

Orientador externo: Silvio Alejandro López Pazos

Universidad Antonio Nariño



**Identificación de la diversidad de parasporinas
de *Bacillus thuringiensis* en organismos procariotas**

Paola Andrea Sánchez Murcia

**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
PROGRAMA BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO**

TRABAJO DE GRADO

BOGOTÁ D.C SEPTIEMBRE 2021



**Identificación de la diversidad de parasporinas
de *Bacillus thuringiensis* en organismos procariotas**

Paola Andrea Sánchez Murcia

Sandra Mónica Estupiñán Torres

Orientadora interna

Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca

Silvio Alejandro López Pazos

Orientador externo

Universidad Antonio Nariño

UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
PROGRAMA BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO
TRABAJO DE GRADO

BOGOTÁ D.C SEPTIEMBRE 2021

Dedicatoria

El camino que he recorrido para llegar a este momento de mi vida y cumplir una de mis metas ha sido fruto del esfuerzo y disciplina; dedico este proyecto principalmente a mi madre, mi padre, hermana y hermano, quienes han sido parte de mi proceso con su apoyo, ánimo, confianza, amor y orgullo.

Agradecimientos

A mis asesores Silvio Alejandro López Pazos y Sandra Mónica Estupiñan Torres por haber compartidos sus conocimientos a lo largo del desarrollo del proyecto, no solo en la parte académica sino a nivel moral, personal y profesional.

Al Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación que financio el trabajo, el cual está enmarcado dentro del proyecto N° 802-2018 “Identificación de parasporinas de *Bacillus thuringiensis*, para determinar su mecanismo de acción sobre células de cáncer de cuello uterino, y su perspectiva de producción en plantas”

Se quedarían cortas las palabras para agradecer a mi madre, principalmente porque goza de salud luego de pasar por una difícil situación, por la infinidad de cosas que ha hecho por mí, me brindo su compañía sin importar las horas de traspasado, su apoyo emocional, sus consejos, su calidez, su amor de madre animándome siempre a seguir adelante, además de cuidarme de todas las maneras posibles. Te amo madre, no sería la mujer que soy ahora sin ti.

A mi padre quien me ha enseñado a sobrellevar las situaciones adversas que se presentan en la vida, los cambios que hay en ella y como ir acoplándome a ellos, inculcándome los mejores valores para tener mis principios claros y ser correcta en mi quehacer. Te amo padre, mi actuar siempre irá ligado a tus enseñanzas.

A mis hermanos quienes han sido como mis segundos padres y amigos, me han brindado su apoyo, cariño, confianza, consejos y muchas cosas más; son los mejores hermanos que podría desear, siempre estaré orgullosa de ustedes y de lo bonita que es nuestra relación. Los amo.

A mi mejor amiga por ser tan sincera y aterrizarme en los momentos requeridos, por su compañía, su forma especial de demostrar cariño, sus consejos y en especial por su ayuda y colaboración. Me llena de alegría poder vernos cumplir nuestras metas.

Y a todas las personas cercanas que formaron parte de mi proceso, con quienes compartí maravillosos momentos, crecimos juntos tanto a nivel personal como profesional y me brindaron

su calidez y cariño en los momentos que me sentí desfallecer, fueron una parte fundamental para seguir por este camino. Siempre los recordaré con mucha alegría y amor.

Tabla de contenido

RESUMEN	10
Introducción	12
Objetivos	14
Objetivo general	14
Objetivos específicos	14
1. Antecedentes	15
2. Marco Referencial	21
2.1. Características de <i>Bacillus thuringiensis</i>	21
2.2. Proteínas Cry	22
2.3. Mecanismo de acción de proteínas Cry y Mpp	24
2.3.1. Modelo de formación de poros (MFP) de proteínas Cry.	24
2.3.2. Modelo de Transducción de señal (MTS) de proteínas Cry.	25
2.3.3. Modelo de formación de poros de proteínas Mpp.	26
2.4. Parasporinas y sus generalidades.	28
2.5. Nomenclatura y estructura de parasporina	29
2.6. Patentes	30
2.6.1. Base de datos de patentes The Lens	31
3. Diseño metodológico	33
3.1. Universo, población y muestra	33
3.2. Hipótesis, variables, indicadores	33
3.3. Técnicas y procedimientos	33

3.3.1	Secuencias de parasporina.	33
3.3.2.	Análisis con BLAST-P para la identificación de secuencias similares a PS en genomas de bacterias y arqueas	33
3.3.3.	Análisis bioquímico de las secuencias de aminoácidos tipo PS.	34
3.3.4.	Patentes.	34
4.	Resultados	35
4.3.	Identificación entre secuencias de PS con géneros de bacterias y arqueas	35
4.4.	Caracterización bioquímica de las proteínas	36
4.5.	Patentes	40
5.	Discusión	45
5.3.	Alineamiento entre secuencias de PS con géneros de bacterias y arqueas	45
5.4.	Caracterización bioquímica de las proteínas	46
5.5.	Patentes	48
6.	Conclusiones.	49
	Referencias bibliográficas	50

Índice de figuras.

Figura 1. Imágenes de microscopía electrónica de barrido de los diferentes tipos de morfologías cristalinas y las esporas (S) producidas por las cepas <i>B. thuringiensis</i> .	21
Figura 2. Proteínas Cry de <i>B. thuringiensis</i> .	23
Figura 3. Estructura de toxinas Cry de tres dominios.	24
Figura 4. Regiones de unión de toxinas Cry a los receptores primarios y secundarios	25
Figura 5. Modelos de acción de las toxinas Cry (20).	26
Figura 6. Grupos estructurales de parasporina.	30

Índice de tablas.

Tabla 1. Proteínas tipo parasporina seleccionadas a partir del análisis en PSI-BLAST. En verde están identificadas las PS y proteína tipo PS Cry y rosado las Mpp. Las 3 últimas filas corresponde a secuencias de arqueas	35
Tabla 2. Caracterización bioquímica de las parasporina. En verde están identificadas las PS Cry y rosado las Mpp	37
Tabla 3. Caracterización bioquímica de las secuencias tipo PS. En verde están identificadas las PS y proteína tipo PS Cry y rosado las Mpp.	38
Tabla 4. Parámetros bioquímicos de proteínas Cry y Mpp. En verde están identificadas las Cry, en rosado las Mpp y en morado las últimas 5 filas representan otras proteínas elegidas con fines comparativos.	39
Tabla 5. Patentes	41



Identificación de la diversidad de parasporinas

de *Bacillus thuringiensis* en organismos procariotas

UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA

FACULTAD CIENCIAS DE LA SALUD

PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO

RESUMEN

Desde hace 21 años se han venido estudiando unas proteínas producidas por *Bacillus thuringiensis* en su fase de esporulación, denominadas parasporinas (PS), las cuales han demostrado tener un efecto citotóxico sobre las células cancerígenas humanas de diversos orígenes, caracterizándose por poseer propiedades entomopatógenas, no son hemolíticas y por presentan una baja o nula citotoxicidad hacia las células sanas. En este trabajo se analizó la diversidad de las PS en genomas procariotas, determinando en ellos sus propiedades bioquímicas, por otra parte se identificaron patentes relacionadas con PS. Las secuencias se analizaron por medio de las herramientas bioinformáticas BLAST-P, ProtParam y la base de datos para patentes THE LENS. Se manejaron 78 genomas de bacterias y 12 de arqueas, los cuales fueron comparados con las secuencias de aminoácidos de las 19 PS experimentalmente determinadas, obteniendo 1404 y 228 proteínas similares a las PS, respectivamente, estas secuencias se filtraron con base en parámetros de cobertura $\geq 60\%$, el valor E más cercano a 0 y un porcentaje de identidad $\geq 20\%$, obteniendo finalmente 16 proteínas de bacterias y 3 de arqueas, encontrando que tienen actividad intracelular, son proteínas estables, hidrófilas y resistentes a cambios repentinos en su estructura física o química. A partir de la búsqueda de patentes se identificó la existencia de dos patentes activas relacionadas con PS. Con este estudio se pudo determinar que los géneros *Bacillus*, *Vibrio*, *Clostridium* y *Nanoarchaeum* producen proteínas tipo PS y además que a la fecha se cuenta con dos patentes activas asociadas a las mismas.

PALABRAS CLAVE: *Bacillus thuringiensis*, parasporinas, parámetros bioquímicos, patentes de parasporina.

Estudiante: Paola Andrea Sánchez Murcia

Decentes: Sandra Mónica Estupiñán Torres-Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca y Silvio Alejandro López Pazos-Universidad Antonio Nariño

Fecha: 03 de septiembre de 2021

Introducción

La bacteria *Bacillus thuringiensis* corresponde a un bacilo Gram positivo móvil, aerobio facultativo, que puede formar endosporas, su hábitat principal es el suelo, y se ha aislado de diversos ecosistemas como bosques, desiertos, archipiélagos, arena o cuevas. Se clasifica en el reino Eubacteria, familia Bacillaceae, género *Bacillus* y pertenece al grupo de *B. cereus* junto con *B. anthracis*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides*, y *B. weihenstephanensis*, pero se diferencia de estas especies por la formación de una inclusión parasporal refringente (1).

B. thuringiensis se caracteriza por producir formas cristalinas paraesporales de origen proteico, este cristal está compuesto por δ -endotoxinas clasificadas en dos grupos: La toxina cristalina (Cry), que es específicamente tóxica para insectos plaga de orden Lepidoptera, Díptera y Coleóptera, y la toxina citolítica (Cyt), la cual es tóxica para larvas de dípteros *in vivo*, aunque se ha demostrado que tiene una amplia gama de citotoxicidad contra células de mamíferos y dípteros *in vitro*, por estas características es que se considera a esta bacteria como un entomopatógeno de eficacia contra plagas de cultivos y mosquitos vectores de enfermedades humanas como el dengue y la malaria (2), (3). Por otra parte, en el año 2000, Mizuki, et al, describen por primera vez una proteína con actividad citocida única, denominada parasporina (PS), la cual presentó una homología de secuencia de aminoácidos muy baja (<25%) con respecto a las proteínas insecticidas Cry y Cyt existentes de *B. thuringiensis*, es decir, esta proteína no está relacionada con las proteínas conocidas, anteriormente mencionadas. Es bien sabido que Cyt es responsable de la actividad citolítica, aunque no tóxica, de amplio espectro en inclusiones paraesporales de *B. thuringiensis serovar israelensis*, sin embargo el efecto citopático que dejan las PS es sustancialmente diferente ya que es capaz de lisar de forma discriminatoria las células cancerosas; debido a que las dos proteínas tienen formas de acción distintas se decide crear una categoría para las PS, formando así una nueva clase de proteína Cry, denominada por el Comité de nomenclatura de proteínas cristalinas de plaguicidas de *B. thuringiensis* como Cry31Aa (4). En la actualidad, el Comité de Clasificación y Nomenclatura de Parasporinas ha designado a 19 PS en 6 niveles de primer rango. Aunque estas PS solo han sido

descritas en *B. thuringiensis* se ha informado de algunas cepas similares en todo el mundo sin un registro confirmado (5).

A la fecha se conocen 670 genomas de *B. thuringiensis* que están depositados en la base de datos del Centro Nacional de Información de Biotecnología (NCBI, por sus siglas en inglés) (6), para la ejecución del presente trabajo se tomó esta información ya que se pretendía identificar y clasificar a las 19 PS junto con la identificación de sus parámetros bioquímicos

Las patentes están dentro de los bienes que protege la propiedad intelectual, las cuales se originan en las creaciones de la mente, estableciéndose así como una autorización legal que concede a su titular el derecho exclusivo a controlar el uso de una invención, según se define en sus “reivindicaciones”, “capítulo reivindicatorio” o “claims” (conjunto de oraciones, usualmente ubicadas al final de la solicitud y que delimitan el alcance de la invención), dentro de un área geográfica y en un plazo limitado, impidiendo que terceros, fabriquen, usen, vendan u ofrezcan en venta, entre otras actividades, la invención sin la autorización pertinente, el plazo de protección de una patente puede variar de país en país, pero en ningún caso es superior a 20 años a partir de la fecha de presentación de la primera solicitud de patente a nivel mundial (7), (8).

Con este trabajo se pretende encontrar proteínas similares a las PS en genomas de bacterias y arqueas, hacer un análisis bioquímico de las mismas e identificar patentes relacionadas con PS. En este sentido se analizaron 78 genomas de bacterias y 12 de arqueas contra las 19 PS por medio de la herramienta BLAST-P donde se encontraron 16 proteínas tipo PS de bacterias, y 3 de arqueas, a las cuales se les realizó un análisis bioquímico con la plataforma ProtParam para identificar su número de aminoácidos (aa), peso molecular, punto isoeléctrico (pI), residuos de carga negativa (Asp + Glu), residuos de carga positiva (Arg + Lys), índice de inestabilidad, índice alifático y el valor de gran promedio de hidropatía (GRAVY, por sus siglas en inglés), finalmente se revisó en la base de datos de patentes THE LENS aquellas que estuvieran relacionadas con las PS, que a la fecha estuvieran activas, para identificar sus reivindicaciones.

Objetivos

Objetivo general

Comprender la diversidad de proteínas tipo parasporina de *Bacillus thuringiensis* en genomas procariotas.

Objetivos específicos

- Identificar proteínas que son similares a las parasporinas de *Bacillus thuringiensis* en genomas de bacterias y arqueas.
- Establecer características bioquímicas de las parasporinas y de las proteínas tipo parasporina de *Bacillus thuringiensis*.
- Revisar el estado de la propiedad intelectual de parasporinas de *Bacillus thuringiensis*

1. Antecedentes

En el estudio de Mizuki, et al (9) de 1999, 1684 cepas de *B. thuringiensis* que no tenían actividad hemolítica, 42 exhibieron citotoxicidad in vitro contra las células T de leucemia. Estas cepas no hemolíticas pero tóxicas para las células leucémicas pertenecían a varios serovares H, incluidos *dakota*, *neoleonensis*, *shandongiensis*, *coreanensis* y otros serogrupos no identificados. Las inclusiones paraesporales purificadas de las tres cepas seleccionadas, denominadas 84-HS-1-11, 89-T-26-17 y 90-F-45-14, no mostraron actividad hemolítica ni actividad insecticida contra insectos dípteros y lepidópteros, pero fueron altamente citocida contra las células T leucémicas y otras células cancerosas humanas, mostrando diferentes espectros de toxicidad y niveles de actividad variados.

En la investigación realizada por Mizuki, et al (4) en el 2000 se describe por primera vez una actividad de reconocimiento de células leucémicas humanas de una proteína no insecticida de *B. thuringiensis*, siendo esto algo inusual pues de las cepas y proteínas conocidas de este microorganismo solo se había visto su actividad tóxico contra insectos, el estudio se centra en conocer esta nueva proteína a la cual se le denomino PS, encontrando así que es codificada por un gen de 2.169 pb de longitud, y a su vez un polipéptido de 723 residuos de aminoácidos con un peso molecular previsto de 81.045. Aunque en el análisis de su secuenciación se vio que contenía los cinco bloques, que comúnmente se encuentran en las proteínas Cry de *B. thuringiensis*, se detectó una homología de menos del 25% entre la parasporina y las clases insecticidas ya existentes de proteínas Cry y Cyt.

El estudio realizado en 2007 por Wu, et al. (10) se centra en identificar la evolución de la familia de genes cry sometiénola a una selección positiva utilizando los modelos de máxima probabilidad de sustitución de codones implementados en el paquete Phylogenetic Analysis by Maximum Likelihood. Se identificaron 24 residuos seleccionados positivamente, que están todos ubicados en el Dominio II o III y a al correlacionar los datos conocidos de estudios de mutagénesis, se puede decir que, a nivel molecular, estos residuos contribuyen mucho a la

determinación de puntos Diana los cuales pueden mutar fácilmente evadiendo así la acción de estas proteínas.

Nagamatsu Y, et al, en 2010 (11), determinaron que la solubilización in vitro con ditioneitol a pH 10,2 y la hidrólisis limitada con tripsina dieron como resultado la eliminación de las porciones N-terminales de las PS y su activación. Las proteínas de 70 kDa (fragmentos de 15 y 55 kDa) de CP78A y CP78B y la proteína de 73 kDa (fragmentos de 14 y 59 kDa) de CP84 exhibieron diversos grados de actividad citocida preferentemente hacia las células HepG2 de cáncer de hepatocitos humanos y el útero. Cáncer de cuello uterino Las células HeLa causan inflamación celular o la formación de vacuolas en el citoplasma. Estas toxinas parecían atacar un objetivo idéntico en las células humanas.

Según la investigación realizada por Fang, et al en 2011 (2) *B. thuringiensis* dispone de un pangenoma abierto, ya que es capaz de recolectar genes esenciales o inofensivos de otras bacterias, que habitan en la misma comunidad microbiana para su supervivencia, a través de la transferencia horizontal, de modo que manifiestan una enorme diversidad para adaptarse a varios entornos. Esto fue evidente al realizar un estudio filogenético donde se comparaban algunas cepas de *Bacillus cereus* con otras de *B. thuringiensis* y el resultado es que comparten una gran similitud en su genoma.

En el trabajo de revisión en 2012 Bravo, et al (3) busca comprender cómo las toxinas Cry de tres dominios de la bacteria *B. thuringiensis* matan a los insectos plaga. Se demostró que la activación con quimiotripsina aumentaba el rendimiento de un fragmento de las toxinas Cry ampliando así su actividad insecticida, la mutagénesis dirigida al sitio de las secuencias del bucle del dominio II dio lugar a toxinas mutantes con una actividad insecticida mayor que con la acción de la quimiotripsina, un ejemplo de esto es la toxina Cry1Ab donde las mutaciones en el bucle 2 dieron como resultado una mayor actividad insecticida contra la polilla *Limantria dispar*. Podrían crearse bibliotecas de genes mediante mutación de epítomos de unión a receptores como regiones de bucle del dominio II o residuos del dominio III / β 16 por medio de fagos.

En el estudio realizado por Okumura, et al (5) en 2014 se evidenció como la Pro-parasporina-4 (ProPS4), precursor de PS4, es capaz de solubilizarse en jugo gástrico y activar mediante enzimas específicas en el tracto digestivo a PS4, esto luego de ser administrada por vía oral en ratones y a su vez la proteína de *B. thuringiensis* demostró tener una actividad citotóxica en el estómago y el intestino delgado que a diferencia de otras PS que se activan en pH alcalino, esta conserva su acción en condiciones bajas de pH, cómo lo describe el autor ProPS4 puede ser un tratamiento eficaz para la terapia de cáncer gastrointestinal. Cabe resaltar que los ratones no tuvieron complicaciones clínicas luego de que ProPS4 fuese administrada por vía oral, caso contrario a lo que sucedió cuando se administró por inyección intramuscular pues se vieron ciertas alteraciones en el perfil renal.

La revisión realizada por Lucena, et al en el (12) 2014 muestra como la combinación de un gen individual o un conjunto de genes homólogos se fragmentan y recombinan para dar lugar a genes con diferentes composiciones de bases, esto por medio del estudio in silico mediante algunos fagos. El uso de la mezcla de ADN combinado y las evaluaciones in silico puede acelerar el diseño de mutaciones puntuales, lo cual permite una evolución dirigida de moléculas específicas facilitando así la comprensión del mecanismo de acción de las toxinas Cry, que pueden revelar nuevos conocimientos en el desarrollo tecnológico del control de plagas.

Desde el descubrimiento de la primera PS hasta la fecha se han descrito 19 proteínas más del mismo tipo, luego de que en el 2005 se describiera la estructura de la PS1 fue claro que el modo de acción de estas es diferente a la de las proteínas Cry y Cyt de *B. thuringiensis*, es por eso que en la investigación realizada por Xu, et al (13) en el 2014 se evidencia que no todas las PS tienen el mismo modo de acción pues algunas tienen la capacidad de inducir la muerte celular por una vía de apoptosis mientras que otras, al tener una alta homología con la proteínas Cry, son capaces de formar poros en la membrana celular. Algunos cambios evolutivos de los residuos de aminoácidos alteran la interacción de unión de estas proteínas dando como resultado nuevas toxicidades específicas y diferencias en las estructuras terciarias.

La parasporina-4 (PS4) es una toxina formadora de poros β de tipo aerolisina producida por la cepa A1470 de *B. thuringiensis*. Presenta citotoxicidad específica contra líneas celulares de

cáncer humano; por lo que se espera sea útil en el diagnóstico y tratamiento de tipos particulares de células cancerosas. Okumura S, et al, 2014 (5) en su investigación examinaron la toxicidad aguda de PS4 en ratones ICR. El LD₅₀ valor fue de 160 mg / kg por vía subcutánea, por ende a esta concentración de PS4 con una cantidad de 48µg administrada en 4 ocasiones hubo una mortalidad del 100%.

Xu C, et al, 2014 (13) centró su revisión principalmente en los últimos descubrimientos del mecanismo de trabajo de la toxina, con énfasis en el progreso relacionado con la estructura. Basándose en las características estructurales, las toxinas Cry, Cyt y PS de *B. thuringiensis* podrían dividirse en tres categorías: α-PFT de tres dominios, β-PFT de toxina Cyt y β-PFT de aerolisina.

En su investigación en 2015 Marsi, et al (14) es la primera en caracterizar tanto genética como fenotípicamente, hasta donde se conoce, patógenos implicados en la adaptación coevolutiva tomando a *B. thuringiensis* como patógeno y *Caenorhabditis elegans* como huésped, lo que dio como resultado un notable favorecimiento a la virulencia de *B. thuringiensis* aumentando la producción de toxinas Cry,

Tanto las toxinas Cry como las Cyt se sintetizan como protoxinas que son activadas por proteasas intestinales de insectos que liberan fragmentos activos de toxinas, Pacheco S, et al (15) en su investigación en 2015 describe dos sistemas de monitoreo eficiente para toxinas de *B. thuringiensis*, la primera por medio de fagos, la cual muestra una flexibilidad en la afinidad de los sitios de unión, lo cual representa una gran avidez en el momento de actuar y el segundo monitoreo por medio de ribosomas el cual se encarga de generar un tipo de biblioteca de genes aumentando la probabilidad de que las toxinas que se requieran sean útiles.

En el estudio realizado por Brasseur K, et al, 2015 (16), se encontró que activa la proteína PS2Aa1 proteinasa K aislado de una novela *B. thuringiensis* la cepa 4R2 fue específicamente citotóxica para el cáncer de endometrio, colon, hígado, cuello uterino, mama y próstata. No mostró toxicidad contra las células normales. Tras el tratamiento con parasporina-2Aa1 activada por proteinasa K, se observaron cambios morfológicos y el análisis de inmunotransferencia de

tipo Western reveló la escisión de poli (ADP-Ribosa) polimerasa, caspasa-3 y caspasa-9 en líneas celulares cancerosas exclusivamente, indicativo de muerte celular programada apoptosis. Los análisis de citometría de flujo, utilizando yoduro de propidio y anexina V, así como un ensayo de caspasas 3/7 confirmaron la inducción de apoptosis.

Zghal, et al (17) en su estudio en 2016 determina como en una proteína quimérica, formada por una fusión entre la parte N-terminal de Cry11a y la parte C-terminal de Cry1Ac de *B. thuringiensis* serovar kurstaki, los cristales aumentan su actividad larvicida de la cepa recombinante contra las larvas de lepidópteros, debido a su cocrystalización donde se da una estabilidad con actividad sinérgica entre la proteína quimérica y la toxina, la cual resulta tener una mejor acción que con Cry4BLB.

Reyes J 2016 (18) estudio 4 cepas de *B. thuringiensis* aisladas de Nuevo León, denominadas CL9-1, CL9-3 y CL9-21, A1470 que produce la Parasporina 4 (PS4), obteniendo inclusiones parasporales, activadas con proteinasa K en un ambiente alcalino. El digerido fue purificado mediante Cromatografía de Intercambio Aniónico y se rastrearon las parasporinas de interés de las fracciones recuperadas mediante el análisis de perfiles proteicos. Las parasporinas purificadas presentaron actividad citotóxica contra dos líneas celulares en las que fueron probadas: MOLT-4 y A431.

Las estructuras secundarias de ADN son biológicamente relevantes aunque se desconoce si se forman en regiones que codifican dominios conservados de toxinas Cry en condiciones de combinación de ADN. En la investigación realizada por Pinzón, et al (19) en el 2017, se sugiere que la presencia de variaciones termodinámicas asociadas a la formación de estructuras secundarias y una relación evolutiva con regiones que codifican dominios altamente conservados en proteínas Cry.

B. thuringiensis hace parte del clado de *B. cereus* y según la investigación realizada por Zheng, et al (20) en 2017, exactamente corresponde a clado 2, puesto que es bastante coherente genéticamente, con un Promedio de Identidad de Nucleótidos (ANI por sus siglas en inglés) entre sus cepas de >95% por lo que se sugiere que contiene las cepas de los patógenos de

invertebrados más efectivos, también incluidas los serovares *thuringiensis*, *kurstaki*, *galleriae*, *aizawai*, *tenebrionis* e *israelensis* y además contiene tres linajes dominados por productores de toxina Cry, lo cual indica que las cepas típicas de *B. thuringiensis* con altos niveles de toxicidad para los insectos se originaron a partir del mismo ancestro y evolucionaron en tres sublinajes, respectivamente.

La mayoría de los genes cry son transmitidos por plásmidos y suelen estar flanqueados por varios elementos móviles como secuencias de inserción, en su investigación Fiedurok, et al. 2017 (21) determina los entornos genéticos y genómicos de los genes cry1. Para ello, se realizó un análisis comparativo de los loci cry1 utilizando los diversos plásmidos de *B. thuringiensis* depositados en GenBank. La similitud del entorno genético de varios genes cry1 implica su origen común, probablemente la isla de patogenicidad insecticida (PAI por sus siglas en inglés) la cual se vio localizada en mega plásmidos de Bt de 300 kb. Se sugiere que existen dos eventos de inserción independientes que "liberaron" cry1 del PAI en forma de casete, que involucra N-acetilmuramoil-1-alanina amidasa y un fragmento de genes antiportadores de K^+ (Na^+) / H^+ . Por lo tanto se cree que los genes de cry1, incluido su retroregulador positivo, que se encuentran en este entorno genético compartido, desempeñan un papel central en la evolución y propagación de los genes cry1.

En el estudio de Beena V, et al 2019 (22), se indicó que la proteína era citotóxica para las células jurkat al mismo tiempo que no era tóxica para los linfocitos normales. La citotoxicidad fue evidente sólo después de la activación proteolítica. La muerte celular apoptótica se confirmó en las células tratadas con proteína mediante el Ensayo TUNEL y también la expresión del gen de caspasa-3 regulada al alza ($P < 0,001$).

Dado que la mayoría de proteínas se agruparon juntas como proteínas Cry, se hizo evidente que la nomenclatura existente tenía limitaciones para representar la diversa gama de proteínas que se habían identificado. Esta nomenclatura revisada por Crickmore N, et al en 2020 (23), conserva los principios básicos de la versión de 1998 pero proporciona mnemónicos específicos para representar diferentes grupos estructurales La gran mayoría de las proteínas han conservado su

nombre o tienen un nuevo nombre que claramente hace referencia al anterior. En esta versión se han incorporado otras proteínas pesticidas no incluidas previamente en la nomenclatura.

La patente registrada por Abe Y, et al en 2009 (24) protege un receptor de PS2 identificado como una proteína Hep27 que puede ser del tipo de unión a la membrana celular, un complejo compuesto por PS2 y una proteína Hep27, una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo contra Hep27, y un método para cribar un compuesto candidato de la medicina, usando Hep27, siendo útil en el campo de la investigación biológica fundamental, diagnóstico o tratamiento de una enfermedad o estado tratable por PS2, y desarrollo de productos farmacéuticos..

2. Marco Referencial

2.1. Características de *Bacillus thuringiensis*

Siendo parte del reino Eubacteria, familia Bacillaceae, género Bacillus y especie *thuringiensis*, junto con *B. cereus* y *B. anthracis*, de los cuales su principal diferencia está dada por la formación de una inclusión parasporal refringente al microscopio de contraste de fases (1), *B. thuringiensis* es un bacilo Gram positivo, aerobio facultativo, móvil, cuyo tamaño oscila entre 1 a 1.2 micrómetros de ancho y de 3 a 5 micrómetros de largo, durante su fase de esporulación se caracteriza por producir formas cristalinas paraesporales de origen proteico (**Figura 1 A-H**), este cristal está compuesto por genes de δ -endotoxinas, clasificadas en dos grupos (1): La toxina cristalina (Cry), que es específicamente tóxica para la mayoría de insectos y algunas tienen un espectro insecticida de los cuales abarca dos o tres órdenes, y la toxina citolítica (Cyt), la cual es tóxica para larvas de dípteros *in vivo*, aunque se ha demostrado que tiene una amplia gama de citotoxicidad contra células de mamíferos y dípteros *in vitro*, por lo tanto se considera a esta bacteria como un entomopatógeno de gran eficacia contra importantes plagas de cultivos, nematodos y también contra mosquitos vectores de enfermedades humanas como el dengue y la malaria (2), (3), este microorganismo es nativo del suelo y está catalogado como cosmopolita pues se ha aislado de diversos ecosistemas como bosques tropicales y templados, zonas desérticas, sabanas, archipiélagos, frutales, suelos agrícolas, arena y cuevas en los cinco continentes (1).

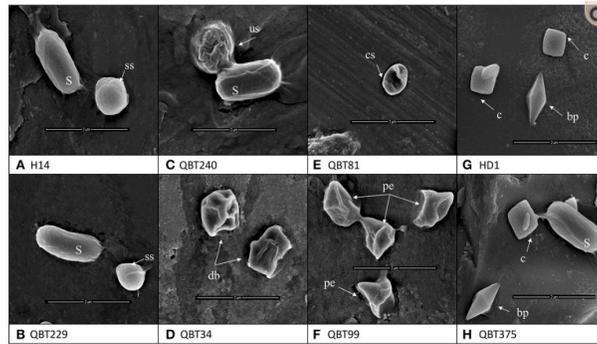


Figura 1. Imágenes de microscopía electrónica de barrido de los diferentes tipos de morfologías cristalinas y las esporas (S) producidas por las cepas *B. thuringiensis*. (A) Cepa de referencia *B. thuringiensis* israelensis H14 con cristal esférico liso [ss] (B) Aislamiento QBT229 de Qatari tipo *B. thuringiensis* israelensis con cristal esférico liso [ss] (C) Cristal esférico con superficie ondulada [us] QBT240 (D) Globo esférico pero desinflado [db] forma QBT34 (E) Cristales esféricos con superficie cóncava [cs] QBT81 (F) cristales esféricos con bordes puntiagudos [pe] QBT99 (G) cepa de referencia *B. thuringiensis* kurstaki HD1 con cristales bipyramidales [bp] y cuboidales [c] (H) QBT375 de Qatari *B. thuringiensis* kurstaki como aislado con cristales bipyramidales [bp] y cuboidales [c] (25).

2.2. Proteínas Cry

Las toxinas Cry tienen una forma estructural que está constituida por tres dominios determinantes para su actividad biológica contra insectos. El dominio I, descrito por primera vez en la proteína Cry3Aa, consiste en un paquete de siete hélices α antiparalelas, donde la hélice 5 está rodeada por las demás, las hélices externas son de naturaleza anfipática y la mayoría de las mismas llegan a medir más de 30\AA por lo tanto son capaces de atravesar una membrana hidrófoba, debido a estas características se cree que el dominio I es principal determinante en la formación de poros de las toxinas Cry, además la acción de las hélices $\alpha 5$ y $\alpha 6$ cuando se juntan forma un bucle en el extremo de la estructura insertándose en la superficie de la membrana lipídica de las células intestinales del insecto susceptible (**Figura 2.A**); el dominio II consta de tres láminas antiparalelas β , dos de ellas están compuestas por cuatro hebras distribuidas en un plegamiento de topología de tipo “llave griega” estando así expuestas al solvente, la tercera

lámina se compacta contra el dominio I y está dispuesta en un motivo similar al de llave griega con tres hebras y una hélice α corta, este dominio es el más variable de los tres y dada la similitud que existe entre las regiones de unión antígeno-anticuerpo y de las lectinas con la conformación de las láminas β se cree que el dominio II es un determinante importante en la especificidad de las toxinas; el dominio III está formado por 2 láminas β antiparalelas formando un β sándwich y juntas se empaquetan con una topología de “Jelly roll”. Ambas láminas se componen de cinco hebras, con la lámina exterior mirando hacia el disolvente y la interior compactada contra el dominio II, además cuenta con dos bucles largos que se extienden desde un extremo del dominio e interactúan con el dominio I, a diferencia del dominio II este muestra una menor variabilidad, debido a sus principales diferencias como las longitudes, orientaciones y secuencias de los bucles, que están implicadas en la unión del receptor N-acetylgalactosamina (GalNAc) (**Figura 2.B**) (1), (26).

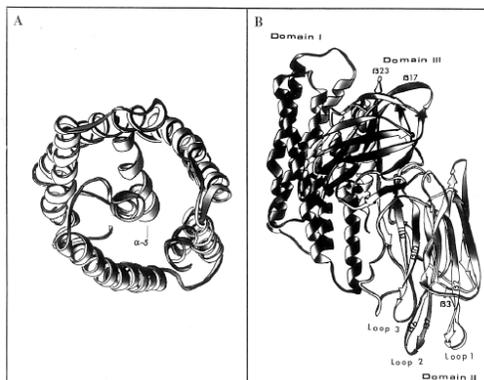


Figura 2. Proteínas Cry de *B. thuringiensis*. (A) Vista superior de hélices α y la ubicación de la hélice central α -5. (B) Posiciones de los tres bucles del dominio II expuestos a la superficie (bucles 1, 2 y 3) que forman el vértice molecular de la toxina, y las hojas- β internas del dominio III (β -17 y β -23) (27).

En la **Figura 3** se observan algunas estructuras generales de las toxinas Cry de *B. thuringiensis* identificando cada uno de los 3 dominios, a pesar de que sus secuencias de aminoácidos tiene una identidad menor de la mitad, su estructura es muy similar, lo que lleva a pensar que el modo de acción es muy parecido (28), (26). Se ha encontrado que estas toxinas tienen un alto grado

diversidad genética, la cual se ha atribuido a que muchos genes *cry* están asociados con elementos transponibles que pueden facilitar la amplificación de los mismos, demostrando así la evolución de nuevas toxinas con puntos diana diferentes (26).

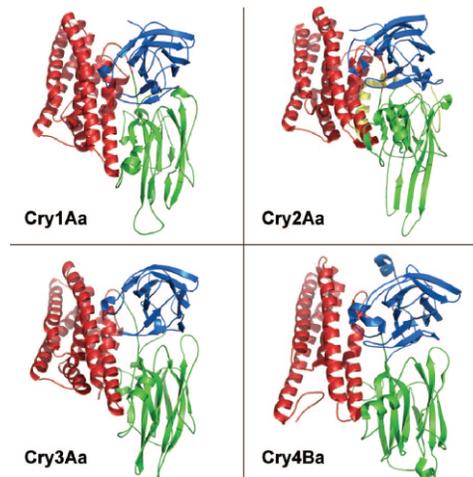


Figura 3. Estructura de toxinas Cry de tres dominios. El Dominio I (rojo) está involucrado en la formación de poro e inserción en membrana, mientras que los Dominios II (verde) y III (azul) tienen regiones particulares de interacción con receptores secundarios, lo cual les confiere especificidad (28), (26).

2.3. Mecanismo de acción de proteínas Cry y Mpp

2.3.1. Modelo de formación de poros (MFP) de proteínas Cry.

Las toxinas Cry son conocidas como proteínas formadoras de poros que matan las células del intestino medio del epitelio en insectos plaga, causando un choque osmótico que conduce a la lisis celular. La mayoría de estas proteínas al ser producidas en inclusiones cristalinas se encuentran como protoxinas de 70 y 130 kDa, al ser ingeridos por las larvas susceptibles los cristales parasporales son solubilizados por las condiciones de pH del intestino del insecto, alcalinos en el caso de los insectos lepidópteros y dípteros y ácidos en el caso de los coleópteros, liberando así las protoxinas para que estas sean activadas por proteasas del intestino medio para

producir el núcleo tridimensional de la toxina activada de tres dominios con un tamaño molecular de aproximadamente 55 a 90 kDa (3).

En la activación proteolítica está involucrada la pérdida del extremo N-terminal y aproximadamente la mitad del resto de la toxina con la eliminación del extremo C-terminal, de esta forma le brinda a la toxina una alta afinidad hacia los receptores específicos presentes en las microvellosidades celulares del intestino del insecto blanco. La cadherina se ha establecido como el receptor proteico primario, su unión esta mediada por tres sitios del Dominio II como lo son bucle α -8, el bucle 2 y el bucle 3 (**Figura 4**), que al interactuar con la toxina Cry provoca un cambio de la misma produciendo un corte en la hélice α -1 en el Dominio I, facilitando así la oligomerización y la formación de un pre-poro (3), (28).

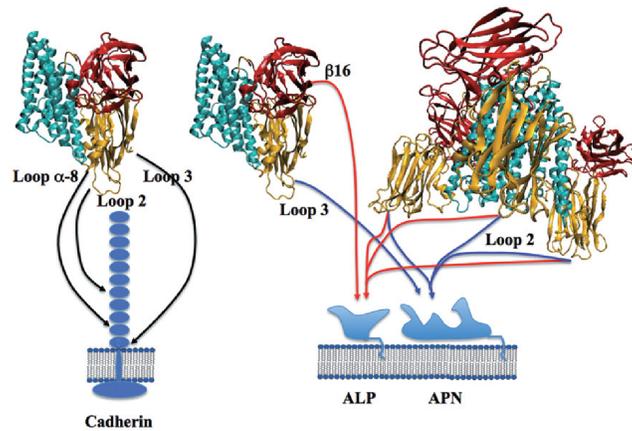


Figura 4. Regiones de unión de toxinas Cry a los receptores primarios y secundarios. Regiones de unión de formas monoméricas y oligoméricas mapeadas en la toxina Cry1Ab a receptores de cadherina, fosfatasa alcalina (ALP) y aminopeptidasa-N (APN). La forma monomérica representada corresponde a la estructura tridimensional de Cry1Aa y la estructura oligomérica corresponde a la estructura trimérica de Cry4Ba (3).

Una vez formado el oligómero este tiene una gran afinidad por receptores secundarios como las Alcalino Fosfatasas (ALP) y Aminopeptidasas-N (APN) anclados a glicosil fosfatidil-inositol (GPI) los cuales permiten la inserción de la toxina a la membrana celular permitiendo la formación de poros los cuales permiten el paso de iones y agua, de esta manera se provoca un

desequilibrio osmótico y por lo tanto lisis de las células del intestino medio liberando además los contenidos intracelulares que llegan a proveer un medio ideal para la germinación de las esporas provocando una septicemia severa y finalmente la muerte del insecto (**Figura 5**) (28).

2.3.2. Modelo de Transducción de señal (MTS) de proteínas Cry.

Este modelo comparte los tres primeros pasos con el MFP desde la solubilización, activación de protoxina por proteasas y la unión al receptor proteico primario cadherina, el cual provoca la activación de la proteína G dependiente de Mg^{2+} , la cual desencadena una cascada de señalizaciones provocando la síntesis de la enzima Adenil Ciclasa (AC) que promueve la producción de Adenosín monofosfato cíclico intracelular (AMPC), debido al aumento en los niveles de este segundo mensajero se activa la proteína quinasa A (PK-A) responsable, finalmente, de la muerte celular. Los argumentos de este modelo están basados en estudios realizados en células H15 *in vitro* que expresan el receptor cadherina, por esta razón no se toman en cuenta las características propias del epitelio intestinal del insecto (**Figura 5**).

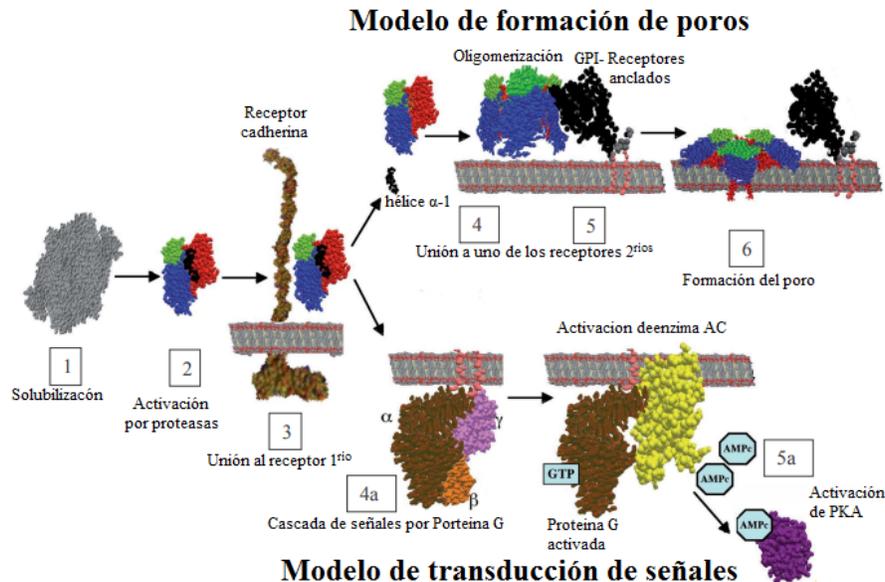


Figura 5. Modelos de acción de las toxinas Cry (28). Ambos modelos comparten los primeros pasos del modo de acción de la toxina que incluye solubilización de la toxina en el lumen intestinal de la larva (1), activación por proteasas intestinales (2), unión al receptor cadherina (3).

En el modelo de formación de poro la unión de la toxina activada a cadherina provoca corte de la hélice α -1 y por lo tanto la toxina oligomeriza y se une a un receptor secundario, como aminopeptidasa N o fosfatasa alcalina (5). La toxina se inserta a la membrana formando un poro que la desestabiliza y provoca muerte del insecto (6). El Modelo de Transducción de Señales (en la imagen, abajo) propone la interacción de la toxina Cry con el receptor cadherina desencadena una cascada de señales intercelulares mediada por proteína G (4a), que provoca activación de Adenilato Ciclasa (AC) y síntesis de Adenosín monofosfato cíclico (AMPC) que activa Protein-quinasa A (PKA) provocando muerte celular (5a).

2.3.3. Modelo de formación de poros de proteínas Mpp.

Las proteínas formadoras de poros se han clasificado en diferentes familias dependiendo de la estructura del poro final, ya sea α -PFP que utilizan canales hechos de α -hélices o β -PFP que utilizan canales hechos de β -barriles. Hay muchas β -PFP diferentes pero la de interés para este proyecto son la superfamilia emergente de la aerolisina-ETX / MTX-2. Las PS se secretan inicialmente como monómeros inactivos y se activan proteolíticamente en el extremo C-terminal, demostrado en líneas celulares de cáncer de mamíferos. La unión del monómero es similar a la aerolisina donde esta mediada por residuos aromáticos en el dominio N-terminal que podría implicar la unión a anclajes GPI (29) (**Figura 6**)

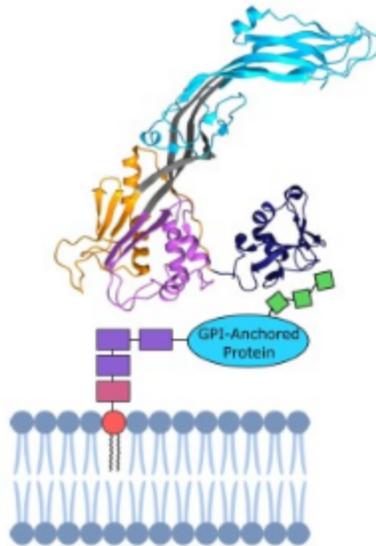


Figura 6. Unión al receptor por miembros de aerolisina. Representación esquemática de la unión de aerolisina a un receptor anclado a GPI con dominio APT (azul marino) y receptor similar a ETX (naranja y púrpura), dominio formador de poros alargados (gris) y tallo transmembrana (azul). (29)

La unión de ETX a la superficie diana está mediada por aminoácidos aromáticos expuestos a la superficie presente en el dominio de unión al receptor, pero los glicanos que contienen β -octil-glucósido también se reconocen en un segundo sitio de la superficie de las ETX. Tras la unión a la membrana diana, se escinde tanto la pro-región N-terminal como la C-terminal, lo que permite la interacción entre subunidades a través del dominio de formación de poros. La posición de la pro-región C-terminal normalmente obstruiría la oligomerización en la forma pro-ETX, que puede actuar como un mecanismo estérico para regular la función. Luego de la escisión, ETX se oligomeriza, formando un preporo heptamérico (**Figura 7**) (29).

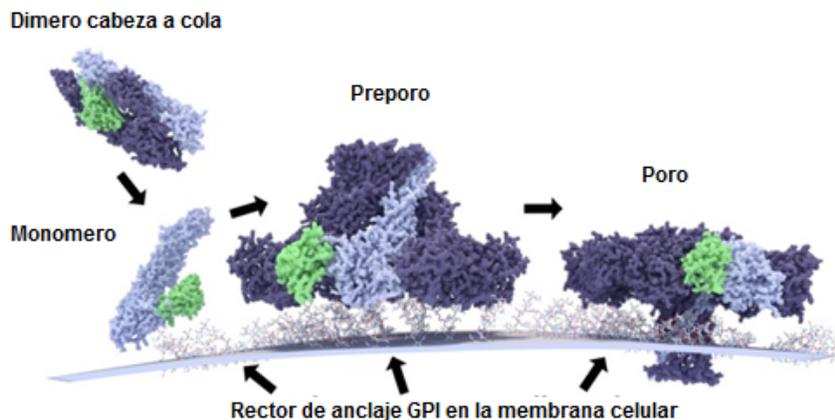


Figura 7. Modelo de acción de proteínas Mpp ETX/MTX. Dímero inactivo se oligomeriza y pasa a ser un monómero uniéndose a la membrana celular por medio por el dominio N-terminal al receptor de anclaje GPI, luego da lugar al preporo heptamérico y finalmente la formación del poro que da lugar a la lisis de la célula.

2.4. Parasporinas y sus generalidades.

En el 2000 se describe por primera vez una proteína de 81 kDa con actividad citocida única denominada PS, la cual presenta una homología de secuencia de aminoácidos muy baja (<25%) con respecto a las proteínas insecticidas Cry y Cyt existentes de *B. thuringiensis*, es decir, esta proteína no está relacionada con ellas. Es bien sabido que Cyt es responsable de la actividad citolítica, aunque no tóxica, de amplio espectro en inclusiones paraesporales de *B. thuringiensis serovar israelensis*, sin embargo algunos estudios identificaron que el efecto citopático que deja la PS es diferente ya que los resultados obtenidos mostraron una fuerte actividad citocida frente a células-T de leucemia (MOLT-4) y cáncer cervical (HeLa), cabe resaltar que las células-T normales no resultaron afectadas, por lo tanto como las dos proteínas tienen formas de acción distintas se decide crear una nueva categoría de proteínas, donde se define oficialmente a las PS de *B. thuringiensis* como proteínas parasporales bacterianas que no son hemolíticas pero sí capaces de matar preferentemente células cancerosas, formando así una nueva clase de proteína Cry, denominada por el Comité de nomenclatura de proteínas cristalinas de plaguicidas de *B. thuringiensis* como Cry31Aa (4), (18), (30).

Posteriormente se creó el Comité de Clasificación y Nomenclatura de Parasporinas, donde se constituyó a la nueva proteína en la familia PS1Aa (PS1Aa). Este hallazgo abrió camino a nuevas investigaciones que a la fecha han permitido establecer cinco familias adicionales de PS: PS2, PS3, PS4, PS5, y PS6 (18). Para esto fue necesario que un comité estableciera características específicas como criterio de inclusión, las cuales son: I) no deben presentar actividad insecticida conocida; II) ser sintetizadas como protoxinas, es decir, necesitan ser hidrolizadas por proteasas en puntos específicos para su activación; III) tienen alta toxicidad contra células humanas de origen neoplásico, pero una baja o nula hacia células sanas y IV) poseen bajos porcentajes de identidad con proteínas Cry insecticidas.

2.5. Nomenclatura y estructura de parasporina

Desde 1998 se adoptó un sistema de nomenclatura de cuatro niveles el cual calificaba las proteínas dependiendo de la similitud de aminoácidos, por lo tanto las proteínas que compartían al menos el 45% de identidad de secuencia se ubicaron en el mismo grupo de clase primaria (Cry1, Cry2, etc.). Ante la gran cantidad de proteínas fue necesario hacer subdivisiones para nombrar cada una de ellas, como el segundo rango donde las proteínas que compartían menos del 78% de identidad se asignaron a rangos secundarios diferentes (Cry1A, Cry1B, etc.). Para proteínas dentro del rango secundario que compartían menos del 95% de identidad de secuencia se utilizó un tercer nivel (Cry1Aa, Cry1Ab, etc.). Finalmente, a las proteínas dentro del mismo nivel terciario que compartían una identidad superior al 95% se asignó como el cuarto nivel (Cry1Aa1, Cry1Aa2, etc.) (23). Por ello las PS fueron clasificadas como una proteínas Cry de tres dominios, sin embargo se reconoció que dentro de la nomenclatura había una serie de proteínas que mostraba muy poca similitud de secuencia pero que, no obstante, eran nombres de Cry asignados (Cry6, Cry15 y Cry22) a pesar de que las proteínas en sí pertenecen a varios grupos estructurales bastante distintos, con el aumento de investigaciones respecto a la secuenciación del genoma y los procedimientos mejorados para la determinación de la estructura de las proteínas, quedo en evidencia que existe una amplia variedad de proteínas insecticidas derivadas de bacterias y que la nomenclatura existente limitaba en gran medida la apreciación de

su diversidad, además de hacer insostenible la denominación manual de nuevas toxinas activas en invertebrados (23), (31).

Debido a estas limitaciones, a mediados del 2020 se propone automatizar el proceso sin dejar a un lado la nomenclatura de 1998 ya que esta ha sido ampliamente adoptada por más de 20 años, razón por la que el sistema actual nombra proteínas de acuerdo con el grado de identidad de aminoácidos compartida, como lo hacía su antecesora. Las nuevas secuencias se comparan con las proteínas holotipo existentes (aquellas cuyo nombre termina en 1) para encontrar la mejor coincidencia según el porcentaje de identidad. Este sistema de denominación da resultados consistentes usando sólo cortes ligeramente modificados del 45%, 76%, 95% de identidad de secuencia. Otro punto que se quiere mejorar con esta nueva actualización es basar la nomenclatura revisada en grupos estructurales de modo que las proteínas con estructuras homólogas (y, por extensión, probablemente tengan mecanismos de acción generales similares) compartan nombres similares; e incorporar proteínas activas de invertebrados de bacterias distintas de *B. thuringiensis* en una estructura de denominación unificada y consistente (23), (31).

A raíz de la actualización de la nomenclatura, las familias de PS se clasificaron en dos grupos de proteínas debido a su estructura, en el primero las PS1, PS3 y PS6 se quedaron en el grupo de proteínas Cry de tres dominios (**Figura 6.A**) Y el segundo las PS2, PS4 y PS5 entraron a ser parte de las proteínas plaguicidas con homología a la familia Etx_Mtx2 (MPP) (**Figura 6.B**) (31).

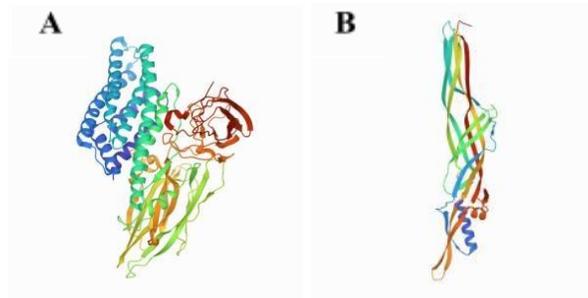


Figura 6. Grupos estructurales de PS. (A) Estructura general de proteínas Cry. (B) Estructura general de proteínas MPP (31).

2.6. Patentes

Una patente es una prerrogativa que concede a su titular el derecho exclusivo a controlar quién fabrica, usa, vende, ofrece en venta o importa el producto o tecnología que reivindica. El pliego reivindicatorio de una patente, también llamado “reivindicaciones”, “capítulo reivindicatorio” o “claims”, es un conjunto de oraciones, usualmente ubicadas al final de la solicitud y que delimitan el alcance de la invención. Con el fin de obtener una patente, se debe describir una invención que sea novedosa, útil y que no resulte evidente a la luz del “estado de la técnica” que se refiere a todo lo que es de conocimiento público y a las invenciones existentes antes de la presentación de la solicitud de patente (7), (8).

Una vez que el agente comprende la invención, puede comenzar a redactar la solicitud. Las partes de la solicitud son generalmente (7):

- Las reivindicaciones,
- La descripción detallada (o memoria descriptiva),
- Los dibujos,
- Los antecedentes,
- El resumen, y
- El sumario o breve descripción de la invención.

2.6.1. Base de datos de patentes THE LENS

Mediante el uso de protocolos de intercambio de datos estandarizados, conjuntos de datos abiertos basados en artefactos de conocimiento como patentes y trabajos académicos MetaRecords y sus vínculos, y métricas granulares, Lens Labs permite la exploración y experimentación hacia una mejor calidad de los datos y un seguimiento más preciso y transparente de la ciencia y la tecnología en nuestra sociedad. Permitiendo el acceso a datos académicos y de patentes agregados en la plataforma gratuita, abierta y que protege la privacidad de Lens.org para reducir la dependencia de los silos de datos y mejorar el descubrimiento y la cooperación. Para ayudar a lograr esto, Cambia está colaborando con Knowledge Futures Group en MIT. Esta iniciativa es una colaboración de datos para datos de innovación abierta y análisis, herramientas y métricas relacionados, incluyendo conjuntos de datos de patentes globales, gráficos de citas entre patentes y becas, y métricas o conjuntos de datos secundarios derivados de estos. Los conjuntos de datos incluyen, enlaces de patentes-productos, datos de financiación de becas, conjuntos de datos de desambiguación para autores y afiliaciones, y subconjuntos del gráfico completo de citas de patentes y becas, enriquecido con metadatos extendidos (32).

3. Diseño metodológico

3.1. Universo, población y muestra

Universo: Proteínas Cry.

Población: Proteínas tipo parasporina.

Muestra: Proteínas tipo parasporina codificadas por genomas de arqueas y bacterias.

3.2. Hipótesis, variables, indicadores

Hipótesis

Nula: No hay secuencias asociadas a parasporinas en los genomas procariotas.

Alternativa: Hay secuencias asociadas a parasporinas en los genomas procariotas.

Variables

Variable independiente: Características bioquímicas de parasporinas.

Variable dependiente: Valores bioquímicos de proteínas tipo parasporina de arqueas y bacterias.

Indicadores

Número de proteínas tipo parasporina.

Parámetros bioquímicos.

Patentes relacionadas a parasporina

3.3. Técnicas y procedimientos

3.3.1 Secuencias de parasporina.

Las secuencias de aminoácidos de las PS fueron tomadas en formato FASTA de la base de datos GenBank del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI, por sus siglas en inglés) de acuerdo con clasificación y nomenclatura (<http://parasporin.fitc.pref.fukuoka.jp/>)(30), la cual proporciona el número de acceso de cada una de las PS, esto con el fin de crear una lista de las 19 PS con su respectiva secuencia (23).

3.3.2. Análisis con BLAST-P para la identificación de secuencias similares a PS en genomas de bacterias y arqueas

Para buscar secuencias de PS en microorganismos diferentes *B. thuringiensis* se utilizaron 78 géneros bacterias y 12 de arqueas, seleccionados a partir del árbol filogenético básico de la vida,

el cual se puede consultar en la página del Laboratorio Europeo de Biología Molecular (EMBL por sus siglas en inglés) en la sección de árbol de la vida interactivo (ITOL por sus siglas en inglés) (<https://itol.embl.de/itol.cgi>) (33).

A las secuencias de las 19 PS se les realizó un alineamiento con los 78 genomas de bacterias y los 12 de arqueas para identificar en ellos proteínas similares a PS por medio de la herramienta básica de búsqueda de alineación local / Proteína- Proteína (BLAST-P, por sus siglas en inglés) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), seleccionando el algoritmo PSI-BLAST el cual construye un perfil iterativo encontrando homólogos nuevos y remotos que contienen mayor información y la matriz BLOSUM62 que se deriva de alineamientos locales enfocándose en las regiones conservadas comparando así las secuencias relacionadas de forma distante con identidad $\geq 62\%$. Los parámetros discriminatorios para escoger secuencias de aa fueron: Cobertura $\geq 60\%$, Valor E cercano a 0 y un porcentaje de identidad $\geq 20\%$ (34), (35).

3.3.3. Análisis bioquímico de las secuencias de aminoácidos tipo PS.

Los parámetros bioquímicos de las secuencias de aa tanto de las PS y de las proteínas tipo PS se analizaron por medio de la herramienta ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>), identificando: número de aminoácidos (aa), peso molecular, punto isoeléctrico (pI), residuos de carga negativa (Asp + Glu), residuos de carga positiva (Arg + Lys), índice de inestabilidad, índice alifático y gran promedio de hidropatía (GRAVY, por sus siglas en inglés).

3.3.4. Patentes.

Se buscaron patentes relacionadas con PS en la base de datos de patentes THE LENS (<https://www.lens.org/>), de acuerdo con las reivindicaciones se analizaron las patentes activas a la fecha del presente proyecto, encontrando dos de ellas, con las cuales se puede tener una idea de las innovaciones que se ha ido proponiendo con el descubrimiento de las PS.

4. Resultados

4.3. Identificación entre secuencias de PS con géneros de bacterias y arqueas

A partir del análisis realizado con PSI-BLAST y empleando la matriz BLOSUM 62 se usó como parámetro de búsqueda cada una de las 19 PS con su secuencia de aminoácidos en formato FASTA contra los 78 genomas de bacterias y los 12 de arqueas. Se obtuvo un resultado de 1404 y 228 secuencias de aa, respectivamente, que tienen relación con PS. De estos resultados se seleccionaron 9 bacterias (*Bacillus sp.* 2479 (taxid:1396) (encontrándose 6 secuencias de aa de este), *Pseudomonas* (taxid:286), *Clostridium* (taxid:1485) (encontrándose 3 secuencias de aa de este), *Treponema* (taxid:157), *Helicobacter* (taxid:209), *Salmonella* (taxid:590), *Bdellovibrio* (taxid:958), *Streptomyces* (taxid:1883), *Vibrio* (taxid:662)) proteínas de bacterias y 3 de arqueas (*Methanosarcina* (taxid:2207), *Pyrococcus* (taxid:2260), *Nanoarchaeum* (taxid:193568)) que cumplen con los parámetros de Cobertura $\geq 60\%$, Valor E más cercano a cero y un porcentaje de identidad $\geq 20\%$ (Tabla 1).

Tabla 1. Proteínas tipo parasporinas seleccionadas a partir del análisis en PSI-BLAST. En verde están identificadas las PS y proteína tipo PS Cry y rosado las Mpp. Las 3 últimas filas corresponde a secuencias de arqueas

PARASPORINA Acceso NCBI	NOMBRE DE LA SECUENCIA Acceso NCBI	COBERTURA	Valor E	Identidad
PS1Aa3 AB250922	hypothetical protein [<i>Bacillus cereus</i>] WP_098589776.1	88%	2e- 16	41.75%
PS1Ad1 AB375062	hypothetical protein [<i>Pseudomonas sp. A-1</i>] WP_136488344.1	61%	1e- 08	22.09%
PS2Aa1 AB099515	N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase family protein [<i>Clostridium botulinum</i>] NFG60757.1	60%	5,e-71	28.16%
	glycosyltransferase family 4 protein [<i>Treponema sp.</i>] NLJ09497.1	65%	8e- 99	20.80%
	type I restriction endonuclease subunit R [<i>Helicobacter pylori</i>] WP_120949812.1	60%	4e- 90	20.10%

PS2Aa2 AB454419	hypothetical protein [<i>Salmonella enterica</i>] EBQ4063490.1	65%	6e- 93	25.19%
	hydralysin-2 [<i>Bacillus cereus</i>] WP_098317434.1	70%	1e- 35	34.31%
PS2Ab1 AB186914	hydralysin-2 [<i>Bacillus cereus</i>] WP_162279601.1	75%	3e- 39	35.65%
	DNA gyrase subunit A [<i>Bdellovibrio sp.</i>] MBC7755674.1	62%	0.010	21.03%
PS3Ab1 AB116651	hypothetical protein [<i>Clostridium puniceum</i>] WP_077845932.1	79%	6e- 51	27.70%
	hypothetical protein, partial [<i>Bacillus cereus</i>] WP_098905715.1	91%	0.0	52.70%
PS4Aa1 BAD22577.1	ETX/MTX2 family pore-forming toxin, partial [<i>Clostridium botulinum</i>] WP_039239436.1	65%	0.012	24.34%
	ETX/MTX2 family pore-forming toxin [<i>Bacillus cereus</i>] WP_180233591.1	97%	5e- 26	33.45%
	ETX/MTX2 family pore-forming toxin [<i>Streptomyces sp.</i> SID1034] WP_161253253.1	66%	5e- 05	27.67%
	ETX/MTX2 family pore-forming toxin [<i>Vibrio caribbeanicus</i>] WP_009601263.1	88%	2e- 08	25.57%
PS5Aa1 BAJ05397.1	ETX/MTX2 family pore-forming toxin [<i>Bacillus cereus</i>] WP_044797748.1	98%	1e- 46	33.99%
PS1Ab1 AB250923	hypothetical protein MSMTP_2113 [<i>Methanosarcina sp.</i> MTP4] AKB25582.1	60%	2e- 10	24.18%
PS4Aa1 BAD22577.1	HAD family hydrolase [<i>Pyrococcus yayanosii</i>] WP_013904941.1	61%	9e- 81	21.14%
PS5Aa1 BAJ05397.1	hypothetical protein [<i>Nanoarchaeum sp.</i>] MBA4405471.1	74%	2e- 29	25.27%

4.4. Caracterización bioquímica de las proteínas

Una vez seleccionadas las proteínas tipo parasporinas se realizó un estudio bioquímico junto con las PS para determinar sus características físico químicas con la herramienta bioinformática ProtParam (Tabla 2), identificando el nombre de la parasporina. En Tabla 3 se observan las secuencias similares a PS identificadas en los genomas de bacteria y arquea. En la Tabla 4 se encuentran proteínas Cry y Mpp insecticidas a las cuales se les hizo el mismo análisis bioquímico como una forma para comparar los resultados obtenidos anteriormente.

Tabla 2. Caracterización bioquímica de las parasporinas. En verde están identificadas las PS Cry y rosado las Mpp

PARASPO RINA Acceso NCBI	Número de aa	Peso molecular	Punto isoeléctri co pI	Residuos de carga negativa (Asp + Glu)	Residuos de carga positiva (Arg + Lys)	Índice de inestabili dad	Índice alifático	Gran promedio de hidropatía (GRAVY)
PS1Aa1 AB031065	723	81049.52	5.73	70	62	39.23	79.88	-0,296
PS1Aa2 AY081052	742	83104.76	5.35	73	61	39.55	79.42	-0,294
PS1Aa3 AB250922	723	81049.52	5.73	70	62	39.23	79.88	-0,296
PS1Aa4 AB274826	723	81095.57	5.73	70	62	38.95	79.34	-0,301
PS1Aa5 AB274827	723	81094.57	5.79	70	62	39.61	79.75	-0,298
PS1Aa6 AB375062	754	84419.39	6.01	72	67	37.81	81.25	-0,290
PS1Ab1 AB250923	726	81778.42	5.96	71	64	39.65	81.03	-0,324
PS1Ab2 AB274825	726	81616.14	5.77	71	62	39.87	81.71	-0,324
PS1Ac1	777	86747.19	5.83	76	67	38.95	82.11	-0,323

AB276125									
PS1Ac2 BAM25048.1	777	86760.15	5.75	76	66	39.42	81.98	-0,327	
PS1Ad1 AB375062	758	84782.64	5.23	72	59	42.31	82.64	-0,279	
PS2Aa1 AB099515	338	37447.66	5.35	31	26	34.26	63.11	-0,433	
PS2Aa2 AB454419	338	37495.66	5.21	31	25	34.09	62.54	-0,441	
PS2Ab1 AB186914	304	33016.63	5.12	24	19	39.99	75.00	-0,258	
PS3Aa1 AB116649	825	93693.80	6.18	81	77	30.98	76.22	-0,496	
PS3Ab1 AB116651	829	93841.89	6.19	83	79	31.41	75.16	-0,508	
PS4Aa1 BAD22577.1	275	30079.88	6.09	21	19	29.03	81.16	-0,171	
PS5Aa1 BAJ05397.1	305	33798.55	5.99	28	27	35.57	72.85	-0,439	
PS6Aa1 AB375063	753	84563.95	5.75	71	65	33.39	94.79	-0,226	

Tabla 3. Caracterización bioquímica de las secuencias tipo PS. En verde están identificadas las PS y proteína tipo PS Cry y rosado las Mpp.

PARASP ORINA Acceso NCBI	NÚMERO DE ACCESO DE LA SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS TIPO PARASPORINA	Nº de aa	Peso molecular	Punto isoeléctrico pI	Residuos de carga negativa (Asp + Glu)	Residuos de carga positiva (Arg + Lys)	Índice de inestabilidad	Índice alifático	Gran promedio de hidropatía (GRAVY)
PS1Aa3	WP_098589776.1	819	91053.26	6.00	89	83	27.06	74.86	-0,476
PS1Ad1	WP_136488344.1	496	56023.66	5.14	74	59	32.25	73.37	-0,469

PS2Aa1	NFG60757.1	581	64098.82	4.52	89	59	9.79	70.79	-0,512
	NLJ09497.1	425	49092.42	5.62	57	46	34.41	96.59	-0,127
	WP_120949812.1	1048	122584.64	6.36	162	152	42.96	87.60	-0,682
	EBQ4063490.1	503	55178.94	6.41	52	50	23.79	76.62	-0,341
PS2Aa2	WP_098317434.1	253	28413.59	5.99	28	24	54.60	93.24	-0,145
PS2Ab1	WP_162279601.1	254	28173.45	6.66	24	23	50.75	92.05	-0,043
	MBC7755674.1	478	53182.22	6.13	67	62	36.43	92.20	-0,291
PS3Ab1	WP_077845932.1	622	71723.46	5.62	79	64	34.71	81.80	-0,455
	WP_098905715.1	795	90470.19	5.93	80	74	34.25	83.31	-0,387
PS4Aa1	WP_039239436.1	277	30842.80	5.30	37	31	29.81	75.60	-0,383
	WP_180233591.1	275	30388.01	4.71	32	21	29.98	76.15	-0,325
	WP_161253253.1	332	36313.70	7.10	34	34	39.17	80.48	-0,377
	WP_009601263.1	299	32606.20	4.98	36	28	38.50	72.68	-0,410
PS5Aa1	WP_044797748.1	310	35407.54	7.09	30	30	35.41	84.90	-0,251
PS1Ab1	AKB25582.1	481	53977.76	5.17	64	47	36.47	80.83	-0,345
PS4Aa1	WP_013904941.1	221	25479.50	5.48	39	35	24.79	103.17	-0,254
PS5Aa1	MBA4405471.1	442	49478.93	3.74	103	27	31.17	85.48	-0,363

Tabla 4. Parámetros bioquímicos de proteínas Cry y Mpp. En verde están identificadas las Cry, en rosado las Mpp y en morado las últimas 5 filas representan otras proteínas elegidas con fines comparativos.

PROTEÍNA Acceso NCBI	Número de aa	Peso molecular	Punto isoele ctrico pI	Residuos de carga negativa (Asp + Glu)	Residuos de carga positiva (Arg + Lys)	Índice de inestabi lidad	Índice alifáti co	Gran promedio de hidropatía (GRAVY)
Cry1Aa6 AAA86265	620	69428.03	5.70	55	47	38.70	87.42	-0,185
Cry2Aa4 AAC04867	633	70748.33	8.21	43	45	34.29	84.53	-0,256
Cry30Ea1 ACC95445	688	77621.97	7.89	57	59	36.77	82.98	-0,297
Cry40Ca1	657	73866.76	5.55	72	61	32.25	82.80	-0,351

ACB14343								
Cry52Ca1 AJW76683	676	77257.99	5.82	73	65	37.36	81.35	-0,410
Mpp2Aa2 AAC44125.1	292	31819.95	5.96	27	24	21.57	87.12	-0,085
Mpp3Aa3 AAB36656.1	327	35916.43	5.32	37	30	30.91	79.33	-0,316
Mpp15Aa1 AAA22333	340	37546.99	6.72	32	31	39.06	80.59	-0,372
Mpp45Aa1 BAD22577	275	30079.88	6.09	21	19	29.03	81.16	-0,171
Mpp51Aa2 ADK94873	309	33985.93	5.43	24	17	39.49	75.70	-0,302
WP_001389837.1	195	22492.96	9.80	15	26	39.16	93.49	-0,331
WP_063349749	309	31722.43	6.55	29	27	35.04	102.75	-0,238
WP_003098126.1	235	26505.84	5.88	33	30	53.28	114.94	-0,058
WP_077040586.1	470	52820.63	6.23	59	53	48.42	80.38	-0,346
WP_061346616	276	30677.74	6.07	36	31	31.49	88.37	-0,364

4.5. Patentes

Acerca de este tema de las PS de *B. thuringiensis* como agente citotóxico contra células cancerígenas humanas, se realizó una búsqueda en la base de datos THE LENS (Tabla 5). Donde se encontraron 2 patentes activas relacionadas registradas en Japón y China en una ventana de tiempo de 6 años entre sí (2004 y 2011), cabe resaltar que la más reciente fue de hace 11 años.

Tabla 5. Patentes

Título de la patente	Código de la patente	País de solicitud	Año de solicitud	Propietario	Reivindicaciones
Cristal de parasporina-1 activado para expresar la actividad de destrucción del reconocimiento de células cancerosas, método para producir la estructura tridimensional y uso de la misma	JP 2005263728 A	Japón	2004	National Institute of Advanced Industrial Science and Technology	<ol style="list-style-type: none"> 1. Un cristal de parasporina-1 capaz de dilucidar la estructura tridimensional de las cadenas laterales de aminoácidos mediante análisis de la estructura cristalina de rayos X. 2. El cristal según la reivindicación 1, donde PS-1 se deriva de <i>B. thuringiensis</i> A1190. 3. El cristal según la reivindicación 1, donde PS-1 es una forma activada que expresa la actividad de destrucción del reconocimiento de células cancerosas. 4. El cristal según la reivindicación 3, caracterizado porque la forma activada se obtiene por descomposición parcial con tripsina. 5. El cristal de acuerdo con la reivindicación 4, donde PS-1 activada es un complejo del siguiente polipéptido (a) o (b) y el siguiente polipéptido (c) o (d): <ol style="list-style-type: none"> (a) Un polipéptido que consta de la secuencia de aminoácidos 94aa a 231aa de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID N °: 2 (b) Que consta de una secuencia de aminoácidos en la que se eliminan, sustituye o añade uno o varios aminoácidos en la secuencia de aminoácidos descrita en (a) anterior, y que comprende un complejo con el siguiente polipéptido (c) o (d): Polipéptido que puede formar y expresar la actividad de destrucción del reconocimiento de células cancerosas. (c) Un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos del 232 al 723 en la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID N °: 2 (d) que consta de una secuencia de aminoácidos en la que se eliminan, sustituye o añaden uno o varios aminoácidos en la secuencia de aminoácidos descrita en (c) anterior, y que comprende un complejo con el polipéptido de (a) o (b) anterior Polipéptido que puede formar y expresar la actividad de destrucción del reconocimiento de células cancerosas. 6. El cristal, de acuerdo con la reivindicación 1, que puede retener al menos 2 de capacidad de difracción de rayos X incluso cuando está congelado con nitrógeno líquido o gaseoso.

					<ol style="list-style-type: none">7. El cristal según la reivindicación 1, que es estable en una solución de cristalización que contiene un agente anticongelante.8. El cristal según la reivindicación 7, en el que el crioprotector es glicerina que tiene una concentración del 20% (v / v) o menos y es estable a 25°C durante al menos 2 horas.9. Un cristal de sustitución isomorfo de átomo pesado de cristal de PS-1, que puede obtenerse permitiendo que un compuesto de metal pesado actúe sobre el cristal de la reivindicación 1.10. Cristal según la reivindicación 9, en el que el compuesto de metal pesado se selecciona del grupo que consiste en mercurio, platino y talio.11. Un método para producir cristales de PS-1 mediante un método de difusión de vapor o un método de microdiálisis, en el que el pH de una solución alcalina de PS-1 se reduce en presencia de un precipitante.12. El método de la reivindicación 11, en el que el agente de precipitación es polietilenglicol.13. Método según la reivindicación 12, en el que el polietilenglicol tiene un peso molecular medio de 3350 Da.14. El método, de acuerdo con la reivindicación 13, en el que la concentración de polietilenglicol es del 5 al 10%.15. El método, de acuerdo con la reivindicación 13, en el que la PS-1 está activada y tiene una concentración de 2 a 10 mg / ml.16. La coordenada estructural tridimensional de la PS-1 obtenida mediante la realización del análisis de cristales de rayos X del cristal de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10.17. Las coordenadas de la estructura tridimensional según la reivindicación 16 se obtienen realizando una operación de movimiento matemático de traslación, rotación, simetría especular o una combinación de las mismas en un espacio tridimensional sin cambiar la disposición relativa de cada átomo. Coordenadas estructurales 3D.18. Un método para determinar una estructura coordinada tridimensional de una proteína desconocida, que comprende construir una estructura tridimensional de la proteína desconocida basándose en las coordenadas de estructura según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 17.
--	--	--	--	--	--

					<p>19. El método de acuerdo con la reivindicación 18, en el que el método de construcción de estructura tridimensional es un método de sustitución molecular o un método de modelado por homología.</p> <p>20. Se busca una parte homóloga comparando la estructura tridimensional obtenida a partir de las coordenadas estructurales según una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 18 con la estructura tridimensional de una proteína de unión a ligando arbitraria. Método de predicción de ligandos.</p> <p>21. Un método para predecir un ligando para PS-1, que comprende realizar una simulación de unión entre la estructura tridimensional obtenida a partir de las coordenadas estructurales según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 18 y la estructura tridimensional de una sustancia candidata a ligando.</p> <p>22. El método de la reivindicación 20 o 21, en el que el ligando es un ligando de la superficie de la célula cancerosa.</p> <p>23. El residuo de aminoácido que debería modificarse para mejorar dicha PS-1 entre las secuencias de aminoácidos en la región de unión del ligando de la PS1 que el ligando estimado por el método de una cualquiera de las reivindicaciones 20-21 se une enlace parejas El método de diseño de PS-1 mejorado, caracterizado por especificar.</p> <p>24. La secuencia de aminoácidos en una región distinta de la región de unión al ligando de la PS-1 a la que se une el ligando predicho por el método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 21 a 23 puede modificarse sin alterar la función de la PS-1. Un método para diseñar PS-1, que se caracteriza por especificar una secuencia o una secuencia inmovilizable.</p> <p>25. Un método para predecir el efecto de una proteína insecticida en células de mamíferos comparando las coordenadas estructurales según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 18 y la estructura tridimensional de la proteína Cry insecticida.</p>
--	--	--	--	--	--

<p><i>Bacillus thuringiensis</i> ST7, gen anticáncer y aplicación de los mismos</p>	<p>CN102517228A</p>	<p>China</p>	<p>2011</p>	<p>Sichuan Agricultural University</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. <i>B. thuringiensis</i> cepa bacteriana ST7, su número de depósito es CGMCC No.3922. 2. Según la reivindicación 1 se caracteriza porque contiene proteína Cry62Aa1 cristal paraesporal, su secuencia de aminoácidos se muestra en SEQ ID N°2. 3. Lo dicho de <i>B. thuringiensis</i> ST7 en la reivindicación 2, se caracteriza porque el gen de la proteína Cry62Aa1 cristalina paraesporal codificante es el gen cry62Aa1, su secuencia de nucleótidos se muestra en la SEQ ID N° 1. 4. <i>B. thuringiensis</i> ST7 descrito arbitrariamente de la reivindicación 1~3 o su sintonía se eliminan de la aplicación en la medicina de las células cancerosas en preparación. 5. <i>B. thuringiensis</i> ST7 descrito arbitrariamente de la reivindicación 1 ~3 o su aplicación de sintonía en la preparación de un fármaco para la terapia del cáncer. 6. El gen <i>cry62Aa1</i> se elimina con la aplicación en la medicina de las células cancerosas en preparación. 7. La aplicación del gen <i>cry62Aa1</i> en la preparación del fármaco para la terapia del cáncer. 8. La aplicación de genes <i>cry62Aa1</i> en preparación de plantas transgénicas o microorganismos. 9. Medicina para matar células cancerosas, contiene el gen <i>cry62Aa1</i>. 10. Medicamento para la terapia del cáncer según la reivindicación 9, es un medicamento contra el cáncer de mama.
---	---------------------	--------------	-------------	--	--

5. Discusión

Desde el descubrimiento de la primera proteína Cry con efecto anticancerígeno aislada de *B. thuringiensis*, designada tiempo después como PS1Aa1 por el Comité de Clasificación y Nomenclatura de Parasporinas puesto que no presenta actividad hemolítica pero tiene actividades citocidas, matando preferentemente las células cancerosas, (36), (30), se han venido realizando investigaciones que permitan dilucidar cuantas proteínas de este género son capaces de producir cristales parasporales, a qué tipo de familia pertenecen estas proteínas, su estructura, sus genes, su modo de acción, entre otras muchas características, sin embargo es muy poco lo que se conoce acerca de su evolución y con los resultados obtenidos en este proyecto, se pretende brindar una orientación más clara de cómo se han ido adaptando con el pasar de los años las parasporina.

5.3. Alineamiento entre secuencias de PS con géneros de bacterias y arqueas

De acuerdo con los resultados plasmados en la Tabla 1, se determinó que las proteínas con mejor cobertura son: ETX/MTX2 family pore-forming toxin [*Bacillus cereus*] seguidas por ETX/MTX2 family pore-forming toxin [*Vibrio caribbeanicus*] e hypothetical protein [*Clostridium puniceum*] del dominio Bacteria, género *Bacillus*, *Vibrio* y *Clostridium* y del dominio arquea hypothetical protein [*Nanoarchaeum* sp.] del género *Nanoarchaeum* con respecto a las PS4Aa1 PS1Aa3 y PS5Aa1, lo cual nos da a entender que las PS han ido evolucionando desde hace muchos años de acuerdo a la gran homología mostrada con *Nanoarchaeum*, el cual tiene una forma de vida primitiva (debido a su alta temperatura de crecimiento y modo de vida anaeróbico) en hábitats acuosos, suelos y vegetación (37). Dando un punto de referencia para la evolución de las mismas y como estos genomas se han dispersado en otros microorganismos como los del dominio bacteria. Además que dos de las tres proteínas con mayor homología respecto al dominio bacteria son de la familia ETX/MTX2 relacionada a proteínas pesticidas (Mpp por sus siglas en inglés) a la cual pertenecen las PS2, PS4 y PS5, coincidiendo asertivamente pues la proteína de *Vibrio* dio su mejor homología con la PS4Aa1 y

en el caso de *Bacillus* fue con la PS5Aa1, aunque la PS2 está clasificada oficialmente como un miembro de esta familia las PS4 Y PS5 aún no, sino que se les clasifica como proteína tipo aerolisina (uno de los miembros más importantes de esta familia), por su estructura y modo de acción siendo una β toxina formadora de poros (β -PFT, por sus siglas en inglés) (29), (5), (38). Debido a que esta familia se comenzó a estudiar más o menos desde el 2000 (39) no se ha logrado determinar una correlación clara de la filogenia de los dominios de cabeza y cola entre las PS pertenecientes a este grupo, por lo tanto se hace necesario que en el futuro se realicen investigaciones en esta área (40).

5.4. Caracterización bioquímica de las proteínas

Aunque las PS han llamado la atención por su efecto citotóxico en células cancerígenas aún se desconocen ciertas cosas respecto a ellas dejando un vacío respecto a su información, a partir de esto, por medio del proyecto, se identificó tanto en PS como en las 19 proteínas tipo parasporina mostradas que comparten varias características bioquímicas (Tabla 2 y 3) como: el número de aminoácidos el cual es representativo para conocer si la proteína corresponde a la familia de proteínas Cry (PS1, PS3 y PS6) con más de 700 aa o Mpp (PS2, PS4 y PS5) con más de 200 (31); el peso molecular depende del número y tipo de aa de la cadena polipeptídica que ayuda a determinar la estequiometría de las proteínas (41) indicando que las PS Cry tienen un peso molecular mayor que las Mpp; su punto isoeléctrico ayuda a determinar en qué punto de una solución la carga neta de una proteína se vuelve cero, (42), como es descrito por Bhatia S. et al, esta característica bioquímica ayuda a conocer el enfoque isoeléctrico determinado a partir de la separación de proteínas en el punto isoeléctrico donde se aplica un gradiente de pH y un potencial eléctrico a través del gel (poliacrilamida o gel de agarosa), donde un extremo es más positivo que el otro, produciendo así la separación sobre la base de los grupos positivos, que serán arrastrados hacia el extremo más negativo del gel, o negativos, que serán arrastrados hacia el extremo más positivo del gel, presentes en la molécula. Las proteínas aplicadas en la primera dimensión migrarán a través del gel y se acumularán en su punto isoeléctrico de esta forma la proteína ya no se mueve en un campo eléctrico (43), por lo tanto se pudo evidenciar que las proteínas se mantienen entre 5 y 7 estableciendo que en este rango de pH la carga total de las

proteínas se vuelve cero; los residuos de carga negativa (Asp + Glu) y carga positiva (Arg + Lys) proporcionan la información de la ubicación en la célula de la proteína en un pH neutro, puesto que las proteínas intracelulares tienden a tener una mayor fracción de residuos negativos y las proteínas extracelulares al tener residuos de carga positiva interactúan con la carga negativa del grupo fosfato de la cabeza de los fosfolípidos de la membrana (44), de este modo se infirió que las proteínas tipo PS tienen una mayor cantidad de residuos negativos (Asp + Glu) que los positivos (Arg + Lys), confirmando así que son proteínas de acción intracelular (44) ya que tanto las PS como las proteínas tipo parasporina al ser tipo Cry o Mpp actúan sobre la membrana de las células para formar el poro y por consiguiente la apoptosis por el desequilibrio generado dentro de la célula al tener una concentración alta de Ca^{2+} (45); el índice de inestabilidad proporciona una estimación de la estabilidad de las proteínas puesto que la aparición de dipéptidos es significativamente diferente en proteínas inestables a comparación de las estables cuando el valor está por encima de 40 predice que una proteína es inestable y cuando es menor que 40 predice una proteína estable (46), (47), por ende tanto PS, a excepción de PS1Ad1, como las proteínas tipo PS se estiman como proteínas estables, pues tienen un rango menor de 40 (41). Sin embargo en los últimos años se ha cuestionado el método de índice de inestabilidad como predicción proteica *in vitro* pues en el estudio de Gamage D et al, se evidenció como las condiciones del medio proteico y la naturaleza misma de la misma interfiere con el resultado correcto (48); el índice alifático o volumen relativo permite conocer si una proteína es resistente a cambios irreversibles en su estructura física o química a temperaturas altas dependiendo del volumen relativo ocupado por las cadenas laterales alifáticas (alanina, valina, isoleucina y leucina), de este modo se infiere que son proteínas termoestables ya que su índice se considera alto (41), en otros estudios este índice se ha utilizado incluso para identificar derivados de combustiones generadas en rocas por el cambio que se puede ver en las estructuras (49); con el gran promedio de hidropatía (GRAVY), según la escala de hidropatía, se determina si la proteína tiene interacciones con el agua dado que entre más bajo sea el índice general de hidropatía hay mayor posibilidad de establecer dicha interacción, lo cual coincide con los resultados pues todas las proteínas dieron un valor negativo en la escala de hidropatía concluyendo así que tienen

mejores interacciones con el agua sugiriendo que puede encontrarse altamente hidratada en medios acuoso (47).

Se encontraron resultados relevantes de secuencias de aa tipo PS en los genomas de *B. cereus* (PS1Aa3, PS2Aa2, PS2Ab1, PS3Ab1 y PS4Aa1), *Vibrio caribbeanicus* (PS4Aa1), *Clatridium* (PS2Aa1, PS3Ab1 y PS4Aa1) y *Nanoarchaeum* (PS5Aa1), por lo tanto es común que compartan algunos genes, a pesar que de este grupo solo *B. thuringiensis* es quien produce toxinas parasporales durante la esporulación (50) y *Vibrio caribbeanicus* con el cual se recomienda realizar estudios más intensivos para identificar su relación genética puesto que cuentan con una cobertura mayor al 87% (33).

Sin embargo se evidenciaron algunas variaciones, con respecto a las PS mismas, por ejemplo, el número de aa no corresponde a los que caracteriza a una proteína de las familias Cry o MPP y también en el peso molecular porque algunas superan los 90 kDa, en el resto de parámetros si concuerdan, siendo proteínas ácidas, de acción intracelular, termoestables e hidrófilas.

De las 4 proteínas que tuvieron mejor cobertura hacia las PS, que vemos marcadas en azul, las que tuvieron variaciones en el número de aa son las de *Clostridium* y *Nanoarcaeum* y es de esperarse ya que son solo proteínas similares y aunque tienen buena cobertura esta es menor del 80%, a diferencia de las proteínas de *Bacillus cereus* y *Vibrio* que no mostraron variaciones ya que su cobertura es mayor al 87%

5.5. Patentes

Se encontraron 2 patentes registradas como activas en la base de patentes THE LENS, registradas en Japón y China en una ventana de tiempo de 6 años entre sí (2004 y 2011), cabe resaltar que la más reciente fue de hace 11 años, se hizo búsquedas en las bases de datos como WIPO, GOOGLE patents y THE LENS pero no se encontró otras patentes activas diferentes a las que ya están en la Tabla 5, ya que la mayoría estaban inactivas o en proceso de revisión a excepción de las mostradas en la Tabla 5, las cuales cubren a la PS1 de *B. thuringiensis* de la cepa A1190, la cual al descomponerse con tripsina queda activa para la destrucción de células cancerígenas, además tiene la capacidad de difracción de rayos X incluso cuando está congelado

con nitrógeno líquido o gaseoso con la glicina como agente anticongelante crioprotector a 25°C durante al menos 2 horas, para la producción de cristales se utiliza el método de difusión o microdiálisis en un pH de solución alcalina con el agente de precipitación polietilenglicol, esto con el fin de ver la estructura de la proteína, por otra parte también cubren al gen *cry62Aa1* de *B. thuringiensis* cepa ST7 aplicándolo como preparación para plantas transgénicas y también para un fármaco de terapia capaz de matar células de cáncer de mama en China (51), (52).

6. Conclusiones.

- A partir de los estudios realizados en este proyecto se identificó que otros 4 microorganismos producen proteínas con una similaridad significativa con respecto a las parasporinas.
- Con los resultados de la caracterización bioquímica de las PS y las proteínas tipo parasporina se concluyó que este conjunto de proteínas tienen actividad intracelular, son proteínas estables, resistentes a cambios repentinos en su estructura física o química además de ser hidrófilas.
- En este trabajo se encontraron patentes activas registradas en Japón y China, con respecto a Latinoamérica no hubo resultados, por tanto a partir de este proyecto se podría empezar a explorar el tema para que en un futuro se puedan utilizar las PS como método alternativo para combatir algunos tipos de cáncer.

Referencias bibliográficas

1. **Portela D, Chaparro A, Lopez S.** La biotecnología de *Bacillus thuringiensis*. *NOVA [Internet]*. 2013 [Citado 17 feb 2021], Vol. 11, (20), págs. 87-96. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/nova/v11n20/v11n20a09.pdf>.
2. **Fang Y, Li Z, Liu J, Shu C, Wang X, Zhang X, et al.** A pangenomic study of *Bacillus thuringiensis*. *J of Genetics and Genomics [Internet]*. 2011 [Cited 16 sept 2020], Vol. 38, (12), pp. 567-576. Available in: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1673852711001895>.
3. **Bravo A, Gómez I, Porta H, García-Gómez B, Rodriguez-Almazan C, Pardo L, et al.** Evolution of *Bacillus thuringiensis* Cry toxins. *J Biotechnology & Applied Microbiology [Internet]*. 2012 [Cited 19 sept 2020], Vol. 6, (1), pp. 17-26. Available in: <https://sfamjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1751-7915.2012.00342.x>.
4. **Mizuki E, Park Y, Saitoh H, Yamashita S, Akao T, Higuchi K, et al.** Parasporin, a Human Leukemic Cell-Recognizing Parasporal. *J Clinical and Vaccine Immunology [Internet]*. 2000 [Cited 30 oct 2020], Vol. 7, (4), pp. 625–634. Available in: <https://cvi.asm.org/content/7/4/625>.
5. **Okumura S, Koga H, Inouye K, Mizuki E.** Toxicity of Parasporin-4 and Health Effects of Pro-parasporin-4 Diet in Mice. *Toxins. J Toxins [Internet]*. 2014 [Cited 31 oct 2020], Vol. 6, (7), pp. 2115-2126. Available in: <https://www.mdpi.com/2072-6651/6/7/2115>.
6. **National Center for Biotechnology Information (NCBI).** Genome. *Genome Information by Organism*. [Online] 1988 [Query: 31 oct 2020]. [Cited: Ago 29, 2021.] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/browse#!/prokaryotes/bacillus%20thuringiensis>.
7. **Ginebra.** *WIPO. WIPO Patent Drafting Manual. IP ASSETS MANAGEMENT SERIES.* (2017) [Cited May 23 2021]. págs. 1-138. Available in: https://www.wipo.int/edocs/pubdocs/en/patents/867/wipo_pub_867.pdf.
8. **Hamm RL, Gregg A, Sparks TC.** Intellectual property in entomology: Analysis and perspective on recent trends in global patent publications. *Pest Manag Sci [Internet]*. 2020 [Cited 29 Aug 2021], Vol. 76, (5), págs. 1603-1611. Available in: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ps.5780>.
9. **Mizuki E, Ohba M, Akao T, Yamashita S, Saitoh H, Park YS.** Unique activity associated with non-insecticidal *Bacillus thuringiensis* parasporal inclusions: in vitro cell-killing action on human cancer cells. *J. Applied Microbiology [Inernet]*. 1999[Cited May 23 2020], Vol. 86, (3),

págs. 477–486. Available in:
<https://sfamjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1046/j.1365-2672.1999.00692.x>.

10. **Wu J, Zhao F, Bai J, Deng G, Qin S, Bao Q.** Adaptive Evolution of cry Genes in *Bacillus thuringiensis*: Implications for Their Specificity Determination. *J Genomics, Proteomics and Bioinformatics [Internet]*. 2007 [Cited 16 sept 2020], Vol. 5, (2), pp. 102-110. Available in: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1672022907600205?via%3Dihub#bibliog0005>.

11. **Nagamatsu Y, Okamura S, Saitou H, Akao T, Mizuki E.** Three Cry toxins in two types from *Bacillus thuringiensis* strain M019 preferentially kill human hepatocyte cancer and uterus cervix cancer cells. *Biosci Biotechnol Biochem [Internet]*. 2010 [Cited 20 Jul 2020], Vol. 74, (3), págs. 494–498. Available in: <https://academic.oup.com/bbb/article/74/3/494/5949553>.

12. **Lucena W, Pelegrini P, Martins-de-Sa D, Fonseca F, Gomes J, de Macedo L, et al.** Molecular Approaches to Improve the Insecticidal Activity of. *J Toxins [Internet]*. 2014 [Cited 24 sept 2020], Vol. 6, (8), pp. 2393-2423. Available in: <https://www.mdpi.com/2072-6651/6/8/2393/htm>.

13. **Xu C, Wang B-C, Yu Z, Sun M.** Structural Insights into *Bacillus thuringiensis* Cry, Cyt and Parasporin Toxins. *J Toxins [Internet]*. 2014 [Cited 30 oct 2020], Vol. 6, (9), pp. 2732-2770. Available in: <https://www.mdpi.com/2072-6651/6/9/2732/htm>.

14. **Masri L, Branc A, Sheppard AE, Papkou A, Laehnemann D, Guenther PS, et al.** Host–Pathogen Coevolution: The Selective Advantage of *Bacillus thuringiensis* Virulence and Its Cry Toxin Genes. *J PLOS Biology [Internet]*. 2015 [Cited 28 sept 2020], Vol. 13, (6), pp. 1-30. Available in: <https://journals.plos.org/plosbiology/article?id=10.1371/journal.pbio.1002169>.

15. **Pacheco S, Cantón E, Zuñiga-Navarrete F, Pecorari F, Bravo A, Soberón M.** Improvement and efficient display of *Bacillus thuringiensis* toxins on M13 phages and ribosomes. *J AMB Express [Internet]*. 2015 [Cited 27 sept 2020], Vol. 5, (73), pp. 1-10. Available in: <https://amb-express.springeropen.com/articles/10.1186/s13568-015-0160-1>.

16. **Brasseur K, Auger P, Asselin E, Parent S, Côté JC, Sirois M.** Parasporin-2 from a New *Bacillus thuringiensis* 4R2 Strain Induces Caspases Activation and Apoptosis in Human Cancer Cells. *PLoS One [Internet]*. 2015 [Cited 23 mar 2021], Vol. 10, (8), págs. 1-22. Available in: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2018.00708/full>.

17. **Zghal RZ, Elleuch J, Ben-Ali M, Darriet F, Rebaï A, Chandre F, et al.** Towards novel Cry toxins with enhanced toxicity/broader: a new chimeric Cry4Ba / Cry1Ac toxin. *J Applied*

Microbiology and Biotechnology [Internet]. 2016 [Cited 27 sept 2020], Vol. 101, (1), pp. 113-122. Available in: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00253-016-7766-3>.

18. **Reyes J.** Obtención de parasporinas de *Bacillus thuringiensis* cepas CL9-1 CL9-3 Y CL9-21 con actividad citotóxica para células de origen neoplásico [Trabajo de grado Maestría en ciencias con orientación en microbiología aplicada]. Mexico: Universidad Autónoma de nuevo León Facultad de ciencias químicas; 2016. Disponible en: <http://eprints.uanl.mx/14439/1/1080252167.pdf>.

19. **Pinzon E, Sierra D, Suarez M, Orduz S, Florez A.** DNA secondary structure formation by DNA shuffling of the conserved domains of the Cry protein of *Bacillus thuringiensis*. *J BMC Biophysics [Internet]*. 2017 [Cited 28sept 2020], Vol. 10, (4), pp. 1-10. Available in: <https://bmcbiophys.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13628-017-0036-7#article-info>.

20. **Zheng J, Gao Q, Liu L, Liu H, Wang Y, Peng D, et al.** Comparative Genomics of *Bacillus thuringiensis* Reveals a Path to Specialized Exploitation of Multiple Invertebrate Hosts. *J mBio [Internet]*. 2017 [Cited 29 sept 2020], Vol. 8, (4), pp. 1-14. Available in: <https://mbio.asm.org/content/8/4/e00822-17/article-info>.

21. **Fiedoruk K, Daniluk T, Mahillon J, Leszczynska K, Swiecicka I.** Genetic Environment of cry1 Genes Indicates Their Common Origin. *J Genome Biology and Evolution [Internet]*. 2017 [Cited 2 oct 2020], Vol. 9, (9), pp. 2265-2275. Available in: <https://academic.oup.com/gbe/article/9/9/2265/4091611>.

22. **Beena V, Ramnath V, SreekumarK, Karthiayini K, Philomina P, Girija D.** Crystal Protein of a Novel *Bacillus thuringiensis* Strain Inducing Cell Cycle Arrest and Apoptotic Cell Death in Human Leukemic Cells. *J Scientific Reports [Internet]*. 2019 [Cited 04 nov 2020], Vol. 9, (1), pp. 1-9. Available in: <https://www.nature.com/articles/s41598-019-45928-z>.

23. **Crickmore N, Berry C, Panneerselvam S, MishraR, Connor T, Bonning B.** A structure-based nomenclature for *Bacillus thuringiensis* and other bacteria-derived pesticidal proteins [Internet]. *J.I of Invertebrate Pathology*. 2020 [17 Mar 2021], Vol. 107438, pp. 1-5. Available in: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022201120301440>.

24. **Japón.** *Kyushu Univ. Parasporin-2 receptor active on cancer, and use thereof.* (2009) [Cited 14 May 2021]. Available in: <https://patents.google.com/patent/JP2011068568A/en?q=JP+2011068568+A>.

25. **Nair K, Al-Thani R, Al-Thani D, Al-Yafei F, Ahmed T, Jaoua S.** Diversity of *Bacillus thuringiensis* Strains From Qatar as Shown by Crystal Morphology, δ -Endotoxins and Cry Gene

Content. *Front. Microbiol [Internet]*. 2018 [cited 15 Jan 2021], Vol. 9, (708), pp. 1-10. Available in: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2018.00708/full>.

26. **Pigott C, Ellar D.** Role of Receptors in *Bacillus thuringiensis* Crystal Toxin Activity. *Microbiol Mol Biol Rev [Internet]*. 2007 [cited 19 Feb 2021], Vol. 71, (2), pp. 255-281. Available in: <https://mmbr.asm.org/content/membr/71/2/255.full.pdf>.

27. **Bravo A.** Phylogenetic Relationships of *Bacillus thuringiensis* δ -Endotoxin. *J. of Bacteriology [Internet]*. 1997 [Cited Feb 19 2021], Vol. 179, (9), pp. 2973-2801. Available in: <https://jb.asm.org/content/179/9/2793>.

28. **Del Toro G.** Caracterización del espectro de acción de la toxina CryAbMod, activa contra insectos resistentes, y su comparación con la toxina convencional CryAbMod de *Bacillus thuringiensis* [Resis pregrado Biólogo]. México: Universidad Nacional Autónoma de México; 2010. Disponible en: <https://www.conacyt.gob.mx/cibiogem/images/cibiogem/Fomento-investigacion/Tesis/Caracterizacion-espectro-de-accion-toxina-Cry1AbMod.pdf>.

29. **Chris J. Lacomel, Michelle A, Bradley A.** Branching out the aerolysin, ETX/MTX-2 and Toxin_10 family of pore forming proteins. *J.Invertebr.Pathol. [Internet]*. 2021 [Cited 24 Aug 2021], págs. 1-9. Available in: <https://www-science-direct-com.hemeroteca.lasalle.edu.co/science/article/pii/S0022201121000379>.

30. **Okumura S, Ohba M, Mizuki E, Crickmore N, Côté J.-C, Nagamatsu Y, et al.** Parasporin nomenclature [Internet]. 2006 [2015; Cited 17 Mar 2021]. Available in: <http://parasporin.fitc.pref.fukuoka.jp/>.

31. **Crickmore N, Berry C, Panneerselvam S, Mishra R, Connor T.R. and Bonning B.C.** Bacterial Pesticidal Protein Resource Center [Internet]. Updated [2020; Cited 25 mar2021]. Available in: <https://www.bpprc.org/>.

32. [Internet], **THE LENS.** 2021 [Cited 29 Aug 2021]. Available in: <https://www.lens.org/lens/labs>.

33. **Letunic I, Bork P.** Interactive Tree Of Life (iTOL) v5: an online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Nucleic Acids Research [Interent]*. 2021 [Cited 17 Aug 2021], Vol. 48, págs. W293–W296. Available in: <https://academic.oup.com/nar/article/49/W1/W293/6246398>.

34. **Madden T.** The BLAST Sequence Analysis Tool. *The NCBI Handbook [Internet]*. 2nd edition, 2013 [Cited 11 Jun 2021]. Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK153387/>.

35. **Johnson M, Zaretskaya I, Raytselis Y, Merezhuk Y, McGinnis S, Madden T.** NCBI BLAST: a better web interface. *Nucleic Acid Research*. 2008 [cited 11 Jun 2021], Vol. 36, págs. 5-9. Available in: <https://academic.oup.com/nar>.
36. **Uemori A, Ohgushi A, Yasutake K, Maeda M, Mizuki E, OHBA M.** Parasporin-1Ab, a Novel *Bacillus thuringiensis* Cytotoxin Preferentially Active on Human Cancer Cells In Vitro. *ANTICANCER RESEARCH [Internet]*. 2008 [Cited 24 Aug 2021], Vol. 28, págs. 91-96. Available in: <https://ar.iiarjournals.org/content/anticancer/28/1A/91.full.pdf>.
37. **Huber, Harald, y otros.** The phylum Nanoarchaeota: Present knowledge and future perspectives of a unique form of life.
38. **Ekino K, Okumura S, Ishikawa T, Kitada S, Saitoh H, Akao T, Mizuki E.** Cloning and Characterization of a Unique Cytotoxic Protein Parasporin-5 Produced by *Bacillus thuringiensis* A1100 Strain. *Toxins [Internet]*. 2014 [Cited 24 Aug 2021], Vol. 6, (6), págs. 882–1895. Available in: <https://www.mdpi.com/2072-6651/6/6/1882>.
39. **Cole A. R, Gibert M, Popoff M, Moss D. S, Titball R. W, Basak A.** Clostridium perfringens ϵ -toxin shows structural similarity to the pore-forming toxin aerolysin. *Nature Structural & Molecular Biology [Internet]*. 2004 [Cited 24 Aug 2021], Vol. 11, (8), págs. 797–798. Available in: <https://www.nature.com/articles/nsmb804>.
40. **Berry C, Crickmore N.** Structural classification of insecticidal proteins – Towards an in silico characterisation of novel toxins. *J. Invertebrate Pathology [Internet]*. 2017 [Cited 24 Aug 2021], Vol. 142, págs. 16–22. Available in: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0022201116301008>.
41. **Expasy ProtParam tool, [Internet].** Gasteiger E. 1993 [Updated oct 2020]; Cited may 13 2021. Available in: <https://web.expasy.org/protparam/>.
42. **Ciborowski P, Silberring J.** Proteomic Profiling and Analytical Chemistry (2nd edition) [Internet]. ELSEVIER, 2016 [Cited jul 25 2021]. Available in: <https://www.sciencedirect.com/book/9780444636881/proteomic-profiling-and-analytical-chemistry>.
43. **Bhatia S, Dahiya R.** Chapter 4 - Concepts and Techniques of Plant Tissue Culture Science. *Modern Applications of Plant Biotechnology in Pharmaceutical Science*. 2015, págs. 121-156. Available in: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128022214000042>.
44. **Baud F, Karlin S.** Measures of residue density in protein structures. *PANAS [Internet]*. 1999 [Cited jul 25 2021], Vol. 9, (22), págs. 12494–12499. Available in: <https://www.pnas.org/content/96/22/12494>.

45. **Katayama H, Kusaka Y, Yokota H, Akao T, Kojima M, Nakamura O, Mizuki E.** 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. *JBC [Internet]*. 2007 [Cited 24 Aug 2021], Vol. 282, (10), págs. 7742–7752. Available in: <https://www.sciencedirect-com.hemeroteca.lasalle.edu.co/science/article/pii/S002192582063616X>.
46. **Guruprasad K, Reddy B. V. B, Pandit M. W.** Correlation between stability of a protein and its dipeptide composition: a novel approach for predicting in vivo stability of a protein from its primary sequence. *Protein Engineering Design and Selection*. 1990 [Cited jul 28 2021], Vol. 4, (2), págs. 155–161. Available in: <https://academic.oup.com/peds/article-abstract/4/2/155/1491271>.
47. **Kyte J, Doolittle F.** A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *JMB [Internet]*. 1982 [Cited jul 30 2021], Vol. 157, (1), págs. 105-32. Available in: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0022283682905150?via%3Dihub>.
48. **Gamage D, Gunaratne A, Periyannan G, Russell T.** Applicability of Instability Index for In vitro Protein Stability Prediction. *J. Protein & Peptide Letters [Internet]*. 2019 [cITED 24 aUG 2021], Vol. 26, (5), págs. 339-347. Available in: <https://www.eurekaselect.com/170322/article>.
49. **Jiang L, George S. C.** Biomarker signatures of Upper Cretaceous Latrobe Group petroleum source rocks, Gippsland Basin, Australia: Distribution and geological significance of aromatic hydrocarbons. *Organic Geochemistry [Internet]*. 2019 [24 Aug 2021], Vol. 138, págs. 1-20. Available in: <https://ezproxy.unicolmayor.edu.co:2163/science/article/pii/S014663801930141X?pes=vor>.
50. **Moazamian E, Bahador N, Azarpira N, Rasouli M.** Anti-cancer Parasporin Toxins of New *Bacillus thuringiensis* Against Human Colon (HCT-116) and Blood (CCRF-CEM) Cancer Cell Lines. *Current Microbiology [Internet]*. 2018 [Cited 24 Aug 2021], Vol. 75, (8), págs. 1090–1098. Available in: https://ezproxy.unicolmayor.edu.co:2425/article/10.1007/s00284-018-1479-z?utm_source=getftr&utm_medium=getftr&utm_campaign=getftr_pilot.
51. **Harada K, Akiba T, Mizushiro H, Ichimatsu T, Katayama H, Akao T, et al.** Parasporin-1 Crystal Activated So as to Express Cancer Cell Recognition Destruction Activity, Method for Producing the Same, Three-Dimensional Structure of the Same, and Method of Using the Same. *Nat Inst of Adv Ind & Technol*. JP 2005263728 A 2004.

52. **Li P, Zheng A, Tang Y, Jun Z, Wang S, Deng Q, et al.** Bacillus thuringiensis ST7 and anticancer gene and application thereof. *Univ Sichuan Agricultural*. CN102517228A 2011.