

UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

CAMPUS TUXTEPEC

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE PÉPTIDOOS CON ACTIVIDAD ANTIPROLIFERATIVA DE CRISTALES PROTEICOS PRODUCIDOS POR CEPAS DE *Bacillus thuringiensis* AX y A34

T E S I S

Para obtener el grado

MAESTRO EN BIOTECNOLOGÍA

Presenta

Erick De Jesus Manzano Reyes

Director de tesis

Dr. Miguel Ángel Peña Rico

Co-Director:

Dra. Ana Karin Navarro Martinez

Tuxtepec Oaxaca, 2019



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

OFICIO	DEP/2019/075
ASUNTO	Autorización de impresión de tesis

San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, México a 13 de febrero de 2019

L. P. YESENIA BARRIENTOS ARENAL
JEFA DE SERVICIOS ESCOLARES
UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

Sirva la presente para informarle que el jurado del examen para obtener el grado de Maestro en Biotecnología del **C. Erick de Jesús Manzano Reyes**, matrícula **16140006**, ha autorizado la impresión del manuscrito que lleva por título "**Aislamiento e identificación de péptidos con actividad antiproliferativa de cristales proteicos producidos por cepas de *Bacillus thuringiensis* AX y A34**" para su posterior presentación y defensa por parte del sustentante.

De antemano agradezco su atención, sin más que agregar, quedo a sus órdenes.



Atentamente

terra uberrima, mens aperta
Bou Lo-tama, chí jí jú

Dr. Adolfo López Torres

Jefe de la División de Estudios de Posgrado

C.c.p. C. Erick de Jesús Manzano Reyes
C.c.p. Archivo

CAMPUS TUXTEPEC
C. Circuito central No. 200, Col. Parque Industrial.
C.P. 38301, Tuxtepec, Oax.
Tel. 01(287)8759240

www.unpa.edu.mx

CAMPUS LOMA BONITA
Av. Ferrocarril S/N, Ciudad universitaria.
C.P. 68400, Loma Bonita, Oax.
Tel. 01(281)8729230



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA

OFICIO	DEP/2019/MBt/002
ASUNTO	Revisión de tesis

San Juan Bautista Tuxtepec, Oax., a 31 de enero de 2019

C. ERICK DE JESÚS MANZANO REYES
ESTUDIANTE DE LA MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA
UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

Por este medio le informo que el jurado de su examen para obtener el grado de Maestría en Biotecnología estará integrado por los siguientes investigadores.

Dr. Edgar García López	Cátedras CONACYT	Presidente
Dra. Karla Viridiana Castro Cerritos	Posdoctorado PRODEP	Vocal
Dr. Miguel Ángel Peña Rico	UNPA	Secretario
Dr. Enrique Villalobos Amador	UNPA	1er Suplente
Dra. Ariana Arlene Huerta Heredia	Cátedras CONACYT	2do Suplente

Sin más por el momento, le envío saludos cordiales.

Atentamente

terra uberrima, mens aperta
Bou Lo-tama, chí ji jú



Dr. Adolfo López Torres
Jefe de la División de Estudios
de Posgrado

M. en C. Héctor López Arjona
Vice-rector Académico

Vo. Bo.

**VICE-RECTORIA
ACADEMICA**

C.c.p. Dr. Miguel Ángel Peña Rico – Director de tesis
C.c.p. L. P. Yesenia Barrientos Arenal – Jefe de Servicios Escolares
C.c.p. Archivo

CAMPUS TUXTEPEC

C. Circuito central No. 200, Col. Parque Industrial.
C.P. 38301, Tuxtepec, Oax.
Tel. 01(287)8759240

www.unpa.edu.mx

CAMPUS LOMA BONITA

Av. Ferrocarril S/N, Ciudad universitaria.
C.P. 68400, Loma Bonita, Oax.
Tel. 01(281)8729230

*Dedicado a la memoria de una mujer, madre y abuela, que pese a la
adversidad siempre tuvo tiempo de regalarme un consejo, anécdota y
una hermosa sonrisa.*

Descansa en paz abue.

Agradecimientos

A la beca CONACYT No 458258 (615686 No becario), por el apoyo permitirme continuar y culminar mis estudios de maestría.

A los fondos otorgados por CONACYT (CB-2015-01-258587) y las facilidades de análisis de LINAN (LN-2015-01-252013, INFRA-2015-01-252013 y LN-2016-271911).

A la Dra. Ana Karin Navarro, jefa del proyecto y Co-director de esta tesis, por la confianza depositada y los conocimientos proporcionados para llevar a cabo esta investigación.

Al Dr. Miguel A. Peña Rico por la dirección, consejos y observaciones otorgadas durante el desarrollo de este trabajo.

Al Dr. Erick A. Juárez Arellano y al M.C Manuel Aguilar Franco, por sus valiosas contribuciones, facilidades en el manejo de equipos, conocimiento y tiempo brindados para poder cumplir con los objetivos de esta investigación.

A los Doctores Enrique, Adolfo y Roberto integrantes del comité tutorial que dio seguimiento al desarrollo de este trabajo y por sus invaluable consejos para su culminación.

A la Universidad del Papaloapan por proporcionar un excelente lugar para el desarrollo de la ciencia y el conocimiento, y ser como mi segunda casa durante más de 7 años.

A mis amigos y compañeros por el tiempo compartido durante el desarrollo de este trabajo, donde además de experiencias laborales, los momentos y excentricidades realizadas son cosas que siempre prevalecerán. Crisanto, Alán, Daniel, Michell, Alain, Liz, Abril, los mejores siempre.

A Guadalupe por el cariño y amor demostrado, además de los momentos compartidos desde el inicio hasta el final de esta gran aventura.

Y finalmente, pero más importante, a mi familia en quien siempre podré encontrar apoyo. En especial a mi madre, a quien debo lo que soy, mis logros y todo mi reconocimiento.

Este trabajo fue desarrollado en los laboratorios de Bioprocesos, Biología Molecular y LINAN de la Universidad del Papaloapan. Con el apoyo del Laboratorio Central de Microscopía del instituto de Física de la UNAM

Resultados obtenidos de esta investigación, fueron presentados en la 5ª Reunión de Materiales, Nanotecnología y Ciencias Aplicadas llevada a cabo en la ciudad de Tuxtepec los días 6, 7 y 8 de Diciembre del 2018 Y en el IX Congreso Nacional de Cristalografía, XII Congreso Nacional de Microscopía y VIII Reunion de Usuarios de Luz Sincrotón. Llevado a cabo en la ciudad de Oaxaca del 20 al 25 de Octubre del 2018.

Contenido

Índice de tablas.....	iv
Índice de Figuras	v
Lista de abreviaturas	vii
Glosario de términos.....	viii
1. Resumen.....	1
2. Abstract.....	3
3. Introducción.....	4
4. Generalidades.....	5
4.1 <i>Bacillus thuringiensis</i> como herramienta biotecnológica	5
4.2 Proteínas parasporales	7
4.3 Parasporinas	9
4.4 Clasificación	10
4.5 Mecanismos de acción de las proteínas parasporales.....	11
4.6 Otras proteínas y péptidos de interés producidos por <i>Bt</i>	12
4.6.1 Bacteriocinas	12
4.6.2 Proteasas asociadas al cristal	13
4.7 Identificación de nuevas proteínas.....	14
5. Antecedentes	16
6. Justificación.....	18
7. Hipótesis	19
8. Objetivos	19
8.1 General	19
8.1 Específicos.....	19

9.	Metodología	20
9.1	Establecimiento de cultivos de <i>Bt</i> y cinéticas de crecimiento.....	21
9.2	Obtención de cristales parasporales	21
9.3	Determinación morfológica de los cristales parasporales	22
9.4	Análisis por difracción de rayos X de los cristales parasporales	22
9.5	Purificación de proteínas provenientes del cristal	23
9.6	Ensayos de citotoxicidad (MTT)	23
9.7	Búsqueda bioinformática en bases de datos.....	24
9.8	Diseño de oligonucleótidos	24
9.9	Extracción de material genético	25
9.10	Detección de genes <i>ps</i> por PCR punto final	25
9.11	Identificación de proteínas por espectrometría de masas.....	26
9.12	Análisis bioinformático de las secuencias de aminoácidos obtenidos ..	27
10.	Resultados y discusión.....	28
10.1	Cinéticas de crecimiento.....	28
10.2	Caracterización microscópica de cristales	30
10.2.1	Micrografías cepa control HD-73.....	30
10.2.2	Micrografías de las cepas A34 y AX con recubrimiento de carbón. 30	
10.2.1	Micrografías cepa A34 con recubrimiento de oro.	32
10.2.1	Micrografías cepa AX con recubrimiento de oro.....	33
10.2.2	Difractogramas de las cepas AX y A34.	35
10.3	Purificación de proteínas.....	37
10.4	Ensayos dosis respuesta de las proteínas aisladas.....	39
10.5	Detección de genes PS por PCR punto final	41

10.5.1	Detección de genes ps con oligonucleótidos reportados.....	41
10.6	Identificación de proteínas	43
10.6.1	Identificación de proteínas producidas por las cepas AX y A34	43
10.6.2	Péptidos obtenidos de la identificación de proteínas.....	46
10.7	Proteínas identificadas y su efecto contra el cáncer.	55
10.7.1	Factor de elongación TU	55
11.	Conclusiones	62
12.	Perspectivas del trabajo	63
13.	Anexos	64
13.1	Composición de las soluciones Stock.....	64
12.2	Protocolo de extracción DNA	64
12.2.1	Extracción de DNA Plasmídico.....	64
12.2.2	Extracción DNA genómico.....	65
12.3	Proceso de tinción y decoloración de geles de acrilamida.....	66
12.4	Protocolo para identificación de proteínas proporcionado por el laboratorio universitario de proteómica.	66
12.5	Oligonucleótidos reportados por Espino-Vázquez 2012	68
12.6	Identificación de proteínas	69
12.7	Alineamiento entre las secuencias de EF-TU y K-RAS.....	71
13	Bibliografía citada	74

Índice de tablas

Tabla 1: Cepas de <i>Bt</i> aisladas en la región del Papaloapan _____	16
Tabla 2: Composición del medio Gerry Rowe _____	21
Tabla 3. ID de las secuencias utilizadas en el análisis bioinformático _____	24
Tabla 7: Oligonucleótidos diseñados para cada grupo de PS _____	25
Tabla 4: Condiciones de reacción de PCR _____	26
Tabla 5 Componentes de la mezcla de reacción _____	26
Tabla 6: Tamaños de bandas de proteínas enviadas a secuenciación _____	26
Tabla 8: Proteínas identificadas _____	43
Tabla 9: Péptidos de la muestra AX-55 _____	46
Tabla 10: Péptidos obtenidos para la muestra AX-50 _____	48
Tabla 11: Péptidos obtenidos para la muestra AX-30 _____	49
Tabla 12: Péptidos obtenidos de la muestra A34-75 emparejada con Piruvato cinasa _____	51
Tabla 13: Péptidos obtenidos de la muestra A34-75 emparejada con Formiato acetil transferasa _____	52
Tabla 14: Péptidos obtenidos de la muestra A34-65 emparejada con la secuencia de una proteína no caracterizada _____	54
Tabla 15 Péptidos con actividad contra cáncer _____	60

Índice de Figuras

Figura 1. Micrografía a una cepa de Bt en estado de esporangio.	5
Figura 2. Diferentes organismos afectados por proteínas Cry.	6
Figura 3. Estructura típica de los tres dominios de las toxinas Cry.	8
Figura 4. Agrupamiento por estructura de las distintas proteínas Cry producidas por <i>B. thuringiensis</i>	9
Figura 5. Sistema de nomenclatura para proteínas producidas por <i>Bt</i>	10
Figura 6. Cinéticas de crecimiento de las cepas A) AX y B) A34.	29
Figura 7. Micrografías de cristales de Bt var Kurstaki cepa HD-73	30
Figura 8. Imagen de microscopia electrónica de barrido de la cepa A34 cubierta con carbono.	31
Figura 9. Imagen de microscopia electrónica de barrido de la cepa AX cubierta con carbono.	32
Figura 10. Imagen de microscopia electrónica de barrido de la cepa A34 a diferentes aumentos cubiertas con oro.	33
Figura 11. Imagen de microscopia electrónica de barrido de la cepa AX a diferentes aumentos cubiertas con oro.	34
Figura 12. Difractogramas de las muestras AX y A34 en diferentes cultivos.	36
Figura 13. Análisis electroforético de las proteínas parasporales de la cepa A34 de Bt.	38
Figura 14. Análisis electroforético de las proteínas parasporales de la cepa AX de Bt.	38
Figura 15. Viabilidad de células MCF-7 frente a las proteínas AX-50 y A34-65.	39
Figura 16. Viabilidad de células MCF-7 frente a proteínas purificadas de las cepas AX y A34	40

Figura 17. Análisis electroforético de los amplificadores con oligonucleótidos para los genes ps3 (A) y ps5 (B) de la cepa AX..	41
Figura 18. Análisis electroforético de los amplificadores de PS3 (A) y PS6 (B) de la cepa A34..	42
Figura 19: Proteínas identificadas por porcentaje de cobertura de secuencia	45
Figura 20. Ubicación de cobertura de péptidos obtenidos de la muestra AX-55... ..	47
Figura 21. Ubicación de cobertura de péptidos de la muestra AX-50.	48
Figura 22. Ubicación de cobertura de péptidos de la muestra AX-30.	49
Figura 23. Ubicación de cobertura de péptidos de la muestra A34-75 emparejada con Piruvato cinasa.	51
Figura 24. Ubicación de cobertura de péptidos de la muestra A34-75 emparejada con Formiato acetil transferasa.	53
Figura 25. Ubicación de péptidos de la muestra A34-65 emparejada con la secuencia de una proteína no caracterizada.....	55
Figura 26. Comparación de las estructuras tridimensionales.....	57
Figura 27. Comparación entre estructuras EF-TU, modelos generados y K-Ras.	59

Lista de abreviaturas

μL: microlitro

a.a: aminoácido

A34-1: A34-75 banda proteica de 75 KDa

A34-2: A34-65 banda proteica de 65 KDa

ALDH: Aldehído deshidrogenasa

AX-1: AX-55 banda proteica de 55 KDa

AX-2: AX-50 banda proteica de 50 KDa

BCN: Bacteriocinas

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool

Bt: *Bacillus thuringiensis*

DRX: Difracción de rayos X

EF-TU: Proteína Factor de elongación Tu (Elongation Factor-TU)

h: hora

KDa: Kilo Dalton

LC: Cromatografía de líquidos

LC-MS: Cromatografía de líquidos acoplada a masas

MEB: Microscopía Electrónica de Barrido

mg: miligramo

mL: mililitro

MS: Espectrometría de masas

MTT: Sal de tetrazolio Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio

NCBI: National Center of Biotechnology Information

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PDB: Protein Data Bank (base de datos)

PS: Parasporina

SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida con duodecilsulfato sódico

Glosario de términos

Inclusión parasporal: Cristales de naturaleza proteica producidos por *Bt*.

Proteína Cry: Proteína formadora de cristales producidas por *Bt* con actividad específica a diferentes órdenes de insectos.

Parasporina: Proteína Cry con actividad específica contra células cancerígenas.

Oligopéptido: secuencia de 10 o más péptidos (péptido como unidad 2 a.a), incluyendo proteínas.

Control biológico: Método de control de plagas que usa depredadores, parásitos, herbívoros u otros medios naturales.

δ -endotoxinas: Término empleado para referirse a las proteínas que componen los cristales parasporales producidos por *Bt*.

Actividad antiproliferativa: Actividad citotóxica que detiene el crecimiento de células, en este caso, cancerígenas.

1. RESUMEN

Bacillus thuringiensis es una bacteria ampliamente estudiada debido a su uso como bioinsecticida sobre diferentes tipos de insectos plaga. En los últimos años, se ha descrito que algunas proteínas Cry producidas por esta bacteria, llamadas y reclasificadas como parasporinas, tienen la capacidad específica de inhibir la proliferación de diferentes líneas celulares cancerígenas. En la Universidad del Papaloapan se han aislado cepas de este bacilo (AX y A34), de las que se han obtenido proteínas con actividad contra líneas celulares de cáncer de mama (MCF-7), sin embargo, dichas proteínas no han sido caracterizadas por lo que no se tiene mayor información acerca de los posibles mecanismos de acción de la actividad mostrada. El objetivo principal de este trabajo fue identificar y clasificar estas proteínas, para lo cual se buscó detectar los genes responsables de su producción, así como la morfología de los cristales en el que se liberan dichas proteínas, y obtener la secuencia peptídica de las mismas. Los resultados obtenidos muestran que de las bandas proteicas obtenidas, la producida por la cepa AX de 50 kDa aproximadamente tiene el mayor efecto antiproliferativo, inhibiendo el crecimiento de las células MCF-7 en un 90% aproximadamente. También se encontró que los cristales producidos por estas cepas, presentaron morfologías irregulares y semiesféricas, mientras que no se identificaron genes de proteínas Cry. La identificación de las proteínas por espectrometría de masas permitió identificar fragmentos peptídicos de las proteínas Aldehído deshidrogenasa, Factor de elongación TU y Represor pleiotropico CodY a partir de la cepa AX, mientras que se identificaron péptidos de Piruvato cinasa, Formiato acetil transferasa y una secuencia no caracterizada de *Bacillus thuringiensis* para las bandas de la cepa A34. Esto proporcionó la información necesaria para sugerir que la actividad de dichas bandas, se debía a proteínas implícitas en el metabolismo primario de *Bacillus thuringiensis*, siendo la de mayor actividad (50 KDa) el Factor de elongación TU. No obstante, se han encontrado reportes donde algunas de estas proteínas indentificadas (intrínsecas de las células), participan como reguladores y promotores (+ y/o -) de la proliferación de células cancerígenas. No existe información sobre el efecto antagonistas que las proteínas identificadas en esta

investigación, ejercen sobre células cancerígenas. Mediante este trabajo se pudieron identificar proteínas participes del metabolismo primario de *Bacillus thuringiensis* con efecto antagonista sobre células MCF-7 de cáncer de mama, las cuales no pueden ser clasificadas como proteínas Cry o parasporinas.

2. ABSTRACT

Bacillus thuringiensis is a bacterium widely studied, because have been used as a biopesticide against different types of insect pests. In recent years, it has been described that some Cry proteins from Bt, also called as parasporins, and that have specific ability to inhibit the proliferation of different cancer cell lines. The strains AX and A34 of Bt were isolated in the University of Papaloapan from which proteins with activity against breast cancer cell lines (MCF-7) have been obtained. However, these polipeptides have not been characterized, this is, we unknow if these proteins are parasporins or some other protein. The main objective of this work was to identify and classify these proteins, starting of with detect the genes responsible for their production, as well as the determinated of morphology of the crystal of protein, from which polipeptides are released, and obtain the peptide sequence of them. The results show that the proteins obtained of band of 50 KDa, produced by the strain AX had greater antiproliferative effect, inhibiting the growth of MCF-7 cells by about 90%. We also found that the crystals produced by these strains showed irregular morphologies hemispherical, while genes of PS proteins were not identified. The identification of the proteins by mass spectrometry allowed to identify peptide fragments of the proteins Aldehyde dehydrogenase, Elongation factor-TU and pleiotropic repressor CodY from the AX strain. Another hand, pyruvate kinase peptides, formate acetyl transferase and an uncharacterized sequence of *Bacillus thuringiensis* were identified for the bands of strain A34. This provided the necessary information to show that the activity of these bands was due to proteins implicit in the primary metabolism of *Bacillus thuringiensis*, being the most active (50 KDa) the Elongation factor-TU. However, reports have been found where some of these identified (intrinsic cells), proteins participate as regulators and promoters (positive and/or negative) of the proliferation of cancer cells, there is no information on the antagonistic effect that the proteins identified in this research have on cancer cells. In this work, has been identified proteins participate primary metabolism of *Bacillus thuringiensis* with antagonistic effect on MCF-7 breast cancer cells, which cannot be classified as Cry or parasporins proteins.

3. INTRODUCCIÓN

Bacillus thuringiensis (*Bt*) es una bacteria gram positiva, que pertenece al grupo de *Bacillus cereus* junto a otras 5 especies: *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus pseudomycoides* y *B. weihenstephanensi* (Xu et al., 2014). Sin embargo, *Bt*, a diferencia de estos otros miembros del grupo, produce inclusiones parasporales de formas irregulares, naturaleza proteica y en forma de cristales durante la fase esporulativa, con propiedades insecticida, considerándolo un patógeno oportunista (De Maagd et al., 2001).

Se sabe que las inclusiones parasporales producidas por *Bt*, pueden estar formadas por diversas proteínas, en su mayoría δ -endotoxinas también llamadas Cry o Cyt. Estas proteínas tienen distintas clasificaciones dependiendo de su porcentaje de homología en su estructura primaria, así como la forma de los cristales (Bravo et al., 2007; Palma et al., 2014).

Algunas de las proteínas Cry que no tuvieron propiedades insecticida, han demostrado tener actividad antiproliferativa sobre distintas líneas celulares de cáncer (Mizuki et al., 2000; Okumura et al., 2008; Yasutake et al., 2006). Estas proteínas Cry, han recibido una nueva clasificación llamada Parasporinas (PS), basada en el mismo principio de la clasificación de las proteínas Cry, es decir, en el porcentaje de homología de la cadena polipeptídica (Okumura et al., 2010).

A pesar de que se ha descrito la maquinaria de toxicidad de *Bt* a través de las proteínas Cry, Cyt y las parasporinas, se sabe que cuenta con otros oligopéptidos que pueden contribuir directa o indirectamente con la toxicidad de dichas proteínas (Raymond et al., 2010). Sin embargo, de muchas de estas proteínas aún no se ha descrito si estas macromoléculas, por si solas, pueden desencadenar una reacción sobre los distintos blancos que atacan las endotoxinas.

4. GENERALIDADES

4.1 *Bacillus thuringiensis* como herramienta biotecnológica

Bt es una bacteria ubicua, gram positiva, de forma bacilar (en forma de bastón) y esporulante, que ha sido aislada de una gran diversidad de ecosistemas (Raymond, 2010). Fue aislada por primera vez a partir de la palomilla mediterránea de la harina *Anagasta kuehniella* en la región de Thuringia, Alemania, por la cual recibe su nombre (Okassov et al., 2015).

Los distintos aislados de *Bt* presentan en general características bioquímicas comunes; poseen la capacidad de fermentar glucosa, fructosa, trealosa, maltosa y ribosa, y de hidrolizar gelatina, almidón, glucógeno, esculina y N-acetil-glucosamina (Sauka and Benintende, 2008). Sin embargo, su característica más importante es la capacidad de producir cristales de naturaleza proteica con actividad insecticida (Figura 1), con lo cual se ha convertido en uno de los mejores organismos utilizados para el control biológico (Palma et al., 2014).

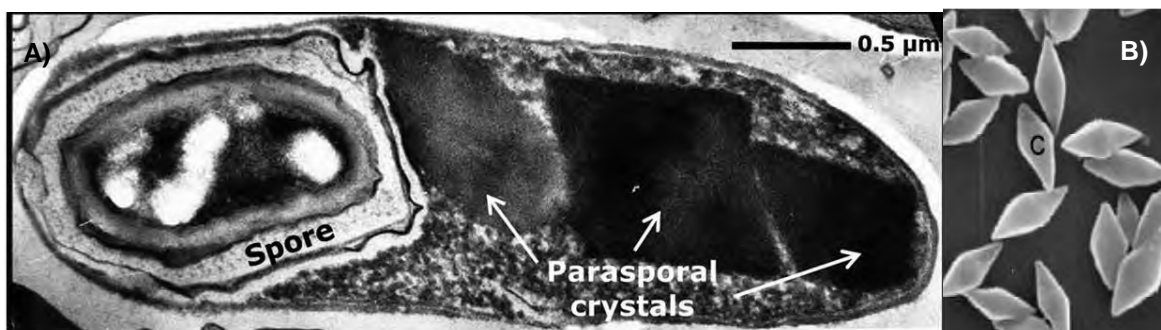


Figura 1. Micrografía a una cepa de *Bt* en estado de esporangio. A) Cepa C18 subs. *morrisoni* en la que se observan la espora y cristales parasporales (Spore= estructura de la espora; Parasporal crystals= cristales parasporales). B) Cristales de forma Bipiramidal producidos por la cepa NT0423 subs. *kurstaki*. Fotos tomadas y modificadas de Bulla et al., 2010; Roh et al., 2007.

Durante los últimos 50 años, *Bt* ha sido utilizado de forma segura para el control de entomopatógenos del orden Lepidóptera, Coleóptera y Díptera en diferentes cultivos gracias a las proteínas con actividad insecticida que produce y libera al medio en forma de cristales (Bravo et al., 2007; Guerrero et al., 2004). Estas moléculas conjuntan un grupo diverso y heterogéneo, también conocido como δ -

endotoxinas (Crickmore et al., 1998), divididas en dos grupos de proteínas: Cyt y Cry. Por un lado, Cry presenta alta especificidad contra insectos de diferentes géneros y especies de importancia agronómica, ver figura 2 (Boonserm et al., 2004; Palma and Berry, 2016). Aunque los productos desarrollados a partir de *Bt* son los biopesticidas más exitosos para el control de insectos, la mayor aplicación de *Bt* para el control de plagas en los cultivos, es a través de plantas transgénicas que producen proteínas Cry, particularmente maíz y algodón (Adang et al., 2014)

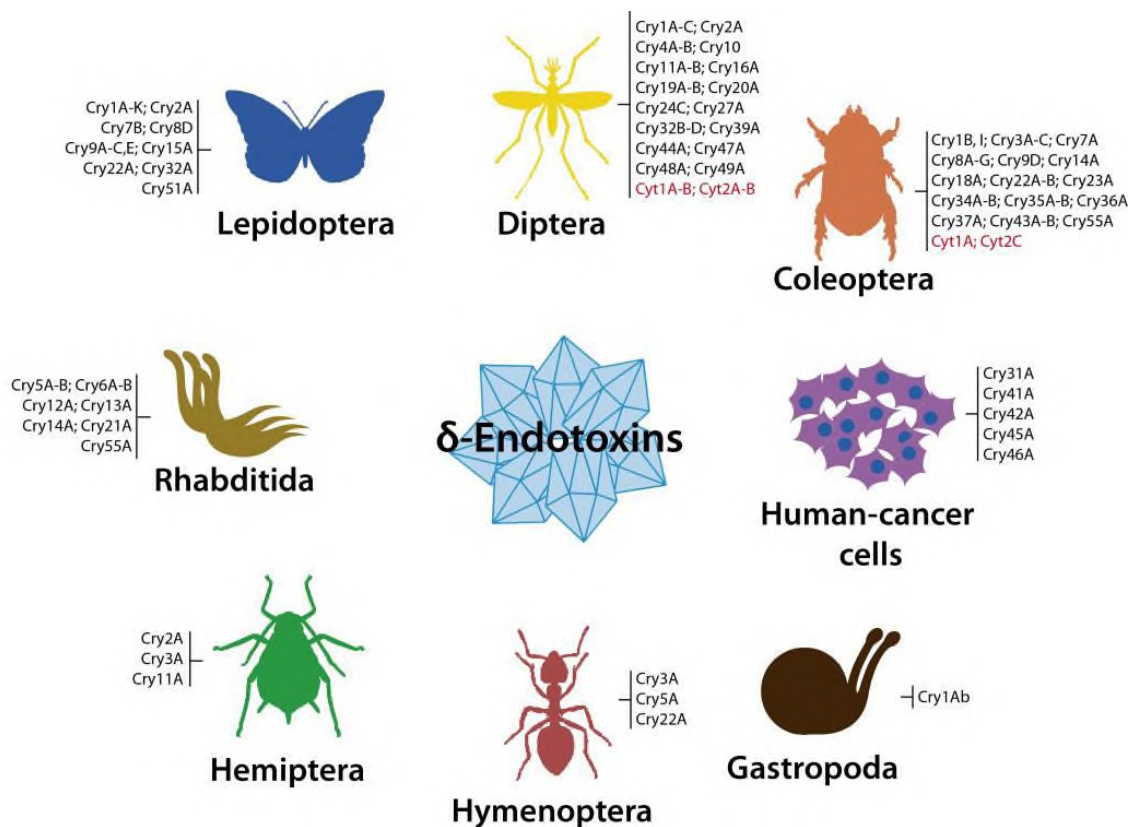


Figura 2. Diferentes organismos afectados por proteínas Cry. Imagen tomada de Palma et al., 2014.

Algunas de las proteínas que comparte homología con las proteínas Cry, no presentan actividad insecticida, no obstante, estudios han revelado que estos polipéptidos presentan actividad antagonista contra otros organismos como tricomonas (Kondo, 2002; Palma et al., 2014), y algunas otras especies de diferente

orden, así como, actividad antiproliferativa contra células cancerígenas (Mizuki et al., 2000).

4.2 Proteínas parasporales

Bt durante su fase esporulativa, produce δ -endotoxinas en forma de inclusiones cristaloides, estas proteínas, anteriormente eran clasificadas en 2 grandes grupos Cyt y Cry (Namba et al., 2003) en la que se incluían proteínas con y sin actividad insecticida. En la actualidad, se consideran 3 grupos distintos con diferentes aplicaciones: Cyt y Cry con alta especificidad hacia insectos (Jisha et al., 2013) y las Parasporinas (PS). Estas han tomado importancia en los últimos años, debido a su actividad antiproliferativa contra líneas de células tumorales (Mizuki et al., 2000; Ohba et al., 2009; Okumura et al., 2008).

Los cristales formados por las δ -endotoxinas, comprenden 20-30% del peso seco de las células (Bulla et al., 1979). Estos cristales deben ser solubilizados por el medio básico del sistema digestivo de los insectos para que se liberen los fragmentos tóxicos con actividad insecticida (en el caso de las proteínas Cry). De la misma forma las PS, deben sufrir un proceso de solubilización *in vitro*, para liberar los fragmentos con propiedades antiproliferativa (Akiba and Okumura, 2016; Bravo et al., 2013)

Las proteínas que pertenecen a la familia de toxinas Cry están formadas estructuralmente por tres dominios altamente conservados, sin embargo, presentan algunas diferencias en sus secuencias de aminoácidos entre dichas familias (Adang et al., 2014; Palma et al., 2014; Palma and Berry, 2016).

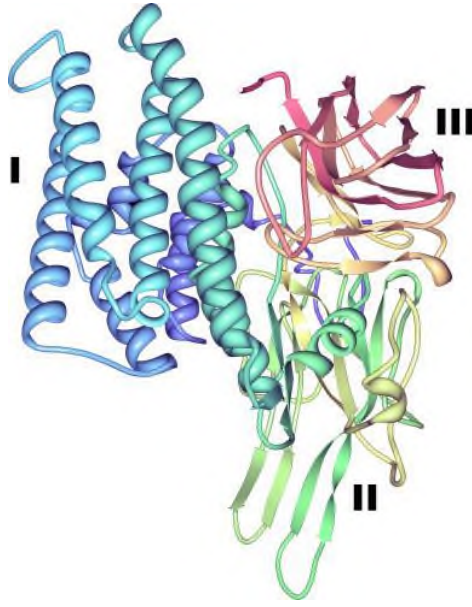


Figura 3. Estructura típica de los tres dominios de las toxinas Cry. La estructura tridimensional mostrada, pertenece a la proteína Cry2Aa, y es representativa de las toxinas Cry de 3 dominios producidas por *Bt*. Imagen tomada de Palma et al. (2014).

En la Figura 3 se muestra la conformación estructural típica de 3 dominios de las δ -endotoxinas. El dominio I o perforante, situado hacia el extremo N-terminal, se constituye por un grupo de 7 α -hélices, las cuales se someten a hidrólisis durante la solubilización, a este dominio se le atribuye la inserción a la membrana por parte de la toxina, y la formación de poro. El dominio II o central, está formado por 3 β -láminas antiparalelas, y tiene un rol importante en las interacciones toxina-receptores. Por último, el dominio III, puede ser escindido por activación proteolítica en algunas proteínas, su función está relacionada a las interacciones con los receptores y la formación de poro en las membranas (Palma and Berry, 2016).

Además de la mayoría de proteínas Cry que presentan este tipo de estructura como se muestra en la figura 4(A) en azul, existen casos de toxinas que tienen una conformación tridimensional distinta, ejemplo de ellas son las proteínas que están estructuradas de forma similar a las toxinas Épsilon (ETX's) de *Clostridium perfringens* (por ejemplo Cry15, Cry33, Cry45), de la misma forma, se ha reportado que la proteína Cry34 presenta una estructura similar a la aerolysina producida por *Aeromonas hydrophila*. No obstante, también existen proteínas que no tienen una relación estructural a otras conocidas.

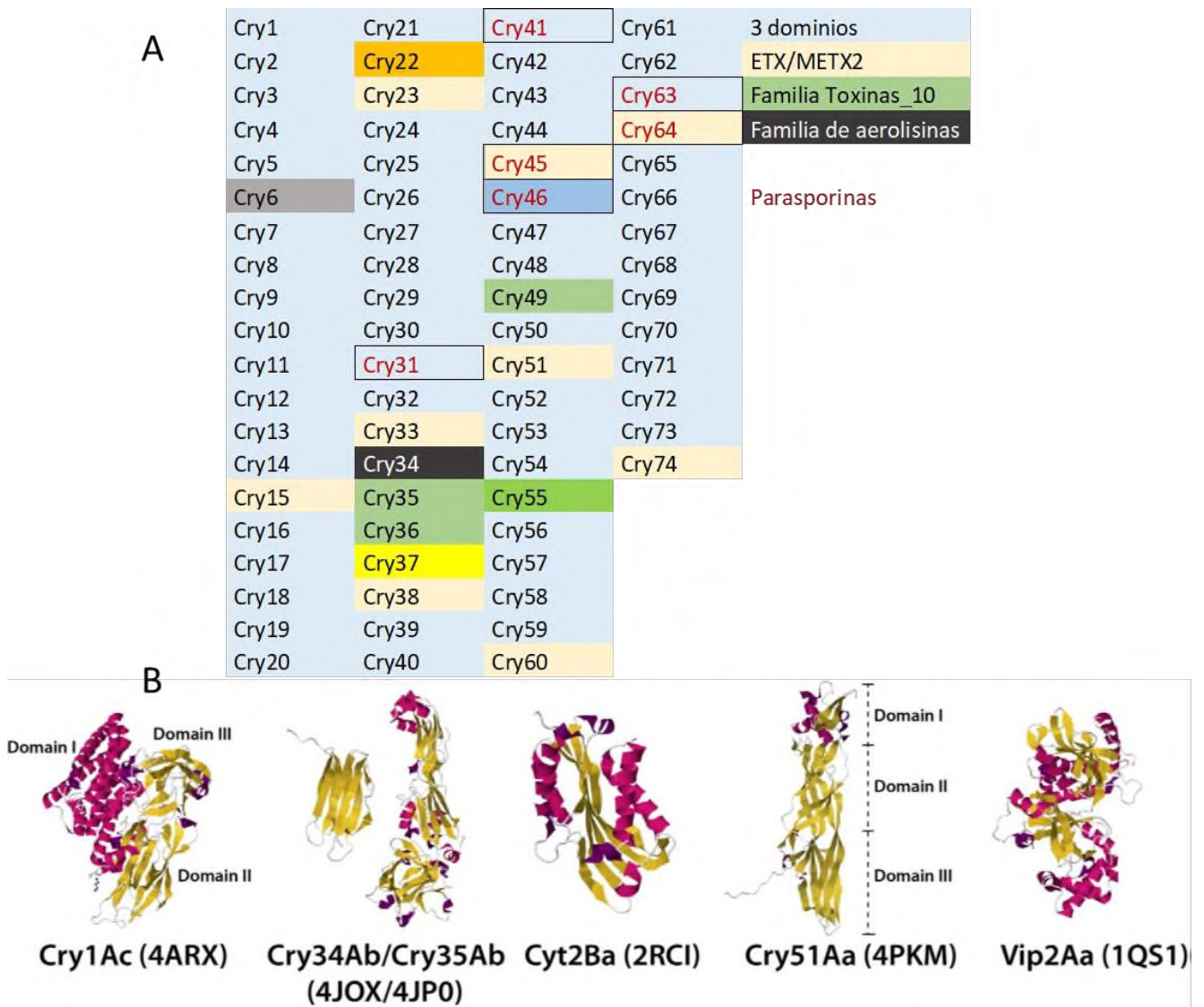


Figura 4. Agrupamiento por estructura de las distintas proteínas Cry producidas por *Bt* imágenes modificadas de Adang et al., 2014; Palma and Berry, 2016.

4.3 Parasporinas

Las PS se definen como: proteínas parasporales producidas por *Bt*, que no son hemolíticas y que preferencialmente tienen la capacidad de matar células cancerígenas (Katayama et al., 2005). Por lo tanto, las definiciones de PS y la toxina Cry no se excluyen mutuamente: algunas PS pueden ser capaces de matar a plagas de insectos y células cancerosas (Akiba and Okumura, 2016).

La capacidad antiproliferativa de las PS fue descrita por primera vez en 1999, cuando se encontraron proteínas *Cry* sin actividad insecticida, pero sí con efecto antagonista sobre células T leucémicas T (Mizuki et al., 1999). Estas cepas no hemolíticas pero tóxicas para las células leucémicas, pertenecían a varios serovares, incluyendo *dakota*, *neoleonensis*, *shandongiensis*, *coreanensis* y otros serogrupos no identificados (Mizuki et al., 1999; Okassov et al., 2015). Las inclusiones parasporales purificadas de 3 cepas seleccionadas, mostraron actividad contra células tumorales de leucemia de células T (Mizuki et al., 1999). Además fueron capaces de discriminar entre las células tumorales de leucemia y las células T normales, matando específicamente las células leucémicas, a partir de esto, investigadores concluyen en la posibilidad de introducir a las PS, como alternativa terapéutica (Okassov et al., 2015).

4.4 Clasificación

El Comité para la Clasificación y Nomenclatura de las Parasporinas (Committee of Parasporin Classification and Nomenclature), clasifica a las PS en 6 grupos distintos (PS1-PS6), y siguen el mismo patrón de nomenclatura en base a la identidad en la cadena polipeptídica de las proteínas *Cry* (Figura 5) (Okumura et al., 2010). Cabe mencionar que las parasporinas anteriormente recibían el nombre y clasificación de *Cry* (Figura 4 A).



Figura 5. Sistema de nomenclatura para proteínas producidas por *Bt*. Adaptada de Palma et al. (2014).

El nombre de las toxinas se basa únicamente en la identidad de la secuencia de aminoácidos y no tiene en cuenta su toxicidad, sean δ -endotoxinas (Cry, Cyt o PS) o exotoxinas (Vip o Sip) (Palma et al., 2014); Por lo tanto, las toxinas que son activas contra el mismo orden de insectos (tal es el caso de las Cry), no necesariamente comparten similitud en sus nombres. El nombre de una toxina consta de cuatro niveles, por ejemplo, para Cry41Ab1 el primer número es el nivel primario y todas las toxinas que comparten este primer número (41 en el ejemplo anterior) compartirán identidad significativa en la secuencia de aminoácidos (a.a), de al menos 45%. Las toxinas que comparten los descriptores del nivel primario, secundario y terciario tendrán una identidad de secuencia creciente. Las que difieren solamente en el descriptor del nivel cuaternario (por ejemplo, Cry41Ab1 y Cry41Ab2) tendrán al menos un 95% de identidad de secuencia (Adang et al., 2014).

4.5 Mecanismos de acción de las proteínas parasporales

Existe poca evidencia de los mecanismos de acción de las PS sobre las células diana, sin embargo, se conoce que no todas actúan de forma similar. Particularmente, las PS1, aumentan la concentración de iones Ca^{+2} , desencadenando la muerte celular denominada apoptosis, el incremento de este ion conduce a la formación de poros en la membrana a causa de la proteína, y el subsecuente desequilibrio osmótico (Katayama et al., 2007). Para las PS de 3 dominios (Parasporinas 3 y 6), existe poca información al respecto, aunque en la mayoría de ensayos se presenta el mismo efecto de hinchazón de las células y la formación de poros (Adang et al., 2014).

En el caso de las PS2, que forman parte del grupo similar a la familia de ETX (Akiba et al., 2009). Se cree que su mecanismo de acción, está dado por la formación de poros en diferentes pasos; primero, se da el anclaje a receptores de membrana, los cuales se encuentran en los embalses lipídicos de la membrana, posteriormente una concentración de las toxinas en esta región membranal, ocasionando, por último, la formación de poros que dañan la permeabilidad de la membrana (Kitada et al, 2009)

4.6 Otras proteínas y péptidos de interés producidos por *Bt*

4.6.1 Bacteriocinas

Generalmente al hablar de proteínas producidas por *Bt*, es común referirse a las proteínas cristal involucradas en procesos que afecten a los insectos u otros organismos así como a las proteínas Cyt hemolíticas (Barboza-Corona et al., 2007; Bravo et al, 2007), y recientemente las PS que atacan a células cancerígenas (Akiba and Okumura, 2016). Sin embargo, al igual que muchas otras bacterias, *Bt* cuenta con la facultad de producir algunas bacteriocinas (BCN) para garantizar su crecimiento en el medio en que se encuentre y no verse afectado por otros organismos (Ahern, et al., 2003). El tipo de BCN producidas por *Bt* son conocidos como thuricinas y BLIS (por sus siglas en inglés Bacteriocin-like inhibitors substances), ambas corresponden a péptidos pequeños que inhiben el crecimiento de otras bacterias (Barboza-Corona et al., 2007).

Para el caso de algunas thuricinas se ha descrito su efecto específico sobre organismos del mismo grupo de *Bacillus cereus* así como otras cepas de la misma especie *Bt*, por lo qué, la liberación de estos péptidos favorecería al aislamiento e identificación de cepas específicas en medio natural (Ahern, et al., 2003; Cherif et al., 2001). La producción de estos péptidos se da durante la fase exponencial del cultivo, manteniéndose constante hasta la fase estacionaria, y suelen ser altamente termoestables y resistentes a cambios de pH (Cherif et al., 2003; Kamoun et al., 2005). Rang et al., mencionan que genes codificantes de BCN se encuentran activos durante la producción de proteínas que conforman la maquinaria necesaria para desencadenar la actividad insecticida, sin embargo, al analizar el proteoma, dichas BCN no fueron encontradas (Rang et al., 2015). Al producirse durante la fase exponencial-estacionaria y por ser extracelular, no se tienen reportes de que péptidos similares o pertenecientes a BCN, hayan sido encontrados en cristales proteicos, sin embargo, se tienen referencias, a que están involucradas durante los procesos infecciosos en insectos, donde la función que se especula, presentan estas biomoléculas, es la de garantizar la colonización de los nuevos bacilos

generados por las esporas recién eclosionadas en el tracto intestinal de los insectos (Palma and Berry, 2016; Raymond et al., 2010).

4.6.2 *Proteasas asociadas al cristal*

Distintos autores relatan la importancia de proteasas intracelulares y extracelulares producidas por *Bt* ya que están relacionadas con la síntesis de oligopéptidos y aminoácidos a través de proteólisis de proteínas extracelulares, que ya no son necesarias para las células en crecimiento vegetal, cuando se empieza a formar la espora, las serinas proteasas realzan modificación postraduccional de los precursores de proteínas cristalinas y esporas y con la hidrólisis de estructuras superficiales de las células para promover la liberación de las esporas (Brar et al., 2007; Carroll et al., 1989; Donovan et al., 1997). Ha sido descrito que diferentes proteasas pueden actuar de forma sinérgica durante el proceso de infección de las proteínas Cry sobre las células de los insectos, las cuales activan a las mismas proteínas Cry para realizar la perforación de membranas, o posteriormente a la infección, ayudando a la proliferación de esporas en el tracto intestinal de los insectos infectados (Raymond et al., 2010). Se ha reportado que al inhibir la síntesis de proteasas durante el cultivo de *Bt*, se observa la ausencia de polipéptidos en el cristal proteico (Carroll et al., 1989), lo que abre pauta a la presencia de proteasas dentro de los cuerpos parasporales liberados al medio, al final del ciclo de vida de la bacteria, aunque se desconoce si la función de estas proteasas van más allá de la escisión de proteínas para generar los cristales, o si influyen en la disociación de los cristales y activación de las proteínas. También se ha observado que si se agregan proteasa (proteínasa K) al medio de crecimiento de *Bt*, la tasa de formación de cristales proteicos se ve reducida hasta no detectar la presencia de dichos cristales (Roldan-Sabino, 2017). Lo cual permite especular que la presencia de proteasas específicas producidas por *Bt*, dentro de los cristales, pueden tener una relación directa en la toxicidad de las proteínas que forman al cristal.

Con los datos anteriores en relación a proteínas que *Bt* produce independientes a los cristales, se ha descrito que guardan relación a la toxicidad en células de

insectos, sin embargo, no hay informes que describan mecanismos de acción que involucren la presencia de proteínas δ -endotoxinas, afectando células tumorales.

4.7 Identificación de nuevas proteínas

El avance de técnicas moleculares para la identificación, secuenciación de genes y proteínas, durante los últimos años, ha facilitado el descubrimiento y la caracterización de nuevas proteínas, así como la deducción de su mecanismo de acción. Anteriormente, la identificación de las toxinas Cry, se iniciaba con la caracterización de la proteína, seguido, de una extensa identificación y clonación de la secuencia del gen. Mientras más genes fueron clonados, mayor información se fue adquiriendo sobre las similitudes en sus secuencias (Adang et al., 2014).

En los últimos años, el uso de metodologías basadas en PCR, han hecho posible la identificación de nuevos genes Cry (Bravo et al., 1998). Hoy en día, el uso de softwares predictivos, facilita el hallazgo de estos genes en nuevas cepas, de las cuales no se tenían registros de que producían proteínas Cry. Así mismo, surgen datos teóricos sobre la conformación secuencial y estructural de las proteínas adjudicadas a estos genes. A la par, la secuenciación masiva del genoma de *Bt*, o los plásmidos en los que la proteína se encuentra, ha facilitado la generación de pipelines computacionales, que permiten la predicción e identificación de genes putativos para estas proteínas. Sin embargo estas tecnologías, limitan la identificación de secuencias genéticas de toxinas totalmente nuevas. (Adang et al., 2014). Una de las soluciones propuestas a estas problemáticas, era volver a analizar la proteína y posteriormente encontrar el gen responsable de su producción. Actualmente con las técnicas proteómicas más avanzadas, como la espectrometría de masas (Lee et al., 2006), se facilita la identificación de las toxinas putativas del cristal *Bt*, o mediante la expresión de proteínas en diferente fase de crecimiento del organismo (Adang et al., 2014; S. Huang et al., 2012).

Junto las herramientas y técnicas mencionadas, la cromatografía de líquidos acoplada a la espectrometría de masas (LC-MS), se ha convertido en la piedra angular para la detección y caracterización de metabolitos de muestras biológicas

complejas, así como, para obtener secuencias proteicas complejas (Rang et al., 2015; Schauer et al., 2005), por lo cual, es una propuesta viable para la identificación de la secuencia de nuevas parasporinas y proteínas con actividad biológica con diferentes aplicaciones producidas por *Bt*.

5. ANTECEDENTES

A nivel mundial, los seis diferentes tipos de parasporinas han podido ser identificados en distintos países (Gonzalez et al., 2011). Así como, dentro del territorio mexicano, se han aislado diferentes cepas productoras de proteínas Cry, en diversos ecosistemas, mientras que la identificación de los genes de estas proteínas, se ha realizado por PCR, dando como resultado, gran cantidad de diversas proteínas identificadas en el país (Bravo et al., 1998; Noguera and Ibarra, 2010), sin embargo, solo unas cuantas han sido relacionadas con actividad antiproliferativa sobre líneas celulares cancerígenas (Espino-Vazquez, 2012).

En la región del Papaloapan han sido aisladas distintas cepas de *Bt* (Tabla 1), de las cuales, se detectó que producen diferentes inclusiones parasporales (Cruz-Nolasco, 2014).

Tabla 1: Cepas de *Bt* aisladas en la región del Papaloapan.

Código	Clasificación serovar	Ecosistema de origen
AC-1	<i>Bacillus thuringiensis alesi</i>	Suelo no cultivado
AC-2		
A-9	ND	Suelo cultivado con plátano y caña
AC-3	<i>Bacillus thuringiensis higo</i>	Suelo cultivado con plátano
A-24	ND	
A-34	<i>Bacillus thuringiensis tolworthi</i>	Suelo cultivado con caña
A-X*	ND	

ND: Datos no determinados.

*Sólo se determinó que pertenecía a la especie *thuringiensis*.

Adaptada de Cruz-Nolasco (2014)

De las cepas A34 y AX, se identificaron dos bandas proteicas por cada cepa, de las que se describe que tienen actividad antiproliferativa contra las líneas celulares MCF-7 y MDA de cáncer de mama. Los tamaños de las toxinas solubilizadas con buffer de Laemmli, fue de 50-75 kDa (aproximadamente), a estas bandas proteicas con base a los antecedentes, fueron nombradas como PS, identificadas como PS A34-1 y A34-2 de la cepa A34, mientras que de la cepa AX, se nombraron PS AX-1 y AX-2 (Cruz-Nolasco, 2017).

De estas bandas proteicas solo fue descrita su actividad mediante ensayos citotóxicos con MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio), por lo que no han podido ser identificadas ni clasificadas como nuevas PS o Cry en su defecto, debido a esto, el presente trabajo tiene como objetivo identificar y clasificar las proteínas responsables de la actividad antiproliferativa.

6. JUSTIFICACIÓN

La región del Papaloapan es considerada un nicho de abundantes de recursos biotecnológicos, entre los que destacan los microorganismos, quienes juegan un papel importante, por ejemplo como sistemas de control biológico de plagas. Nuestro grupo de trabajo ha aislado de la región, distintas cepas de *Bt*. En las cuales se han podido identificar proteínas de diferentes pesos moleculares, y algunas han sido probadas contra distintas líneas celulares de cáncer de mama, presentando actividad antiproliferativa sobre éstas. Sin embargo, dichas proteínas no han podido ser identificadas ni caracterizadas según la nomenclatura reportada para las δ -endotoxinas. El hallazgo de estos polipéptidos representa una nueva alternativa en el campo terapéutico contra el cáncer. Por lo que, la determinación de la secuencia y estructura de dichas macromoléculas resulta vital para entender el posible mecanismo de acción de estos polipéptidos, involucrados con su actividad antiproliferativa, así como, dar la clasificación correspondiente al tipo de proteína del que trate. Lo que permitirá hacer uso de una herramienta con gran potencial biotecnológico en uno de los más importantes campos y con gran repercusión terapéutica, como lo es la lucha contra el cáncer. Por lo que este proyecto de investigación tiene como objetivo identificar estas proteínas que demostraron actividad antiproliferativa y poder clasificarlas.

7. HIPOTESIS

Los polipéptidos con actividad antiproliferativa contra células MCF-7 producidos por las cepas de *Bacillus thuringiensis* AX y A34, presentarán homología estructural como en la secuencia aminoacídica y nucleotídica a algún grupo de parasporinas reportadas.

8. OBJETIVOS

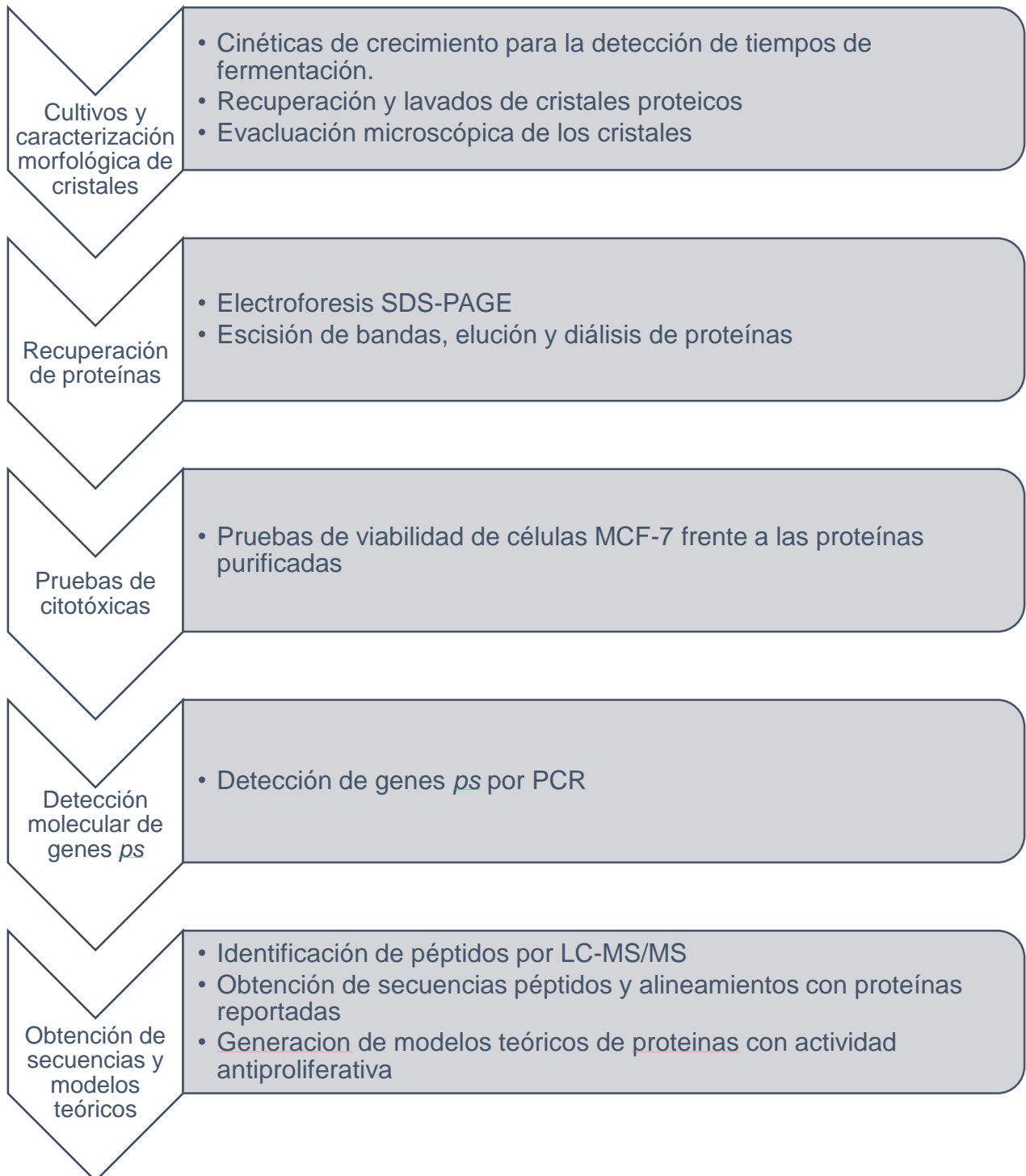
8.1 General

Identificar y clasificar a los polipéptidos AX-1, AX-2, A34-1 y A34-2 que presentan actividad antiproliferativa contra las líneas celulares de cáncer de mama.

8.1 Específicos

- Identificar los genes que codifican para los polipeptidos identificadas como AX-1, AX-2, A34-1 y A34-2.
- Caracterizar microscópicamente la morfología de los cristales parasporales que contienen a las polipeptidos con actividad antiproliferativa.
- Obtener la secuencia aminoacídica de las bandas proteicas producidas por las cepas A34 y AX.
- Proponer un modelo *in silico* de la estructura tridimensional de los polipéptidos con actividad antiproliferativa AX-1, AX-2, A34-1 y A34-2.

9. METODOLOGÍA



9.1 Establecimiento de cultivos de *Bt* y cinéticas de crecimiento

Las cepas A34 y AX de *Bt* se cultivaron en medio Gerry Rowe con la siguiente composición (Tabla 2).

Tabla 2: Composición del medio Gerry Rowe

Componente	Proporción (por cada 100 mL)
Glucosa	1.5 g
Extracto de levadura	0.32 g
Peptona caseína	0.32 g
Sol. Stock A (Cloruros)	1 mL
Sol. Stock B (Sulfatos)	1 mL
Sol. Stock C (Citratos)	1 mL
Sol. Stock D (Fosfatos)	1 mL

La composición de las soluciones stock (A, B, C y D) se muestran en el anexo 1. El medio fue ajustado a un pH de 7.4 para el óptimo crecimiento bacteriano y posteriormente esterilizado en autoclave 120 °C y 15 lb de presión. El medio fue inoculado con discos de papel filtro que contenían esporas viables de *Bt*. La cinética se llevó a cabo con mediciones a cada 8 horas durante un periodo de 88 horas en matraces con agitación de 180 rpm y a temperatura constante de 30 °C. En cada muestra (8 h) se midió la concentración de bacilos y esporas por cuenta directa en cámara de Neubauer, y con esta se determinaron los tiempos para la extracción de material genético es al momento que se alcanza la fase de transición entre la fase exponencial y la estacionaria, y los tiempos mínimos de esporulación al final de la fermentación.

9.2 Obtención de cristales parasporales

Se realizaron cultivos en matraz con agitación, en medio Gerry-Rowe y caldo nutritivo, durante 6-7 días a 30 °C y 180 rpm. Al término de la fermentación el mosto fue centrifugado a 5200 XG por 20 minutos en tubos centrifuga de 50 mL para la recolección de las esporas con los cristales. El precipitado obtenido de los cultivos en matraz corresponde a los elementos insolubles entre ellos, proteínas insolubles, fue lavado siguiendo la metodología propuesta por Cruz-Nolasco (2017), que incluye lavados por triplicado con solución isotónica al 0.85% (P/V) a 5200 XG, seguido de un segundo lavado por triplicado de agua acidificada a un pH de 2 y

5200 XG por 15 min. La pastilla resultante, la cual contiene en su mayoría cristales proteicos asociados a esporas y trazas de elementos insolubles, fue resuspendido en 10 mL de agua destilada estéril.

De la solución resultante, se tomaron 5 mL en tubos centrifuga de 50 mL de capacidad, estos se congelaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 h. Después del congelamiento, las muestras fueron liofilizadas por 24 h a una presión de 0.050 mBar a $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ en un liofilizador Labconco.

9.3 Determinación morfológica de los cristales parasporales

Para obtener micrografías por microscopía electrónica de barrido (MEB), se emplearon los sistemas de recubrimiento de carbono y de oro. Para el primero, las muestras se prepararon en dados de aluminio y se fijaron mediante cinta adhesiva de carbón, en la que se colocó la muestra liofilizada. Posteriormente se sometió a un recubrimiento de carbono al vacío en un evaporador. Dicho tratamiento fue usado para todas las muestras y fueron analizadas en un microscopio electrónico de barrido de bajo vacío JEOL JSM-5600LV en el departamento de microscopía del Instituto de Física de la UNAM. En cuanto a los recubrimientos de oro, se estudiaron muestras diferentes lotes de cultivos de *Bt*, las cuales fueron preparadas de forma similar en dados de aluminio, solo cambiando la fuente o elemento de cubrimiento. Se empleó un microscopio electrónico de barrido marca Phenom Pro Desktop Sem. Las micrografías resultantes permitieron determinar los tamaños promedio de los cristales empleando el software ImageJ de libre acceso.

9.4 Análisis por difracción de rayos X de los cristales parasporales

Con la finalidad de poder generar una caracterización más específica de los cristales las muestras liofilizadas, fueron llevadas a un Difractómetro de Rayos X (DRX) de polvos, para obtener los patrones de difracción de cada una de las muestras. Las muestras fueron analizadas en la región que va de 5° - 50° con 0.01° de tamaño de paso y 8 segundos por cada uno a 40 kV y 30 mA en el Angulo 2θ .

9.5 Purificación de proteínas provenientes del cristal

Para aislar y recuperar las proteínas de interés, una fracción del material lavado y resuspendido (0.7 mL), obtenido de los cultivos líquidos, fue solubilizado con buffer Laemmli 2X e incubado a 95°C por 5 min. Garantizando la disociación y liberación de las proteínas que forman los cristales.

Las muestras solubilizadas fueron cargadas en geles de poliacrilamida al 10% y 12% separadas por electroforesis a 150 V por 150 minutos. Los geles fueron teñidos con azul de coomasie durante toda la noche, posteriormente fueron lavados con soluciones desteñidoras (Anexo 3). Las bandas de interés fueron visualizadas y cortadas del gel para su recuperación. Adicional a las bandas de interés, fue cortada una banda de tamaño aproximado a 30 kDa. Las proteínas fueron eluidas mediante un electroelutor (BIORAD) a 10 mA durante 5 h, para separar las proteínas del gel de acrilamida. El producto de la elución, fue dializado con membranas (Dialysis sacks) con un tamaño de poro de 12 kDa.

9.6 Ensayos de citotoxicidad (MTT)

Una curva dosis respuesta fue realizada empleando diferentes concentraciones de proteínas (0, 6, 9, 12 y 15 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) en la línea celular MCF-7 de cáncer de mama siguiendo el protocolo reportado por Cruz-Nolasco en 2017. Para ello se cultivaron 2×10^4 células en placas de 96 pozos con medio DMEM suplementado con suero fetal bovino (10%), y se incubaron a 37 °C con una atmósfera de 5% de CO_2 . Posteriormente, se agregó a cada pozo las concentraciones mencionadas anteriormente y se incubaron a 37 °C por 48 h. Posteriormente se realizó la prueba de MTT, para ello se añadieron 200 μL de MTT a una concentración 0.25 mg/mL, y esto fue incubado por 4 h.

Al término de la incubación, se retiró el sobrenadante y se agregaron 100 μL de isopropanol. Se hizo la lectura a una longitud de onda a 595 nm, y fueron realizados 3 ensayos independientes. Para el análisis estadístico se aplicó un ANOVA de una vía seguido de la prueba post hoc de Dunnett. Los valores con $p < 0.05$ fueron

considerados estadísticamente significantes. Siendo * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$.

9.7 Búsqueda bioinformática en bases de datos

A la par del establecimiento de los cultivos, se realizaron los análisis pertinentes con las secuencias de genes *ps* reportados en bases de datos. Se obtuvieron las distintas secuencias consenso de los diferentes grupos de PS (PS1-PS6), reportadas en el GeneBank del NCBI con los siguientes ID de acceso (Tabla 3).

Tabla 3. ID de las secuencias utilizadas en el análisis bioinformático.

<i>Grupo PS</i>	<i>Nombre PS</i>	<i>ID Acceso</i>	<i>Grupo PS</i>	<i>Nombre PS</i>	<i>ID Acceso</i>
<i>PS1</i>	PS1Aa1	AB031065.1	PS2	PS2Aa1	AB099515.1
	PS1Aa2	AY081052.1		PS2Aa2	AB454419.1
	PS1Aa3	AB250922.1		PS2Ab1	AB186914.1
	PS1Aa4	AB274826.1	PS3	PS3Aa1	AB116649.1
	PS1Aa5	AB274827.1		PS3Ab1	AB116651.1
	PS1Aa6	AB375062.1	PS4	PS4Aa1	AB180980.2
	PS1Ab1	AB250923.1	PS5	PS5Aa1	AB555650.1
	PS1Ab2	AB274825.1	PS6	PS6Aa1	AB375063.1
	PS1Ac1	AB276125.1			
	PS1Ac2	AB731600.1			
	PS1Ad1	AB375062.1			

Dichas secuencias se sometieron a alineamientos múltiples, empleando el software MEGA7, para identificar regiones homólogas entre los distintos genes *ps*, lo cual garantiza la especificidad de los oligonucleótidos para cada uno de los genes que codifican a los diferentes grupos de PS.

9.8 Diseño de oligonucleótidos

El alto porcentaje de identidad entre las secuencias reportadas de cada grupo, observada tras los alineamientos con el software MEGA7, y comprobados con el software online Clustal Omega, permitió el diseño específico de un par de oligonucleótidos para cada una de las 6 diferentes familias de *ps* (PS1-PS6). Estos

fueron diseñados con ayuda del software Primer-Blast del NCBI, para detectar las regiones específicas a cada grupo de ps. En el caso de los primers diseñados para identificar el gen *ps4*, el oligonucleótido directo, se empareja en una región no codificante de la secuencia AB180980.2, mientras que el reverso cubre hasta el codón 23 de la región *N*-Terminal de la secuencia de a.a. reportada. Los oligonucleótidos fueron sintetizados por la unidad de síntesis del Instituto de Biotecnología (IBT) de la UNAM. Los oligonucleótidos diseñados para este trabajo se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 4: Oligonucleótidos diseñados para cada grupo de PS

Grupo PS		Secuencia 5' a 3'	%G-C	Tamaño	Tm	Amp
PS1	F	ACCTCCTGAGACTAACATGAGC	50	22	56	651 pb
	R	CCCCACACAGAAGTCGTTGC	60	20	58.8	
PS2	F	CAATCCACTACAGACGTTATTCG	43	23	53.4	115 pb
	R	CGGGATTAGTACCATAAATAGAGG	42	24	52.2	
PS3	F	TTTGAACCTGTACGGGATAATTGC	42	24	55.5	236 pb
	R	GACACTTCCCCACCAGTACC	60	20	57.4	
PS4	F	CATCAAATAGAACACGGTCAATAGG	40	25	53.8	135 pb
	R	GTATCCCCTTGCAGCACACC	60	20	58.5	
PS5	F	GGCCCGTTTGTTGTTCCCTGC	60	20	59.9	53 pb
	R	GTGCCTTCCCTTGTATAGTTGC	48	23	56.1	
PS6	F	TAGGAACCACTATTGGAGGTGC	50	22	56.4	1117 pb
	R	GGAAGTCCAGCAACATTTACTCC	48	23	55.9	

9.9 Extracción de material genético

El DNA plasmídico se extrajo a partir de 1.5 mL de medio con *Bt*, tomados a las 32 horas de la fermentación, mediante el protocolo miniprep de lisis alcalina (Ausubel et al., 2003; Birnboim, 1983), así como, DNA genómico, esto mediante un protocolo de extracción con solventes orgánicos (Anexo 2).

La calidad del DNA se comprobó por corrimiento electroforético en geles de agarosa al 0.8 % a 90 V durante 40 minutos.

9.10 Detección de genes *ps* por PCR punto final

Se realizaron pruebas de PCR punto final con DNA genómico y plasmídico para la búsqueda de genes codificantes de parasporinas. Las condiciones de corrida y la composición de la mezcla de reacción se presentan en las tablas 4 y 5.

Tabla 5: Condiciones de reacción de PCR

Paso	T °C	Tiempo	N. ciclos
Desnaturalización inicial	95	3 m	
Desnaturalización	95	30 s	
Alineación	52	30 s	35
Extensión	72	30 s	
Extensión final	72	5 m	

Tabla 6 Componentes de la mezcla de reacción

Reactivo	Cantidad (µL)	Concentración
Buffer 10x	5	(10x)
MgCl ₂	2.5	50 mM
dNTPs	1	10 mM
Oligo directo	2	10 pmol/µL
Oligo reverso	2	10 pmol/µL
Muestra DNA	1	10-50 ng/µL
NZyTaq pol II	0.5	5 u/µL
H ₂ O libre de nucleasas	36	
Vol. final	50	

Los productos de PCR de cada uno de los genes evaluados se corrieron por electroforesis en gel de agarosa (3%) a 90 volts por 45 minutos, posteriormente fueron revelados con un fluoróforo (EpiQuik DNA Stain). Para visualizar las bandas obtenidas fueron observadas en un foto documentador (SYNGENE).

9.11 Identificación de proteínas por espectrometría de masas

Para conocer las secuencias de las proteínas de interés, se enviaron bandas cortadas directamente de geles de acrilamida al 10 y 12% de concentración, los tamaños de las bandas se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 7: Tamaños de bandas de proteínas enviadas a secuenciación.

Cepa	Muestra (Id)	Tamaño aproximado (kDa)
AX	AX-55	55
	AX-50	50
	AX-30	30
A34	A34-75	75
	A34-65	65
	A34-30	30

El protocolo empleado por el laboratorio de proteómica se encuentra en el anexo 4.

9.12 Análisis bioinformático de las secuencias de aminoácidos obtenidos

Las secuencias de los fragmentos peptídicos fueron analizadas con el programa Scaffold versión 4.8.8 (recomendado por el laboratorio de proteómica).

Los péptidos fueron seleccionados y recuperados tomando como parámetros de selección: 1) el porcentaje de probabilidad de identificación para cada péptido, 2) para cada proteína se empleó el porcentaje máximo de cobertura.

Los péptidos fueron analizados por separado mediante alineamientos múltiples y BLAST, para encontrar regiones homologas con proteínas Cry y PS. Asimismo, las secuencias de los péptidos fueron sometidas a un BLAST por homología de estructura secundaria en el servidor en línea de JPred (<http://www.compbio.dundee.ac.uk/jpred/>), donde el alineamiento obtenido, fue basado en las interacciones y propiedades fisicoquímicas de los péptidos, para la generación de estructuras secundarias. Por otra parte, se realizaron alineamientos de los péptidos obtenidos por secuenciación con péptidos identificados y reportados en la literatura, que tienen actividad membranalítica sobre células cancerígenas, y en específico contra líneas de cáncer de mama.

Para obtener los modelos de las secuencias de proteínas y péptidos obtenidos: primero se realizaron alineamientos por homología con JPred y se seleccionaron las secuencias proteicas con las que mejor valor de emparejamiento tuvieron, de estas secuencias fue descargada su estructura tridimensional del PDB (Protein Data Bank). Seguido a esto, mediante el software Chimera v1.12, se realizó el modelado por homología de nuestras secuencias, basado en la estructura 3D obtenidas del PDB. Para cada secuencia de interés se obtuvieron 20 modelos teóricos, de los que se seleccionó el que mejor puntaje de zDope obtuvo (mayor valor negativo) y de GA341 donde >0.7 es indicativo de una probabilidad $>95\%$ de que el modelo sea correcto (Pettersen et al., 2004; Yang et al., 2012).

10. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

10.1 Cinéticas de crecimiento

Se realizaron las cinéticas de crecimiento para las cepas AX y A34, para poder identificar los tiempos necesarios para obtener material genómico y al final de la fermentación, esporas junto con cristales parasporales. Las cinéticas de ambas cepas se realizaron midiendo por triplicado a cada 8 h, por cuenta directa en cámara, la concentración de esporas y bacilos como se presenta en la figura 6. En ambas cepas se observa el comportamiento típico de crecimiento de los microorganismos, una fase de adaptación durante las primeras 14 h, la exponencial de 14-30 h y la fase estacionaria 30-40 horas, para el caso de la cepa A34, esta se prolongó hasta la hora 50, y la fase de muerte, para la cepa A34 fue alrededor de las 72 h la concentración de bacilos fue mínima, mientras que la cepa AX al final de la fermentación (88 h) aún se podían encontrar bacilos viables. A partir de estas curvas se determinó que el tiempo necesario para obtener una buena concentración de material genómico, es entre las 28 y 32 h para ambas cepas. La cepa A34 reportó un crecimiento más acelerado, aproximadamente de 10 veces mayor que la cepa AX ($7 \times 10^9 > 8 \times 10^8$), y por lo tanto, el mismo comportamiento se reporta al final de la fermentación donde las esporas y los cristales se encuentran en mayor concentración en A34 que en AX. Sin embargo, una clara diferencia que se observa en la cepa AX es que al pasar la fase estacionaria y entrar en la fase de muerte (40 h), se ve una segunda fase estacionaria, la cual se prolonga hasta las 70 horas, el mismo fenómeno relaciona con la estabilidad en la presencia de esporas que se mantiene estable durante este mismo periodo. Durante la fase estacionaria, se sabe que la velocidad de muerte de los bacilos es igual a la velocidad de formación de nuevos bacilos a partir, de las esporas presentes en el cultivo, por lo cual, el aumento de la concentración de esporas no debería verse afectado.

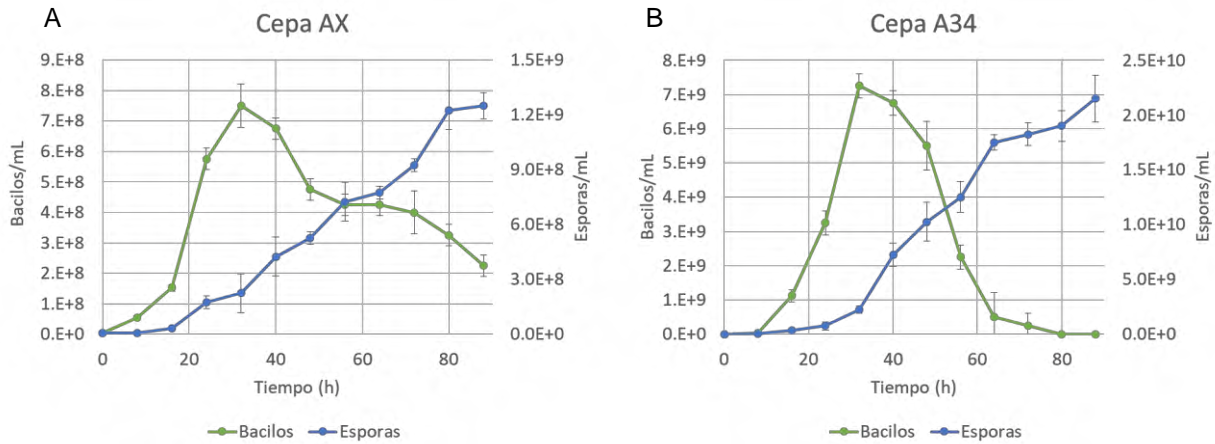


Figura 6. Cinéticas de crecimiento de las cepas A) AX y B) A34. Para la cepa AX, obtuvo una máxima concentración promedio de 7.5×10^8 bacilos/mL, mientras que para esporas de la misma cepa alrededor 1.2×10^9 esporas/mL. En el caso de la cepa A34 se observó una máxima concentración de bacilos arriba de 7×10^9 bacilos/mL y mayor a 2×10^9 esporas/mL.

Las diferencias encontradas en la producción de biomasa, y por ende, de esporas al final de la fermentación, puede deberse a múltiples variables en nuestro sistema de cultivo, entre las que podemos encontrar los niveles de oxígeno disuelto, la cantidad de inóculo inicial, la diferencia en el aprovechamiento de nutrientes por cada una de las cepas, entre otros (Liu and Tzeng, 2000). Alguno de estos factores, pueden ser los responsables de las diferencias encontradas en el crecimiento de estas 2 cepas y con otras especies del mismo género que han sido descritos dentro del grupo de trabajo (Cruz-Nolasco, 2014; Roldan-Sabino, 2017). Por otro lado diferentes estudios tratan de homogeneizar estos parámetros, haciendo uso de distintos sistemas como los biorreactores, donde se tiene el control de todas las variables, si se utiliza un medio similar al utilizado en este trabajo, se maximiza la producción y se reducen tiempos (Rowe et al., 2003). Sin embargo para los fines de este proyecto, solo es necesario que exista una producción constante y que los resultados sean reproducibles en el contexto de calidad y cantidad de esporas y cristales.

10.2 Caracterización microscópica de cristales

10.2.1 Micrografías cepa control HD-73

Para poder determinar la morfología de los cristales y comprobar que nuestras cepas producían cristales, las muestras liofilizadas fueron observadas con MEB obteniendo lo siguiente. En la Figura 7 se muestran en diferentes puntos (círculos rojos), cristales de forma bipiramidal característicos de la cepa HD-73 de *Bt var kurstaki*, productora de proteína Cry1Ac, donde se encontraron estructuras cristalinas tienen un tamaño medio de 1.5 μm de largo y 0.6 μm . La figura 7(A) muestra un acercamiento de 2000 veces en la cual se alcanzan a observar cristales bien definidos, mientras que en la figura 7(B), se pueden visualizar perfectamente la morfología característica de estos cristales de forma bipiramidal. Esta muestra fue empleada como control de la producción de cristales por las cepas de *Bt* y la visualización de los cristales por MEB.

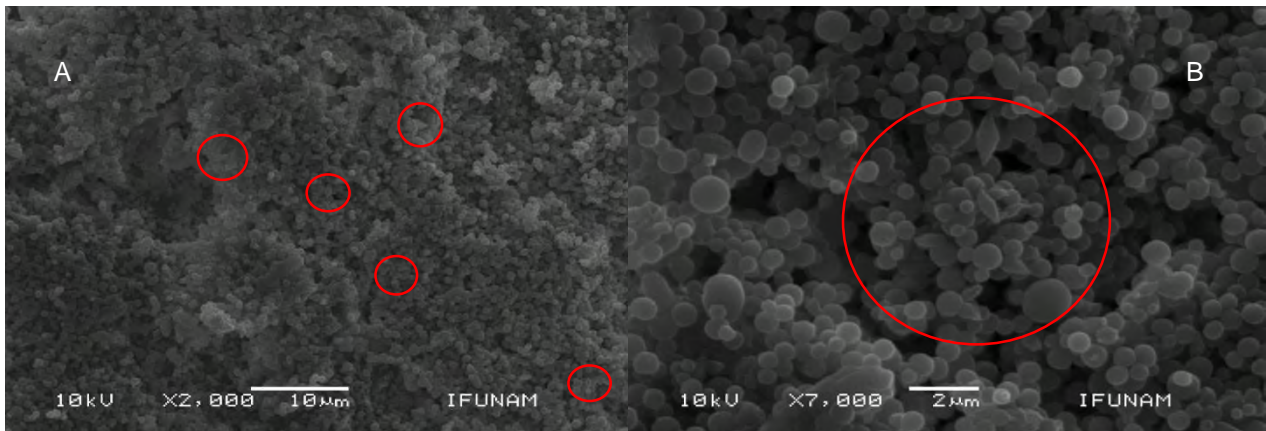


Figura 7. Micrografías de cristales de *Bt var Kurstaki* cepa HD-73, empleada como control positivo.

10.2.2 Micrografías de las cepas A34 y AX con recubrimiento de carbón.

En la figura 8 se pueden apreciar en distintos campos, estructuras cristalinas producidas por la cepa A34, las cuales muestran una morfología irregular. El tamaño promedio de la superficie de estos elementos es de 0.7 x 0.3 μm , mientras que las esporas tienen un tamaño de 2 x 1 μm aproximadamente.

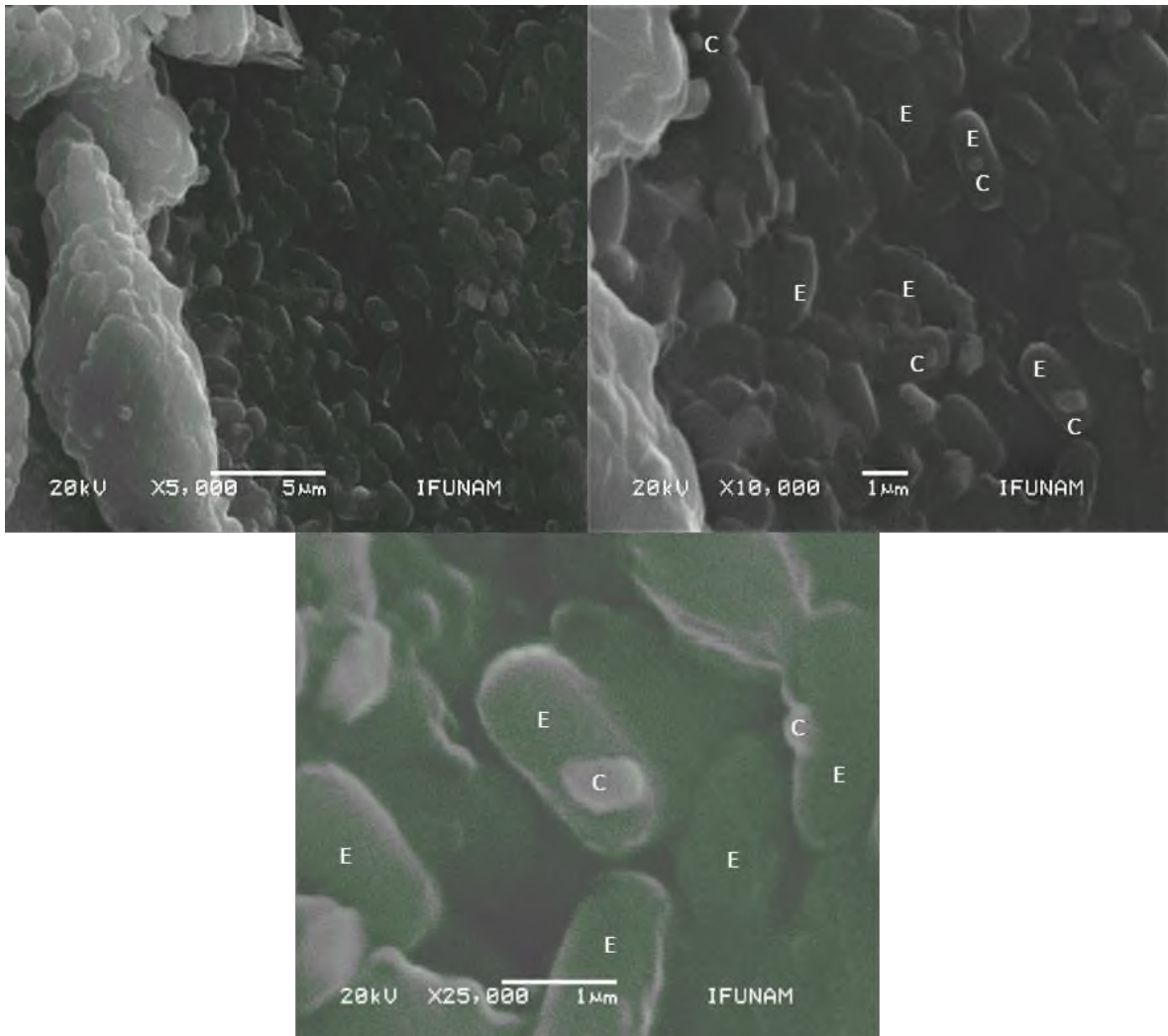


Figura 8. Imagen de microscopía electrónica de barrido de la cepa A34 cubierta con carbono. En donde E indica esporas y C indica cristal de proteína.

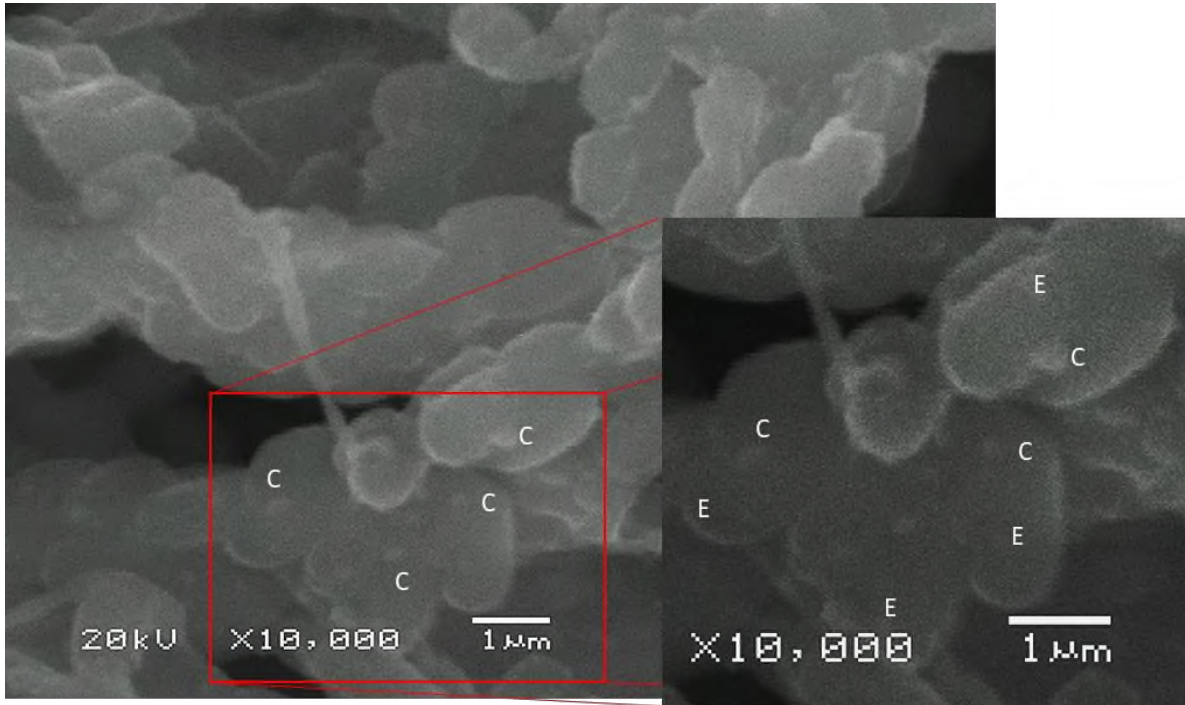


Figura 9. Imagen de microscopía electrónica de barrido de la cepa AX cubierta con carbono. En donde E indica esporas y C indica cristal de proteína.

Para mejorar y complementar la caracterización morfológica de los cristales de ambas cepas, se realizaron nuevas micrografías con recubrimiento de oro para obtener una mayor definición y nitidez en las imágenes.

10.2.1 Micrografías cepa A34 con recubrimiento de oro.

Las micrografías de la cepa A34 con recubrimiento de oro, ver figura 10, confirmaron la presencia de cuerpos cristalinos de formas irregulares y semiesféricas.

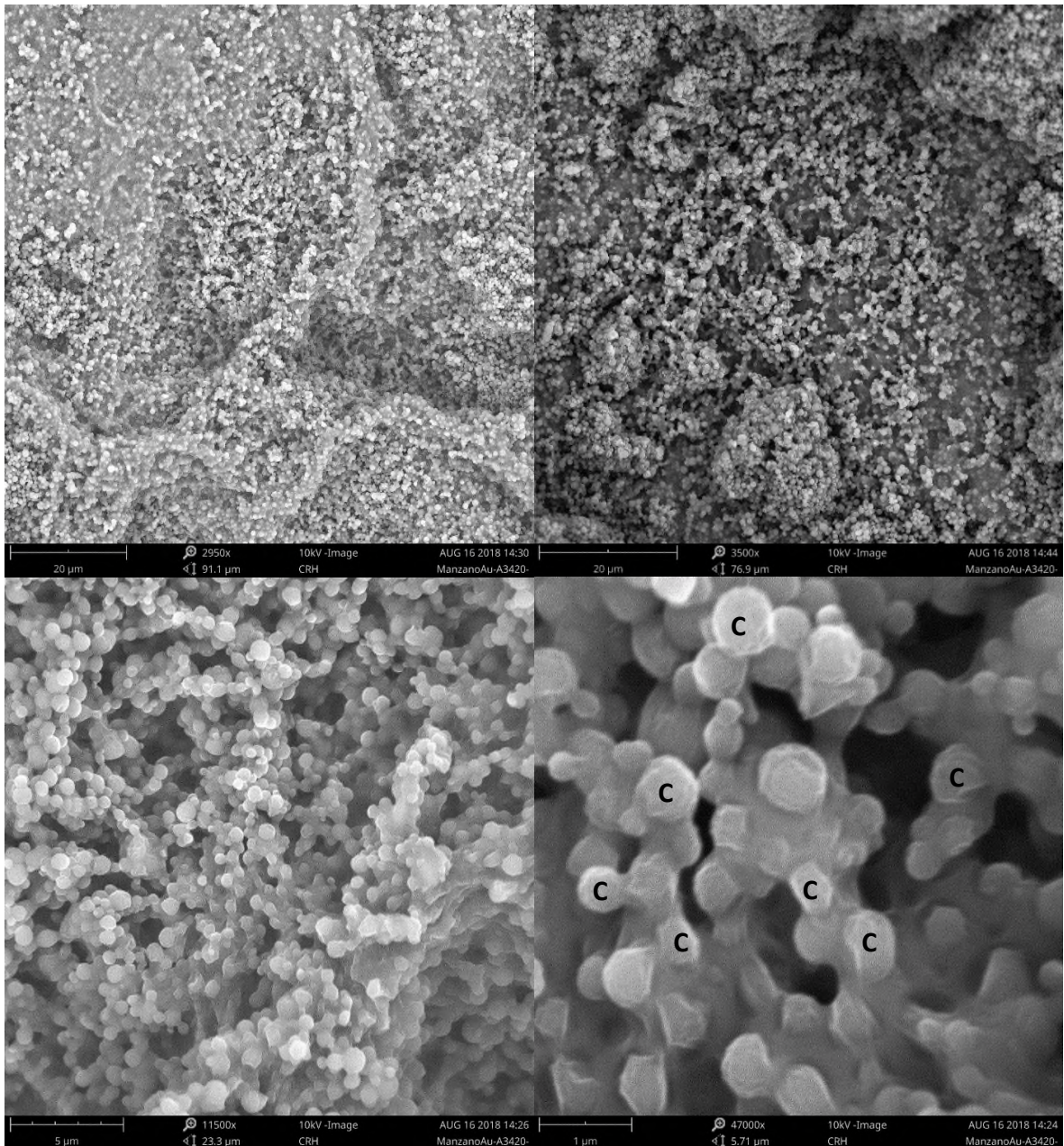


Figura 10. Imagen de microscopía electrónica de barrido de la cepa A34 a diferentes aumentos cubiertas con oro. En donde C indica cristal de proteína.

10.2.1 Micrografías cepa AX con recubrimiento de oro

Al igual que con las estructuras observadas de la cepa A34, estas micrografías permiten definir mejor la morfología de las estructuras cristalinas producidas por la cepa AX, donde podemos ver cristales semiesféricos e irregulares, aunque de un tamaño menor a $0.4 \mu\text{m}$ de diámetro en promedio (Figura 11).

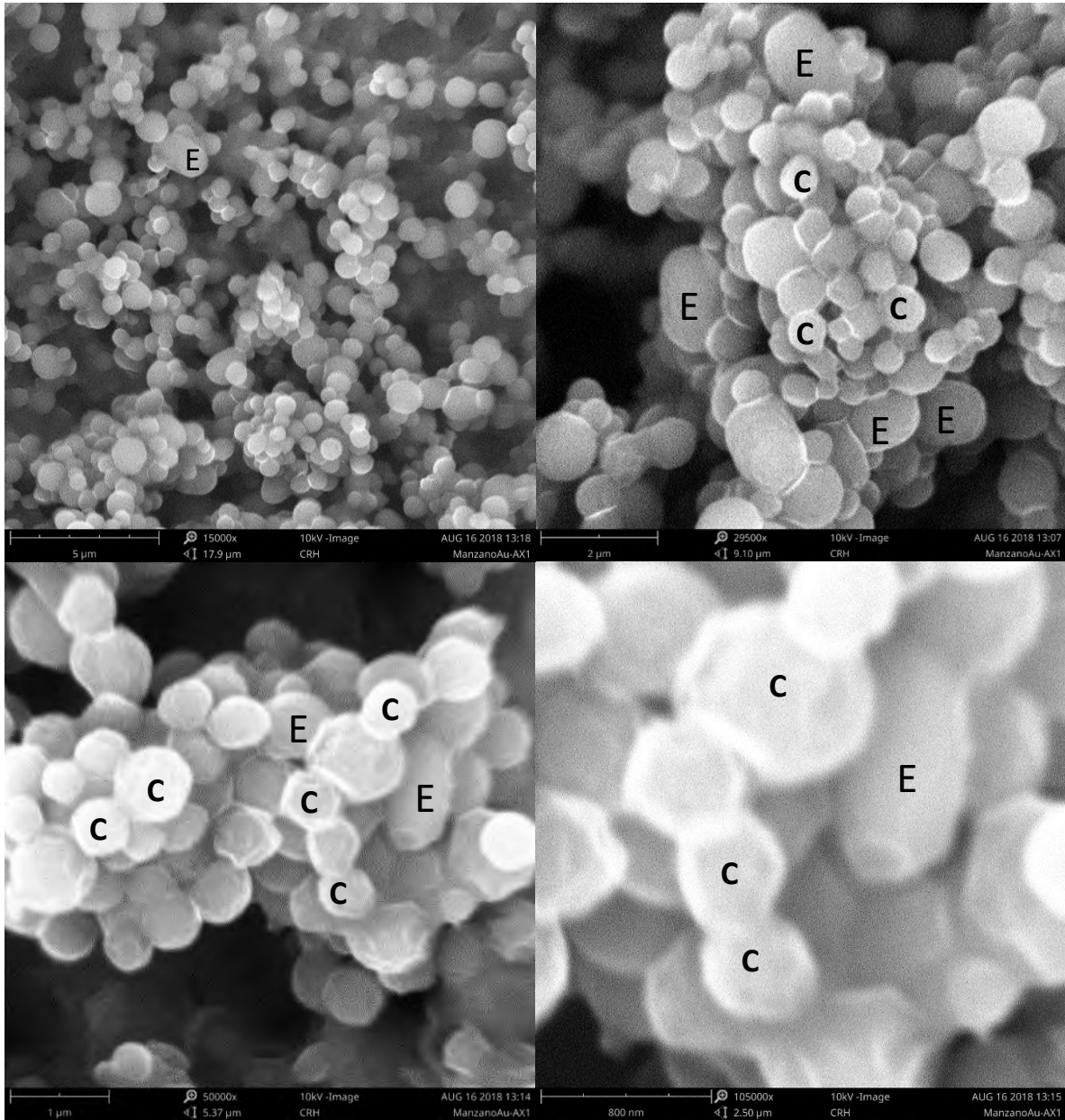


Figura 11. Imagen de microscopía electrónica de barrido de la cepa AX a diferentes aumentos cubiertas con oro. En donde E indica esporas y C indica cristal de proteína.

Desde la primera vez que fue identificado *Bt* en 1902 por Ishiwata, esta bacteria ha sido aislada de diferentes ecosistemas y estudiada ampliamente. Sin embargo, debido a que existen regiones donde aún no se han buscado cepas de *Bt*, se cree que se pueden encontrar cepas con distintas aplicaciones (Nair et al., 2018). En particular de la morfología de las inclusiones parasporales producidas por *Bt*, han sido descritas diversas morfologías, no obstante, la más abundante es la bipiramidal

(producida por la variedad *kurstaki* por ejemplo) que podemos ver en la figura 7, esta morfología es asociada a la producción de proteína Cry1Ac, una de las más utilizadas en productos para el control biológico (Feng et al., 2001; Roh et al., 2007; Schünemann et al., 2014). Existen reportes de formaciones cristalinas esféricas, cúbicas entre otras (Deng et al., 2014; Feng et al., 2001; Nair et al., 2018; Schünemann et al., 2014), sin embargo las cepas de interés en este estudio, presentaron inclusiones cristaloides de morfologías irregulares y semiesféricas (Figuras 8-11). Ibrahim y colaboradores (2010) menciona que muchas cepas productoras de cristales que no tienen actividad insecticida, son de morfología irregular, esto se puede relacionar directamente con investigaciones que dan a conocer las proteínas producidas por *Bt*, con efecto citotóxico sobre células cancerígenas (Ps), donde describen que la forma de los cristales en los que se encuentran las proteínas, es irregular (Ibrahim et al., 2010; Kitada et al., 2005; D. W. Lee et al., 2000; Lenina et al., 2014). En cuanto la cepa A34, investigaciones previas describen que pertenece a la variedad *Tolworthi*, como observamos en la figura 10 los cristales que produce son de morfología irregular semiesférica (Bravo-D et al., 2015; Cruz-Nolasco, 2014). Sin embargo, un reporte de la cepa Btt01, perteneciente a esta misma variedad, aislada en Brasil, describe la presencia de cristales bipiramidales con potencial insecticida (Argôlo-Filho et al., 2014), siendo diferente a lo descrito por nuestro grupo de trabajo, no obstante, los cristales y su morfología al ser dependientes del tipo de proteína que lo compone, pueden variar de una cepa a otra, dependiendo del lugar donde fue aislada dicha cepa y su interacción con el ambiente para generar la forma de dichos cristales.

10.2.2 Difractogramas de las cepas AX y A34.

Con la finalidad de asociar la morfología de los cristales analizados con patrones de difracción de rayos X (DRX), se realizó el análisis por DRX con las muestras seleccionadas, obteniendo los siguientes difractogramas. En la figura 12(A) se observan los difractogramas con las muestras alineadas donde se muestra la convergencia de picos en las mismas posiciones mientras que en la figura 12(B) se pueden ver los patrones de difracción por separado de los cristales de dos cultivos de AX crecidas en caldo nutritivo (AX2401CN y AX1403CN), así como los cristales

de dos cultivos A34, A341405LI con un tratamiento de lavado incompleto y crecida en caldo nutritivo, y A340303 con tratamiento de lavado completo crecida en medio Gerry-Rowe.

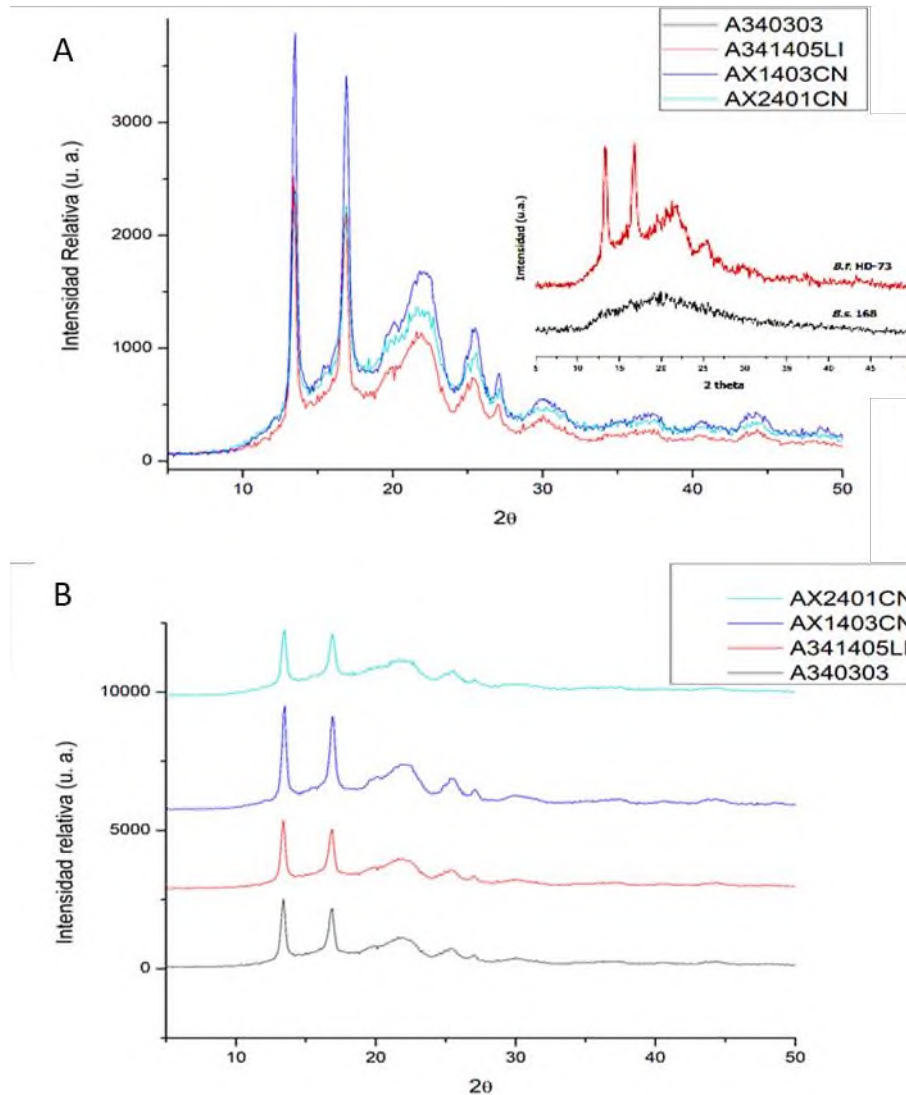


Figura 12. Difractogramas de las muestras AX y A34 en diferentes cultivos. A) Difractogramas obtenidos de cada muestra, donde se observan picos que señalan el alto grado de cristalinidad en la región 13 y 17 del ángulo 2θ . B) muestra los difractogramas opo separado de cada muestra, se pueden observar las similitudes entre las regiones cristalinas (13-27 del ángulo 2θ) y la zona amorfa (28-50 del ángulo 2θ). En el recuadro (A) se notan las similitudes con los difractogramas descritos previamente por Martínez-García 2018.

Podemos observar que los picos coinciden a las mismas regiones del ángulo 2θ entre sí, por lo que no podemos aseverar si solo se debe a la presencia de cristales en nuestra muestra, o a un arreglo similar de las agrupaciones de proteínas que

conforman los cristales. En un trabajo previo por Martínez-García (2018), y el único de su tipo hasta este momento, menciona las diferencias en los grados de cristalinidad de mediante DRX de polvos, obtenidos de dos géneros de *Bacillus*, donde la cepa HD-73, que produce cristales bipiramidales, genera un patrón de difracción muy parecido a los obtenidos en nuestro trabajo, mientras que la cepa de *Bacillus subtilis* var. 168 que no produce cristales, solo se observa una región con amorfa (Martínez-García, 2018, p. 51). En la figura 12A podemos observar que los picos de mayor intensidad convergen en la posición 13 y 17 de la región 2θ al igual que en 22 y 27 aproximadamente como describe Martínez-García (recuadro de la figura 12A).

Si bien los resultados de esta técnica esta técnica no son suficientes para obtener una relación directa, comparando los patrones de difracción con las morfologías observadas por MEB, puede ser muy útil para determinar el grado de cristalinidad de las muestras de *Bt* al final de la esporulación, lo cual garantiza un éxito al aislar, purificar e identificar bandas de interés producidas por el bacilo. En conjunto ambas cepas demostraron poseer cristales de morfología irregular con patrones de difracción que corresponden a difractogramas reportados para cepas de *Bt* productoras de proteínas Cry.

10.3 Purificación de proteínas

Para llevar a cabo las pruebas citotóxicas, las proteínas de interés descritas por Cruz-Nolasco (2017), fueron purificadas a partir de bandas recuperadas de geles SDS-PAGE, como se muestra en las siguientes imágenes. En las figuras 19 A y B, y 20 A y B se presentan los geles SDS-PAGE al 10 y 12% de concentración de acrilamida, en los que se observan bandas proteicas correspondientes a los tamaños indicados anteriormente en la tabla 4 para las cepas A34 y AX respectivamente. En dichas figuras se pueden observar, para el caso de la cepa A34 (Figura 13), bandas dentro de los recuadros rojo, naranja y verde, las cuales fueron recortadas y enviadas a secuenciación e identificación. Para la cepa AX (Figura 14) dichas bandas se encuentran encerradas en los cuadros rojo, negro y azul.

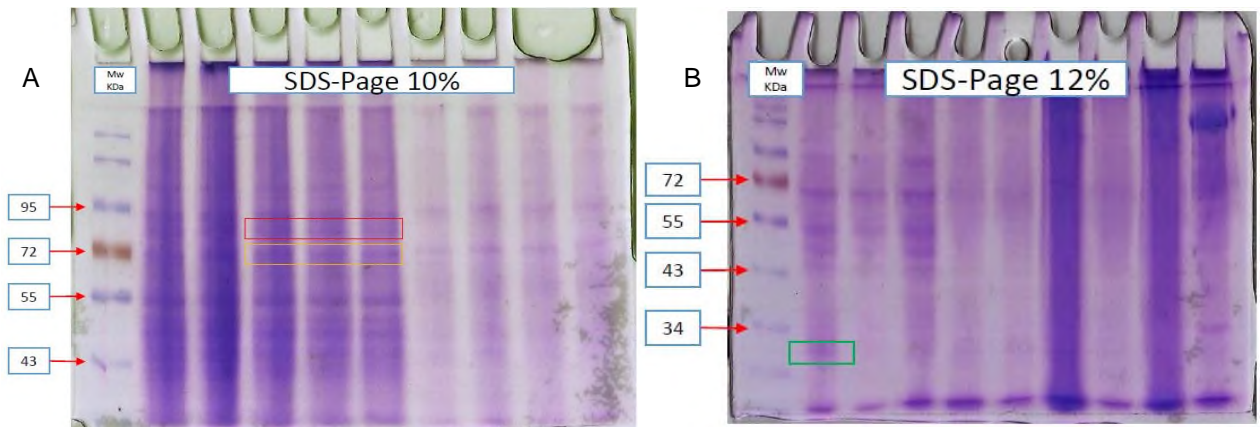


Figura 13. Análisis electroforético de las proteínas parasporales de la cepa A34 de *Bt*. El carril uno presenta el marcador de peso molecular con los tamaños de referencia, para ambos geles, los carriles 2-10 presentan muestras de la cepa A34 de diferentes cultivos.

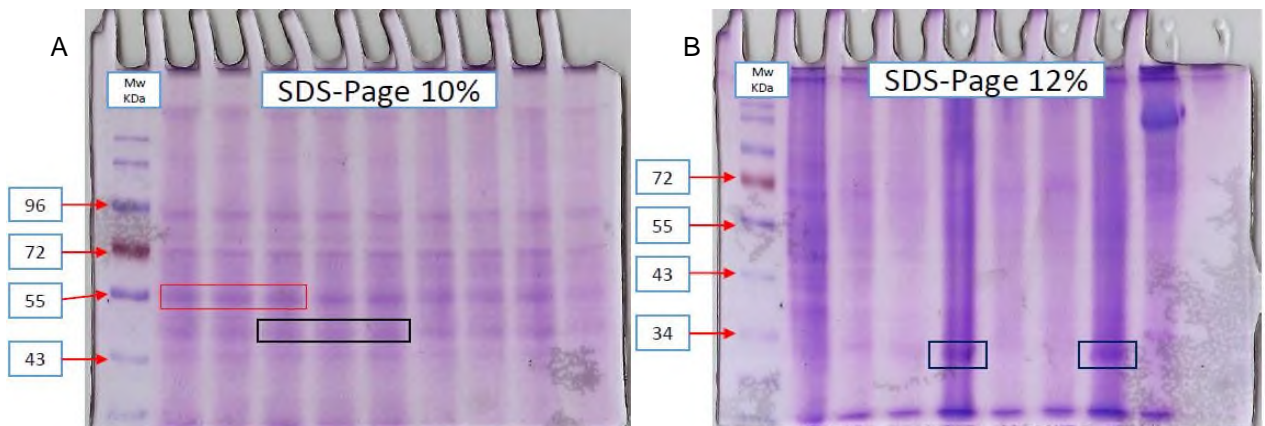


Figura 14. Análisis electroforético de las proteínas parasporales de la cepa AX de *Bt*. El carril uno presenta el marcador de peso molecular con los tamaños de referencia, para ambos geles, los carriles 2-10 presentan muestras de la cepa AX de diferentes cultivos

Diferentes autores mencionan que las protoxinas que componen los cristales proteicos de *Bt*, suelen tener tamaños de 130-140 KDa, los cuales disminuyen al momento de activar a dichas protoxinas mediante hidrólisis, liberando los fragmentos tóxicos (K. xue Huang et al., 2007; Song et al., 2008; Whiteley and Schnepf, 1986). Con base a lo mencionado, solo se purificaron bandas que mostraron actividad antiproliferativa en trabajos previos (Cruz Nolasco, 2017), como muestran los geles (Figuras 13 y 14). Estas bandas fueron eluidas y dializadas para recuperar la proteína soluble, y con ella poder hacer las pruebas citotóxicas.

10.4 Ensayos dosis respuesta de las proteínas aisladas

Se realizaron ensayos citotóxicos dosis respuesta en células MCF-7 de cáncer de mama, los resultados indicaron que las proteínas AX-50 y A34-65 tuvieron una actividad antiproliferativa estadísticamente significativa a una concentración de 9, 12 y 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para las muestras de AX-50 y de 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para la muestra A34-65 respectivamente (Figura 15).

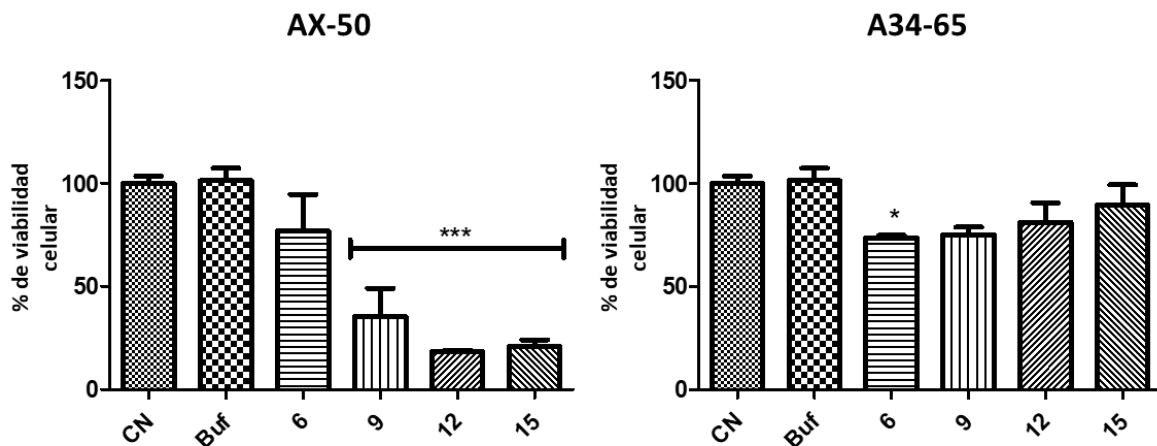


Figura 15. Viabilidad de células MCF-7 frente a las proteínas AX-50 y A34-65.

CN: Control negativo (células sin tratamiento). Buf: Blanco, Tratamiento con buffer de diálisis (sin proteínas). Para el estadístico, el CN fue considerado como el 100 % de células viables, para cada ensayo. El análisis estadístico fue realizado mediante un ANOVA de una vía seguido de la prueba post hoc de Dunnett. * $p < 0.05$ vs control, y *** $p < 0.001$ vs control.

En la figura 16 se presentan los gráficos de los ensayos de citotoxicidad del resto de las bandas proteicas purificadas con las células MCF-7. Podemos observar que más de una tuvo efecto sobre el crecimiento de la célula, sin embargo, estos efectos no fueron significativos comparados con el grupo control (CN) y el control más vehículo (Buf).

Estos resultados son similares a los reportados por Cruz-Nolasco (2017), quien describió que las bandas proteicas A34-75, A34-65, AX-55 y AX-50, tuvieron actividad antiproliferativa contra células MCF-7, con la diferencia que solo A34-65 y AX-50 fueron las que mayor actividad mostraron en este trabajo. El tratamiento con AX-50 alcanzó una IC50 (concentración inhibitoria 50) de 9 $\mu\text{g}/\text{mL}$, mientras que para las proteínas de la cepa A34 la IC50 no fue alcanzada.

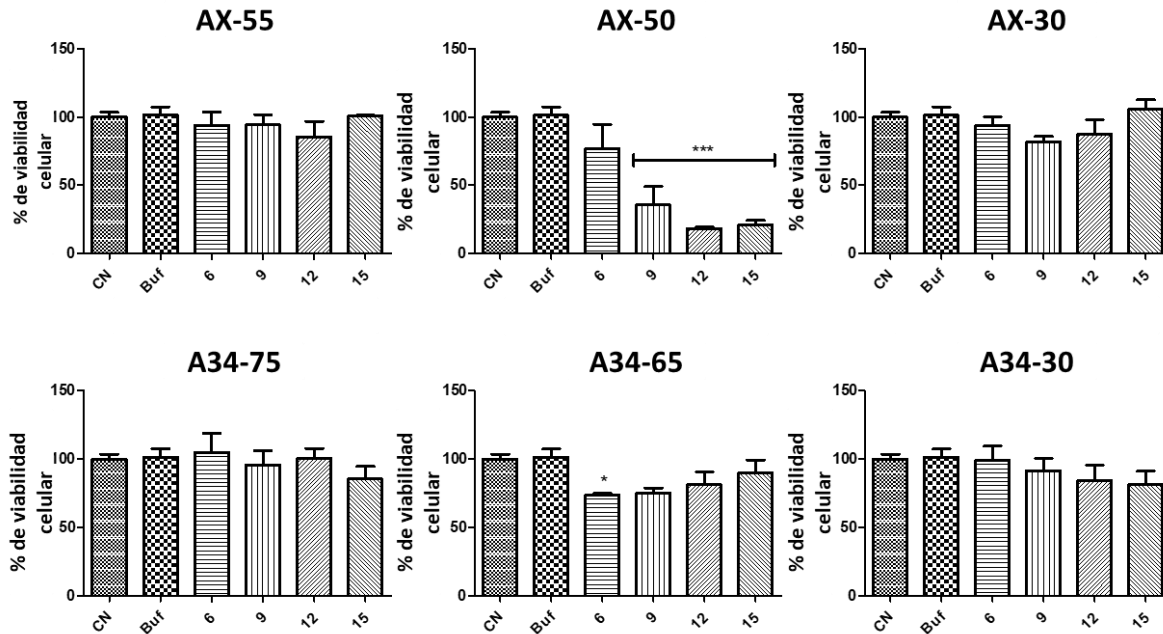


Figura 16. Viabilidad de células MCF-7 frente a proteínas purificadas de las cepas AX y A34 CN: Control negativo (células sin tratamiento). Buf: Blanco, Tratamiento con buffer de diálisis (sin proteínas). Para el estadístico, el CN fue considerado como el 100 % de células viables, para cada ensayo. El análisis estadístico fue realizado mediante un ANOVA de una vía seguido de la prueba post hoc de Dunnett. * $p < 0.05$ vs control, y *** $p < 0.001$ vs control.

Brasseur y colaboradores demostraron que 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de parasporina tipo 2 (PS2), previamente digerida con proteinasa K, inhibió cerca del 90% de la proliferación de células MCF-7 (Brasseur et al., 2015). Resultados que son semejantes al efecto alcanzado por la fracción proteica AX-u50. Si bien, los mecanismos que siguen las PS para inhibir la proliferación celular en la células cancerosas aún no están bien elucidados, se cree que estas proteínas se unen a receptores de membrana dañándola y conduciendo a procesos apoptóticos (Soberón et al., 2018). Debido a que entre las células cancerígenas presentan características diferentes, entre ellas el número de receptores que contienen a nivel de membrana, es posible que estas proteínas aisladas interactúen con estos receptores llevando a desencadenar las reacciones que culminaran en la muerte de las células (Wong et al., 2010). Es por ello, que se recomienda ampliar el panorama de acción de la actividad antiproliferativa de nuestras proteínas aisladas, probando a estas contra diferentes cultivos celulares de distintos tipos de cáncer.

10.5 Detección de genes PS por PCR punto final

Para poder confirmar que el efecto encontrado sobre la proliferación de las células era ocasionado por PS, se realizaron las PCR correspondiente a cada par de oligonucleótidos, para determinar los genes *ps* presentes en las cepas AX y A34. Los amplificados obtenidos con los oligonucleótidos diseñados, mostraron diferentes patrones de especificidad, impidiendo obtener bandas acordes a los tamaños esperados, haciendo difícil definir si nuestras cepas contienen o no genes PS. Por lo que se buscó una alternativa para determinar la presencia de estos genes, empleando oligonucleótidos reportados.

10.5.1 Detección de genes *ps* con oligonucleótidos reportados

Con los oligonucleótidos reportados por Espino-Vázquez en 2012 (Anexo 5), se encontró que la cepa AX amplifica a para los genes *ps3* y *ps5*, mientras que la cepa A34 amplificó para *ps3* y *ps6*.

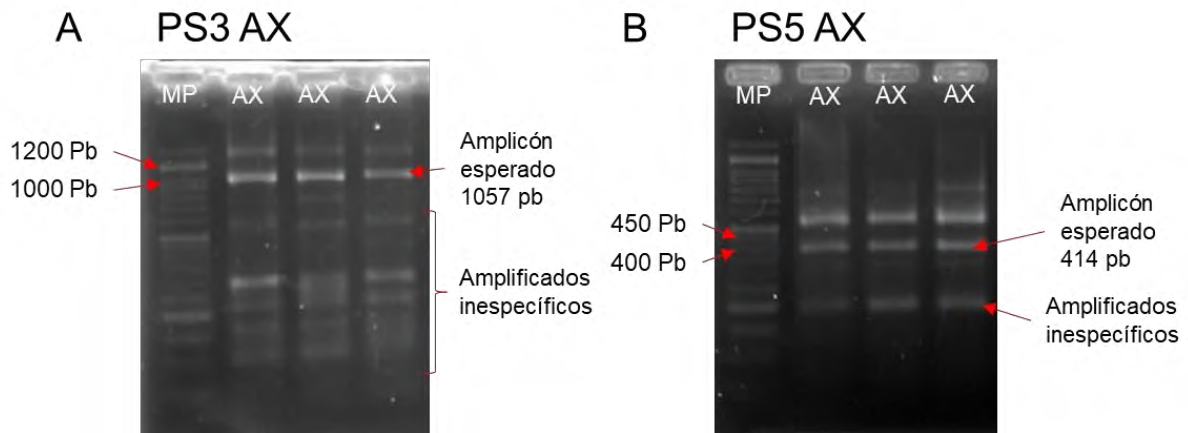


Figura 17. Análisis electroforético de los amplificados con oligonucleótidos para los genes *ps3* (A) y *ps5* (B) de la cepa AX. A) muestra los amplicones de 1047 pb aproximadamente, correspondientes al gen *ps3* en 3 diferentes muestras de la cepa AX, además que presenta bandas inespecíficas de diferentes tamaños. B) presenta amplicones de 414 pb aproximadamente, correspondientes al gen *ps5* en 3 diferentes muestras de la cepa AX, también se observan bandas de tamaños inespecíficos. El marcador de peso utilizado fue de 50 a 1500 pb.

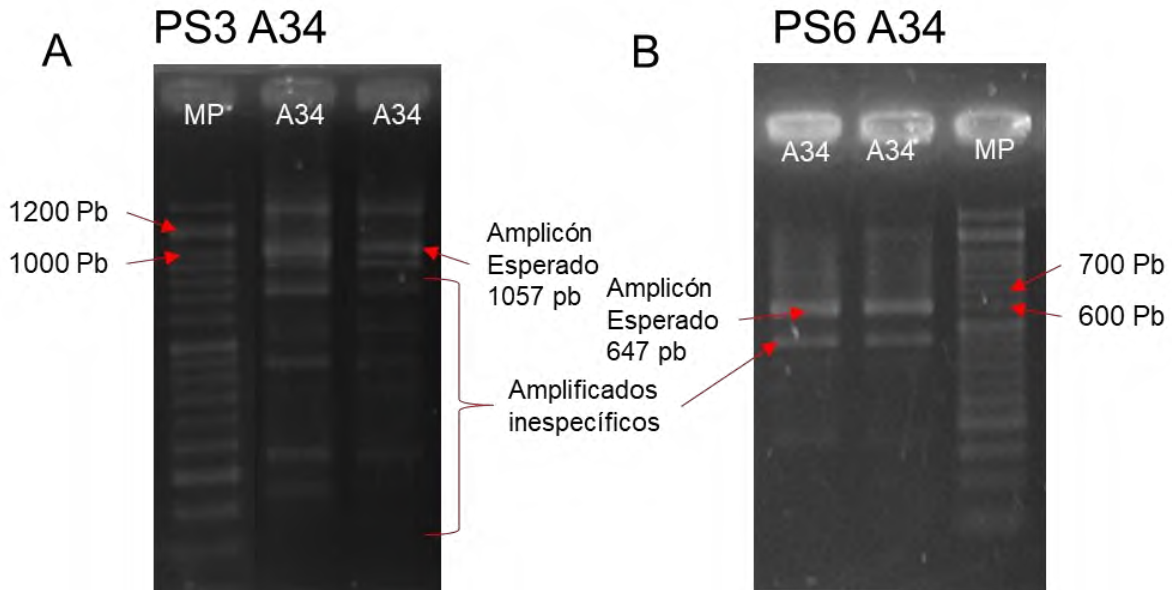


Figura 18. Análisis electroforético de los amplificadores de PS3 (A) y PS6 (B) de la cepa A34. A) muestra los amplicones de 1057 pb aproximadamente, que corresponden al gen *ps3* en 3 diferentes muestras de la cepa A34, además que presenta bandas inespecíficas de diferentes tamaños. B) presenta amplicones de 647 pb aproximadamente, correspondientes al gen *ps6* en 3 diferentes muestras de la cepa A34, también se observan bandas de tamaños inespecíficos. El marcador de peso utilizado fue de 50 a 1500 pb.

En las figuras 17 se pueden apreciar los amplificadores de tamaños correspondientes a *ps3* y *ps5* para la cepa AX, mientras que en la figura 18 se muestran los amplificadores que indican la presencia de *ps3* y *ps6* para A34. Diferentes investigadores indican que existe la probabilidad que cepas de *Bt* tengan la capacidad de contener 2 o más genes de PS diferentes (Ohba et al., 2009; Okumura et al., 2011), lo cual no significa que ambas proteínas se expresen al mismo tiempo, e incluso que otros genes Cry estén presentes en sus plásmidos y cristales como proteínas independientes. Como podemos distinguir en ambas figuras (17 y 18), existen bandas que pueden representar amplicones del tamaño esperado para genes de PS, para el caso de la cepa AX PS3 y PS5, mientras que PS3 y PS6 para la cepa A34, sin embargo también se muestran bandas que no corresponden al amplicón esperado, a diferencia del análisis bioinformático de las secuencias donde sólo se observa un tamaño de amplicón. Por lo tanto, el análisis por PCR no con oligonucleótidos diseñados para este trabajo y oligonucleótidos descritos por Espino-Vásquez (2012), no fue suficiente para determinar la presencia de genes *ps*.

10.6 Identificación de proteínas

Puesto que por análisis de PCR para la búsqueda de genes PS, no se pudo establecer si nuestras cepas producen parasporinas, debido a la alta inespecificidad encontrada. Se realizó la identificación de las proteínas, que previamente se habían recuperado y probado contra células MCF-7, mediante fragmentación peptídica y su identificación por espectrometría de masas.

10.6.1 Identificación de proteínas producidas por las cepas AX y A34

Mediante el análisis por espectrometría de masas, los resultados obtenidos de la identificación de proteínas para las cepas A34 y AX, se obtuvieron las siguientes proteínas, ver tabla 8, con los Identificadores de bases de datos y nombres de proteínas con mayor porcentaje de identidad de péptidos y porcentaje de cobertura.

Tabla 8: Proteínas identificadas

Muestra	ID	Nombre	C (%)	P.U	M	% ID
A34-75	A0A231I8M_BACTU	Piruvato cinasa	49	20	62	>95
	A0A0G4D760_BACTO	Formiato acetiltransferasa	41	23	85	>95
	A0A0B5NU36_BACTU	Proteína no caracterizada	28	13	66	>95
	A0A0G4CU24_BACTO	Proteína DnaK Chaperona	27	12	66	>95
A34-65	A0A0B5NU36_BACTU	Proteína no caracterizada	34	22	66	>95
AX-55	A0A1E8AA22_BACTU	Aldehído deshidrogenasa Put.	46	14	54	>95
AX-50	A0A243NAT9_BACTU	Factor de elongación TU	16	4	43	>95
Ax-30	A0A084J462_BACMY	CodY Represor pleiotrópico transcripcional dependiente de GTP	14	3	29	>95

ID= número de acceso UniProt, C= porcentaje de cobertura, P.U= número de péptidos únicos encontrados en la secuencia, M= masa (KDa) %ID= Porcentaje de identidad.

De las 6 muestras enviadas y procesadas, se pudieron identificar 41 proteínas en la base de datos de la UniProt. En la figura 19 se observan las proteínas que mostraron mayor porcentaje de cobertura de las 41 detectadas. Esta figura es una representación gráfica de la interfaz proporcionada por el software Scaffold 4, con el que se analizaron los resultados. En el anexo 6 se muestran el resto de proteínas identificadas con base al porcentaje de cobertura y número de péptidos únicos. Por otro lado, en la tabla 8 solo se muestran 4 resultados para una sola muestra (A34-75), mientras que las restantes solo se indica 1 por cada banda purificada, omitiendo a la muestra A34-30 debido a que esta no tuvo presencia de proteínas en el análisis.

Dentro de las 5 muestras que dieron positivo para al menos 1 proteína, 38 proteínas presentaron identidad a la muestra de A34-75, 16 para A34-65, 4 para AX-30, 2 para AX-50 y solo 1 proteína para AX-55.

Reportes indican que las proteínas presentes en las inclusiones parasporales de *Bt* tienen tamaños que van de 50-140 KDa (Roh et al., 2007), lo mismo aplica para las PS responsables de la actividad citotóxica, y puesto que las bandas aisladas con mayor actividad están dentro de este rango de tamaño (apartado 10.4), se esperaba poder identificar proteínas con homología a alguna parasporina descrita en bases de datos, o en su defecto, homología a proteínas Cry que no se hayan descrito su actividad antagonista contra células cancerígenas. Contrario a esto, las 41 macromoléculas identificadas, la mayoría pertenecen a la maquinaria de estabilidad y supervivencia de los bacilos (metabolismo primario y esporulación), entre los que destacan, proteínas del metabolismo de azúcares (aldehído deshidrogenasa, Piruvato cinasa, acetiltransferasas), reguladores transcripcionales (represor pleiotrópico y chaperonas), reguladores del crecimiento (Factor de elongación Tu), entre otras secuencias no definidas. Por lo que se cree que la presencia de estas proteínas en el cristal se deba a los mecanismos de supervivencia de *Bt*, es decir, que sean proteínas necesarias para el correcto funcionamiento y que favorezcan la eclosión de las esporas llegado el momento idóneo por el ambiente.

Bio View: Identified Proteins (41) Including 0 Decoys	Accession Number	Molecular Weight	Protein Grouping Ambiguity	Probability Legend:				
				BioSample AX-55	BioSample AX-50	BioSample AX-30	BioSample A34-75	BioSample A34-65
Putative aldehyde dehydrogenase DhaS OS=Bacillus thuringiensis OX=1428 GN=dhaS2 PE=3 SV=1	A0A1E8AA22_BACTU	54 kDa	★	46%	2.6%	4.9%	5.1%	
Elongation factor Tu OS=Bacillus thuringiensis serovar canadensis OX=180855 GN=tuf PE=3 SV=1	A0A243NAT9_BACTU (+1)	43 kDa			16%			
GTP-sensing transcriptional pleiotropic repressor CodY OS=Bacillus mycoides OX=1405 GN=codY PE=3 SV=1	A0A084J462_BACMY (+3)	29 kDa					23%	3.3%
3-hydroxypropionyl-coenzyme A dehydratase OS=Bacillus thuringiensis OX=1428 GN=AYK81_19945 PE=3 SV=...	A0A0B5NR66_BACTU (+28)	28 kDa				14%		
Pyruvate kinase OS=Bacillus thuringiensis OX=1428 GN=BK775_08820 PE=3 SV=1	A0A231I8M8_BACTU (+1)	62 kDa	★				49%	
Formate acetyltransferase OS=Bacillus thuringiensis subsp. tolworthi OX=1442 GN=KNN_05696 PE=4 SV=1	A0A0G4D760_BACTO (+8)	85 kDa	★				41%	4.7%
Uncharacterized protein OS=Bacillus thuringiensis OX=1428 GN=BF38_765 PE=3 SV=1	A0A0B5NU36_BACTU (+12)	66 kDa	★				28%	34%
Chaperone protein DnaK OS=Bacillus thuringiensis subsp. tolworthi OX=1442 GN=dnaK PE=2 SV=1	A0A0G4CUZ4_BACTO (+11)	66 kDa					27%	
Contig0101, whole genome shotgun sequence OS=Bacillus thuringiensis Sbt003 OX=1235825 GN=C797_26867...	A0A0D1NKT7_BACTU (+15)	64 kDa					5.3%	9.3%
Dihydrolipoamide acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex OS=Bacillus thuringiensis...	A0A0D1QZ39_BACTU (+5)	43 kDa					14%	7.3%
Glutamine--fructose-6-phosphate aminotransferase [isomerizing] OS=Bacillus thuringiensis OX=1428 GN=gl...	A0A0B5NV56_BACTU (+29)	66 kDa					6.3%	5.8%

Figura 19: Proteínas identificadas por porcentaje de cobertura de secuencia

Se puede leer en las etiquetas por código de colores la probabilidad de identidad para cada una de las muestras analizadas, donde verde indica una probabilidad mayor al 95 %, amarillo 80-94 %, naranja de 50-79 %, rojo de 20-49 % y blanco que va de porcentaje nulo a 19 %. La probabilidad de identidad de la proteína es independiente al porcentaje de homología de las secuencias encontradas, como se puede mostrar en la figura 19 y en el anexo 6.

10.6.2 Péptidos obtenidos de la identificación de proteínas

En las siguientes tablas 9-14 y figuras 20-25 se presentan las secuencias de los péptidos obtenidos de cada una de las muestras emparejadas con las proteínas de mayor cobertura e identidad mencionadas en la tabla 8, dichos péptidos y figuras fueron obtenidos directamente de los resultados proporcionados por el programa Scaffold4.

10.6.2.1 Péptidos obtenidos de la muestra AX-55

La muestra AX-55 fue positiva para una sola proteína, la aldehído deshidrogenasa putativa, de la cual se pudieron obtener 13 péptidos de diferentes tamaños, como se muestra en la tabla 9.

Tabla 9: Péptidos de la muestra AX-55

<i>N</i>	<i>Secuencia</i>	<i>P</i>	<i>I</i>	<i>F</i>	<i>M</i>
1	LYVnGSFIESASGK	99%	22	35	D (+1)
2	TPnPATGETLAVVSEAGR	98%	39	56	D (+1)
3	TPNPATGETLAVVSEAGREDIHK	100%	39	61	
4	YYAGWATK	97%	130	137	
5	IVGQTIPVSGDYFNYTR	99%	138	154	
6	mGAALATGcTIVLKP AEQTPLSAL				O (+16),
	YLAELIEEAGFPK	97%	178	214	C (+57)
7	IAFTGSTPVGK	98%	240	250	
8	VTLELGGK	49%	263	270	
9	SPNIILPDADLSR	98%	271	283	
10	EEIFGPVISAIPFNDInEVIER	99%	396	417	D (+1)
11	SQFGLAAGVWTVNK	99%	421	435	
12	AGTVWVNcYNVFDAASPFGGFK	99%	446	467	C (+57)
13	EmGSYALNNYTEVK	97%	474	487	O (+16)

N=número, P=probabilidad de identidad, I=posición de inicio, F=Posición final y M=modificaciones.

D= Desaminación (Asparagina N y Ac Glutámico Q), O= Oxidación (Metionina M) y C= Carbamida metilación (Cisteína C)

+(#)= número de repeticiones de modificaciones en los espectros.

En minúsculas, se muestran los aminoácidos modificados durante el proceso de identificación.

La figura 20 muestra las zonas de cobertura de los péptidos en la secuencia de la proteína (amarillo), y los aminoácidos modificados durante el proceso de identificación. La mayor zona de cobertura comprende desde la posición del triptófano (Y) 130 hasta arginina (R) en la posición 283.

A0A1E8AA22_BACTU (100%), 53,676.0 Da
 Putative aldehyde dehydrogenase DhaS OS=Bacillus thuringiensis OX=1428 GN=dhaS2 PE=3 SV=1
 14 exclusive unique peptides, 20 exclusive unique spectra, 571 total spectra, 229/494 amino acids (46% coverage)

MSQLAVNLHE	KVEKFLQGTK	KLYVNGSFIE	SASGKTFKTP	NPATGETLAV
VSEAGREDIH	KAVVAARMAF	DEGPWSRMST	AERSRLMYKL	ADLMEEHKEE
LAQLETLDNG	KPIRETMAAD	IPLAIEHMRY	YAGWATKIVG	CTIPVSGDYF
NYTRHEAVGV	VGQIIPWNFP	LLMAMWK MGA	ALATGCTIVL	KPAEQTPLSA
LYLAELIEEA	GFPKGVINIV	PGFGESAGQA	LVNHPLVDKI	AFTGSTPVGK
QIMRQASESL	KRVTTLELGGK	SPNIILPDAD	LSRAIPGALS	GVMFNQQQVC
SAGSRLFVPK	KMYDNDVMADL	VLYSKKLNQG	AGLSPETTIG	PLVSEEQQKR
VMGYIEKGI E	EGAEVLCGGS	NPFDDQGYFVS	PTVFADV NDE	MTIAKEEIFG
PVISAIPFND	INEVIERANK	SQFGLAAGVW	TENVKTAHYV	ASKVRAGTVW

Figura 20. Ubicación de cobertura de péptidos obtenidos de la muestra AX-55. En amarillo se marcan la secuencia de los péptidos identificados por MS en contraste de la secuencia completa de la proteína depositada en la base de datos de la UniProt, mientras que en verde se indican los péptidos modificados durante el proceso de identificación.

Las Aldehído deshidrogenasa (ALDH) pertenecen a una familia de enzimas dependientes de NADP⁺ que catalizan la oxidación de un gran número de aldehídos alifáticos y aromáticos, además de tener participación activa en las principales rutas metabólicas de un gran número de organismos de diferentes vertientes evolutivas (Lindahl, 1992). Diversos autores relacionan modificaciones de estas enzimas así como cambios en la concentración de este tipo de proteínas en diferentes tumores o tejidos cancerígenos, con la resistencia a diferentes fármacos (Cojoc et al., 2015; Januchowski et al., 2016; Januchowski et al, 2013; Li et al., 2018; X. Xu et al., 2015). Sin embargo estas investigaciones tratan sobre isoformas de ALDH's intrínsecas del mismo tejido, es decir producidas por el mismo organismo. A la fecha no existen reportes sobre el efecto que pudiera causar la presencia de alguna ALDH proveniente de un organismo de diferente naturaleza, como *Bt*, frente a un tumor o cultivo de células cancerígenas, como se detectó en el presente estudio.

10.6.2.2 Péptidos obtenidos de la muestra AX-50

La muestra AX-50 dio positivo para dos proteínas, de las cuales se tomó la de mayor porcentaje de cobertura y con mayor porcentaje de identidad (Factor de elongación TU), de esta secuencia se pudieron obtener 4 péptidos (tabla 10). Ninguno presenta modificaciones y las probabilidades de identidad son bajas en relación a la proteína descrita anteriormente.

Tabla 10: Péptidos obtenidos para la muestra AX-50

<i>N</i>	<i>Secuencia</i>	<i>P</i>	<i>I</i>	<i>F</i>	<i>M</i>
1	TTLTAAITTVLAK	91%	26	38	
2	GITISTAHVEYETETR	70%	60	75	
3	DLLSEYGFPGDDIPVIK	91%	156	172	
4	LLDQAQAGDNIGALLR	91%	266	281	

N=número, P=probabilidad de identidad, I=posición de inicio, F=Posición final y M=modificaciones.
D= Desaminación (Asparagina N y Ac Glutámico Q), O= Oxidación (Metionina M) y C= Carbamida metilación (Cisteína C)
+(n)= número de repeticiones de modificaciones en los espectros.
En minúsculas, se muestran los aminoácidos modificados durante el proceso de identificación.

A0A243NAT9_BACTU (100%), 42,924.6 Da
Elongation factor Tu OS=Bacillus thuringiensis serovar canadensis OX=180855 GN=tuf PE=3 SV=1
4 exclusive unique peptides, 4 exclusive unique spectra, 68 total spectra, 62/395 amino acids (16% coverage)

```

MAKAKFERSK PHVNI GTIGH VDHGK TTLTA AITTVLAK AG GAEARGYDQI
DA APEERER GITISTAHVEY ETETRHYAHV DCPGHADYVK NMITGAAQMD
GGILV VSAAD GPMPQ TREHI LLSRQ VGV PY I VVFLNKCDM VDDEELLELV
EMEV RDLLSE YGFPGDDIPV IKGSALKALQ GEADWEAKII ELMAEVDAYI
PTPERETDKP FLMPVEDVFS ITGRGT VATG RVERGIVKVG DVVEIIGLAE
ENASTT VTGV EMFRK LLDQA QAGDNIGALL RGVARED IQR GQVLA KSGSV
KAHAKFKAEV FVLSKEEGGR HTPFF ANYRP QFYFR TTDVT GIIQL PEGTE
MVM PGDNVEM TIELI APIAI EEGTKFSIRE GGRTVGYGVV ATIVE

```

Figura 21. Ubicación de cobertura de péptidos de la muestra AX-50. En amarillo se marcan la secuencia de los péptidos identificados por MS en contraste de la secuencia completa de la proteína depositada en la base de datos de la UniProt.

Para el caso de estas secuencias peptídicas, el mapa de cobertura (Figura 21) observamos que los péptidos se emparejan a distancias considerables dentro de la secuencia, pero manteniendo altos porcentajes de identidad de dichos péptidos con la secuencia de esta proteína. Se sabe que el Factor de Elongación Tu (EF-TU) es una molécula de gran importancia en el metabolismo y supervivencia de *Bt*, y en general para el grupo de *Bacillus cereus* (Jinshui et al., 2017).

10.6.2.3 Péptidos identificados de la muestra AX-30

La muestra AX-30 dio positivo para 4 proteínas distintas, de las cuales para el análisis de los péptidos, solo se tomó en cuenta la proteína con el mayor porcentaje de cobertura y su naturaleza misma (represor pleiotropico transcripcional dependiente de GTP CodY), con esta se obtuvieron los siguientes péptidos (Tabla 11) y el siguiente mapa de cobertura (Figura 22).

Tabla 11: Péptidos obtenidos para la muestra AX-30

<i>N</i>	<i>Secuencia</i>	<i>P</i>	<i>I</i>	<i>F</i>	<i>M</i>
1	LLGYAIHQIENER	96%	48	61	
2	LLGYAIHQIENER	13%	48	61	
3	EKAEIEEEEAR	77%	157	167	
4	EKAEIEEEEAR	40%	157	167	
5	KLESAGVIESR	99%	223	233	
6	KLESAGVIESR	99%	223	233	
7	KLESAGVIESR	99%	223	233	

N=número, P=probabilidad de identidad, I=posición de inicio, F=Posición final y M=modificaciones.
D= Desaminación (Asparagina N y Ac Glutámico Q), O= Oxidación (Metionina M) y C= Carbamida metilación (Cisteína C)
+(n)= número de repeticiones de modificaciones en los espectros.
En minúsculas, se muestran los aminoácidos modificados durante el proceso de identificación.

A0A084J462_BACMY (100%), 28,775.6 Da

GTP-sensing transcriptional pleiotropic repressor CodY OS=Bacillus mycoides OX=1405 GN=codY PE=3 SV=1
3 exclusive unique peptides, 3 exclusive unique spectra, 8 total spectra, 36/259 amino acids (14% coverage)

```

MELLAKTRKL  NALLQSAAGK  PVNFREMSDT  MCEVIEANVF  VVSRRGKLLG
YAIHQIENE  RMKHMLAERQ  FPEEYTSLSF  NVTETSSNLG  VDSDYTAFPV
ENRELFQGL  TTIVPVGGL  ERLGTLVLAR  LGQEFLLDDL  ILAEYSSTVV
GMEILREKAE  EIEEEARSKA  VVQMAISSLS  YSELEAIEHI  FEELNGTEGL
LVASKIADRV  GITRSVIVNA  LRKLESAGVI  ESRSLGMKGT  YIKVLNDKFL
QELAKLKTN

```

Figura 22. Ubicación de cobertura de péptidos de la muestra AX-30. En amarillo se marcan la secuencia de los péptidos identificados por MS en contraste de la secuencia completa de la proteína depositada en la base de datos de la UniProt.

La proteína CodY es un polipéptido altamente conservado en bacterias bajas en G + C, como el grupo de *Bacillus cereus*, y que al igual que EF-TU, es dependiente de GTP, su principal función es detectar la concentración de GTP intracelular como un indicador de las condiciones nutricionales y regula la transcripción de los genes de la fase estacionaria temprana y la esporulación, lo que permite que la célula se adapte a la limitación de nutrientes (Han et al., 2016; Ratnayake-Lecamwasam et al, 2001). En el caso de *Bt*, esta proteína participa en la regulación temprana de la fase estacionaria de crecimiento, así como también participan en la regulación del inicio de síntesis de las proteínas cristal a través de la regulación de los genes NprR y NprX, que participan en la cascada de señalización para la esporulación (Dubois et al., 2013). Sin embargo, al ser proteínas intracelulares que participan activamente en al inicio de la fase estacionaria, se desconoce si tienen participación activa posterior a la esporulación en los mecanismos de acción de las proteínas Cry o en

la formación de nuevos bacilos a partir de las esporas liberadas y mucho menos en procesos citotóxicos contra células cancerígenas.

10.6.2.4 Péptidos identificados de la muestra A34-75

Los péptidos identificados de A34-75 fueron los más extensos, un total de 38 probables proteínas, de las cuales para la obtención de péptidos solo se tomaron en cuenta las secuencias de mayor porcentaje de cobertura, mayor probabilidad de identidad y que la secuencia correspondiera a una proteína bien definida y caracterizada en bases de datos. La proteína que cumplió con estas condiciones fue la formiato acetiltransferasa, misma que al ser emparejada con el programa Scaffold4, indicó que pertenece a la subespecie *Bt tolworthi*, que como ya se había mencionada en apartados anteriores (Cruz-Nolasco, 2014), es a la variedad que pertenece nuestra cepa A34. La piruvato cinasa es la otra proteína de la que se obtuvieron péptidos, ambas proteínas tuvieron un porcentaje de cobertura de 41 y 49% respectivamente, y de identidad del >95%. En la tabla 12 podemos ver las 20 secuencias de aminoácidos obtenidas a partir del emparejamiento con la proteína piruvato cinasa. En dicha tabla se muestra que los péptidos 3, 11, 17 y 19 están por debajo del 90% de probabilidad de identidad lo que significa que los espectros obtenidos de esos péptidos, podrían no encajar perfectamente con la secuencia de esta proteína.

Tabla 12: Péptidos obtenidos de la muestra A34-75 emparejada con Piruvato cinasa

N	Secuencia	P	I	F	M
1	IVcTIGPASESIEKLEqLIEAGmNVAR	94%	6	32	C (+57), D (+1), O (+16)
2	LNFSHGSHEEHGAR	94%	33	46	
3	TVGILLDTK	63%	60	68	
4	TVGILLDTKGPEIR	100%	60	73	
5	THDFVDGqAELVTGAEVVLSTEQVLGTAEK	98%	74	103	D (+1)
6	FSVSYAGLYDDVDPGSR	99%	104	120	
7	ILIDDGLIELEVIEK	100%	121	135	
8	GVNVPNVSİK	98%	155	164	
9	GVNVPNVSİKLPGITEK	100%	155	171	
10	DVKDIIFGIEQK	98%	172	183	
11	DIIFGIEQK	87%	175	183	
12	VDFIAASFVR	100%	184	193	
13	KASDVLEIR	95%	194	202	
14	ELLEEHNAQYIQIVPK	100%	203	218	
15	IENQEGIDNIDSILEVSDGLmVAR	100%	219	242	O (+16)
16	SPIVAVTSDEQVGRR	99%	394	408	
17	LALVWGVQAFmAEK	76%	409	422	O (+16)
18	IHVVGEEIAK	97%	469	478	
19	TAAEAVANVNEGDILVTTSTDKDmIPAIEK	53%	496	525	O (+16)
20	GIVYnGHAEVL	99%	575	585	D (+1)

N=número, P=probabilidad de identidad, I=posición de inicio, F=Posición final y M=modificaciones.
 D= Desaminación (Asparagina N y Ac Glutámico Q), O= Oxidación (Metionina M) y C= Carbamida metilación (Cisteína C)
 +(n)= número de repeticiones de modificaciones en los espectros.
 En minúsculas, se muestran los aminoácidos modificados durante el proceso de identificación.

Mientras que la figura 23 muestra el mapa de cobertura de los péptidos, se nota una marcada zona de cobertura desde el aminoácido número 6 hasta el 242, que a pesar de contener algunos huecos, se tiene una región de aproximadamente 90% de cobertura.

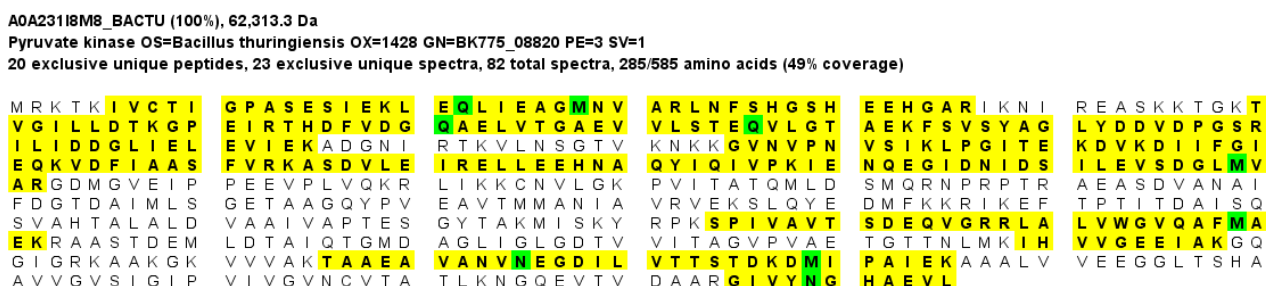


Figura 23. Ubicación de cobertura de péptidos de la muestra A34-75 emparejada con Piruvato cinasa. En amarillo se marcan la secuencia de los péptidos identificados por MS en contraste de la secuencia completa de la proteína depositada en la base de datos de la

UniProt, mientras que en verde se indican los péptidos modificados durante el proceso de identificación.

Para el caso de los péptidos de A34-75 emparejados con formiato acetiltransferasa, se obtuvieron 22 secuencias (Tabla 13), que de forma general proporcionan una zona de cobertura a lo largo de toda la secuencia de la proteína, con sus respectivos gaps o zonas no emparejadas (Figura 24).

Tabla 13: Péptidos obtenidos de la muestra A34-75 emparejada con Formiato acetil transferasa

<i>N</i>	<i>Secuencia</i>	<i>P</i>	<i>I</i>	<i>F</i>	<i>M</i>
1	YGNND DR VDEIAVNLVK	100%	561	577	
2	VVGFQTDKPFKR	99%	97	108	
3	VALYGIDHLIEAK	100%	185	197	
4	TSTFLDIYIER	100%	275	285	
5	TPDYNELFSGDPTWVTESIGG m ALDGRPLVTK	100%	316	347	O (+16)
6	TmATGIAGLSVVADSLSAIK	100%	516	535	O (+16)
7	SLQPYGGIR	10%	109	117	
8	SGVITGLPDAYGR	99%	163	175	
9	RVALYGIDHLIEAK	98%	184	197	
10	QLWDQVMDLTTK	97%	53	64	
11	NLVSmLDGYAVK	99%	679	690	O (+16)
12	LREELSEQMR	92%	215	224	
13	LPYEDAQDGISNTFSIIPK	100%	649	667	
14	KSGVITGLPDAYGR	100%	162	175	
15	IEMALHDTNVLR	100%	504	515	
16	GALASLLSVAK	99%	638	648	
17	FLHTLDNLGPAPEPNLTVLWSK	100%	352	373	
18	EQQIDVINR	87%	735	743	
19	DTKGALASLLSVAK(99%	635	648	
20	DLAnGTLTEEEVQEIVDHFImK	96%	286	307	D (+1), O (+16)
21	DFILNNVNVFEGDESFLAEATEATK	100%	28	52	
22	ALLYAlnGGKDEK	99%	436	448	D (+1)

N=número, P=probabilidad de identidad, I=posición de inicio, F=Posición final y M=modificaciones.

D= Desaminación (Asparagina N y Ac Glutámico Q), O= Oxidación (Metionina M) y C= Carbamida metilación (Cisteína C)

+(n)= número de repeticiones de modificaciones en los espectros.

En minúsculas, se muestran los aminoácidos modificados durante el proceso de identificación.

A0A0G4D760_BACTO (100%), 84,710.9 Da

Formate acetyltransferase OS=Bacillus thuringiensis subsp. tolworthi OX=1442 GN=KNN_05696 PE=4 SV=1

23 exclusive unique peptides, 35 exclusive unique spectra, 226 total spectra, 310/749 amino acids (41% coverage)

MTQVLE NVKN	AWENFKG EKW	KAEIDVR	DFI	LNNVNVFEGD	ESFLAEATEA	TKQLWDQVMD
LTTKERENGG	VLDMDTKIVS	SITSHDPGYL	NKDIEKVVGF	QTDKPFKRSL	QPYGGIRMAE	
QACESYGYEM	DKELSRIFRE	WRKTHNQGVF	DAYTPEMRNA	RKSGVITGLP	DAYGRGRIG	
DYRRVALYGI	DHLIEAKKAD	LNL TGGVMSE	DTMRLREELS	EQMRALQELK	EMAASHGFDI	
SKPATNAQEA	FQWLYFAYLA	AIKEQNGAAM	SLGRTSTFLD	IYIERDLANG	TLTEEEVQEI	
VDHFI M KLRRL	VKFFARTPDYI	ELFSGDPTWV	TESIGGMALD	GRPLVTKNSF	RFLHTLDNLG	
PAPEPNLTVL	WSKQLPENFK	NYCAKMSIKT	SAIQYENDDI	MRPEYGDDYG	IACCVSAMRI	
GKQMQFFGAR	ANLAKALLYA	INGGKDEKSK	AQVGPEYAPI	TSEVLNYEEV	MHKFDMTMEW	
LAGLYLNTLN	VIHYMHDKYS	YERIE M ALHD	TNVLRTMATG	IAGLSVVADS	LSAIKYAKVK	
PIRDENGIAV	DFEIEGDFPK	YGNDDRVDI	IAVNLVKTFM	NKLRKHKTYR	NSVHTMSILT	
ITSNVVGK	TGNTPDGRR	GEPFAPGANP	MHGRDTKGAL	ASLLSVAKLP	YEDAQDGISN	
TFSIIPKALG	KEDDVQVRNL	VSMLDGYAVK	EGHHLNINVF	NRETLM DAME	HPEKYPQLTI	
RVSGYAVNFI	KLTR EQQIDV	INR TMHESM				

Figura 24. Ubicación de cobertura de péptidos de la muestra A34-75 emparejada con Formiato acetil transferasa. En amarillo se marcan la secuencia de los péptidos identificados por MS en contraste de la secuencia completa de la proteína depositada en la base de datos de la UniProt, mientras que en verde se indican los péptidos modificados durante el proceso de identificación.

10.6.2.5 Péptidos identificados de la muestra A34-65

La muestra A34-65 fue emparejada con 16 proteínas distintas, de las cuales solo 7 tienen arriba del 95% de probabilidad en la identidad y de estas 7 secuencias, por tamaño y porcentaje de cobertura, se decidió analizar solo a la secuencia de la proteína no caracterizada (A0A0B5NU36_BACTU), en la que se observa un 34% de cobertura.

De esta secuencia se obtuvieron 19 péptidos que en su mayoría presentan un porcentaje de identidad elevado, sin embargo, algunos tienen bajos porcentajes de identidad como los péptidos numerados 1, 3, 10 y 16. Además del número 4, el cual se descartó por su baja probabilidad de identidad (Tabla 14).

Tabla 14: Péptidos obtenidos de la muestra A34-65 emparejada con la secuencia de una proteína no caracterizada.

<i>N</i>	<i>Secuencia</i>	<i>P</i>	<i>I</i>	<i>F</i>	<i>M</i>
1	VSSALIAEK	84%	93	101	
2	YLPLLATGEK	95%	135	144	
3	LAAYALTEPGSGSDALGAK	78%	145	163	
4	LNAEGTHYVLnGEK	12%	168	181	D (+1)
5	TLILEDALVPK	96%	234	244	
6	TLILEDALVPKENLLGEIGK	98%	234	253	
7	ENLLGEIGK	92%	245	253	
8	GHIIFNILNIGR	98%	254	266	
9	AVEISAQYANQR	96%	280	291	
10	FPLIQEK	76%	301	307	
11	TYAAESSVYR	96%	315	324	
12	TVGLFESR	91%	325	332	
13	AVAASIAEYAIEcSLNK	99%	346	362	C (+57)
14	IFEGTNEINR	96%	403	412	
15	LIVPGTFLR	95%	413	421	
16	YLVTNAK	68%	459	465	
17	IGLmVAGLAAQK	96%	467	478	O (+16)
18	HTPLNVIK	94%	570	578	
19	ILEDERYTV	95%	586	594	

N=numero, P=probabilidad de identidad, I=posición de inicio, F=Posición final y M=modificaciones.

D= Desaminación (Asparagina N y Ac Glutámico Q), O= Oxidación (Metionina M) y C= Carbamida metilación (Cisteína C)

+(n)= número de repeticiones de modificaciones en los espectros.

En minúsculas, se muestran los aminoácidos modificados durante el proceso de identificación.

La figura 25, nos permite ver las zonas de emparejamiento de los péptidos en esta secuencia, que comienza en la posición 93 a lo largo de la parte media de la proteína, que podría considerarse continua hasta la posición 421, y algunos péptidos discontinuos sobre el final de la secuencia. La secuencia descrita A0A0B5NV36_BACTU tiene actividad deshidrogenasa de AcilCoA la cual tiene participación activa en el metabolismo de carbohidratos en *Bt* (<https://www.uniprot.org/uniprot/A0A0B5NU36>, 24/01/2018).

A0A0B5NU36_BACTU (100%), 65,624.5 Da
 Uncharacterized protein OS=Bacillus thuringiensis OX=1428 GN=BF38_765 PE=3 SV=1
 20 exclusive unique peptides, 22 exclusive unique spectra, 471 total spectra, 203/594 amino acids (34% coverage)

MEKTVGN AVK	GGSFLLVDEIT	IDQVFTPEDF	SSEHKMI AKT	TEDFIVNEVL	PELEYLEQHE
FDRSVRL LKE	AGELGLLLGAD	VPEEYGGIGL	DKVSSALIAE	KFSRAGGF AI	THGAHVGI GS
LPIVLF GNEE	QKKKYLP LLA	TGEKLAAYAL	TEPGSGSDAL	GAKTTAR LNA	EGTHYV L NGE
KQWITNSAFA	DVFI VYAKID	GEHFSAFIVE	KDYAGVSTSP	EEKKMG I KCS	STRTLI LEDA
LVPKENLLGE	IGKGHI IAFN	ILNIGRYKLG	VGTVGS AKRA	VEISAQYANQ	RQQFKQPI AR
FPLIQEKL AN	MAAKTYAAES	SVYRTVGLFE	SRMSTLSEEE	VKDGKAVAAS	IAEYAI EC SL
NKVFGEVLD	YTVDEGVQIH	GGYGFM AEYE	I ERM YRDSRI	NRIFEGTNEI	NRLIVP GTFL
RKAMK GELPL	LQKAQKLQEE	LMMMMPEEVG	DEPLALQKYL	VTNAKKI GLM	VAGLAAQK YG
KALDKEQEIL	VNIADIVSNL	YAMESAVLRT	EKAIKTTGLE	KNKQKVLYTE	VFCQEA FN EI
EAHAKETLIA	VENGDM LRMM	LSSLRKLRH	TPLNVI PKKR	EIAAK ILEDE	RYTV

Figura 25. Ubicación de péptidos de la muestra A34-65 emparejada con la secuencia de una proteína no caracterizada. En amarillo se marcan la secuencia de los péptidos identificados por MS en contraste de la secuencia completa de la proteína depositada en la base de datos de la UniProt, mientras que en verde se indican los péptidos modificados durante el proceso de identificación.

En conjunto, las proteínas identificadas de las muestras aisladas de la cepa A34, tienen participación activa en el metabolismo de carbohidratos, sin embargo, de estas proteínas solo se ha descrito que la piruvato cinasa puede tener participación en la regulación de la proliferación y crecimiento de tumores cancerígenos (Israelsen and Vander Heiden, 2015). Al igual que como se describió para el caso de aldehído deshidrogenasa, esta información proviene de investigaciones con isoformas de piruvato cinasa sintetizadas por las mismas células que componen los tejidos cancerígenos, no hay indicios de la participación de proteínas provenientes del metabolismo de Bt, que afecten el crecimiento de este tipo de células. Por lo que sería interesante evaluar la función de esta proteína completa sin fragmentar sobre este tipo de células.

10.7 Proteínas identificadas y su efecto contra el cáncer.

10.7.1 Factor de elongación TU

Como se mostró en el apartado 10.4 el extracto proteico obtenido de la banda de 50 KDa aproximadamente, producido por la cepa AX, fue la que mejor resultado mostró al inhibir el crecimiento de células MCF-7. Contrario a lo esperado, al identificar las proteínas contenidas en dicha banda, se encontró que la de mayor probabilidad y homología fue Factor de elongación TU (EF-TU), esta proteína está involucrada en la síntesis de proteínas bacterianas, en la regulación de la síntesis de ARN ribosomal y en general se le encuentra involucrada en procesos traduccionales de la información de algunas bacterias (Beck et al., 1978; Gong et

al., 2012; Kjeldgaard et al, 1993). En diferentes cepas de *Bt*, la presencia del EF-TU se ve incrementada hasta 2 veces más en la fase estacionaria, cuando la acumulación y formación de los cuerpos cristalinos de naturaleza proteica se lleva a cabo (Gong et al., 2012), lo cual puede explicar la presencia de estas proteínas atrapadas entre las redes cristalinas que conforman los cuerpos parasporales producidos por las cepas de *Bt* como fue encontrado en nuestros resultados. No existen reportes que indiquen que en forma aislada, tenga actividad antiproliferativa sobre células cancerígenas, como se describe en este trabajo. Por lo que es necesario aislar y purificar esta proteína y probar esta actividad en células tumorales. Nuestros datos pueden contribuir a un nuevo campo de estudio para el tratamiento del cáncer a partir de proteínas participes del metabolismo de bacterias como *Bt*.

En este contexto, Halliday (1983) describió que las proteínas EF-TU comparten ciertas similitudes funcionales y estructurales con las proteínas RAS de mamíferos, entre ellas, interactuar con nucleótidos de guanina (GTP) así como 2 regiones homólogas en secuencia y estructura, responsables de la unión de GTP. Otras dos regiones homólogas contienen aminoácidos críticos para la activación del potencial de transformación de las proteínas RAS de los mamíferos (Halliday, 1983; Simanshu et al., 2017). Las proteínas RAS son interruptores binarios, que alternan entre los estados ON y OFF durante la transducción de señales involucradas en la proliferación, migración, diferenciación y supervivencia de las células. Estos interruptores normalmente están estrechamente controlados, y todas sus interacciones se llevan a cabo en la membrana plasmática (Nickerson et al., 2013; Simanshu et al., 2017). Su localización está determinada por la modificación específica de lípidos, composición local de la membrana y por la naturaleza electrostática de las regiones hipervariables propias de la proteína, de 19-20 a.a en el extremo C-terminal (Abankwa et al., 2010). Múltiples investigaciones describen el papel de los oncogenes y proteínas RAS mutadas presentes en el desarrollo de enfermedades como el cáncer (Edkins et al., 2006; Ostrem and Shokat, 2016; Scheffzek et al., 2010; Simanshu et al., 2017; To et al., 2013). Sin embargo, en la actualidad ya existen reportes de moléculas y elementos identificados que inhiben

la proliferación de células cancerígenas al atacar e inhibir las funciones llevadas a cabo por las proteínas RAS (Ostrem and Shokat, 2016). Uno de estos reportes habla de la efectividad que péptidos sintéticos en forma de α -hélice, tiene sobre el sitio de unión GTP de una mutante de proteína RAS, con lo cual se inhibe la fosforilación y se interrumpe la ruta metabólica impidiendo la proliferación de células (Patgiri et al., 2011). Tomando esto en consideración y la estructura del EF-TU (Figura 26 A) cabe la posibilidad de que durante el proceso de incubación de las células MCF-7 con el extracto proteico AX-50, las proteínas EF-TU que podrían estar integras o fragmentadas, puedan contener pequeñas α -hélice que interactúen con las proteínas RAS, que se ha visto tienen un papel importante en la modulación del crecimiento en las células MCF-7 (Datta et al., 2006), y por lo tanto tengan un efecto similar a los péptidos sintéticos que se ha descrito sobre la disminución de la proliferación de estas células.

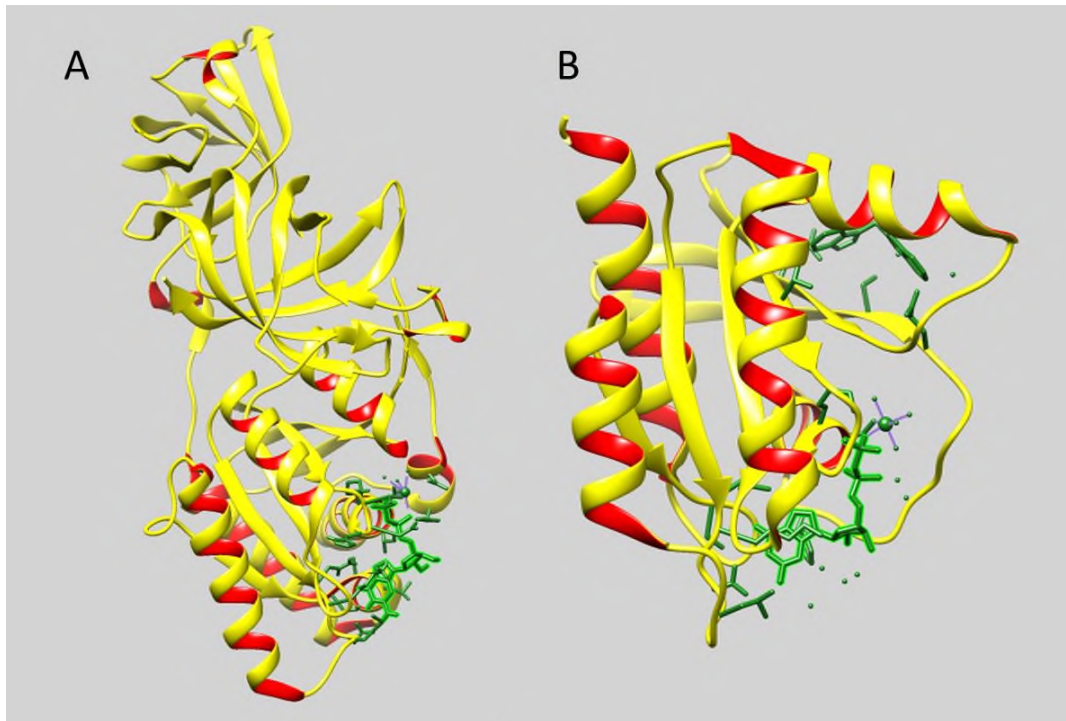


Figura 26. Comparación de las estructuras tridimensionales A) EF-TU consenso expresada en *E. coli* y B) K-RAS *Homo sapiens*. A) EF-TU: estructura consenso expresada en *E. coli* (PDB: 5W7Q) obtenida a partir del alineamiento por homología con Jpred. B) K-RAS. Proteína KRAS mutada unida a GDP (PDB: 4EPV). Las moléculas en verde indican el sitio de unión a GDP que comparten ambas proteínas.

Los gráficos moleculares fueron realizados con el software UCSF Chimera. Chimera fue desarrollado por Resource for Biocomputing, Visualization, and Informatics de la University of California, San Francisco (supported by NIGMS P41-GM103311).

Por otro lado, como mencionó Halliday (1983), al compartir homología estructural en los sitios activos (Figura 26 moléculas en color verde), y utilizar el mismo sustrato, puede que la presencia en altas concentraciones del EF-TU, en el cultivo de células MCF-7, y que la posición de las proteínas RAS en la membrana de dichas células, genere una competencia, donde al estar EF-TU en mayor concentración, acapare la mayor cantidad de sustrato (GTP), por el cual, al no disponer de él, la célula cancerígena no pueda desempeñar sus procesos metabólicos y comience a morir. Sin embargo, todo esto debería ser demostrado como ya se propuso en apartados anteriores.

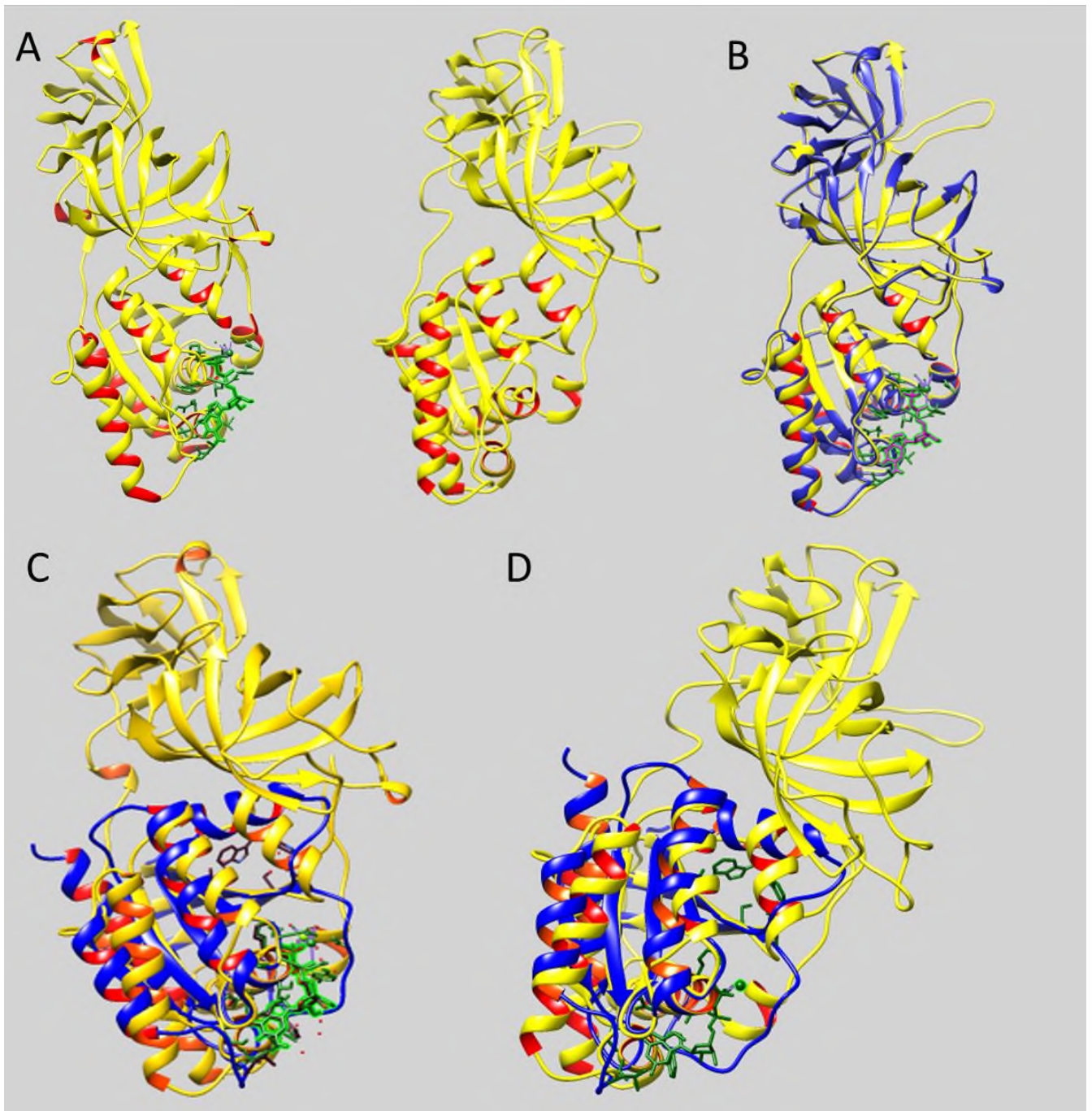


Figura 27. Comparación entre estructuras EF-TU, modelos generados y K-Ras. A) Indica las estructuras de la proteína EF-TU (PDB: 5W7Q) y el modelo generado con Chimera de la secuencia obtenida por MS. B) Muestra el emparejamiento espacial de ambas estructuras donde la superposición de estructuras muestra un alto nivel en de homología y fiabilidad del modelo. C) Señala la superposición de las estructuras EF-TU (PDB: 5W7Q) y la proteína K-RAS (4EPV). D) Propone la superposición y homología estructural entre el modelo de la secuencia EF-TU obtenida por MS, y la proteína K-RAS (4EPV).

Los gráficos moleculares fueron realizados con el software UCSF Chimera. Chimera fue desarrollado por Resource for Biocomputing, Visualization, and Informatics de la University of California, San Francisco (supported by NIGMS P41-GM103311).

En la figura 27 se muestran modelos bioinformáticos que indican los altos niveles de homología estructural encontrado entre las proteínas EF-TU depositada en el PDB y la secuencia obtenida por MS, así como la homología descrita por Halliday (1983), entre las proteínas EF-TU y proteínas RAS (K-RAS en este caso), al igual que con el modelo generado de nuestras proteínas identificadas. Como ya se mencionó, estas similitudes en secuencia (Anexo 7), pueden ser las responsables de la actividad antiproliferativa encontrada de nuestra proteína sobre las células MCF-7, cuyos mecanismos deben ser estudiados.

En informes recientes, se ha demostrado que los péptidos son una alternativa interesante en la búsqueda de nuevos tratamientos para el cáncer (Ortiz-Martinez et al., 2014). De estos se ha comprobado que diferentes fragmentos peptídicos provenientes de diversas fuentes naturales, pueden servir como nuevas dianas terapéuticas a nivel farmacológico contra el cáncer (Tabla 15). Se ha descrito que estos péptidos afectan a las células vía perforación y daño de la membrana, sin embargo, al igual que muchas otras investigaciones, no se tienen bien esclarecidos los mecanismos de acción de cada uno de estos (Aina et al., 2002; Schweizer, 2009).

Tabla 15 Péptidos con actividad contra cáncer.

<i>Péptido</i>	<i>Secuencia</i>	<i>Actividad</i>
<i>Melitina</i>	GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ	Membranolíticos ¹
<i>LL-37</i>	LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLV RTES	
<i>Cecropina B</i>	KWKVFKKIEKMGRNIRNGIVKAGPAIAVLG EAKAL	Células de cáncer de mama (membrana) ²
<i>Magainina 2</i>	GIGKFLHSAKKFGKAFVGEIMNS	
<i>ND</i>	VPWMEPAYQRFL	
<i>ND</i>	HLQIQPWYPQIS	

Tabla modificada y adaptada de Schweizer 2009 (1), y Aina et al., 2002 (2). ND: no clasificado.

A partir de estos péptidos reportados (Tabla 15), se realizó un análisis por homología de secuencia y estructura frente al modelo generado del EF-TU identificado en este trabajo (Figura 27A), sin embargo no se pudo encontrar modelos con valores adecuados para considerar como modelos fiables. Curiosamente la

única secuencia que obtuvo un alineamiento parcial la proteína identificada fue con el péptido Melitina, quien tiene conformación helicoidal (Hristova et al., 2001), con el extremo C-terminal de la secuencia de EF-TU que se identificó y modeló en este trabajo, donde 9 a.a del péptido alinean en base a sus características fisicoquímicas, tanto en el modelo de EF-TU cristalizada (5W7Q) y el modelo generado de manera experimental (Figuras 26A y 27A respectivamente), no se muestra una homología estructural como se pudiera esperar en base a la secuencia alineada. Sin embargo esto quizá no esté afectando la actividad antiproliferativa encontrada, si no que se deba a otro tipo de mecanismo que no es igual al propuesto para el péptido Melitina.

Con la información disponible de proteínas PS que están en los cristales formados por *Bt* y que tienen actividad citotóxica sobre células cancerígenas, así como péptidos de diferentes fuentes que han sido estudiados, en este trabajo no se encontró una relación directa tanto en homología y estructura con las PS y con algunos péptidos reportados con actividad antiproliferativa con las proteínas identificadas en este trabajo. No obstante, este trabajo sugiere que otras proteínas del metabolismo de *Bt*, incluidas en el cristal también están involucradas en procesos de toxicidad contra células MCF-7 de cáncer de mama. En conjunto los hallazgos de este trabajo permiten concluir que la hipótesis planteada inicialmente es rechazada dado que no se encontró la participación de PS. Sin embargo, esto abre la puerta a diferentes interrogantes y alternativas que deberán ser estudiadas en trabajos posteriores y no solo la búsqueda de parasporinas del cristal sino a otras proteínas que puedan estar involucradas en estos procesos contra el cáncer.

11. CONCLUSIONES

- Los cristales producidos por las cepas AX y A34 guardan similitud morfológica entre las 2, al encontrarse cristales de forma irregular (superficialmente) y semiesférica.
- De las bandas seleccionadas solo AX-50 y A34-65 mostraron valores de actividad antiproliferativa estadísticamente significativos.
- El análisis de la identificación de proteínas permitió identificar 41 proteínas que podrían estar participando en la actividad antiproliferativa, de las cuales los análisis por identidad y homología sugieren que en el caso de AX-50 y A34-65, las proteínas responsables de dicha actividad son el Factor de elongación TU y AcilCoA deshidrogenasa respectivamente.
- Los modelos bioinformáticos obtenidos por modelado y la información bibliográfica, sugieren que una de las vías probables de acción de las proteínas identificadas, sea la interacción con proteínas de membrana de las células MCF-7 como las proteínas KRAS.
- Los resultados de este trabajo relacionan por primera vez al Factor de Elongación TU, producido por *Bt*, como una proteína con actividad antiproliferativa contra células de cáncer de mama.

12. PERSPECTIVAS DEL TRABAJO

- Clonar, aislar y purificar las secuencias de los péptidos identificados de la proteína EF-Tu para comprobar que sean los responsables de esta actividad antiproliferativa mostrada en este trabajo.
- Ampliar la búsqueda de genes y proteínas Cry en ambas cepas, e identificar si pertenecen a la familia de PS.
- Identificar por secuenciación el resto de bandas proteicas que no fueron analizadas en este trabajo.
- Secuenciar el genoma de las cepas AX y A34 y hacer una búsqueda dirigida de proteínas con actividad de interés.

13. ANEXOS

13.1 Composición de las soluciones Stock

Componente	Concentración
Solución A (cloruros)	
Cloruro de Calcio dihidratado	0.106 g/l
Cloruro de potasio	0.5 g/l
Solución B (Sulfatos)	
Sulfato de magnesio heptahidratado	0.38 g/l
Sulfato de manganeso	0.05 g/l
Sulfato de zinc heptahidratado	0.0075 g/l
Sulfato de cobre heptahidratado	0.0045 g/l
Solución C (citratos)	
Citrato férrico	0.075 g/l
Solución D (Fosfatos)	
Fosfato de sodio dibásico	1.86 g/l
Fosfato de sodio monobásico	1.153 g/l

12.2 Protocolo de extracción DNA

12.2.1 Extracción de DNA Plasmídico.

El procedimiento de lisis alcalina es el protocolo miniprep comúnmente más utilizado, el DNA que se puede separar de diferentes tipos de cultivos bacterianos en pequeñas cantidades (1 o 2 μ l). Las bacterias son lisadas por una solución que contiene dodecilsulfato sódico (SDS) e hidróxido de sodio (NaOH), donde el SDS desnaturaliza a las proteínas mientras que el NaOH hace lo mismo con el DNA genómico y plasmídico. La mezcla es neutralizada con acetato de potasio, haciendo que el DNA del plásmido se cierre o reagrupe de forma covalente y de forma rápida. El DNA cromosómico es precipitado junto con las proteínas al igual que los residuos de SDS eliminándose por centrifugación. El DNA realineado se es separado y recuperado del sobrenadante mediante precipitación con etanol.

- Se toma una alícuota de 1.5 mL de medio con las células, son centrifugadas a máxima velocidad por 1 min y se descarta el sobrenadante.
- El pellet es resuspendido en 100 μ l de solución GTE (Glucosa/TRIS base/EDTA) y se incuba por 5 min a temperatura ambiente.
- Se agregan 200 μ l de la solución NaOH/SDS y se mezcla el tubo por inversión, se deja incubar en hielo por 5 min.
- Se agregan 150 μ l de acetato de potasio y se mezcla vigorosamente por vortex a máxima velocidad. Se deja incubar en hielo durante 5 min.

- Terminado el tiempo de incubación, inmediatamente se centrifuga a 13000 rpm durante 3 min. El sobrenadante es transferido a un tubo nuevo y el pellet es descartado (DNA genómico y proteínas).
- Al sobrenadante se le agregan 0.8 ml de EtOH 95% y se deja incubar 2 min a temperatura ambiente para la precipitación del DNA plasmídico.
- Se centrifuga 1 min a 13000 rpm, el pellet formado es resuspendido y lavado con etanol al 70%.
- Nuevamente se centrifuga y descarta el sobrenadante, el pellet es secado mediante vacío.
- El pellet es resuspendido en 30 μ l de buffer TE (TRIS/EDTA) o en agua libre de DNAasas.

Para lograr una mayor eficiencia en los diferentes procedimientos a realizar con el DNA obtenido, se recomienda agregar RNAsas al DNA recuperado.

12.2.2 Extracción DNA genómico

- Se toma una alícuota de 1.5 mL de medio con las células, son centrifugadas a máxima velocidad por 1 min y se descarta el sobrenadante.
- El pellet es resuspendido en 100 μ l de solución GTE (Glucosa/TRIS base/EDTA) y se incuba por 5 min a temperatura ambiente.
- Se agregan 200 μ l de la solución NaOH/SDS y se mezcla el tubo por inversión, se deja incubar en hielo por 5 min.
- Centrifugar a 13000 rpm por 3 min, transferir el sobrenadante a un microtubo nuevo.
- Añadir un volumen de solución fenol-cloroformo y mezclar por inversión el tubo hasta conseguir una solución blancuzca.
- Centrifugar 13000 rpm por 3 min, transferir el sobrenadante a un nuevo tubo.
- Añadir 2 volúmenes de etanol absoluto frío o 0.6 volúmenes de alcohol isopropílico para precipitar el ADN por 15 min. Centrifugar 5 min a 13000 rpm (el incubar en hielo favorece la precipitación del ADN).
- Descartar el sobrenadante y lavar la pastilla con 500 μ L de alcohol al 70%. Centrifugar 13000 rpm por 5 min.

Descartar sobrenadante y secar al vacío.

12.3 Proceso de tinción y decoloración de geles de acrilamida

Solución	Tiempo
TCA 12.5%	30 minutos
Agua destilada	Lavado 3 veces
Azul Comasie 0.1%	1 hora (o toda la noche)
EtOH 50%	10 minutos
EtOH/AAc/H ₂ O (30:7:63)	30 minutos
MetOH/AAc/H ₂ O (25:10:65)	10 minutos
Lavado final y resuspensión en agua destilada	

12.4 Protocolo para identificación de proteínas proporcionado por el laboratorio universitario de proteómica.

Procesamiento químico de las muestras

Las muestras fueron previamente reducidas con dithiothreitol (Sigma-Aldrich; St Louis, MO, USA), alquilada con iodoacetamida (Sigma-Aldrich) y digerida "in gel" con Tripsina (Promega Sequencing Grade Modified Trypsin; Madison, WI, USA). En el procesamiento de la muestra con tripsina se utilizó una solución de 50mM bicarbonato de amonio (pH 8.2) y la incubación fue de 18 horas a temperatura de 37°C.

Análisis espectrométrico

Los péptidos producidos por clivaje enzimático fueron desalados con Zip Tip C18 (Millipore; Billerica, MA, USA) y aplicados en un sistema LC-MS (Liquid Chromatography-Mass Spectrometry) compuesto de una bomba de nanoflujo EASY-nLC II (Thermo-Fisher Co.; San Jose, CA, USA) acoplado a un espectrómetro de masas LTQ-Orbitrap Velos (Thermo-Fisher Co., San Jose, CA, USA) con fuente de ionización tipo nano-electrospray (ESI).

La calibración del espectrómetro fue realizada con una solución Calmix (N-butilamina, cafeína, péptido Met-Arg-Phe-Ala y Ultramark 1621). Estos calibrantes se utilizan para calibrar el módulo LTQ Velos con trampa de iones (IT) y el módulo Orbitrap con detector de masas FT (Fourier Transform) en modo de ionización positiva ESI. La N-butilamina (73.14 Da) se incluye para extender la calibración de masas a menores valores de m/z. Este tipo de calibración permite determinaciones de masas moleculares con exactitudes menores a 5 ppm (partes/millón).

En la cromatografía de líquidos de nano flujo en línea se utilizó un sistema gradiente de 5-80% de solvente B (agua/acetonitrilo con 0.1% de ácido fórmico) y solvente A (agua con 0.1 % de ácido fórmico) en 120 minutos utilizando una columna capilar hecha en casa (ID 0.75 µm y 10cm largo RP-C18). El flujo del sistema LC fue de 300 nanolitros/minuto.

El escaneo total de iones (Full Scan) fue realizado en el analizador Orbitrap con un poder de resolución de masas (Resolution Power; $RP=m/FWHM$) de 60,000. La fragmentación de los péptidos se realizó aplicando los métodos de CID (Collision-Induced Dissociation) y HCD (High-energy Collision Dissociation). Todos los espectros fueron adquiridos en modo de detección positivo. La ejecución y captura de los datos de fragmentación fueron realizados de forma dependiente del escaneo total de iones según las cargas pre-determinadas (solamente se fragmento iones con carga $z 2+$, $z 3+$ y $z 4+$) con un ancho de aislamiento de 2.0 (m/z), energía de colisión normalizada de 35 unidades arbitrarias, activación Q de 0.250, tiempo de activación de 10 milisegundos y tiempo máximo de inyección de 10 milisegundos por micro-escaneo. Durante la captura automática de los datos fue utilizado la exclusión dinámica de iones: (i) lista de exclusión de 200 iones, (ii) tiempo de pre-exclusión de 30 segundos y (iii) tiempo de exclusión de 70 segundos.

Búsqueda en PDB e identificación de proteínas

La identificación de proteínas se realizó con los datos espectrométricos en formato .raw en el programa Proteome Discoverer 1.4. (Thermo-Fisher Co., San Jose, CA, USA) a través del motor de búsqueda Sequest HT. Para la búsqueda de identidad se utilizó la base de datos de proteínas *Bacillus thuringiensis* (UniProt). Se utilizó un FDR-False Discovery Rate (Mínimo) de 0.01 y FDR 0.05 (Máximo) además de la base de datos invertida (Decoy database) como herramienta del programa de validación "Percolator". La tolerancia máxima de diferencia de masas moleculares del ion precursor cuando comparados los valores teóricos contra experimentales (precursor mass tolerance) fue de 20 ppm y la tolerancia para los fragmentos obtenidos por disociación del ion precursor (fragment mass tolerance) fue de 0.6 Da. Para la búsqueda automática fueron establecidas modificaciones constantes (carbamido-metilación de cisteínas) y variables como oxidación de metioninas (M) y deaminación de asparagina (N) y glutamina (Q).

12.5 Oligonucleótidos reportados por Espino-Vázquez 2012

Nombre	Secuencia	Tm artículo	Amplicón
<i>PS1 F</i>	TACAAGCAGGGCGTCCAG	57.5	737
<i>PS1 R</i>	TCTGCTGGAATTTGCAATGCT	56.3	
<i>PS2 F</i>	TGTTGGGACTGTTCAGTACG	54.5	237
<i>PS2 R</i>	GTAGTAGAGAATGAACTTCTCCACC	54.7	
<i>PS3 F</i>	TGGGCGAATACTGACGTCCT	58.3	1057-1069
<i>PS3 R</i>	GCAGTGCTTGTACCCGCTAC	58.5	
<i>PS4 F</i>	GACAGAAACGTCTCGGAGTT	59.3	172
<i>PS4 R</i>	TACCAGTGTAACCAGGAGCA	59.1	
<i>PS5 F</i>	CGGAGACAACAACAACAATG	65.8	414
<i>PS5 R</i>	CCAGCATAACCTGGTAAAGGCG	66.9	
<i>PS6 F</i>	TACAAGCGAGTTAGCATC	53.6	647
<i>PS6 R</i>	GATAAAGTTCAACGGTTCCAGC	54.2	

12.6 Identificación de proteínas

#	visible?	starred?	Bio View: Identified Proteins (41) Including 0 Decoys	Accession Number	Molecular Weight	Protein Grouping Ambiguity	Probability Legend:					
							over 95%	80% to 94%	50% to 79%	20% to 49%		
							BioSample AX-55	BioSample AX-50	BioSample AX-30	BioSample A34 75	BioSample A34 65	BioSample A34 30
1	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	3-hydroxypropionyl-coenzyme A dehydratase OS=Bacillus thuringiensis OX=1428 GN=AYK81_19945 PE=3 SV=...	A0A0B5NR66_BACTU (+28)	28 kDa			11%				
2	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate--homocysteine methyltransferase OS=Bacillus thuringiensis Sbt003 ...	A0A0D1NJG5_BACTU (+23)	87 kDa				5.8%			
3	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	60 kDa chaperonin OS=Bacillus thuringiensis subsp. tolworthi OX=1442 GN=groL PE=3 SV=1	A0A0G4D7Y9_BACTO (+10)	57 kDa				8.6%	1.8%		
4	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit OS=Bacillus mycooides OX=1405 GN=clpC PE=3 SV=1	A0A084ITJ8_BACMY (+17)	91 kDa				6.5%			
5	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	Aconitate hydratase OS=Bacillus thuringiensis subsp. indiana OX=180850 GN=citB PE=3 SV=1	A0A0K05BIO_BACT3 (+10)	99 kDa				7.5%	0.88%		
6	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	Alcohol dehydrogenase AdhP OS=Bacillus thuringiensis OX=1428 GN=CIN411_03155 PE=3 SV=1	A0A2A8P1P6_BACTU (+1)	37 kDa				23%			
7	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	Alpha-ketoacid dehydrogenase subunit beta OS=Bacillus thuringiensis serovar subtoxicus OX=475791 GN=BK...	A0A243DMH9_BACTU (+1)	37 kDa	★			15%			
8	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	Carboxyl transferase domain protein OS=Bacillus mycooides OX=1405 GN=pccB PE=4 SV=1	A0A0A0WKW9_BACMY (+...	57 kDa				5.1%	2.3%		
9	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	Chaperone protein ClpB OS=Bacillus thuringiensis Sbt003 OX=1235825 GN=clpB PE=3 SV=1	A0A0D1R2P6_BACTU (+57)	97 kDa				6.0%			
10	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	Chaperone protein DnaK OS=Bacillus thuringiensis subsp. tolworthi OX=1442 GN=dnaK PE=2 SV=1	A0A0G4CUZ4_BACTO (+11)	66 kDa				27%			
11	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	Contig0002, whole genome shotgun sequence OS=Bacillus thuringiensis Sbt003 OX=1235825 GN=C797_03829...	A0A0D1PTJ7_BACTU (+13)	64 kDa				4.5%			
12	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	Contig0014, whole genome shotgun sequence OS=Bacillus thuringiensis Sbt003 OX=1235825 GN=C797_13198...	A0A0D1R2T8_BACTU (+6)	38 kDa				23%	2.3%		
13	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	Contig0015, whole genome shotgun sequence OS=Bacillus thuringiensis Sbt003 OX=1235825 GN=C797_13718...	A0A0D1R226_BACTU (+18)	36 kDa				13%			
14	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	Contig0015, whole genome shotgun sequence OS=Bacillus thuringiensis Sbt003 OX=1235825 GN=C797_14153...	A0A0D1R2B9_BACTU (+28)	29 kDa			7.9%				
15	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	Contig0017, whole genome shotgun sequence OS=Bacillus thuringiensis Sbt003 OX=1235825 GN=C797_14907...	A0A0D1R1C1_BACTU (+15)	72 kDa				20%	1.5%		
16	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	Contig0101, whole genome shotgun sequence OS=Bacillus thuringiensis Sbt003 OX=1235825 GN=C797_26867...	A0A0D1NK7T_BACTU (+15)	64 kDa				5.3%	9.3%		
17	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	Dihydropolipoamide acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex OS=Bacillus thuringiensis...	A0A0D1QZ39_BACTU (+5)	43 kDa				14%	7.3%		
18	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	Dihydropolipoamide dehydrogenase OS=Bacillus thuringiensis subsp. kurstaki OX=29339 GN=lpdA PE=3 SV=1	A0A0F6FP38_BACTK (+10)	49 kDa				7.0%			
19	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	Elongation factor G OS=Bacillus thuringiensis Sbt003 OX=1235825 GN=fusA PE=3 SV=1	A0A0D1QWQ3_BACTU (+5)	76 kDa				13%			
20	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	Elongation factor Tu OS=Bacillus thuringiensis serovar canadensis OX=180855 GN=tuf PE=3 SV=1	A0A243NAT9_BACTU (+1)	43 kDa		16%		23%	3.3%		
21	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	Enolase OS=Bacillus thuringiensis OX=1428 GN=eno PE=3 SV=1	A0A0M0MIH2_BACTU (+9)	46 kDa				10%	2.8%		
22	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	Enoyl-CoA hydratase/isomerase family protein OS=Bacillus thuringiensis OX=1428 GN=BF38_767 PE=4 SV=1	A0A0B5NTV5_BACTU (+47)	87 kDa				4.4%			
23	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	Formate acetyltransferase OS=Bacillus thuringiensis subsp. tolworthi OX=1442 GN=KNN_05696 PE=4 SV=1	A0A0G4D760_BACTO (+8)	85 kDa	★			41%	4.7%		
24	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	GTP-binding protein TypA/BipA OS=Bacillus thuringiensis subsp. kurstaki OX=29339 GN=typA PE=4 SV=1	A0A0F6F5S3_BACTK (+18)	69 kDa				9.5%			
25	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	GTP-sensing transcriptional pleiotropic repressor CodY OS=Bacillus mycooides OX=1405 GN=codY PE=3 SV=1	A0A084J462_BACMY (+3)	29 kDa			14%				
26	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	Glutamine-fructose-6-phosphate aminotransferase [isomerizing] OS=Bacillus thuringiensis OX=1428 GN=gL...	A0A0B5NV56_BACTU (+29)	66 kDa				6.3%	5.8%		
27	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS=Bacillus thuringiensis OX=1428 GN=ATN06_25810 PE=3 SV=1	A0A0S3C4C2_BACTU (+9)	36 kDa				9.0%	3.0%		
28	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	Hydroxyacetone kinase-like protein OS=Bacillus thuringiensis subsp. tolworthi OX=1442 GN=KNN_01920 PE=4...	A0A0G4CX45_BACTO (+27)	61 kDa				3.8%	3.8%		
29	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	Methionine--tRNA ligase OS=Bacillus thuringiensis T01-328 OX=1324966 GN=metG PE=3 SV=1	A0A0F6IZ34_BACTU (+10)	75 kDa				11%			
30	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	Ornithine aminotransferase OS=Bacillus thuringiensis subsp. tolworthi OX=1442 GN=rocD PE=3 SV=1	A0A0G4D6M3_BACTO (+16)	43 kDa				9.3%			
31	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	Phosphoglycerate kinase OS=Bacillus thuringiensis OX=1428 GN=pgk PE=3 SV=1	A0A1B1LEI6_BACTU (+13)	42 kDa				14%			
32	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	Protein prkA OS=Bacillus thuringiensis OX=1428 GN=ATN06_02670 PE=4 SV=1	A0A0B5XK51_BACTU (+11)	73 kDa				5.1%			
33	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	Putative aldehyde dehydrogenase DhaS OS=Bacillus thuringiensis OX=1428 GN=dhaS2 PE=3 SV=1	A0A1E8AA22_BACTU	54 kDa	★	46%	2.6%	4.9%	5.1%		
34	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	Pyruvate kinase OS=Bacillus thuringiensis OX=1428 GN=BK775_08820 PE=3 SV=1	A0A231I8M8_BACTU (+1)	62 kDa	★			49%			
35	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	Succinate dehydrogenase/fumarate reductase, flavoprotein subunit OS=Bacillus thuringiensis OX=1428 GN=s...	A0A0B5NQ57_BACTU (+11)	66 kDa				3.4%	3.4%		
36	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	Succinate--CoA ligase [ADP-forming] subunit alpha OS=Bacillus mycooides OX=1405 GN=sucD PE=3 SV=1	A0A0D65QA9_BACMY (+9)	31 kDa				12%			
37	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	Threonine--tRNA ligase OS=Bacillus thuringiensis OX=1428 GN=thrS PE=3 SV=1	A0A1B1LCT8_BACTU	74 kDa				6.4%	1.7%		
38	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	Transketolase OS=Bacillus thuringiensis OX=1428 GN=tkt PE=3 SV=1	A0A0B5NY11_BACTU (+29)	72 kDa				17%			
39	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	Triosephosphate isomerase OS=Bacillus thuringiensis OX=1428 GN=tpiA PE=3 SV=1	A0A0S3C4I8_BACTU (+17)	26 kDa				13%			
40	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	Uncharacterized protein OS=Bacillus thuringiensis OX=1428 GN=BF38_765 PE=3 SV=1	A0A0B5NU36_BACTU (+12)	66 kDa	★			28%	34%		
41	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	Universal stress protein OS=Bacillus thuringiensis subsp. tolworthi OX=1442 GN=KNN_00969 PE=3 SV=1	A0A0G4CVB4_BACTO (+12)	17 kDa				17%			

Proteínas identificadas por porcentaje de cobertura de secuencia

#	Visible?	Starred?	Bio View: Identified Proteins (41) Including 0 Decoys	Accession Number	Molecular weight	Protein Grouping Ambiguity					
						BioSample AX-55	BioSample AX-50	BioSample AX-30	BioSample A34 75	BioSample A34 65	BioSample A34 30
1	✓		GTP-sensing transcriptional pleiotropic repressor CodY OS=Bacillus mycoides OX=1405 GN=codY PE=3 SV=1	ACA094J462_BACMY (+3)	29 kDa			3			
2	✓		3-hydroxypropionyl-coenzyme A dehydratase OS=Bacillus thuringiensis OX=1428 GN=AYK81_19945 PE=3 SV=1	ACA005NR66_BACTU (+28)	28 kDa			3			
3	✓		Contig0015, whole genome shotgun sequence OS=Bacillus thuringiensis Sbt003 OX=1235825 GN=C797_14153...	ACA0D1R2B9_BACTU (+28)	29 kDa			2			
4	✓		Putative aldehyde dehydrogenase Dha5 OS=Bacillus thuringiensis OX=1428 GN=dha52 PE=3 SV=1	ADA1E8AA22_BACTU	54 kDa	★	14	1	2	1	
5	✓		Uncharacterized protein OS=Bacillus thuringiensis OX=1428 GN=BF38_765 PE=3 SV=1	ACA005NU36_BACTU (+12)	66 kDa	★				13	22
6	✓		Formate acetyltransferase OS=Bacillus thuringiensis subsp. tolworthi OX=1442 GN=KWN_05696 PE=4 SV=1	ADA0G4D76D_BACTO (+6)	85 kDa	★				23	3
7	✓		Elongation factor Tu OS=Bacillus thuringiensis serovar canadensis OX=180855 GN=tuf PE=3 SV=1	ACA243NAT9_BACTU (+1)	43 kDa			4		6	1
8	✓		Pyruvate kinase OS=Bacillus thuringiensis OX=1428 GN=BK775_08820 PE=3 SV=1	ADA231I8M8_BACTU (+1)	62 kDa	★				20	
9	✓		Chaperone protein DnaK OS=Bacillus thuringiensis subsp. tolworthi OX=1442 GN=dnaK PE=2 SV=1	ADA0G4CUZ4_BACTO (+11)	66 kDa					12	
10	✓		Contig0017, whole genome shotgun sequence OS=Bacillus thuringiensis Sbt003 OX=1235825 GN=C797_14907...	ADA0D1R1C1_BACTU (+15)	72 kDa					9	1
11	✓		Contig0014, whole genome shotgun sequence OS=Bacillus thuringiensis Sbt003 OX=1235825 GN=C797_13196...	ADA0D1R2T6_BACTU (+6)	38 kDa					5	1
12	✓		Elongation factor G OS=Bacillus thuringiensis Sbt003 OX=1235825 GN=fusa PE=3 SV=1	ADA0D1QWX3_BACTU (+5)	76 kDa					7	
13	✓		Transketolase OS=Bacillus thuringiensis OX=1428 GN=tkt PE=3 SV=1	ADA005NYY1_BACTU (+29)	72 kDa					7	
14	✓		Contig0101, whole genome shotgun sequence OS=Bacillus thuringiensis Sbt003 OX=1235825 GN=C797_26867...	ADA0D1NKT7_BACTU (+15)	64 kDa					2	5
15	✓		Aconitate hydratase OS=Bacillus thuringiensis subsp. indiana OX=180850 GN=citB PE=3 SV=1	ACA0K05B10_BACT3 (+10)	99 kDa					6	1
16	✓		Methionine--tRNA ligase OS=Bacillus thuringiensis T01-328 OX=1324966 GN=metG PE=3 SV=1	ACA0F6I234_BACTU (+10)	75 kDa					4	
17	✓		Alcohol dehydrogenase AdhP OS=Bacillus thuringiensis OX=1428 GN=CW411_03155 PE=3 SV=1	ACA248P1P6_BACTU (+1)	37 kDa					6	
18	✓		Dihydroliponamide acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex OS=Bacillus thuringiensis...	ACA0D1QZ39_BACTU (+5)	43 kDa					5	3
19	✓		Glutamine--fructose-6-phosphate aminotransferase [isomerizing] OS=Bacillus thuringiensis OX=1428 GN=gln...	ADA005NW56_BACTU (+29)	66 kDa					2	4
20	✓		Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS=Bacillus thuringiensis OX=1428 GN=ATN06_25810 PE=3 SV=1	ADA0053C4C2_BACTU (+9)	36 kDa					2	1
21	✓		Carboxyl transferase domain protein OS=Bacillus mycoides OX=1405 GN=pccB PE=4 SV=1	ADA0A0WKN9_BACMY (+35)	57 kDa					3	1
22	✓		GTP-binding protein TypA/BipA OS=Bacillus thuringiensis subsp. kurstaki OX=29339 GN=typA PE=4 SV=1	ADA0F6F553_BACTK (+18)	69 kDa					4	
23	✓		Threonine--tRNA ligase OS=Bacillus thuringiensis OX=1428 GN=thrS PE=3 SV=1	ACA181LCT8_BACTU	74 kDa					3	1
24	✓		Alpha-ketoacid dehydrogenase subunit beta OS=Bacillus thuringiensis serovar subtoxicus OX=475791 GN=BK...	ACA243DMH9_BACTU (+1)	37 kDa	★				3	
25	✓		5-methyltetrahydropteroyl triglutamate--homocysteine methyltransferase OS=Bacillus thuringiensis Sbt003 ...	ADA0D1NDG5_BACTU (+23)	87 kDa					3	
26	✓		Enolase OS=Bacillus thuringiensis OX=1428 GN=eno PE=3 SV=1	ACA0M0M1H2_BACTU (+9)	46 kDa					3	1
27	✓		Hydroxyacetone kinase-like protein OS=Bacillus thuringiensis subsp. tolworthi OX=1442 GN=KWN_01520 PE=4 ...	ADA024GX45_BACTO (+27)	61 kDa					2	2
28	✓		Universal stress protein OS=Bacillus thuringiensis subsp. tolworthi OX=1442 GN=KWN_00969 PE=3 SV=1	ACA0G4CVB4_BACTO (+12)	17 kDa					2	
29	✓		ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit OS=Bacillus mycoides OX=1405 GN=clpC PE=3 SV=1	ADA084ITJ8_BACMY (+17)	91 kDa					3	
30	✓		Enoyl-CoA hydratase/isomerase family protein OS=Bacillus thuringiensis OX=1428 GN=BF38_767 PE=4 SV=1	ADA005NTV5_BACTU (+47)	87 kDa					2	
31	✓		Succinate dehydrogenase/fumarate reductase, flavoprotein subunit OS=Bacillus thuringiensis OX=1428 GN=s...	ADA005NQ57_BACTU (+11)	66 kDa					1	2
32	✓		Dihydrolipoyl dehydrogenase OS=Bacillus thuringiensis subsp. kurstaki OX=29339 GN=lpdA PE=3 SV=1	ACA0F6FP38_BACTK (+10)	49 kDa					2	
33	✓		Phosphoglycerate kinase OS=Bacillus thuringiensis OX=1428 GN=pgk PE=3 SV=1	ACA181LE16_BACTU (+13)	42 kDa					3	
34	✓		Chaperone protein ClpB OS=Bacillus thuringiensis Sbt003 OX=1235825 GN=clpB PE=3 SV=1	ADA0D1R2P6_BACTU (+57)	97 kDa					3	
35	✓		Protein prkA OS=Bacillus thuringiensis OX=1428 GN=ATN06_02670 PE=4 SV=1	ACA005XK51_BACTU (+11)	73 kDa					3	
36	✓		Succinate--CoA ligase [ADP-forming] subunit alpha OS=Bacillus mycoides OX=1405 GN=sucD PE=3 SV=1	ADA0D6SQA9_BACMY (+9)	31 kDa					2	
37	✓		60 kDa chaperonin OS=Bacillus thuringiensis subsp. tolworthi OX=1442 GN=groL PE=3 SV=1	ADA0G4D7Y9_BACTO (+10)	57 kDa					2	1
38	✓		Contig0002, whole genome shotgun sequence OS=Bacillus thuringiensis Sbt003 OX=1235825 GN=C797_03829...	ADA0D1PTJ7_BACTU (+13)	64 kDa					2	
39	✓		Ornithine aminotransferase OS=Bacillus thuringiensis subsp. tolworthi OX=1442 GN=rocD PE=3 SV=1	ADA0G4D6M3_BACTO (+16)	43 kDa					2	
40	✓		Contig0015, whole genome shotgun sequence OS=Bacillus thuringiensis Sbt003 OX=1235825 GN=C797_13718...	ADA0D1R226_BACTU (+18)	36 kDa					2	
41	✓		Triosephosphate isomerase OS=Bacillus thuringiensis OX=1428 GN=tpiA PE=3 SV=1	ADA005C4I8_BACTU (+17)	26 kDa					2	

Proteínas identificadas en base al número de péptidos únicos

Alineamiento entre la secuencia de EF-TU 5W7Q y K-RAS 4EPV

```

EF-TU      RTKPHVNIIGTIIGHVDHGKTTLTAAITTVLAKKGGAEAKAYDQIDNAPEEKGITINTAHVE 60
KRAS       -GMT EYKLVVVGAGGVGKSALTIQLIQ-----NHFVDEYDPTIEDSYRK 43
           .  ::  .:*  .  ::::**  :                               ::  :*  .  :::  ::  :

EF-TU      YETENRHYAHVD---CPGH----ADYVKNMITGAAQMDGAILVWSAADGPMPTREHILL 113
KRAS       QVIDGETCLLDILDITAGQEEYSAMRDQYMRG----EGFLCVFAINN---TKSFEDIHH 96
           .  .  .  .:*  *  *  :  *  **  :*  :  *:  :  :  :  :  :  *  .

EF-TU      ARQVG-----VPYIVVFLNKCDMVDDEELLELVEMEVRELLSEYDFPGDDIPIIRGSA 166
KRAS       YREQIKRVKDSSEVPMVLVGNKSDLPSR----TVDTKQAQDLARSYG-----IPFIETSA 147
           *  :                               :::  **:*  .  :  :  :  :*  .  *  .  **:*  .  **

EF-TU      LKALEGDAEWEDKILELMDAVDSYIPTPERDIDKPF LMPIEDVFSISGRGTVWTGRVERG 226
KRAS       K----TRQGVDDAFYTLVREIRKHKEK----- 170
           :*  :  *  :  :  :  .

EF-TU      IVKVGEEVEIVGIKDTQKTTVTGVEMVGALLRGTKREDVERGQVLAKPGSITPHTKFEAE 286
KRAS       ----- 170

EF-TU      VVLSKEEGGRHTPPFNGYRPQFYFRTTDVTGVIELPEGVEMVMPGDMVKMTVELIAPIA 346
KRAS       ----- 170

EF-TU      MEEGLRFAIREGGRTVGAGVWSKII 371
KRAS       ----- 170
    
```


13 BIBLIOGRAFÍA CITADA

- Abankwa, D., Gorfe, A. A., Inder, K., & Hancock, J. F. (2010). Ras membrane orientation and nanodomain localization generate isoform diversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(3), 1130–1135. <http://doi.org/10.1073/pnas.0903907107>
- Adang, M. J., Crickmore, N., & Jurat-Fuentes, J. L. (2014). Diversity of *Bacillus thuringiensis* Crystal Toxins and Mechanism of Action. In *Advances in Insect Physiology* (Vol. 47, pp. 39–87). <http://doi.org/10.1016/B978-0-12-800197-4.00002-6>
- Ahern, M., Verschueren, S., & Sinderen, D. Van. (2003). Isolation and characterisation of a novel bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis* strain B439. *FEMS Microbiology Letters*, 220, 127–131. [http://doi.org/10.1016/S0378-1097\(03\)00086-7](http://doi.org/10.1016/S0378-1097(03)00086-7)
- Aina, O. H., Sroka, T. C., Chen, M. L., & Lam, K. S. (2002). Therapeutic cancer targeting peptides. *Biopolymers - Peptide Science Section*, 66(3), 184–199. <http://doi.org/10.1002/bip.10257>
- Akiba, T., Abe, Y., Kitada, S., Kusaka, Y., Ito, A., Ichimatsu, T., ... Harata, K. (2009). Crystal Structure of the Parasporin-2 *Bacillus thuringiensis* Toxin That Recognizes Cancer Cells. *Journal of Molecular Biology*, 386(1), 121–133. <http://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.12.002>
- Akiba, T., & Okumura, S. (2016). Parasporins 1 and 2: Their structure and activity. *Journal of Invertebrate Pathology*, 1–6. <http://doi.org/10.1016/j.jip.2016.10.005>
- Argôlo-Filho, R. C., Costa, R. L., Pinheiro, D. H., Corrêa, F. M., Valicente, F. H., Pomella, A. W. V., & Loguercio, L. L. (2014). Requirement of simultaneous assessment of crystal- and supernatant-related entomotoxic activities of *Bacillus thuringiensis* strains for biocontrol-product development. *Toxins*, 6(5), 1598–1614. <http://doi.org/10.3390/toxins6051598>
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingstons, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J.

- A., & Struhl, K. (2003). *Current Protocols in Molecular Biology* (Righbou ed).
- Barboza-Corona, J. E., Vázquez-Acosta, H., Bideshi, D. K., & Salcedo-Hernández, R. (2007). Bacteriocin-like inhibitor substances produced by Mexican strains of *Bacillus thuringiensis*. *Archives of Microbiology*, *187*(2), 117–126. <http://doi.org/10.1007/s00203-006-0178-5>
- Beck, B. D., Arscott, P. G., & Jacobson, A. (1978). Novel properties of bacterial elongation factor Tu. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *75*(3), 1250–1254. <http://doi.org/10.1073/pnas.75.3.1250>
- Birnboim, H. C. (1983). A Rapid Alkaline Extraction Method for the Isolation of Plasmid DNA. *Methods in Enzymology*, *100*(1979), 243–255. [http://doi.org/10.1016/0076-6879\(83\)00059-2](http://doi.org/10.1016/0076-6879(83)00059-2)
- Boonserm, P., Pornwiroon, W., Katzenmeier, G., & Panyim, S. (2004). Optimised expression in *Escherichia coli* and purification of the functional form of the *Bacillus thuringiensis* Cry4Aa delta-endotoxin. *Protein Expression and Purification*, *35*, 397–403. <http://doi.org/10.1016/j.pep.2004.02.016>
- Brar, S. K., Verma, M., Tyagi, R. D., Surampalli, R. Y., Barnabé, S., & Valéro, J. R. (2007). *Bacillus thuringiensis* proteases: Production and role in growth, sporulation and synergism. *Process Biochemistry*, *42*(5), 773–790. <http://doi.org/10.1016/j.procbio.2007.01.015>
- Brasseur, K., Auger, P., Asselin, E., Parent, S., Côté, J. C., & Sirois, M. (2015). Parasporin-2 from a new *Bacillus thuringiensis* 4r2 strain induces caspases activation and apoptosis in human cancer cells. *PLoS ONE*, *10*(8), 1–22. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0135106>
- Bravo-D, H. R., Cruz-Nolasco, A., Raúl Gutiérrez-Lucas, L., Navarro-Mtz, A. K., & Bravo-D, H. R. (2015). Bioinformatics Analysis of NprR-NprX Quorum-Sensing System of *Bacillus thuringiensis* Isolates from the Papaloapan Region, Oaxaca-Mexico. *Advances in Biological Chemistry*, *5*(5), 293–304. <http://doi.org/10.4236/abc.2015.57027>

- Bravo, A., Gill, S. S., & Soberón, M. (2007a). Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon*, *49*(4), 423–435. <http://doi.org/10.1016/j.toxicon.2006.11.022>
- Bravo, A., Gill, S. S., & Soberón, M. (2007b). Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon*, *49*(4), 423–435. <http://doi.org/10.1016/j.toxicon.2006.11.022>
- Bravo, A., Gómez, I., Porta, H., García-Gómez, B. I., Rodríguez-Almazan, C., Pardo, L., & Soberón, M. (2013). Evolution of *Bacillus thuringiensis* Cry toxins insecticidal activity. *Microbial Biotechnology*, *6*(1), 17–26. <http://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2012.00342.x>
- Bravo, A., Sarabia, S., Lopez, L., Ontiveros, H., Abarca, C., Ortiz, A., ... Quintero, R. (1998). Characterization of cry genes in a Mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. *Applied and Environmental Microbiology*, *64*(12), 4965–4972.
- Bulla, L. A., Davidson, L. I., Kramer, K. J., & Jones, B. L. (1979). Purification of the insecticidal toxin from the parasporal crystal of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*. *Biochemical and Biophysical Communications*, *91*(3), 1123–1130.
- Carroll, J., Lit, J., & David, J. (1989). Proteolytic processing of a coleopteran-specific 5-endotoxin produced by *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis*. *Biochemical Journal*, *261*(1), 99–105. <http://doi.org/10.1042/bj2610099>
- Cherif, A., Chehimi, S., Limem, F., Hansen, B. M., Hendriksen, N. B., & Daffonchio, D. (2003). Detection and characterization of the novel bacteriocin entomocin 9, and safety evaluation of its producer, *Bacillus thuringiensis* ssp. *entomocidus* HD9. *Journal of Applied Microbiology*, *95*(5), 990–1000. <http://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.02089.x>
- Cherif, A., Ouzari, H., Daffonchio, D., Cherif, H., Slama, K. Ben, Hassen, A., ... Boudabous, A. (2001). Thuricin 7: a novel bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis* BMG1.7, a new strain isolated from soil. *Letters in Applied Microbiology*, *32*(4), 243–247. <http://doi.org/https://doi.org/10.1046/j.1472-765X.2001.00898.x>

- Cojoc, M., Mäbert, K., Muders, M. H., & Dubrovskaja, A. (2015). A role for cancer stem cells in therapy resistance: Cellular and molecular mechanisms. *Seminars in Cancer Biology*, 31, 16–27. <http://doi.org/10.1016/j.semcancer.2014.06.004>
- Crickmore, N., Zeigler, D. R., Feitelson, J., Schnepf, E., Van Rie, J., Lereclus, D., ... Dean, D. H. (1998). Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 62(3), 807–813. <http://doi.org/1092-2172/98>
- Cruz-Nolasco, A. (2014). *Aislamiento e identificación de cepas de Bacillus thuringiensis productoras de proteína Cry*. Universidad del Papaloapan.
- Cruz Nolasco, A. (2017). *Síntesis de nanoliposomas que contienen parasporinas de Bacillus thuringiensis con actividad antiproliferativa*. Universidad del Papaloapan.
- Datta, D., Flaxenburg, J. A., Laxmanan, S., Geehan, C., Grimm, M., Waaga-Gasser, A. M., ... Pal, S. (2006). Ras-induced modulation of CXCL10 and its receptor splice variant CXCR3-B in MDA-MB-435 and MCF-7 cells: Relevance for the development of human breast cancer. *Cancer Research*, 66(19), 9509–9518. <http://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-4345>
- De Maagd, R. A., Bravo, A., & Crickmore, N. (2001). How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. *Trends in Genetics*, 17(4), 193–199. [http://doi.org/10.1016/S0168-9525\(01\)02237-5](http://doi.org/10.1016/S0168-9525(01)02237-5)
- Deng, C., Peng, Q., Song, F., & Lereclus, D. (2014, July 23). Regulation of cry gene expression in *Bacillus thuringiensis*. *Toxins*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute. <http://doi.org/10.3390/toxins6072194>
- Donovan, W. P., Tan, Y., & Slaney, A. C. (1997). Cloning of the nprA Gene for Neutral Protease A of *Bacillus thuringiensis* and Effect of In Vivo Deletion of nprA on Insecticidal Crystal Protein. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(6), 2311–2317. <http://doi.org/10.1128/aem.63.6.2311-2317.1997>
- Dubois, T., Perchat, S., Verplaetse, E., Gominet, M., Lemy, C., Aumont-Nicaise, M.,

- ... Lereclus, D. (2013). Activity of the *Bacillus thuringiensis* NprR-NprX cell-cell communication system is co-ordinated to the physiological stage through a complex transcriptional regulation. *Molecular Microbiology*, 88(1), 48–63. <http://doi.org/10.1111/mmi.12168>
- Edkins, S., O'Meara, S., Parker, A., Stevens, C., Reis, M., Jones, S., ... Futreal, P. A. (2006). Recurrent KRAS codon 146 mutations in human colorectal cancer. *Cancer Biology and Therapy*, 5(8), 928–932. <http://doi.org/10.4161/cbt.5.8.3251>
- Espino-Vazquez, A. N., Gomez-Treviño, J. A., Galan-Wong, L., & Pereyra-Alferez, B. (2012). Isolation of *Bacillus thuringiensis* strains with cytotoxic activity against MOLT-4, leukemia cell line. *Microbes in Applied Research: Current Advances and Challenges.*, 147–151. <http://doi.org/10.1142/9789814405041>
- Feng, K. C., Liu, B. L., Chan, H. S., & Tzeng, Y. M. (2001). Morphology of a spectrum of parasporal endotoxin crystals from cultures of *Bacillus thuringiensis* ssp. *kurstaki* isolate A3-4. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 17(2), 119–123. <http://doi.org/10.1023/A:1016674430979>
- Gong, Y., Li, M., Xu, D., Wang, H., He, J., Wu, D., ... Yu, Z. (2012). Comparative proteomic analysis revealed metabolic changes and the translational regulation of Cry protein synthesis in *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Proteomics*, 75(4), 1235–1246. <http://doi.org/10.1016/j.jprot.2011.10.037>
- Gonzalez, E., Granados, J. C., Short, J. D., Ammons, D. R., & Rampersad, J. (2011). Parasporins from a Caribbean Island: Evidence for a globally dispersed *Bacillus thuringiensis* strain. *Current Microbiology*, 62(5), 1643–1648. <http://doi.org/10.1007/s00284-011-9905-5>
- Guerrero, G. G., Dean, D. H., & Moreno-Fierros, L. (2004). Structural implication of the induced immune response by *Bacillus thuringiensis* Cry proteins: Role of the N-terminal region. *Molecular Immunology*, 41(12), 1177–1183. <http://doi.org/10.1016/j.molimm.2004.06.026>
- Halliday, K. R. (1983). Regional homology in GTP-binding proto-oncogene products

and elongation factors. *Journal of Cyclic Nucleotide and Protein Phosphorylation Research*, 9(6), 435—448. Retrieved from <http://europepmc.org/abstract/MED/6396323>

Han, A., Kang, H.-R., Son, J., Kwon, D. H., Kim, S., Lee, W. C., ... Hwang, K. Y. (2016). The structure of the pleiotropic transcription regulator CodY provides insight into its GTP-sensing mechanism. *Nucleic Acids Research*, 44(19), gkw775. <http://doi.org/10.1093/nar/gkw775>

Hristova, K., Dempsey, C. E., & White, S. H. (2001). Structure, location, and lipid perturbations of melittin at the membrane interface. *Biophysical Journal*, 80(2), 801–811. [http://doi.org/10.1016/S0006-3495\(01\)76059-6](http://doi.org/10.1016/S0006-3495(01)76059-6)

Huang, K. xue, Badger, M., Haney, K., & Evans, S. L. (2007). Large scale production of *Bacillus thuringiensis* PS149B1 insecticidal proteins Cry34Ab1 and Cry35Ab1 from *Pseudomonas fluorescens*. *Protein Expression and Purification*, 53(2), 325–330. <http://doi.org/10.1016/j.pep.2007.01.010>

Huang, S., Ding, X., Sun, Y., Yang, Q., Xiao, X., Cao, Z., & Xia, L. (2012). Proteomic Analysis of *Bacillus thuringiensis* at Different Growth Phases by Using an Automated Online Two-Dimensional Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Strategy. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(15), 5270–5279. <http://doi.org/10.1128/AEM.00424-12>

Ibrahim, M. A., Griko, N., Junker, M., & Bulla, L. A. (2010, January 21). *Bacillus thuringiensis* A genomics and proteomics perspective. *Bioengineered Bugs*. <http://doi.org/10.4161/bbug.1.1.10519>

Israelsen, W. J., & Vander Heiden, M. G. (2015, July 1). Pyruvate kinase: Function, regulation and role in cancer. *Seminars in Cell and Developmental Biology*. Academic Press. <http://doi.org/10.1016/j.semcdb.2015.08.004>

Januchowski, R., Wojtowicz, K., Sterzyńska, K., Sosińska, P., Andrzejewska, M., Zawierucha, P., ... Zabel, M. (2016). Inhibition of ALDH1A1 activity decreases expression of drug transporters and reduces chemotherapy resistance in ovarian cancer cell lines. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*,

78, 248–259. <http://doi.org/10.1016/j.biocel.2016.07.017>

- Januchowski, R., Wojtowicz, K., & Zabel, M. (2013). The role of aldehyde dehydrogenase (ALDH) in cancer drug resistance. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 67(7), 669–680. <http://doi.org/10.1016/j.biopha.2013.04.005>
- Jinshui, Z., Qiuling, G., Linlin, L., Hualin, L., Yueying, W., Donghai, P., ... Ming, S. (2017). Comparative Genomics of *Bacillus thuringiensis* Reveals a Path to Specialized Exploitation of Multiple Invertebrate Hosts. *MBio*, 8(4), 1–14. <http://doi.org/10.1128/mBio.00822-17>
- Jisha, V. N., Smitha, R. B., & Benjamin, S. (2013). An Overview on the Crystal Toxins from *Bacillus thuringiensis*. *Advances in Microbiology*, 03(05), 462–472. <http://doi.org/10.4236/aim.2013.35062>
- Kamoun, F., Mejdoub, H., Aouissaoui, H., Reinbolt, J., Hammami, A., & Jaoua, S. (2005). Purification , amino acid sequence and characterization of Bacthuricin F4 , a new bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Applied Microbiology*, 98(4), 881–888. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02513.x>
- Katayama, H., Kusaka, Y., Yokota, H., Akao, T., Kojima, M., Nakamura, O., ... Mizuki, E. (2007). Parasporin-1, a novel cytotoxic protein from *Bacillus thuringiensis*, induces Ca²⁺ influx and a sustained elevation of the cytoplasmic Ca²⁺ concentration in toxin-sensitive cells. *Journal of Biological Chemistry*, 282(10), 7742–7752. <http://doi.org/10.1074/jbc.M611382200>
- 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. <http://doi.org/10.1093/jb/mvi003>
- Kitada, S., Abe, Y., Ito, A., Kuge, O., Akao, T., & Mizuki, E. (2005). Molecular Identification and Cytocidal Action of Parasporin, a Protein Group of Novel Crystal Toxins Targeting Human Cancer Cells. In J.-C. Côté, I. . Otvos, J.-L. Schwartz, & C. Vincent (Eds.), *6th Pacific Rim Conference on the Biotechnology of Bacillus thuringiensis and its Environmental Impact Pacific Rim Conference*

on the Biotechnology of Bacillus thuringiensis and its Environmental Impact (pp. 6–10). Victoria BC.

- 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. <http://doi.org/10.1016/j.tox.2009.07.016>
- Kjeldgaard, M., Nissen, P., Thirup, S., & Nyborg, J. (1993). The crystal structure of elongation factor EF-Tu from *Thermus aquaticus* in the GTP conformation. *Structure*, *1*(1), 35–50. [http://doi.org/10.1016/0969-2126\(93\)90007-4](http://doi.org/10.1016/0969-2126(93)90007-4)
- Kondo, S., Mizuki, E., Akao, T., & Ohba, M. (2002). Antitrichomonal strains of *Bacillus thuringiensis*. *Parasitology Research*, *88*(12), 1090–1092. <http://doi.org/10.1007/s00436-002-0692-6>
- Lee, D. W., Akao, T., Yamashita, S., Katayama, H., Maeda, M., Saitoh, H., ... Ohba, M. (2000). Noninsecticidal parasporal proteins of a *Bacillus thuringiensis* serovar shandongiensis isolate exhibit a preferential cytotoxicity against human leukemic T cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *272*(1), 218–223. <http://doi.org/10.1006/bbrc.2000.2765>
- Lee, K. Y., Kang, E. Y., Park, S., Ahn, S. K., Yoo, K. H., Kim, J. Y., & Lee, H. H. (2006). Mass spectrometric sequencing of endotoxin proteins of *Bacillus thuringiensis* ssp. *konkukian* extracted from polyacrylamide gels. *Proteomics*, *6*(5), 1512–1517. <http://doi.org/10.1002/pmic.200500298>
- Lenina, N. K., Naveenkumar, A., Sozhavendan, A. E., Balakrishnan, N., Balasubramani, V., & Udayasuriyan, V. (2014). Characterization of parasporin gene harboring Indian isolates of *Bacillus thuringiensis*. *3 Biotech*, *4*(5), 545–551. <http://doi.org/10.1007/s13205-013-0190-9>
- Li, Y., Chen, T., Zhu, J., Zhang, H., Jiang, H., & Sun, H. (2018). High ALDH activity defines ovarian cancer stem-like cells with enhanced invasiveness and EMT progress which are responsible for tumor invasion. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *495*(1), 1081–1088. <http://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.11.117>

- Lindahl, R. (1992). Aldehyde dehydrogenases and their role in carcinogenesis. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 27(4–5), 283–335. <http://doi.org/10.3109/10409239209082565>
- Liu, B. L., & Tzeng, Y. M. (2000). Characterization study of the sporulation kinetics of *Bacillus thuringiensis*. *Biotechnology and Bioengineering*, 68(1), 11–17. [http://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(20000405\)68:1<11::AID-BIT2>3.0.CO;2-T](http://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(20000405)68:1<11::AID-BIT2>3.0.CO;2-T)
- Martinez García, R. (2018). *Soya modificada con molienda mecánica de alta energía como sustrato para el crecimiento de Bacillus thuringiensis y Difracción de Rayos X para la detección de proteína Cry*. Universidad del Papaloapan.
- Mizuki, E., Ohba, M., Akao, T., Yamashita, S., Saitoh, H., & Park, Y. S. (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(3), 477–486. <http://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1999.00692.x>
- Nair, K., Al-Thani, R., Al-Thani, D., Al-Yafei, F., Ahmed, T., & Jaoua, S. (2018). Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains from Qatar as shown by crystal morphology, δ -Endotoxins and Cry gene content. *Frontiers in Microbiology*, 9(APR), 1–10. <http://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00708>
- Namba, A., Yamagiwa, M., Amano, H., Akao, T., Mizuki, E., Ohba, M., & Sakai, H. (2003). The cytotoxicity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *coreanensis* A1519 strain against the human leukemic T cell. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1622(1), 29–35. [http://doi.org/10.1016/S0304-4165\(03\)00102-8](http://doi.org/10.1016/S0304-4165(03)00102-8)
- Nickerson, S., Joy, S. T., Arora, P. S., & Bar-Sagi, D. (2013). *An Orthosteric Inhibitor of the RAS-SOS Interaction*. *Enzymes* (1st ed., Vol. 34). Elsevier Inc. <http://doi.org/10.1016/B978-0-12-420146-0.00002-0>
- Noguera, P. A., & Ibarra, J. E. (2010). Detection of new cry genes of *Bacillus thuringiensis* by Use of a Novel PCR primer system. *Applied and Environmental*

Microbiology, 76(18), 6150–6155. <http://doi.org/10.1128/AEM.00797-10>

Ohba, M., Mizuki, E., & Uemori, A. (2009). Parasporin, a new anticancer protein group from *Bacillus thuringiensis*. *Anticancer Research*, 29(1), 427–433.

Okassov, A., Nersesyan, A., Kitada, S., & Ilin, A. (2015). Parasporins as new natural anticancer agents: a review. *Journal of Balkan Union of Oncology*, 20(1), 5–16. Retrieved from <http://www.jbuon.com/pdfs/5-16.pdf>

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 - Biomembranes*, 1808(6), 1476–1482. <http://doi.org/10.1016/j.bbamem.2010.11.003>

Okumura, S., Saitoh, H., Ishikawa, T., Mizuki, E., & Inouye, K. (2008). Identification and characterization of a novel cytotoxic protein, parasporin-4, produced by *Bacillus thuringiensis* A1470 strain. In *Biotechnology Annual Review* (Vol. 14, pp. 225–252). [http://doi.org/10.1016/S1387-2656\(08\)00009-4](http://doi.org/10.1016/S1387-2656(08)00009-4)

Ortiz-Martinez, M., Winkler, R., & García-Lara, S. (2014). Preventive and therapeutic potential of peptides from cereals against cancer. *Journal of Proteomics*, 111, 165–183. <http://doi.org/10.1016/j.jprot.2014.03.044>

Ostrem, J. M. L., & Shokat, K. M. (2016). Direct small-molecule inhibitors of KRAS: From structural insights to mechanism-based design. *Nature Reviews Drug Discovery*, 15(11), 771–785. <http://doi.org/10.1038/nrd.2016.139>

Palma, L., & Berry, C. (2016). Understanding the structure and function of *Bacillus thuringiensis* toxins. *Toxicon*, 109, 1–3. <http://doi.org/10.1016/j.toxicon.2015.10.020>

Palma, L., Muñoz, D., Berry, C., Murillo, J., Caballero, P., & Caballero, P. (2014). *Bacillus thuringiensis* toxins: An overview of their biocidal activity. *Toxins*, 6(12), 3296–3325. <http://doi.org/10.3390/toxins6123296>

Patgiri, A., Yadav, K. K., Arora, P. S., & Bar-Sagi, D. (2011). An orthosteric inhibitor of the Ras-Sos interaction. *Nature Chemical Biology*, 7(9), 585–587.

<http://doi.org/10.1038/nchembio.612>

- Petterson, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C., & Ferrin, T. E. (2004). UCSF Chimera - A visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of Computational Chemistry*, *25*(13), 1605–1612. <http://doi.org/10.1002/jcc.20084>
- Rang, J., He, H., Wang, T., Ding, X., Zuo, M., Quan, M., ... Xia, L. (2015a). Comparative analysis of genomics and proteomics in bacillus thuringiensis 4.0718. *PLoS ONE*, *10*(3), e0119065. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0119065>
- Rang, J., He, H., Wang, T., Ding, X., Zuo, M., Quan, M., ... Xia, L. (2015b). Comparative analysis of genomics and proteomics in bacillus thuringiensis 4.0718. *PLoS ONE*, *10*(3), 1–15. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0119065>
- Ratnayake-Lecamwasam, M., Serror, P., Wong, K. W., & Sonenshein, A. L. (2001). Bacillus subtilis CodY represses early-stationary-phase genes by sensing GTP levels. *Genes & Development*, *15*(9), 1093–1103. <http://doi.org/10.1101/gad.874201>
- Raymond, B., Johnston, P. R., Nielsen-LeRoux, C., Lereclus, D., & Crickmore, N. (2010a). Bacillus thuringiensis: An impotent pathogen? *Trends in Microbiology*, *18*(5), 189–194. <http://doi.org/10.1016/j.tim.2010.02.006>
- Raymond, B., Johnston, P. R., Nielsen-LeRoux, C., Lereclus, D., & Crickmore, N. (2010b). Bacillus thuringiensis: An impotent pathogen? *Trends in Microbiology*, *18*(5), 189–194. <http://doi.org/10.1016/j.tim.2010.02.006>
- Roh, J. Y., Choi, J. Y., Li, M. S., Jin, B. R., & Je, Y. H. (2007). Bacillus thuringiensis as a specific, safe, and effective tool for insect pest control. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, *17*(4), 547–559.
- Roldan-Sabino, C. (2017). *Estudio del efecto de la proteínasa K sobre la disociación de la proteína Cry1Ac en Bacillus thuringiensis var. kurstaki HD-73*. Universidad del Papaloapan.

- Sauka, D., & Benintende, G. (2008). *Bacillus thuringiensis*: generalidades. Un acercamiento a su empleo en el biocontrol de insectos lepidópteros que son plagas agrícolas. *Revista Argentina de Microbiología*, *40*, 124–140.
- Schauer, N., Steinhauser, D., Strelkov, S., Schomburg, D., Allison, G., Moritz, T., ... Kopka, J. (2005). GC-MS libraries for the rapid identification of metabolites in complex biological samples. *FEBS Letters*, *579*(6), 1332–1337. <http://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.01.029>
- Scheffzek, K., Ahmadian, M. R., Kabsch, W., Wiesmüller, L., Lautwein, A., Schmitz, F., ... Wittinghofert, A. (2010). The Ras-RasGAP Complex: Structural Basis for GTPase Its in Activation and Oncogenic Ras Mutants. *Advancement Of Science*, *277*(5324), 333–338. Retrieved from <http://science.sciencemag.org/>
- Schünemann, R., Knaak, N., & Fiuza, L. M. (2014). Mode of Action and Specificity of *Bacillus thuringiensis* Toxins in the Control of Caterpillars and Stink Bugs in Soybean Culture. *ISRN Microbiology*, *2014*, 1–12. <http://doi.org/10.1155/2014/135675>
- Schweizer, F. (2009). Cationic amphiphilic peptides with cancer-selective toxicity. *European Journal of Pharmacology*, *625*(1–3), 190–194. <http://doi.org/10.1016/j.ejphar.2009.08.043>
- Simanshu, D. K., Nissley, D. V., & McCormick, F. (2017). RAS Proteins and Their Regulators in Human Disease. *Cell*, *170*(1), 17–33. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2017.06.009>
- Soberón, M., Portugal, L., Garcia-Gómez, B. I., Sánchez, J., Onofre, J., Gómez, I., ... Bravo, A. (2018, February 1). Cell lines as models for the study of Cry toxins from *Bacillus thuringiensis*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. Pergamon. <http://doi.org/10.1016/j.ibmb.2017.12.008>
- Song, R., Peng, D., Yu, Z., & Sun, M. (2008). Carboxy-terminal half of Cry1C can help vegetative insecticidal protein to form inclusion bodies in the mother cell of *Bacillus thuringiensis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *80*(4), 647–654. <http://doi.org/10.1007/s00253-008-1613-0>

- To, M. D., Rosario, R. D., Westcott, P. M. K., Banta, K. L., & Balmain, A. (2013). Interactions between wild-type and mutant Ras genes in lung and skin carcinogenesis. *Oncogene*, 32(34), 4028–4033. <http://doi.org/10.1038/onc.2012.404>
- Whiteley, H. R., & Schnepf, H. E. (1986). The molecular biology of parasporal crystal body formation in *Bacillus thuringiensis*. *Annual Review of Microbiology*, 40(1), 549–576. <http://doi.org/10.1146/annurev.micro.40.1.549>
- Wong, R. S. Y., Mohamed, S. M., Nadarajah, V. D., & Tengku, I. A. T. (2010). Characterisation of the binding properties of bacillus thuringiensis 18 toxin on leukaemic cells. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, 29(1), 1–11. <http://doi.org/10.1186/1756-9966-29-86>
- 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. <http://doi.org/10.3390/toxins6092732>
- Xu, X., Chai, S., Wang, P., Zhang, C., Yang, Y., Yang, Y., & Wang, K. (2015). Aldehyde dehydrogenases and cancer stem cells. *Cancer Letters*, 369(1), 50–57. <http://doi.org/10.1016/j.canlet.2015.08.018>
- Yang, Z., Lasker, K., Schneidman-Duhovny, D., Webb, B., Huang, C. C., Pettersen, E. F., ... Ferrin, T. E. (2012). UCSF Chimera, MODELLER, and IMP: An integrated modeling system. *Journal of Structural Biology*, 179(3), 269–278. <http://doi.org/10.1016/J.JSB.2011.09.006>
- Yasutake, K., Binh, N. D., Kagoshima, K., Uemori, A., Ohgushi, A., Maeda, M., ... Ohba, M. (2006). Occurrence of parasporin-producing *Bacillus thuringiensis* in Vietnam. *Can. J. Microbiol*, 52, 365–372. <http://doi.org/10.1139/W05-134>