activa de 29.8 kDa. La cry64Aa fue aislada y purificada por la cepa A1100 y presenta actividad citotóxica contra MOLT-4 (Ekino et al., 2014).

La parasporina-6, (cry63Aa) es un tipo de toxina cry de los tres dominios, como protoxina tiene un tamaño de 88 kDa fueron aisladas y purificadas de las cepas de CP84 y de M109 y es relacionada con la parasporina-1 debido a que comparten algunas secuencias conservadas y tiene actividad citotóxica para HeLa y para HepG2 (Okumura et al., 2011), (Nagamatsu et al., 2010).

Tabla 1. Clasificación y características de las Parasporinas (Tomada de Okumura et al., 2013).

Parasporina	Nomenclatura Cry	Cepa <i>Bt</i>	Gen (pb)	Pro-toxina (kDa)	Fragmentos tóxicos (kDa)	Proteasa	País	Referencia
PS1Aa1	Cry31Aa1	84HS-1-11	2,169	81	66,58,56	Tripsina	Japón, Estados Unidos	(Mizuki et al., 2000)
PS1Aa2	Cry31Aa2	M15	2,226	83	55, 70	Tripsina	Canadá	(Jung et al., 2007)
PS1Aa3	Cry31Aa3	B195	2,169	81	56	Tripsina	Japón	(Uemori et al., 2008)
PS1Aa4	Cry31Aa4	Bt79-25	2,169	81	—	Proteinasa K	Vietnam	(Yasutake et al., 2008)
PS1Aa5	Cry31Aa5	Bt92-10	2,169	81	—	Proteinasa K	Vietnam	(Yasutake et al., 2008)
PS1Aa6	Cry31Aa6	64-1-94, M15, M019	2,262	70	15 y 55	Tripsina	Japón, Caribe, Canadá.	(Nagamatsu et al., 2010)
PS1Ab1	Cry31Ab1	B195	2,178	82	56	Tripsina	Japón	(Uemori et al., 2008)
PS1Ab2	Cry31Ab2	Bt31-5	2,178	82	—	Proteinasa K	Vietnam	(Yasutake et al., 2008)
PS1Ac1	Cry31Ac1	Bt87-29	2,331	87	—	Proteinasa K	Vietnam	(Yasutake et al., 2008)
PS1Ac2	Cry31Ac2	B0462	2,331	87	15 y 607445	Proteinasa K	Japón	(Kuroda et al., 2013 - No publicado; Kuroda et al., 2013)
PS1Ad1	Cry31Ad1	64-1-94, M15, M019	2,262	73	14 y 59	Tripsina	Japón, Caribe, Canadá.	(Nagamatsu et al., 2010)
PS2Aa1	Cry46Aa1	A1547, 4R2	1,014	37	30	Proteinasa K	Japón, Estados Unidos.	(Ito et al., 2004)
PS2Aa2	Cry31Aa2	A1470	1,011	37	—	—	Japón	(Ishikawa et al., 2008 2013 - No publicado)
PS2Ab1	Cry31Ab1	TK-E6	912	33	29	Proteinasa K	Japón	(Hayakawa et al., 2007)
PS3Aa1	Cry41Aa1	A1462	2,475	88	64	Proteinasa K	Japón	(Yamashita et al., 2005)
PS3Ab1	Cry41Ab1	A1462	2,487	70	—	Tripsina	Japón	(Nagamatsu et al., 2010)
PS4Aa1	Cry45Aa1	A1470, T98+	2,487	30	26.8	Pepsina ó Proteinasa K	Japón	(Okumura et al., 2004)
PS5Aa1	Cry64Aa1	A1100	918	33	30	Proteinasa K	Japón	(Ekino et al., 2014)
PS6Aa1	Cry63Aa1	64-1-94, M15, 1019	2,259	85	14 y 59	Tripsina	Japón, Caribe, Canadá.	(Nagamatsu et al., 2010)

La acción de las parasporinas sobre células de cáncer es realizada a través de diferentes mecanismos, como la apoptosis descrita para la parasporina-1 y la formación de poro principalmente a través de receptores proteicos en la membrana de la célula blanco, principalmente para las parasporinas 2 y 3.

La actividad citotóxica de las parasporinas sobre células cancerosas específicamente, hace que estas proteínas se conviertan en una alternativa potencial para el tratamiento del cáncer, por su baja o nula citotoxicidad hacia células normales (Holmes and Monro, 1965).

El cáncer es un término que incluye un grupo de más de 200 enfermedades, las cuales pueden presentar diferentes características siendo estas enfermedades independientes, lo que permite que el pronóstico y tratamiento sea diferente para cada una. Sin embargo, todas tienen algo en común: las células cancerosas se multiplican y diseminan por todo el cuerpo sin control alguno (Small et al., 2017). El origen etimológico de la palabra “cáncer” proviene de Hipócrates, conocido como “El padre de la medicina”, el cual usaba las palabras carcino y carcinoma haciendo referencia al cangrejo, debido a la forma que tiene el cáncer (Pérgola and Okner. 1986). Es una de las principales causas de muerte en el mundo junto con las enfermedades respiratorias, cardiovasculares, cerebrovasculares, entre otras, y se clasifica según el tejido en el cual se forman las células cancerosas, donde pueden continuar con un desarrollo anormal y proliferar de manera descontrolada (Crosbie et al., 2013). El proceso fisiológico normal del organismo para eliminar células dañadas, se llama “apoptosis”, que es un mecanismo de muerte celular programada, para que las células no se repliquen y pasen información errónea al ADN de las nuevas células. Este proceso es importante en la prevención del cáncer, pero si no funciona correctamente se produce división celular descontrolada y como consecuencia desarrollo de tumores (Xu et al., 2019). Puede ser desarrollado por diferentes factores tanto genéticos como externos, relacionados a sobrepeso, obesidad, diabetes, consumo de tabaco, alcohol, entre otros. En el año 2020, aproximadamente 10 millones de muertes se registraron a causa del cáncer, donde los más comunes en orden descendente fueron: mama con 2.26 millones de casos, pulmón 2.21, colon y recto 1.93, próstata 1.41, piel 1.20 y de estómago con 1.09 millones de casos. El 70% de las muertes se presentan principalmente en personas de 65 años o menos en países en desarrollo donde hay deficiencia en los programas de prevención de enfermedades y hábitos de nutrición no apropiados.

Sin embargo, según la OMS entre el 30 y 50% de los cánceres pueden ser evitados, puesto que muchos tienen alta probabilidad de curación cuando se presenta un diagnóstico temprano (McGuire, S., 2016). El cáncer de cuello uterino o de cérvix es una enfermedad asociada a infecciones relacionadas con el Virus del Papiloma Humano, siendo el serotipo El VPH 16 y VPH-18 los de alto riesgo de producir cáncer (Chatterjee, A., 2014), El virus VPH se transmite por contacto sexual y afecta 8 de cada 10 personas (hombres y mujeres). Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) el cáncer de cérvix se encuentra en la posición siete en neoplasias más frecuentes en la población mundial y la cuarta en mujeres con aproximadamente 520.000 casos nuevos al año y es la primera causa de muerte debido a tumores malignos en los países en vías de desarrollo (Chaturvedi, et al., 2011). En América latina este cáncer es la segunda neoplasia más común con 68.818 casos anuales atribuyéndose una incidencia del 21.2 casos por 100 mujeres y la mortalidad es de 8,7 por 100 mujeres, el 75% ocurre principalmente en México, Brasil, Colombia, Perú, Venezuela y Argentina (Wiesner et al., 2013). En Colombia se estima que hay alrededor de 5000 nuevos casos/año, y aproximadamente 2000 muertes por esta causa, representando cerca del 13% de las defunciones por malignidades en mujeres, afecta 19/100.000 mujeres/año (Pardo and Cendales, 2015), siendo el VPH 16 el tipo más frecuente en nuestro país (Merle L., 2004). El tratamiento que se conoce para el cáncer de cérvix son las vacunas contra diferentes tipos de VPH, como la Gardasil, Gardasil 9 y Cervarix, todas protegen contra la infección por los tipos VPH-16.

Pregunta de investigación:

¿Es posible que cepas de *B. thuringiensis* sinteticen proteínas tipo parasporina con potencial anticancerígeno?

Objetivo general:

- Producir cristales parasporales de *B. thuringiensis* con perspectiva de actividad anticancerígena.

Objetivos específicos:

1. Producir cristales parasporales a partir del cultivo de diferentes cepas de *B. thuringiensis*.
2. Identificar bandas relacionadas a parasporinas mediante SDS-PAGE.
3. Identificar secuencias de aminoácidos tipos parasporinas en genomas de *B. thuringiensis in silico* e implementar PCR para la correspondiente caracterización de cepas *in vitro*.

1. Materiales y métodos

Cepas utilizadas en este estudio

Para la obtención de cristales parasporales y amplificación de genes de parasporinas, se usaron diferentes cepas de *B. thuringiensis* donadas por el instituto Pasteur por el científico Jean-François Charles relacionadas en la Tabla 2.

Tabla 2. Cepas de *B. thuringiensis*

Código	Cepa
T10001	<i>B. thuringiensis londrina</i>
T038001	<i>B. thuringiensis sumiyoshiensis</i>
T39001	<i>B. thuringiensis brazilensis</i>
T25001	<i>B. thuringiensis coreanensis</i>
4A3	<i>B. thuringiensis thuringiensis HD2</i>
T24001	<i>B. thuringiensis neoleonesis</i>
T15001	<i>B. thuringiensis dakota</i>
4AJ1	<i>B. thuringiensis monterrey</i>
T36001	<i>B. thuringiensis seromalayensis</i>
T21001	<i>B. thuringiensis colmeri</i>
T38001	<i>B. thuringiensis oswaldocruzi</i>
T41001	<i>B. thuringiensis sooncheon</i>
T35001	<i>B. thuringiensis seoulensis</i>
Producto comercial	<i>B. thuringiensis israelensis</i>

Reactivación cepas de *B. thuringiensis*:

La reactivación de las cepas de *B. thuringiensis* se realizó en medio de cultivo Tripticasa Soya agar a partir de inóculos en papel filtro guardados en frascos ámbar a temperatura ambiente. Las cajas de petri con los inóculos de papel filtro se incubaron a 30°C por 24 horas. Después del tiempo de incubación se verificó el crecimiento y pureza de la cepa.

Obtención de cristales parasporales de *B. thuringiensis*:

La obtención de cristales parasporales se realizó a partir de la inoculación de *B. thuringiensis* en agar Tripticasa Soya, dejando 30 días a temperatura ambiente, para permitir la etapa de esporulación y formación de inclusiones parasporales. Seguido al tiempo de incubación se procedió a recolectar toda la biomasa en tubos eppendorf estériles, se realizaron 4 lavados a la biomasa agregando 1 mL de agua destilada estéril (DDE), y 5 µL de fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMFS) 100 mM (después de cada lavado se realizó una centrifugación a 8000 rpm durante 15 minutos), el pellet final se resuspendió en 1 mL de buffer carbonato de Sodio Na₂CO₃ pH (10.0), 1 µL de dithiothreitol (DTT) 2 mM y 1 µL de PMFS, y se dejó en incubación por 2 horas y 30 minutos en agitación constante a 37°C en oscuridad, luego de esta incubación la muestra fue centrifugada por 25 minutos a 10.000 rpm, se tomó el sobrenadante y se conservó a 4°C en oscuridad.

Cuantificación de Proteínas: La cuantificación de proteínas se realizó por el método de Bradford. Brevemente: A 100 µL de muestra de solubilizado de proteínas de *Bacillus* se añadió 1 mL reactivo de Bradford. Como blanco se utilizó 100 µL de agua destilada. La mezcla de reacción se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos y se tomó la absorbancia a 590 nm contra el blanco. La concentración de proteínas se determinó con una curva patrón de albúmina bovina (BSA) a diferentes concentraciones 25- 125µg/mL de proteínas (Bradford, M., 1976). El ensayo se realizó por duplicado (Ver anexo 1).

Electroforesis de proteínas en SDS-PAGE: Para evidenciar las bandas relacionadas a proteínas tipo PS se realizó una electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) a una concentración del 10%. El gel separador se preparó como sigue: 1462 μL de agua destilada esteril, 1800 μL de poliacrilamida que contenía 30 % acrilamida + 0.8 % bisacrilamida, más 1125 μL de Tris 1M de pH 8.8, 24 μL de SDS al 10%, 4,5 μL de TEMED, y 45 μL de Persulfato de amonio. El gel concentrador se preparó con 1125 μL de agua destilada esteril, 421 μL de poliacrilamida, 703 μL de Tris 1M pH 6.8, 28 μL de SDS al 10%, 2.8 μL de TEMED y 28 μL de persulfato de amonio. Una vez polimerizado el gel se depositaron las muestras con buffer de carga 4x y marcador de peso molecular de proteínas que permitió identificar el tamaño de las bandas obtenidas del extracto de *B. thuringiensis* (Ver anexo 2).

Extracción de ADN genómico de *B. thuringiensis*

Para la extracción de ADN, las cepas de *B. thuringiensis* crecieron en caldo nutritivo durante 18-24 h a 30°C con agitación a 180 rpm. El pellet de células se obtuvo por centrifugación a 9300 rpm durante 5 minutos, y se adicionó 600 μL de solución de lisis (50 mM TRIS HCl pH 8,0, 50 mM EDTA pH 8,0, 1% SDS, 50 mM NaCl), se mezcló por pipeteo suave y se incubó a 80°C durante 5-10 minutos. Posteriormente, se adicionó 300 μL de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1), se mezcló por vortex suave durante 2 minutos, y se centrifugó a 12.000 rpm durante 6 minutos a 4°C. El sobrenadante con el ADN se transfirió a un tubo de 1.5 mL y se repitió el paso anterior con 300 μL de cloroformo:isoamílico (24:1). El sobrenadante se transfirió a un tubo de 1.5 mL y se añadió 600 μL de isopropanol (frío), se mezcló por inversión varias veces y se incubó a -20°C por 20 minutos. El pellet de ADN se obtuvo por centrifugación a 12.000 rpm durante 10 minutos a 4°C. El ADN se lavó con 600 μL de etanol 70% dos veces, a 12.000 rpm durante 5 minutos a 4°C. Se eliminó el etanol cuidando de no perder el pellet de ADN. Finalmente el tubo fue dejado abierto para secar el ADN

(aprox 5-10 min), y se resuspendió en 50 μL de agua destilada esteril y fue (Ver anexo 3) conservado a -20°C . La concentración de ADN fue medida en el espectrómetro - nanodrop Colibrí (Titertek-Berthold).

Extracción de ADN plasmídico de cepas de *B. thuringiensis*:

Para la extracción de ADN plasmídico, las cepas de *B. thuringiensis* se sembraron en 3 mL de caldo nutritivo durante 18-24 horas a 30°C con agitación 180 rpm. El pellet de ADN se obtuvo por centrifugación y se resuspendió en 100 μL de solución tampón (Tris-HCL 50 Mm, pH 8.0, Acetato de amonio 2,5 M, tritón X-100 al 4% y EDTA 62.5 Mm). Posteriormente se agregó 300 μL de fenol-cloroformo-isoamílico (25:24:1). Se centrifugó por 10 minutos a 4°C -12000 rpm. El sobrenadante se transfirió a un tubo de 1.5 mL y se adicionó 300 μL de cloroformo-isoamílico se mezcló por inversión y se centrifugó por 10 minutos a 4°C 12000 rpm. La fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo de 1.5 mL y se agregó 600 μL de etanol absoluto frío y se dejó 20 minutos a -20°C . Se centrifugó por 10 minutos a 4°C a 12000 rpm. Se retiró el sobrenadante y el pellet de ADN fue lavado 2 veces con 500 μL de etanol al 70%. Finalmente el pellet de ADN se obtuvo por centrifugación durante 10 minutos a 4°C a 4000 rpm y se resuspendió en 50 μL de agua destilada esteril y se almacenó a -20°C (Anexo 4).

Implementación de PCR para amplificación de genes tipo parasporina: Para la amplificación de genes de parasporinas de las 6 familias se utilizaron genes sintéticos donados por el profesor Silvio Alejandro López Pazos (Universidad Antonio Nariño), cuyas secuencias se relacionan en la tabla 3. Inicialmente se estandarizaron las condiciones de reacción y amplificación para los genes PS1 y Ps6, como se describe a continuación: 12.5 μL GoTaq Green Master Mix 1x, Oligonucleótido forward y reverso (10 μM) 1 μL cada uno, templado de ADN 1 μL y 9.5 μL de agua libre de nucleasas, para un volumen final de reacción de 25 μL . Para el control negativo de la reacción se utilizó agua destilada esteril. Las condiciones de amplificación como sigue: 95°C 3 minutos- 1 ciclo; 95°C 30 seg, 60°C 30

seg, 72°C 1 minuto- 30 ciclos; 72°C 5 minutos -1 ciclo. Los tubos de reacción para cada gen se colocaron en el termociclador marca Biorad.

Tabla 3. Secuencias de oligonucleótidos de parasporinas PS1 - PS6 y sus Tm

PARASPORINA	OLIGONUCLEÓTIDO	Tm °C
PS1	PS1F: 5'-ATGCGAAATACTCTATGCAAAGATTTACC-3'	Directo: 56.5 ~ 57.3
PS1	PS1R: 5'-ATCTTGACTTGTTATACCGCCTGGTATTCC-3'	Reverso: 60.4
PS2	PS2F: 5'-GATGGTATTGCATTAAATAATGAAAC-3'	Directo: 50.5
PS2	PS2R: 5'-GCTGGTTGYACTAYAGTTTGGGAAGT-3'	Reverso: 54.9 ~ 59.9
PS3	PS3F: 5'-TGAATGGGCACTTCGAAAACA-3'	Directo: 55.5
PS3	PS3R: 5'-ACATCGCGGRCCCAAATTC-3'	Reverso: 55.9 ~ 58.6
PS4	PS4F: 5'-TGGTGTGCTGCAAGGGGATA-3'	Directo: 58.4
PS4	PS4R: 5'-CCGCTTGGTAGCGAAACTGG-3'	Reverso: 58.7
PS5	PS5F: 5'-CGGAGACAACAACAACAA-3'	Directo: 54.4
PS5	PS5R: 5'-CCTGGTAAAGGCGATTCTCT-3'	Reverso: 54
PS6	PS6F: 5'-GAACCGTAATTCCAGGAGGA-3'	Directo: 53.6
PS6	PS6R: 5'-GTTCAACGGTTCCAGCAAAT-3'	Reverso: 54.2

Determinación de secuencias de aminoácidos tipo parasporina en genomas de *B. thuringiensis*:

Para identificar la secuencias de aminoácidos de las parasporinas en genomas de *B. thuringiensis* se tomaron 673 genomas y 391 plásmidos depositados en la base de datos de Genome del NCBI (Consultado 10 de Noviembre 2021). Inicialmente se ingresó a Browse microbial genomes para buscar los genomas y plásmidos de *B. thuringiensis*, en cada uno de los genomas se buscaron las 19 parasporinas utilizando la herramienta tBLASTn aplicando los parámetros predeterminados, con un porcentaje de cobertura mayor a 60% y porcentaje de identidad mayor al 35%, con un valor E menor a 0.001, como límites para que un resultado sea validado como positivo.

2. Resultados y Discusión

Obtención de cristales parasporales de *B. thuringiensis*

Las inclusiones parasporales se caracterizan por contener cristales de proteínas con actividad citotóxica frente a diferentes células blanco. Con el fin de determinar si los extractos celulares de las cepas de *B. thuringiensis* contenían proteínas, se realizó la cuantificación de proteínas totales por el método de Bradford utilizando una curva patrón de albúmina bovina (BSA) a diferentes concentraciones (25 - 150 $\mu\text{g/mL}$). La concentración de proteínas de los extractos de las cepas de *B. thuringiensis* presentó concentraciones que estuvieron en un rango de 8 a 115 $\mu\text{g/mL}$ como se observa en la Tabla 4. Los resultados de la cuantificación de proteínas en las cepas evaluadas, se correlacionan con las concentraciones de 0 a 20 $\mu\text{g/mL}$ obtenidas por Brasseur., 2015, 10 a 100 $\mu\text{g/mL}$ por Rosales et al., 2014 y cercanas a 150.71 $\mu\text{g/mL}$ obtenidas por Torres., et al 2016. La actividad citotóxica de extractos celulares de cepas de *B.t.* conteniendo parasporinas ha sido probada en diferentes líneas celulares de cáncer por diferentes estudios de investigación; en los cuales se demuestra que la actividad citotóxica puede ser a concentraciones muy bajas de 0.12 y 0.32 $\mu\text{g/mL}$ para células HeLa de cáncer de cervical y HL-60 de leucemia promielocítica respectivamente (Akiba and Okumura. 2016).

Tabla 4. Concentración de proteína de extractos proteicos solubilizados de cepas de *B. thuringiensis*, por el método de Bradford.

CEPA	Concentración de proteína ($\mu\text{g/mL}$)
<i>B. thuringiensis londrina</i>	18.40
<i>B. thuringiensis brazilensis</i>	8.55
<i>B. thuringiensis coreanensis</i>	33.07
<i>B. thuringiensis thuringiensis HD2</i>	75.36
<i>B. thuringiensis neoleonensis</i>	8.08
<i>B. thuringiensis dakota</i>	64.00
<i>B. thuringiensis israelensis</i>	7.95
<i>B. thuringiensis monterrey</i>	52.18
<i>B. thuringiensis seromalayensis</i>	115.82
<i>B. thuringiensis colmeri</i>	43.73
<i>B. thuringiensis oswaldocruzi</i>	48.55
<i>B. thuringiensis sooncheon</i>	44.00
<i>B. thuringiensis seoulensis</i>	15.20

Identificación de bandas relacionadas a parasporinas mediante SDS-PAGE.

De los 14 extractos ricos en cristales parasporales obtenidos de las 14 cepas de *B. thuringiensis*, 10 fueron visualizados y analizados mediante SDS-PAGE para la presencia de posibles bandas que puedan corresponder a proteínas parasporales de acuerdo con su peso en kDa esperados para las mismas. En la figura 4 se evidencian bandas de diferentes tamaños, que podrían corresponder a algún tipo de parasporina. Para el extracto de *B. thuringiensis colmeri* (carril 2 y 3) y *B. thuringiensis coreanensis* (carril 4), se observan bandas en el rango de 28 a 37 kDa que podrían corresponder a parasporina PS4 de 30 kDa ó a PS5 de 33 kDa. Para las misma cepas se observa un banda en el rango de 47 a 91 kDa, que podría corresponder a una banda de 70 a 88 kDa para PS1, PS3 ó PS6. Para *B. thuringiensis londrina* en el carril 5 se observa una banda de 120 kDa que puede corresponder a proteínas Cry.

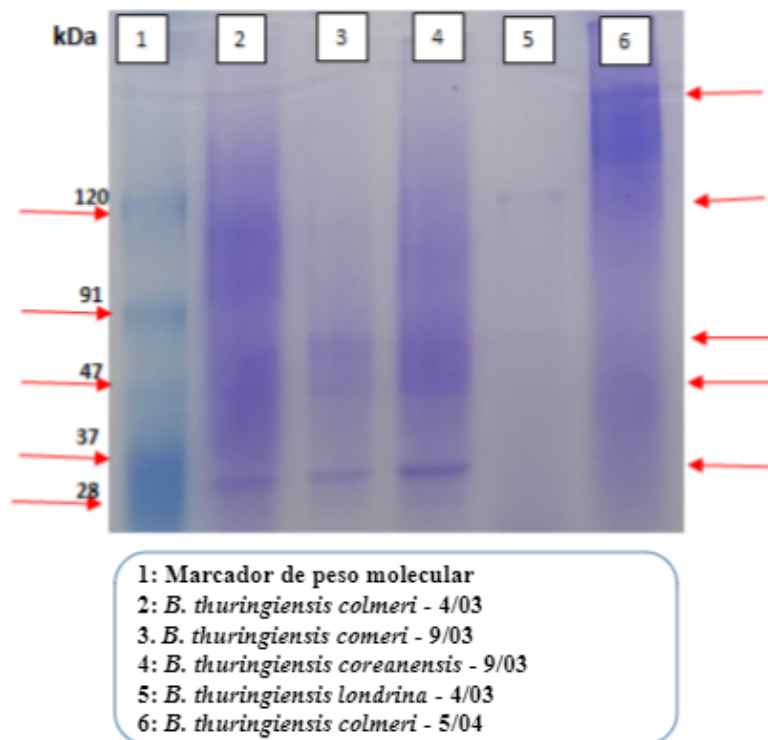


Figura 4. Análisis de bandas relacionadas a parasporinas en gel SDS-PAGE de cepas de *B. thuringiensis*.

En la figura 5 se observa que para *B. thuringiensis thuringiensis* HD2 y *B. thuringiensis oswaldocruzi* se observa una banda de aproximadamente 80 y 70 kDa respectivamente, que podría corresponder a parasporinas de la familia 1,3 ó 6. Para estas misma cepas se observan bandas de aproximadamente 30 kDa, indicando posible presencia de parasporinas de la familia PS2, PS4 y PS5. En el carril 4 de *B.*

thuringiensis dakota se observa una banda cercana a los 37 kDa que puede corresponder con PS2 y también una de 70 kDa relacionada a miembros de la familia PS1 y PS3.

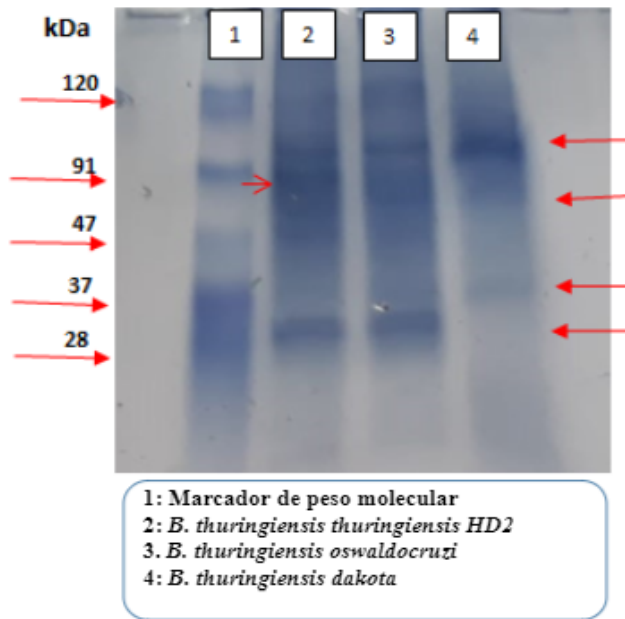


Figura 5. Análisis de bandas relacionadas a parasporinas en gel SDS-PAGE de cepas de *B. thuringiensis*.

En la Figura 6 se puede observar una banda de aproximadamente 80 y 70 kDa para el extracto de *B. thuringiensis dakota* y nuevamente de 70 kDa para *B. thuringiensis neoleonensis*, que pueden corresponder con parasporinas PS1Aa1 (81 kDa) y PS3Ab1 de (70 kDa). Además se observan bandas a la altura de 30/33 kDa para *B. thuringiensis israelensis*, *B. thuringiensis dakota*, *B. thuringiensis neoleonensis* y *B. thuringiensis sooncheon*, que podría corresponder a parasporinas PS2, PS4 y PS5.

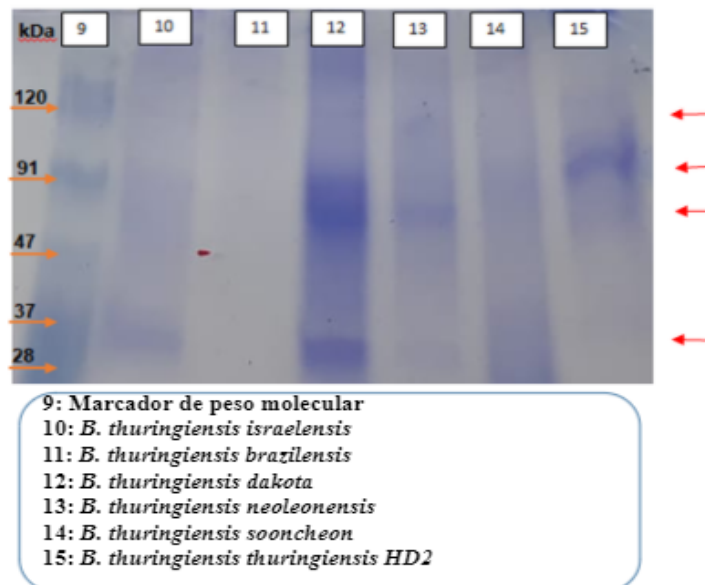


Figura 6. Análisis de bandas relacionadas a parasporinas en gel SDS-PAGE de cepas de *B. thuringiensis*.

Estandarización de PCR para amplificación de genes de parasporinas de cepas de *B. thuringiensis*.

Para la amplificación de genes de parasporinas de las familias PS1 a PS6, se realizó la extracción de ADN genómico y plasmídico, teniendo en cuenta que los genes han sido identificados en genoma y plásmidos. El material se obtuvo a partir de cultivos de cada cepa de *B. thuringiensis* crecidos en caldo nutritivo por 24 h a 30°C y 180 rpm. La calidad del ADN fue visualizado en geles de agarosa al 1%, como se observa en la figura 7 para ADN plasmídico, donde se evaluaron las 14 cepas. Para cada una se observa una banda de alto peso molecular correspondiente al DNA plasmídico, aunque se observa un pequeño barrido de degradación para las cepas *Bt. seoulensis*, *Bt. oswaldocruzi* y *Bt. monterrey* (carriles: 3, 10 y 13). Además contaminación de RNA en algunas de las muestras que pueden interferir en la concentración total de DNA, a partir del carril 10 al 14.

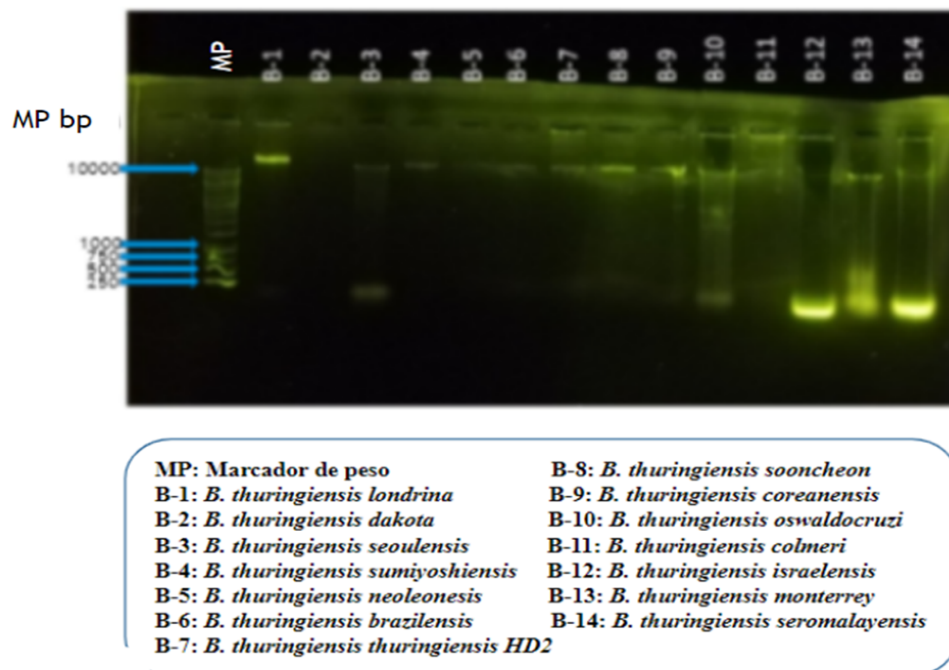


Figura 7. Calidad del ADN plasmídico de cepas de *B. thuringiensis* en gel de agarosa al 1%. MP: marcador de peso molecular. B1 a B14 cepas de *B. thuringiensis*.

Para el ADN genómico se realizó extracción en 8 cepas inicialmente. En la figura 8 se observan bandas de alto peso molecular correspondientes a ADN cromosómico para las cepas de *B. thuringiensis* evaluadas, aunque hay presencia de RNA que puede interferir en la concentración total de DNA, y en las reacciones de amplificación de genes.

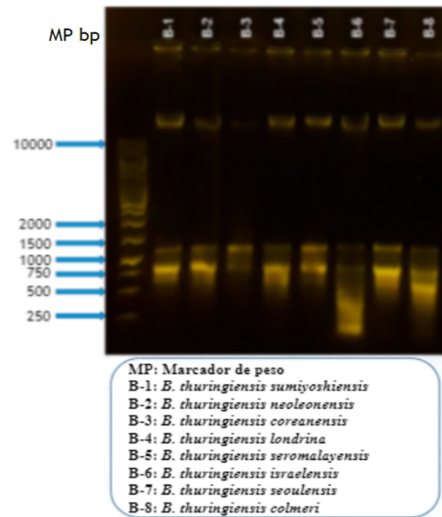


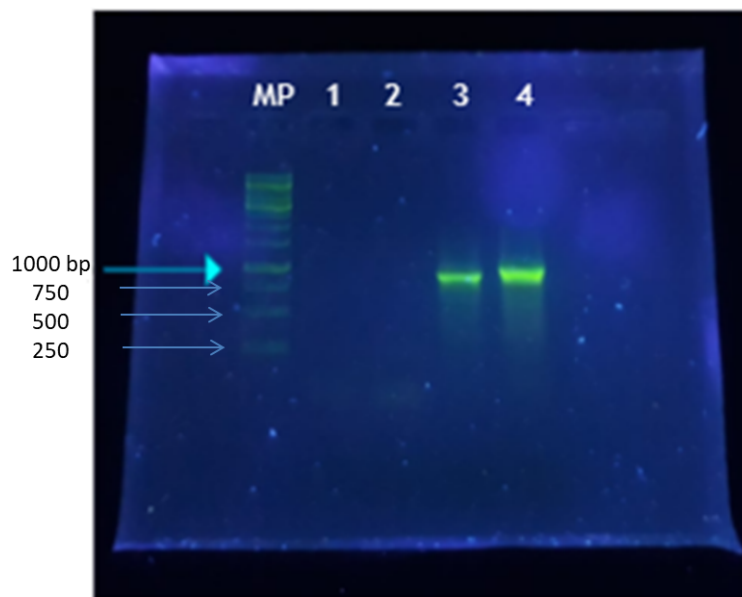
Figura 8. Extracción de ADN genómico de las cepas de *B. thuringiensis*. MP: marcador de peso molecular. B1 a B8 cepas de *B. thuringiensis*.

La concentración de ADN plasmídico y cromosómico de cada cepa fue medida en el espectrómetro nanodrop Colibrí (Titertek-Berthold), adicionando 2 μL muestra leídas contra blanco de agua MQ. Los resultados son presentados en la Tabla 5. Para el ADN plasmídico la concentración de ADN estuvo en rango de 14 a 690 $\text{ng}/\mu\text{L}$ con relaciones 260/280 entre 1.6 a 2.0 indicando buena calidad y pureza de la muestra, óptimas para procesos de PCR. Con respecto al ADN cromosómico, aunque los valores fueron más altos (118 a 778 $\text{ng}/\mu\text{L}$), que el ADN plasmídico, la relación 260/280 fue menor a 1.3 lo cual indica que no son muestras óptimas para ensayos de PCR.

Tabla 5. Concentraciones de DNA plasmídico y cromosómico.

CEPA	DNA PLASMÍDICO ($\text{ng}/\mu\text{L}$)	DNA CROMOSÓMICO ($\text{ng}/\mu\text{L}$)
<i>B. thuringiensis londrina</i>	55.18	709.58
<i>B. thuringiensis sumiyoshiensis</i>	52.76	405.28
<i>B. thuringiensis brazilensis</i>	29.31	497.95
<i>B. thuringiensis coreanensis</i>	172.65	-
<i>B. thuringiensis thuringiensis HD2</i>	167.30	240.79
<i>B. thuringiensis neoleonensis</i>	14.11	118.90
<i>B. thuringiensis dakota</i>	17.36	526.38
<i>B. thuringiensis israelensis</i>	692.15	-
<i>B. thuringiensis monterrey</i>	148.89	-
<i>B. thuringiensis seromalayensis</i>	149.70	-
<i>B. thuringiensis colmeri</i>	97.35	693.11
<i>B. thuringiensis oswaldocruzi</i>	380.17	778.82
<i>B. thuringiensis sooncheon</i>	55.35	454.75
<i>B. thuringiensis seoulensis</i>	150.65	-

Para los ensayos de amplificación de los genes de parasporinas, inicialmente se estandarizó el protocolo de amplificación para la parasporina PS1 y PS6, tomando como templado ADN plasmídico sintético, lo cual nos aseguraba la presencia del gen en la construcción del vector. Se usaron los oligonucleótidos respectivos forward y reverse para cada gen, teniendo en cuenta las condiciones descritas en materiales y métodos. El fragmento de amplificación para los genes corresponde a un tamaño de 900 bp para los 2 genes (carril 3 y 4) (Figura 9). Con las condiciones descritas de amplificación para PS1 y PS6, se realizaron varios intentos de amplificación de los genes a partir de ADN plasmídico sin obtener resultados satisfactorios, lo cual puede ser debido a que estos 2 genes no estén presentes en las cepas evaluadas.



MP: Marcador de peso molecular bp
 Carril 1: Control negativo
 Carril 2: DNAP comercial con PS6 (~200 bp)
 Carril 3: DNAP comercial con PS6 (~900 bp)
 Carril 4: DNAP comercial con PS1 (~850 bp)

Figura 9. Amplificación del gen *ps1* y *ps6*, a partir de ADN plasmídico sintético. Visualización en gel de agarosa 1%

Identificación *in silico* de secuencias de aminoácidos tipo parasporina en genomas de *B. thuringiensis*

Se realizó análisis bioinformático en genomas de *B. thuringiensis* depositados en el NCBI, encontrando 10 secuencias tipo parasporina que corresponden al 1% de los genomas evaluados, según los criterios establecidos en este trabajo (Tabla 6). Cabe resaltar que se encontraron 14 secuencias con valores muy cercanos a los parámetros de inclusión que también podrían corresponder a proteínas tipo parasporina.

Tabla 6. Secuencias de aminoácidos tipo parasporina. Se incluyen otras secuencias que también podrían corresponder a parasporinas.

#	CEPA	PARASPORIN QUERY	GENOME STRAIN	QUERY COVER	E-VALUE	PER. IDENT	ACCESSION
1	ATCC 10792	PS3Ab1	Bacillus thuringiensis serovar berliner ATCC 10792	65%	4,00E-44	35.83%	NZ_CM000753.1
2	ATCC 10792	PS3Ab1	Bacillus thuringiensis strain ATCC 10792 plasmid poh2	59%	7,00E-46	35.83%	NZ_CP021063.1
3	YC-10	PS3Ab1	Bacillus thuringiensis strain YC-10 plasmid pYC1	79%	5,00E-49	34.26%	NZ_CP011350.1
4	GR007	PS3Ab1	Bacillus thuringiensis strain GR007 plasmid pGR157	64%	2,00E-45	34.77%	NZ_CP076540.1
5	HER1410	PS3Ab1	Bacillus thuringiensis strain HER1410 chromosome	59%	4,00E-44	35.83%	NZ_CP050183.1
6	YGd22-03	PS5Aa1	Bacillus thuringiensis strain YGd22-03 plasmid pYGD98	97%	1,00E-69	43.77%	NZ_CP019235.1
7	CT-43	PS3Ab1	Bacillus thuringiensis serovar chinensis CT-43 plasmid pCT127	59%	8,00E-46	35.83%	NC_017202.1
8	CT-43	PS3Ab1	Bacillus thuringiensis serovar chinensis CT-43 plasmid pCT281	64%	2,00E-49	34.26%	NC_017203.1
9	LM1212	PS3Ab1	Bacillus thuringiensis LM1212 plasmid pLM1	99%	0.0	42.63%	NZ_CP024772.1
10	LM1212	PS4Aa1	Bacillus thuringiensis LM1212 plasmid pLM2	100%	5,00E-75	48.56%	NZ_CP024773.1
11	LM1212	PS3Ab1	Bacillus thuringiensis LM1212 plasmid pLM3	82%	0.0	51.15%	NZ_CP024774.1
12	BGSC 4AA1	PS3Ab1	Bacillus thuringiensis serovar morrisoni strain BGSC 4AA1 plasmid pBMB51	62%	4,00E-58	37.06%	NZ_CP010582.1
13	HD-1	PS3Ab1	Bacillus thuringiensis serovar kurstaki str. HD-1 plasmid pBMB299	64%	2,00E-49	34.26%	NZ_CP004876.1
14	YBT-1520	PS3Ab1	Bacillus thuringiensis serovar kurstaki str. YBT-1520 plasmid pBMB293	64%	2,00E-49	34.26%	NZ_CP007615.1
15	YBT-1520	PS3Ab1	Bacillus thuringiensis serovar kurstaki str. YBT-1520 plasmid pBMB293	64%	2,00E-49	34.26%	NZ_CP004861.1

16	IS5056	PS3Ab1	Bacillus thuringiensis serovar thuringiensis str. IS5056 plasmid pIS56-107	59%	7,00E-46	35.83%	NC_020393.1
17	IS5056	PS3Ab1	Bacillus thuringiensis serovar thuringiensis str. IS5056 plasmid pIS56-285	64%	2,00E-49	34.26%	NC_020384.1
18	MC28	PS3Aa1	Bacillus thuringiensis MC28 plasmid pMC183	81%	1,00E-47	34.67%	NC_018686.1
19	MC28	PS3Aa1	Bacillus thuringiensis MC28 plasmid pMC189	100%	1,00E-58	36.05%	NC_018687.1
20	HD-1	PS3Ab1	Bacillus thuringiensis serovar kurstaki strain HD 1i plasmid unnamed2	64%	2,00E-49	34.26%	NZ_CP009999.1
21	BGSC 4AW1	PS3Aa1	Bacillus thuringiensis serovar andalusiensis BGSC 4AW1 chromosome	100%	0.0	46.14%	NZ_CM000754.1
22	T01001	PS3Ab1	Bacillus thuringiensis serovar thuringiensis str. T01001 chromosome	65%	4,00E-44	35.83%	NZ_CM000748.1
23	ATCC 10792	PS3Ab1	Bacillus thuringiensis strain ATCC 10792 plasmid pLDW-17	59%	7,00E-46	35.83%	CP020756.1
24	ST7	PS4Aa1	Bacillus thuringiensis serovar coreanensis strain ST7 plasmid pST7-3	100%	2,00E-161	85.82%	CP016197.1

3. Conclusiones

En este trabajo se realizó un estudio sobre la obtención de cristales parasporales a partir de diferentes cepas de *B. thuringiensis*. Los cristales parasporales se caracterizan por contener proteínas denominadas parasporinas las cuales se han demostrado por tener efecto sobre diferentes líneas celulares de cáncer. Los extractos celulares con los cristales parasporales mostraron buena concentración de proteína total entre 8 a 115 $\mu\text{g/mL}$, concentraciones que pueden ser óptimas para ensayos de citotoxicidad sobre diferentes líneas de cáncer. El resultado de gel SDS-PAGE permitió la observación de diferentes bandas de proteínas con tamaños de 30 a 80 kDa que pueden estar relacionadas a los tamaños descritos para las 6 familias de parasporinas PS1 a PS6 (Xu et al., 2014). Para los ensayos de amplificación se logró la estandarización por PCR para el gen Ps1 y Ps6 utilizando oligonucleótidos específicos como ya se ha hecho para los genes insecticidas *cry* de *B.*

thuringiensis (Porcar, M., and Juárez-Pérez, V., 2021). Utilizando bioinformática se logró analizar la totalidad de genomas de *B. thuringiensis* encontrando varias cepas que sintetizan proteínas tipo parasporinas.

Agradecimientos

Al profesor Silvio López por la donación de los plásmidos sintéticos con los genes *ps1* y *ps6*, los oligonucleótidos para las 6 familias de parasporinas y por la asesoría de este trabajo.

Al Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación - MINCIENCIAS (Contrato 802-2018, código:123380763011).

Referencias

1. Adang. M; Crickmore, N; & Jurat Fuentes, JL. (2014). Diversity de *Bacillus thuringiensis* Crystal Toxins and Mechanism of Action. Chapter two In: Insect midgut and insecticidal proteins, volumen 47. p. 39-87.
2. Akiba, T; Abe, Y; Kitada, S; Kusaka, Y; Ito, A; Ichimatsu, T; Katayama, H; Akao, T; Higuchi, K; Mizuki, E; Ohba, M; Kanai, R; & Harata, K. (2009). Crystal Structure of the Parasporin-2 *Bacillus thuringiensis* Toxin That Recognizes Cancer Cells. *Journal of Molecular Biology*, 386,121-133.
3. Akiba T, Okumura S. (2017). Parasporins 1 and 2: Their structure and activity. *J Invertebr Pathol*. 142:44-49. doi: 10.1016/j.jip.2016.10.005.
4. Avignone-Rossa, C. & Mignone, C. (1995) *Bacillus thuringiensis* Growth and Toxicity. *Molecular biotechnology*. 4(1), 55-71. doi: 10.1007/BF02907471
5. Bradford Mm. A Rapid And Sensitive Method For The Quantitation Of Microgram Quantities Of Protein Utilizing The Principle Of Protein-Dye Binding. *Anal Biochem*. 1976, Vol. 7, 72.
6. Bravo A., Gill S.S., Soberón M. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon*. 2007;49:423–435. doi: 10.1016/j.toxicon.2006.11.022.
7. Centers for Disease Control and Prevention (CDCP) (2021). *Tratamientos contra el cáncer*. Retrieved 9 November 2021, from <https://www.cdc.gov/spanish/cancer/survivors/patients/treatments.htm>.
8. Chatterjee A. The next generation of HPV vaccines: Nonavalent vaccine V503 on the horizon. *Expert Review of Vaccines* 2014; 13(11):1279-90.

9. Chaturvedi AK, Engels EA, Pfeiffer RM, et al. Human papillomavirus and rising oropharyngeal cancer incidence in the United States. *Journal of Clinical Oncology* 2011; 29(32):4294–4301.
10. Crosbie EJ, Einstein MH, Franceschi S, Kitchener HC. Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet*. 2013; 382: 889-899.
11. 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(6), 1882-1895.
12. Federici B.A., Park H.W., Bideshi D.K. Overview of the basic biology of *Bacillus thuringiensis* with emphasis on genetic engineering of bacterial larvicides for mosquito control. *OpenToxinol. J.* 2010;3:83–100.
13. *Home - Genome - NCBI*. Ncbi.nlm.nih.gov. (2021). Retrieved 10 November 2021, from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome>.
14. Holmes, K., & Monro, R. (1965) Studies on the structure of parasporal inclusions from *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Molecular Biology*. (14(2), 572-581.
15. Katayama, H., Kusaka, Y. And Mizuki E. 2011. Parasporin-1 receptor and use thereof. European Patent Application. US20090935513. 2009-03-30. Fukuoka Prefectural Government.
16. Katayama, H., Yokota, H., Akao, T., Nakamura, O., Ohba, M., Mekada, E., & Mizuki, E. (2005). Parasporin-1, a novel cytotoxic protein to human cells from non-insecticidal parasporal inclusions of *Bacillus thuringiensis*. *Journal of biochemistry*, 137(1), 17-25.
17. Kitada, S., Abe, Y., Maeda, T., & Shimada, H. (2009). Parasporin-2 requires GPI-anchored proteins for the efficient cytotoxic action to human hepatoma cells. *Toxicology*, 264(1-2), 80-88.
18. Krishnan, V. 2013. Investigation of parasporins, the cytotoxic proteins from the bacterium *Bacillus thuringiensis*. Thesis: Department of Biochemistry, School of Life Sciences, University of Sussex.
19. Kuroda, S; Begun, A; Saga, M; Hirao, A; Mizuki, E; Sa-kai, H; & Hayakawa, T. (2012). Parasporin 1Ac2, a novel cytotoxic crystal protein isolated from *Bacillus thuringiensis* B0462 strain. *Current Microbiology*, 66 (5), 475-480.

20. McGuire, S. (2016). World cancer report 2014. Geneva, Switzerland: World Health Organization, international agency for research on cancer, WHO Press, 2015. *Advances in nutrition*, 7(2), 418-419.
21. Merle, L. Análisis de la situación del cáncer cérvico uterino en América Latina y el Caribe. s.l. Organización Panamericana de la Salud, 2004. pág. 40.
22. Mizuki, E., Park, Y., Saitoh, H., Yamashita, S., Akao, T., Higuchi, K., and Ohba, M. 2000. Parasporin, a human leukemic cell-recognizing parasporal protein of *Bacillus thuringiensis*. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 7: 625–630.
23. 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*, 1001281837-1001281837.
24. 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/>.
25. 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 (BBA) – Biomembranes*, 1808(6), 1476-1482.
26. Okumura, S; Ishikawa, T; Saitoh, H; Akao, T; & Mizuki, E. (2013). Identification of a second cytotoxic protein produced by *Bacillus thuringiensis* A1470. *Biotechnology letters*, 35(11), 1889-1894.
27. Pardo C., Cendales R. Incidencia, mortalidad y prevalencia de cáncer en Colombia, 2007-2011. Primera. Bogotá D.C: Instituto Nacional de Cancerología, 2015. pág. 148. Vol. 1.
28. Pérgola F. Okner O. Historia de la Medicina. Buenos Aires: Ed. EDIMED; 1986. pág. 121
29. Porcar, M., & Juárez-Pérez, V. (2021). *PCR-based identification of Bacillus thuringiensis pesticidal crystal genes*. Retrieved 14 November 2021, from.
30. Small Jr, W, Bacon MA, Bajaj A et al. Cervical cancer: a global health crisis. *Cancer*. 2017; 123: 2404-2412
31. Soberón, M; López -Díaz, JA; & Bravo, A. (2013). Cyt toxins produced by *Bacillus thuringiensis*: a protein fold conserved in several pathogenic microorganisms. *Peptides*, 41,87-93.
32. Stabb, E., Jacobson, L., Handelsman J. 1994. Zwittermicin A-producing strains of *Bacillus cereus* from diverse soils. *Applied and Environmental Microbiology* 60:4404– 4412.

33. Thomson M., Knuth M., Cardineau G. *Bacillus thuringiensis* Toxins with Improved Activity. 5,874,288 A. U.S. Patent. 1999 Feb 23.
34. Tsuzuki, K; Kimura, K; Fujii, N; Yokosawa, N; Indoh, T; Murakami, T; & Oguma K. (1990). Cloning and complete nucleotide sequence of the gene for the main component of hemagglutinin produced by *Clostridium botulinum* type C. *Infection and Immunity*, 58, 3173–3177.
35. Van Frankenhuyzen K, Nystrom C. The *Bacillus thuringiensis* toxin specificity database. 2002. Available from: <http://www.glf.cfs.nrcan.gc.ca/bacillus>
36. Wiesner C., et al. Barreras para la implementación de la prueba ADN-VPH como técnica de tamización primaria para cáncer de cuello uterino en un área demostrativa en Colombia. *Revista Colombiana de Cancerología*. 2013, Vol. 17, págs. 93-102.
37. Xu, X., Lai, Y., & Hua, Z. (2019). Apoptosis and apoptotic body: disease message and therapeutic target potentials. *Bioscience Reports*, 39.
38. Xu, C., Wang, B. C., Yu, Z., & Sun, M. (2014). Structural insights into *Bacillus thuringiensis* Cry, Cyt and parasporin toxins. *Toxins*, 6(9), 2732–2770.
39. Zhang, X., Candas, M., Griko, N. B., Taussig, R. & Bulla, L. A., Jr. 2006. A mechanism of cell death involving an adenylyl cyclase/PKA signaling pathway is induced by the Cry1Ab toxin of *Bacillus thuringiensis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 9897-9902.

ANEXOS

ANEXO 1 - CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

Tabla 1. Curva patrón de proteínas con albúmina bovina BSA

Concentración BSA ($\mu\text{L}/\text{mL}$)	Cantidad de BSA (μl)	Agua (μL)	Cantidad de Buffer (mL)
0	0	0	5
25	25	975	5
50	50	950	5
75	75	925	5
100	100	900	5
125	125	875	5
150	150	850	5

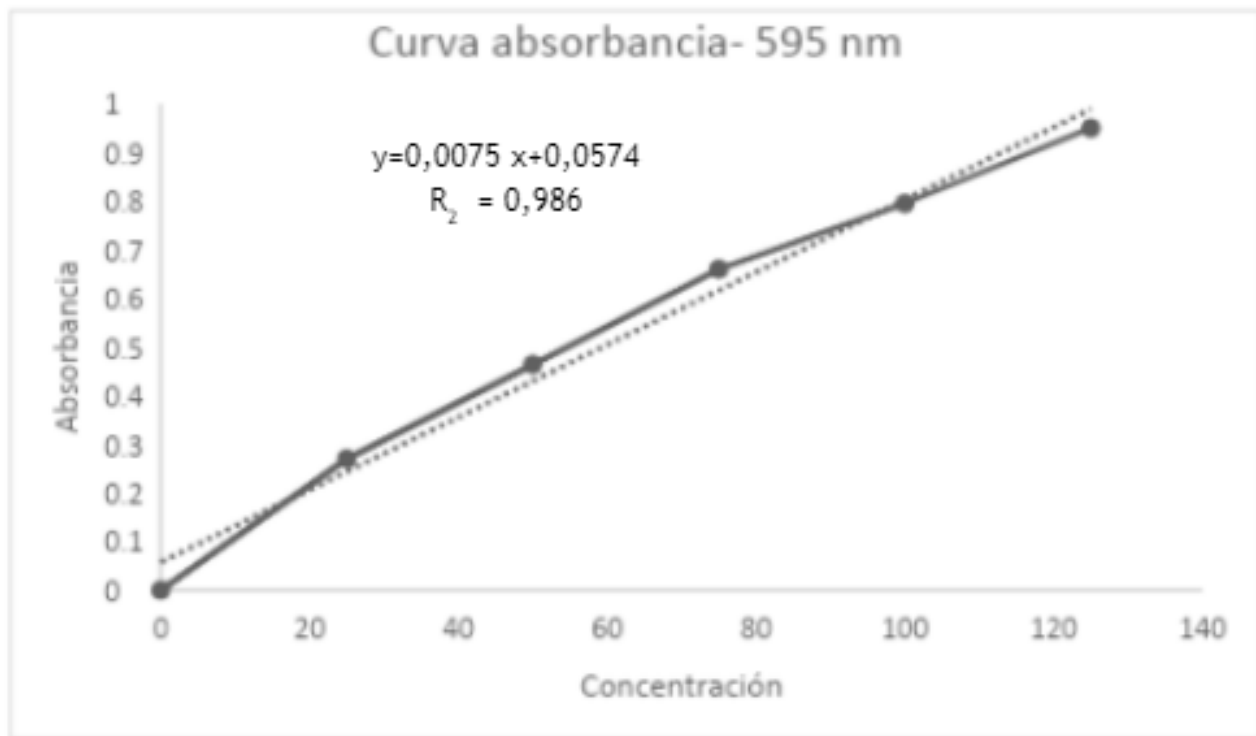


Figura 1. Curva patrón de Albúmina bovina (BSA)

ANEXO 2 - ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS

Preparación de soluciones

- **BUFFER DE LA MUESTRA 4X PARA PROTEÍNAS**

Mezclar los siguientes componentes:

Reactivos		[final]
Tris 0,5 M, pH 6,8	2,5 mL	0,125 M
SDS al 10 %	2,5 mL	2.5 %
2-Mercaptoetanol	2,5 mL	25 %
Glicerol	2,5 mL	25 %
Azul de bromofenol	1 mg	0,1 mg/mL

- **BUFFER DE ELECTROFORESIS TRIS-GLICINA 10X PARA PROTEÍNAS**

Reactivos		[final]
Tris base	3,038 g	0,25 M
Glicina	15,01 g	2 M
SDS	1 g	1 %

Completar con 100 mL de agua bidestilada.

- **SOLUCIÓN DE TRABAJO ACRILAMIDA/BISACRILAMIDA AL 30%**

Reactivos		[final]
Acilamida	29,2 g	29,2%
Bisacrilamida	0,8 g	0,8 %
Mezcla total	30 g	30 %

Disolver con 100 mL de agua bidestilada. Filtrar para remover las impurezas y forrar el recipiente con papel aluminio.

- **BUFFER TRIS 1,5 M pH= 8,8**

Pesar 181,65 g de tris base y enrasar con agua bidestilada hasta un volumen de 1 L. Ajustar a pH= 8,8 con HCl.

- **BUFFER TRIS 0,5 M pH=6,8**

Pesar 60,55 g de tris base y enrasar con agua bidestilada hasta un volumen de 1 L. Ajustar a pH = 6,8 con HCl.

- **PERSULFATO DE AMONIO (APS 10%)**

Pesar 100 mg y diluir en un volumen final de 1 mL con agua tridestilada.

Este reactivo en polvo es altamente hidrofílico, por lo tanto, es importante mantener el envase herméticamente cerrado.

La preparación debe ser de 1 semana de antigüedad como máximo.

- **PREPARACIÓN DE GELES POLIACRILAMIDA DE RESOLUCIÓN DE ACUERDO A SU CONCENTRACIÓN Y VOLUMEN**

COMPONENTES DE LA SOLUCIÓN	VOLUMEN FINAL DE LA SOLUCIÓN			
	5 mL	10 mL	15 mL	20 mL
GEL AL 6%				
Agua bidestilada	2,6	5,3	7,9	10,6
Acrilamida/bisacrilamida 30%	1	2	3	4
Tris 1,5 m pH 8,8	1,3	2,5	3,8	5
SDS 10%	0,05	0,1	0,15	0,2
Persulfato de amonio 10%	0,025	0,05	0,075	0,1
TEMED	0,0025	0,05	0,0075	0,01

COMPONENTES DE LA SOLUCIÓN	VOLUMEN FINAL DE LA SOLUCIÓN			
	5 mL	10 mL	15 mL	20 mL
GEL AL 8%				
Agua bidestilada	2,3	4,6	6,9	9,3
Acrilamida/bisacrilamida 30%	1,3	2,7	4	5,3
Tris 1,5 m pH 8,8	1,3	2,5	3,8	5
SDS 10%	0,05	0,1	0,15	0,2
Persulfato de amonio 10%	0,025	0,05	0,075	0,1
TEMED	0,0025	0,05	0,0075	0,01

COMPONENTES DE LA SOLUCIÓN	VOLUMEN FINAL DE LA SOLUCIÓN			
	5 mL	10 mL	15 mL	20 mL
GEL AL 10%				
Agua bidestilada	1,9	4	5,9	7,9
Acrilamida/bisacrilamida 30%	1,7	3,3	5	6,7
Tris 1,5 m pH 8,8	1,3	2,5	3,8	5
SDS 10%	0,05	0,1	0,15	0,2
Persulfato de amonio 10%	0,025	0,05	0,075	0,1
TEMED	0,0025	0,05	0,0075	0,01

COMPONENTES DE LA SOLUCIÓN	VOLUMEN FINAL DE LA SOLUCIÓN			
	5 mL	10 mL	15 mL	20 mL
GEL AL 12%				
Agua bidestilada	1,6	3,3	4,9	6,6
Acrilamida/bisacrilamida 30%	2	4	6	8
Tris 1,5 m pH 8,8	1,3	2,5	3,8	5
SDS 10%	0,05	0,1	0,15	0,2
Persulfato de amonio 10%	0,025	0,05	0,075	0,1
TEMED	0,0025	0,05	0,0075	0,01

COMPONENTES DE LA SOLUCIÓN	VOLUMEN FINAL DE LA SOLUCIÓN			
	5 mL	10 mL	15 mL	20 mL
GEL AL 15%				
Agua bidestilada	1,1	2,3	3,4	4,6
Acrilamida/bisacrilamida 30%	2,5	5	7,5	10
Tris 1,5 m pH 8,8	1,3	2,5	3,8	5
SDS 10%	0,05	0,1	0,15	0,2
Persulfato de amonio 10%	0,025	0,05	0,075	0,1
TEMED	0,0025	0,05	0,0075	0,01

- **PREPARACIÓN DE GELES DE EMPACAMIENTO AL 5% DE ACUERDO A SU VOLUMEN**

COMPONENTES DE LA SOLUCIÓN	VOLUMEN FINAL DE LA SOLUCIÓN			
	3 mL	4 mL	6 mL	8 mL
Agua bidestilada	1,1	2,3	3,4	4,6
Acrilamida/bisacrilamida 30%	2,5	5	7,5	10
Tris 1,5 m pH 8,8	1,3	2,5	3,8	5
SDS 10%	0,05	0,1	0,15	0,2
Persulfato de amonio 10%	0,025	0,05	0,075	0,1
TEMED	0,0025	0,05	0,0075	0,01

- **SOLUCIÓN DE TRABAJO DE AZUL BRILLANTE DE COOMASSIE R250**
Disolver 0,25 g de azul brillante de coomassie R250 en 90 mL de metanol:H₂O (v/v 1:1) y 10 mL de ácido acético glacial. Filtrar la solución para eliminar los residuos extraños. Antes de usar dejar en reposo por una semana en un frasco oscuro.
- **SOLUCIÓN DE DECOLORACIÓN RÁPIDA**
Mezclar 10 mL de ácido acético glacial con 50 mL de metanol. Llevar la solución a 100 mL con 40 mL de agua destilada.

- **SOLUCIÓN DE DECOLORACIÓN LENTA**

Mezclar 10 mL de ácido acético glacial con 5 mL de metanol. Llevar la solución a 100 mL con 85 mL de agua destilada.

- **SOLUCIÓN GLICEROL METANOL**

Mezclar 4 mL de glicerol con 45 mL de metanol. Llevarlo a un volumen de 100 mL de agua destilada.

- **SDS 10%**

Disolver 10 g de SDS en 80 mL de agua bidestilada, una vez disuelto se lleva a pH 7,2 con 10 N de NaOH, finalmente se completa hasta 100 mL con agua bidestilada.

Calentar a 68° C para disolver completamente el SDS.

ANEXO 3 - EXTRACCIÓN DE ADN DE BACTERIAS

Para la extracción de DNA de bacterias, las cepas de bacterias se cultivaron en 3.0 mL de caldo nutritivo por separado y se incubaron a 30°C por 24 horas.

- **Lisis celular**

1. Añadir 1.5 mL de un cultivo overnight a un tubo de 1.5 mL.
2. Centrifugar a 9300 durante 5 minutos. Eliminar el sobrenadante.
3. Añadir 600 µL de Solución de Lisis (50 mM TRIS HCl pH 8.0, 50 mM EDTA pH 8.0, 1% SDS, 50 mM NaCl) al pellet celular y pipetear para resuspender y lisar las células.
4. Incubar las muestras a 80°C durante 5-10 minutos. Enfriar a temperatura ambiente.

- **Precipitación de proteínas**

1. Enfriar la muestra a temperatura ambiente.
2. Añadir 300 µL de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1).
3. Vortex vigorosamente durante 2 minutos.
4. Centrifugar a 12.000 rpm durante 6 minutos. Se observará que el precipitado proteico forma un pellet.
5. Pasar el sobrenadante que contiene el ADN a un tubo de 1.5 mL.
6. Adicionar 300 µL de cloroformo: isoamílico (24:1), centrifugar a 12.000 rpm durante 6 minutos

- **Precipitación del ADN**

1. Pasar el sobrenadante a un tubo de 1.5 mL.
2. Adicionar 600 µL de isopropanol (frío), mezclar por inversión varias veces. 20 minutos en refrigeración.
3. Centrifugar a 12.000 rpm durante 10 minutos.
4. Eliminar el sobrenadante. Añadir 600 µL de etanol 70% e invertir varias veces para lavar el pellet de ADN.
5. Centrifugar a 12.000 rpm durante 5 minutos. Cuidadosamente eliminar todo el etanol. Vigilar no perder el pellet de ADN.
6. Adicionar 600 µL de etanol 70% y centrifugar a 12.000 rpm durante 5 minutos. Cuidadosamente eliminar todo el etanol.
7. Invertir el tubo y dejar secar en papel absorbente durante 15 minutos para que se evapore el etanol.

- **Hidratación del ADN**

1. Añadir 50 µL de Agua destilada. Resuspender mediante micropipeta el pellet blanco.
2. La incubación a 55°C por 10 a 15 minutos puede ayudar a la disolución del ADN.

ANEXO 4 - EXTRACCIÓN DE ADN PLASMÍDICO

1. Las bacterias se siembran en medio líquido durante 24 horas a 30° en agitación con shaker (180 rpm).
2. Tomar en tubos eppendorf la muestra de cultivo y llevar a centrifugación.
3. Obtener el pellet y resuspender en 100 μ L con solución tampón (Tris-HCL 50 Mm, pH 8.0, Acetato de amonio 2,5 M, tritón X-100 al 4% y EDTA 62.5 Mm).
4. Posteriormente agregar 300 μ L de fenol-cloroformo-isoamílico (25:24:1).
5. Centrifugar por 10 minutos a 4°C 12000 rpm. Pasar el sobrenadante a un tubo de 1.5 mL.
6. Agregar 300 μ L de cloroformo-isoamílico, donde se obtendrá dos fases; la fase acuosa se separa con pipeta y se agrega 300 μ L de etanol absoluto (frío), dejar 20 minutos a -20°C.
7. Centrifugar por 10 minutos a 4°C a 12000 rpm. Pasar el sobrenadante a un tubo de 1.5 mL.
8. El DNA se lava 3 veces con 500 μ L de etanol al 70%, centrifugando cada paso por 5 minutos a 4°C a 4000 rpm.
9. Descartar el sobrenadante cuidadosamente, sin perder el ADN.
10. Resuspender el DNA en 50 μ L de agua DDE.
11. El DNA se almacena a -20°C.

