ESTADO DEL ARTE DE LA ACTIVIDAD ANTICANCERíGENA DE PROTEíNAS PARASPORINAS DEL *Bacillus thuringiensis*

Roberto García Díaz
Código y cedula 1075209061

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE QUIMICA
Bogotá, Colombia
2017

ESTADO DEL ARTE DE LA ACTIVIDAD ANTICANCERíGENA DE PROTEíNAS PARASPORINAS DEL *Bacillus thuringiensis*

Roberto García Díaz

Trabajo de grado presentado para optar al título de:

Magister en Ciencias - Químicas

Director:

Jairo Alonso Cerón Salamanca Ph.D.

Instituto de biotecnología (IBUN)

Grupo de Investigación:

Biopesticidas

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE QUIMICA
Bogotá, Colombia
2017

“La ciencia es el alma de la prosperidad de las naciones y la fuente de vida de todo progreso”.

Louis Pasteur (27 de diciembre de 1822 – 28 de septiembre de 1895), Químico nacido en Francia

Agradecimientos

Quiero agradecer en primer lugar a la Universidad Nacional de Colombia y al departamento de Química por brindarme, con esta maestría, la posibilidad de crecer personal e académicamente, agradezco el compromiso demostrado para formar científicos con rigor analítico y crítico.

Agradezco de manera especial al Profesor Dr. Jairo Cerón Salamanca por aceptarme para realizar este trabajo de maestría bajo su dirección. Su apoyo y confianza en mi trabajo, sumado a su inmensa capacidad para guiarlo han sido muy importantes para le exitosa culminación de este. Destaco y agradezco su disponibilidad y compromiso, en el desarrollo de cada una de las actividades que realice bajo su orientación.

Por último, gracias Laura y Nico por ser el motor de mi vida.

Contenido

Pag.

Lista de figuras……V

Lista de tablas……..VI

Lista de símbolos y abreviaturas……VIII

Introducción……..10

1. **Capitulo 1: *Bacillus thuringiensis*…….....12**
2. **Capitulo 2: Mecanismo de acción de las proteínas Cry bioinsecticidas…….24**
3. **Capitulo 3: Parasporinas (PS) ……33**
4. **Capitulo 4: Espectro citotóxico de las PS y su mecanismo de acción……50**
5. **Analisis y conclusiones……60**
6. **Bibliografía……62**

Lista de figuras

Pág

Figura 1: Micrografía electrónica de la cepa 84-HS-1-11 de *Bt*.....**11**
Figura 2: Filograma de las proteínas Cry de *Bt*….……...**16**
Figura 3: Diagrama de Venn que muestra las relaciones de las toxinas…….**18**
Figura 4: Estructura de la toxina Cry1Aa……...**23**
Figura 5: Mecanismo de acción de las proteínas Cry del *Bt*…….…...**25**
Figura 6: Procesamiento y activación de la protoxina Cry1Ac……**27**
Figura 7: Estructura terciaria de la enzima tripsina……...**28**
Figura 8: Estructura terciaria de la quimotripsina……..**29**
Figura 9: Modelo de formación de poros……**32**
Figura 10: Dendrograma de las parasporinas……....**37**
Figura 11: Esquema del corte de la pro-parasporina -1……**40**
Figura 12: Estructura de la parasporina-2 activada……...**44**
Figura 13: Estructuras similares a la parasporina-2…….. **45**
Figura 14: Representación Parasporina -3……..**46**
Figura 15: Modelo del Mecanismo de acción de la parasporina- 1……..**55**
Figura 16: Modelo del Mecanismo de acción de la parasporina- 2……..**56**

Lista de tablas

Pág

Tabla 1: Clasificación de las toxinas del *Bt*…….. **19**

Tabla 2: Principales características de las parasporinas…… **38**

Tabla 3: Diversidad de las parasporinas……... **39**

Tabla 4: Espectro citotóxico de las principales parasporinas…… **52**

Lista de símbolos y abreviaturas

AC	Adenilato ciclasa
APN	Aminopeptidasa N
α	Alfa
ATP	Adenosín trifosfato
β-TPF	Beta toxinas formadoras de poro
δ	Delta
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ARN	Ácido Ribonucleico
Bt	*Bacillus thuringiensis*
B2M	Beta 2 microglobulina
BLAST	"Basic Local Alignment Search Tool"
Cry	Cristal
Cyt	Citolítica
CL_{50}	Concentración letal cincuenta
EC	Efecto citotóxico
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
kDa	Kilo Dalton
LDH	Lactato deshidrogenasa
ORP	Marco abierto de lectura
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PKA	Proteina quinasa A
PS	Parasporinas
SDS	Sodecilsulfato Sódico
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con Sodecilsulfato Sódico
TFP	Toxinas Formadoras de Poros
µg	Microgramos
µl	Micro litros
µm	Micrómetros
µM	Micro Molar
Vip	Proteína vegetativa insecticida.

MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
MOLT-4	Leucemia de células T humanas
A549	Celulas con càncer de pulmón
Hela	Celulas con càncer de cuello uterino
HL-60	Celulas con Leucemia meloide
MCF-7	Celulas con cáncer de seno
PC3	Celulas con cáncer de próstata
HepG2	Celulas con cáncer de hígado
CACO-2	Celulas con cáncer de colon
Sawaco	Celulas con cáncer endometrial
TCS	Celulas con cáncer cervical de utero
Jurkat	Celulas T con leucemia
MRC-5	Celulas normales de pulmón
UtSMC	Celulas normales de utero

Resumen

Este trabajo presenta un panorama general de los estudios realizados hasta el 2016 con las proteínas Cry producidas por el Bacillus thuringiensis que presentan actividad anticancerígena contra diferentes líneas celulares cancerígenas, conocidas como parasporinas. El material presentado sirve de base para futuros trabajos experimentales que permitan encontrar nuevos compuestos con potencial actividad anticancerígena.

Palabras clave*:* *Bacillus thuringiensis*, Proteínas Cry, Parasporinas, Anticancerígena, Citotóxico.

Abstract

This work presents an overview of the studies carried out until 2016 with the Cry proteins produced by Bacillus thuringiensis that present anticancer activity against different cancer cell lines, known as parasporins. The material presented serves as a basis for future experimental works to find new compounds with potential anti-cancer activity.

Keywords: *Bacillus thuringiensis*, proteins Cry, Parasporins, Anticancer, Cytotoxic.

Introduccion

El cáncer es una de las principales causas de muerte en el mundo, por lo que los principales retos en la actualidad son la búsqueda de nuevos y eficaces tratamientos para la solución de este problema. Se ha planteado que el tratamiento ideal para el cáncer, sería aquel capaz de erradicar las células tumorales selectivamente, con una toxicidad muy baja o nula hacia las células normales (1). Además de lo anterior, también es muy importante mencionar que actualmente muchos pacientes con ciertos tipos de cáncer o estados avanzados en la enfermedad han desarrollado resistencia a las terapias convencionales, lo que ha generado la búsqueda de nuevos y eficaces agentes anticancerígenos que permitan enfrentar estos desafíos, lo anterior, ha sido posible gracias al rápido desarrollo de la farmacología y medicina.La búsqueda de drogas modernas anticáncer se ha centrado en principios activos de origen natural (2).En este sentido por ejemplo se han propuesto compuestos con actividades anti-cancerígena producidos por microorganismos, como las bacterias, que presentan ventajas sobre otras fuentes naturales como son; altas tasas de crecimiento que favorece a una acelerada producción de compuestos, que sumada a su versatilidad para crecer en medios de cultivo preparados a partir de residuos agroindustriales se traduciría en altas cantidades de producción de fármacos y menores costos de los mismos, además de lo anterior, otro factor importante es su amplia biodiversidad, por lo que representa un mundo inagotable para la búsqueda de nuevas móleculas activas. Por otra parte las bacterias pueden manipularse fácilmente e incluso modificarse genéticamente, para muchas aplicaciones biotecnológicas (2).

Un microorganismo muy utilizado como recurso biotecnológico es el *Bacillus thuringiensis* un bacilo gram positivo, de flagelación perítrica, que mide de 3 a 5 µm de largo por 1 a 1,2 µm de ancho, su característica principal es que durante el proceso de esporulación produce una inclusión parasporal formada por uno o mas cuerpos cristalinos de naturaleza proteica constituidos principalmente por delta-endotoxinas que son tòxicas para distintos invertebrados (figura 1), especialmente larvas de insectos (3). Este es un microorganismo anaerobio facultativo, quimioorganótrofo y con actividad de catalasa (3). Los distintos aislamientos de *B. thuringiensis* presentan en general

características bioquímicas comunes. Poseen la capacidad de fermentar glucosa, fructosa, trehalosa, maltosa y ribosa, y de hidrolizar gelatina, almidón, glucógeno, esculina y N-acetil-glucosamina (3). Dentro de los factores de virulencia producidos por el *Bacillus thuringiensis* sobresalen las delta-endotoxinas que se dividen en dos grandes grupos las proteínas Cyt que presentan actividad hemolítica, y las proteínas Cry que han sido muy estudiadas por su actividad bioinsecticida hacia diferentes insectos plagas. Recientemente han sido de especial interés las proteínas Cry conocidas como parasporinas (PS) que no presentan actividad bioinsecticida pero si actividad anticancerígena. Estas parasporinas surgen como una potencial alternativa para el tratamiento del cáncer debido a que presentan alta citotoxicidad hacia diferentes líneas celulares cancerígenas, y baja o nula citotoxicidad hacia células normales (4).

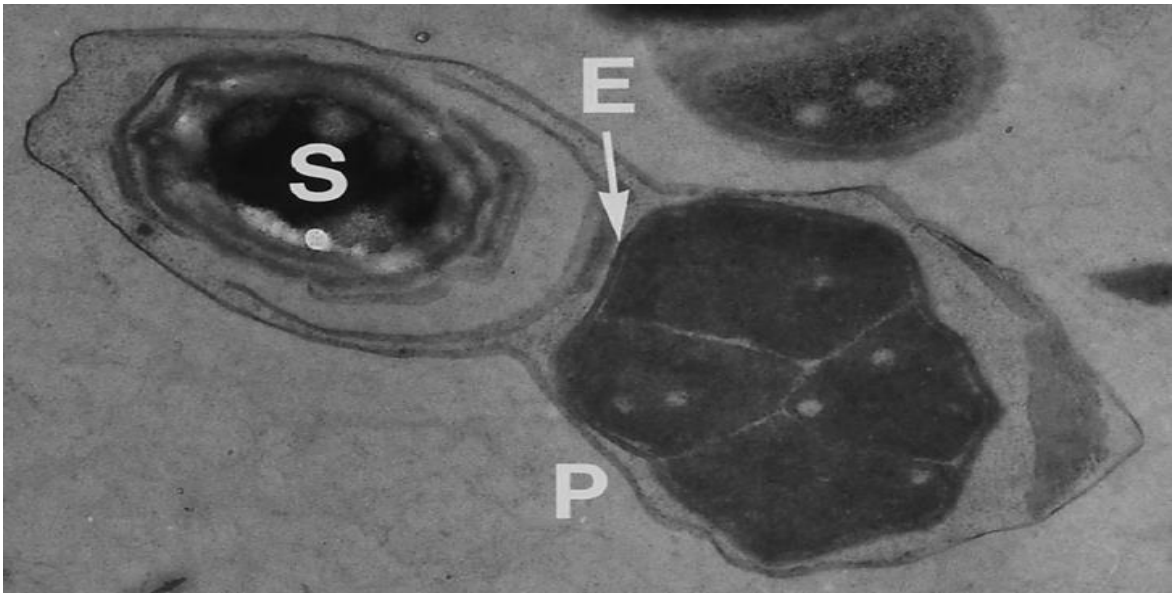

Figura 1. Micrografia electrónica de transmisión de la cepa 84-HS-1-11 de *Bacillus thuringiensis,* donde se muestra el esporangio conteniendo una espora madura (S) y una inclusión parasporal (P). Mizuki et al. (4).

1. Capitulo 1: *Bacillus thuringiensis*

1.1 Clasificación taxonómica

El *B. thuringiensis* pertenece a la familia Bacillaceae y se ubica dentro del grupo 1 del género Bacillus; forma parte del grupo *de Bacillus cereus* (5), el que incluye a *B. anthracis, B. cereus, B. mycoides, B. pseudomycoides y B. weihenstephanensis* (6). Se encuentra estrechamente relacionado con los dos primeros, de los que no logran distinguirse por completo debido a que no existen suficientes diferencias en sus características morfológicas y bioquímicas, la individualidad de la especie *Bacillus thuringiensis* se basa sobre todo en dos características diferenciales: la presencia de la inclusión o cristal parasporal y sus propiedades insecticidas (7) .

1.2 Cristales paraesporales

El *B. thuringiensis* durante su ciclo de vida presenta dos fases diferenciadas, la fase de crecimiento vegetativo donde las bacterias se duplican mediante bipartición cada 30-90 min dependiendo del medio de cultivo y la fase de esporulación, la cual es un proceso de diferenciación de bacteria a espora y consta de siete estadios, que se desencadena cuando la bacteria se encuentra en un medio con limitación de nutrientes. La espora es una forma de vida latente que puede permanecer en el ambiente por periodos de tiempo muy largos (años) en ausencia de humedad y nutrientes. Cuando la espora se encuentra de nuevo en un medio rico que contenga los nutrientes necesarios, puede germinar para comenzar de nuevo el crecimiento vegetativo (8).

En el proceso de esporulación desde el instante en el que ocurre el englobamiento de la pre-espora hasta su maduración, en simultaneidad con la formación de la espora, tiene lugar en *B. thuringiensis* la síntesis de uno o varios cristales parasporales, que pueden representar hasta un 30% del peso seco del esporangio. Estos cristales pueden presentar distintas morfologías y pueden clasificarse en bipiramidales, cúbicos, cuadrados aplanados, esféricos y otras formas atípicas menos frecuentes (7).

Los cristales de *B. thuringiensis* pueden ser degradados por la acción de los microorganismos del suelo y, al igual que sus esporas, también pueden ser inactivados por la acción de la luz ultravioleta (9). El cristal parasporal se ubica en el interior del esporangio y, por lo general, fuera del exosporio de la espora, y ambos son finalmente liberados tras la lisis celular. Se han observado casos donde se describieron cristales dentro del exosporio, por lo que estos continúan junto a las esporas tras la lisis. En otro caso muy atípico, se pudo observar que los cristales se forman fuera del exosporio, pero ambos permanecen indefinidamente dentro de un esporangio que no se lisa, preservándolos de una rápida degradación (10). Cada cuerpo de inclusión cristalino puede estar constituido por proteínas Cry de una o varias clases que se agrupan entre sí mediante puentes disulfuro. La estabilidad de estas uniones condiciona el pH de solubilización del cristal. Particularmente en el caso de los cristales bipiramidales, cuando estos puentes están distorsionados, estos cristales son solubles a pH mayor de 9,5; mientras que si permanecen en su estado más estable necesitan un pH superior a 12 para lograrlo (11).

1.3 Actividad citòxida del Bacillus thuringiensis

El *Bacillus thuringiensis* es una bacteria capaz de sintetizar una gran cantidad y variedad de agentes con actividad citotóxica hacia una amplia gama de organismos, tanto procariotas como eucariotas. Entre los compuestos antimicrobianos que produce se encuentran: 1) antibióticos como la zwitermicina A (12) y 2) bacteriocinas (13). Entre los principales factores de virulencia contra eucariotas, se distinguen tres grupos de proteínas sintetizadas por *B. thuringiensis*: 1) las proteínas VIP, que son producidas y excretadas al medio durante la fase vegetativa (14) ; 2) exotoxinas, una serie de toxinas termolábiles o solubles que presentan actividad enzimática inespecífica (15) y 3) δ-endotoxinas, que son sintetizadas como inclusiones durante la fase de esporulación, y al término de esta, son liberadas como cristales de diferentes formas geométricas; estas δ-endotoxinas han sido muy investigadas debido a su gran espectro bioinsecticida, aunque recientemente se ha reportado que algunas bacterias de *Bacillus thuringiensis* sintetizan

estas toxinas con actividad anticancerígena *in vitro* hacia diferentes lineas celulares de cáncer, las cuales han sido llamadas y clasificadas como parasporinas (PS) (16).

1.4 δ-Endotoxinas

La célula esporoangial de *B. thuringiensis* produce uno o más cuerpos parasporales o cristales proteínicos que contienen las δ-endotoxinas. Cuando Heirnpel (1967) designo el cuerpo parasporal como la δ-endotoxinas no se sabía aún, que la proteína del cuerpo parasporal era una pro-toxina y que algunas cepas producían este cuerpo sin actividad biológica conocida; a pesar de ello, el término δ-endotoxinas es ampliamente usado en la literatura para definir el cristal, lo cual es etimológicamente incorrecto. Por lo tanto es necesario definir la δ-endotoxina como una clase de proteína tóxica proveniente de una pro-toxina (proteína del cristal), la cual es llevada a toxinas más pequeñas, endotoxinas, por enzimas proteolíticas del intestino medio del insecto. *In vivo,* las endotoxinas solo tienen actividad en el intestino medio de las larvas susceptibles (17).

Las δ-endotoxinas comprenden a las proteínas Cyt, que son hemolíticas e inespecíficas, y a las proteínas Cry, que son altamente específicas y de una gran variabilidad entre las diferentes cepas de *B. thuringiensis*, así como un enorme espectro de organismos blanco.

A la fecha se han clonado y secuenciado 166 diferentes genes Cry y 16 Cyt .La primera clasificación se basó en la especificidad de la actividad insecticida y fue propuesta por hofte y whiteley en 1989 .En esta clasificación las toxinas Cry I eran todas aquellas de peso molecular aproximado a 130 kDa, que presentaban actividad contra insectos lepidópteros ,las toxinas Cry ll eran proteínas más pequeñas de 70 kDa, que presentaban actividad contra lepidópteros y dípteros ,las proteínas Cry III eran proteínas de 70 o 130 kDa activas contra insectos coleópteros y finalmente las toxinas Cry IV con pesos moleculares de 70 y 130 kDa eran activas contra insectos dípteros. Todas las δ-endotoxinas Cyt mostraban actividad citolitica frente a una variedad de células de invertebrados y vertebrados, incluidos eritrocitos de mamíferos (7).

Sin embargo muy rápidamente se dieron cuenta que esta clasificación no era adecuada ya que empezaron a encontrar proteínas Cry que eran muy semejantes a alguna otra descrita pero con especificidad diferente o por ejemplo se reportaron toxinas Cry con actividad dual hacia lepidópteros y coleópteros, las cuales fueron llamadas Cry V creando una gran confusión. Por esto fue necesario que se creara una nueva nomenclatura de las δ-endotoxinas basadas exclusivamente en la identidad de la secuencia primaria. En esta nueva nomenclatura los números romanos se cambiaron por números arábicos y una combinación de letras mayúsculas y minúsculas, Ampliando la definición de las proteínas Cry como cualquier proteína paraesporal de *B. thuringiensis* que muestre un efecto tóxico hacia algún organismo diana y que se pueda verificar experimentalmente, o que muestre similitud de secuencia con las proteínas Cry ya conocidas. Del mismo modo, las proteínas Cyt se definieron como las proteínas parasporales de *B. thuringiensis* que presentan actividad hemolítica o que muestren similitud con la secuencia de proteínas Cyt conocidas (18). Por esta nueva clasificación basada en la identidad de la secuencia de aminoacidos, las proteínas Cry no son exclusivas de *B. thuringiensis* y se encuentran también en otras especies de *Bacillus* o en otras bacterias como *Clostridium bifermentans*. En la figura 2, se muestran los principales criterios de clasificación basados en la identidad de la secuencia de aminoácidos de las proteínas Cyt y Cry del *Bt*.

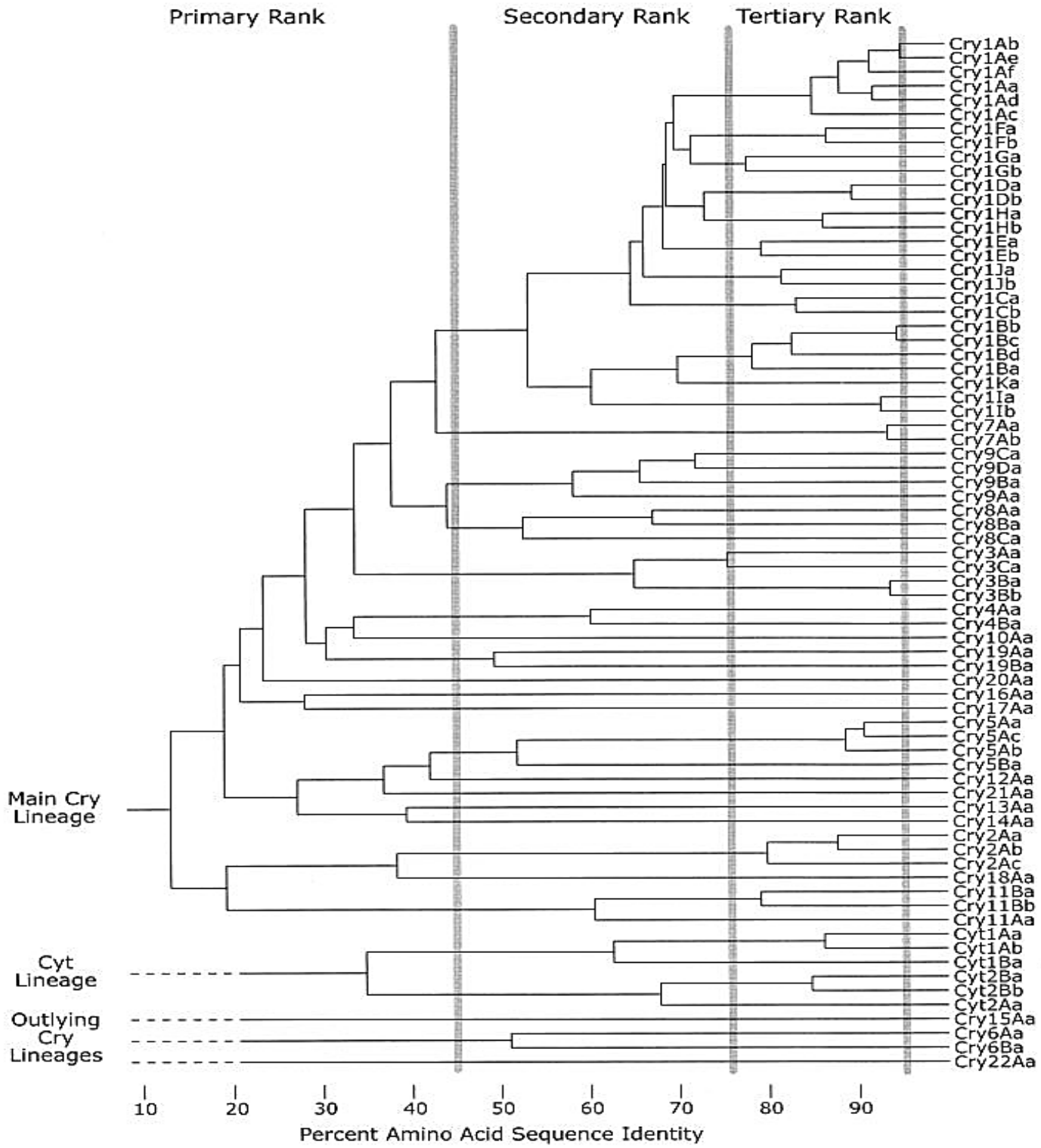

Figura 2. Filograma donde se muestra el porcentaje de identidad en la secuencia de aminoácidos de las proteínas Cry y Cyt. Crickmore et al. (18).

Las proteínas Cry son las más utilizadas en todo el mundo, constituyendo un conjunto de proteínas adecuadas para ser usadas como insecticidas biológicos o para su expresión en plantas transgénicas, ya que se considera uno de los insecticidas más inofensivos para humanos, vertebrados, insectos no diana y plantas, además de ser completamente biodegradable (19).

1.5 Proteinas Cry

Actualmente, en base al porcentaje de identidad en la secuencia de aminoácidos de las proteínas Cry se reconocen más de 40 subgrupos (primera jerarquía numérica, aprox. <48% identidad) que comprenden más de 150 holotipos (tercera jerarquía) y más de 300 secuencias (cuarta jerarquía) (20). Aunque el sistema de nomenclatura actual, no tenga en cuenta la especificidad de las toxinas Cry, algunos subgrupos muestran cierta especificidad hacia algunos órdenes de insectos. Así, las toxinas del subgrupo Cry1 son activas mayoritariamente contra lepidópteros y las del subgrupo Cry3 afectan mayoritariamente a coleópteros. Sin embargo, las toxinas Cry1C, Cry2Aa, Cry4 o Cry11, entre otras, son activas contra dípteros. Debido a la gran diversidad de las 279 toxinas producidas por el Bacillus *thuringiensis* estas han sido organizadas en grupos que presentan diferentes homologías con familias de proteínas o dominios encontrados en diversos grupos de organismos (tabla 1 y figura 3) (21).

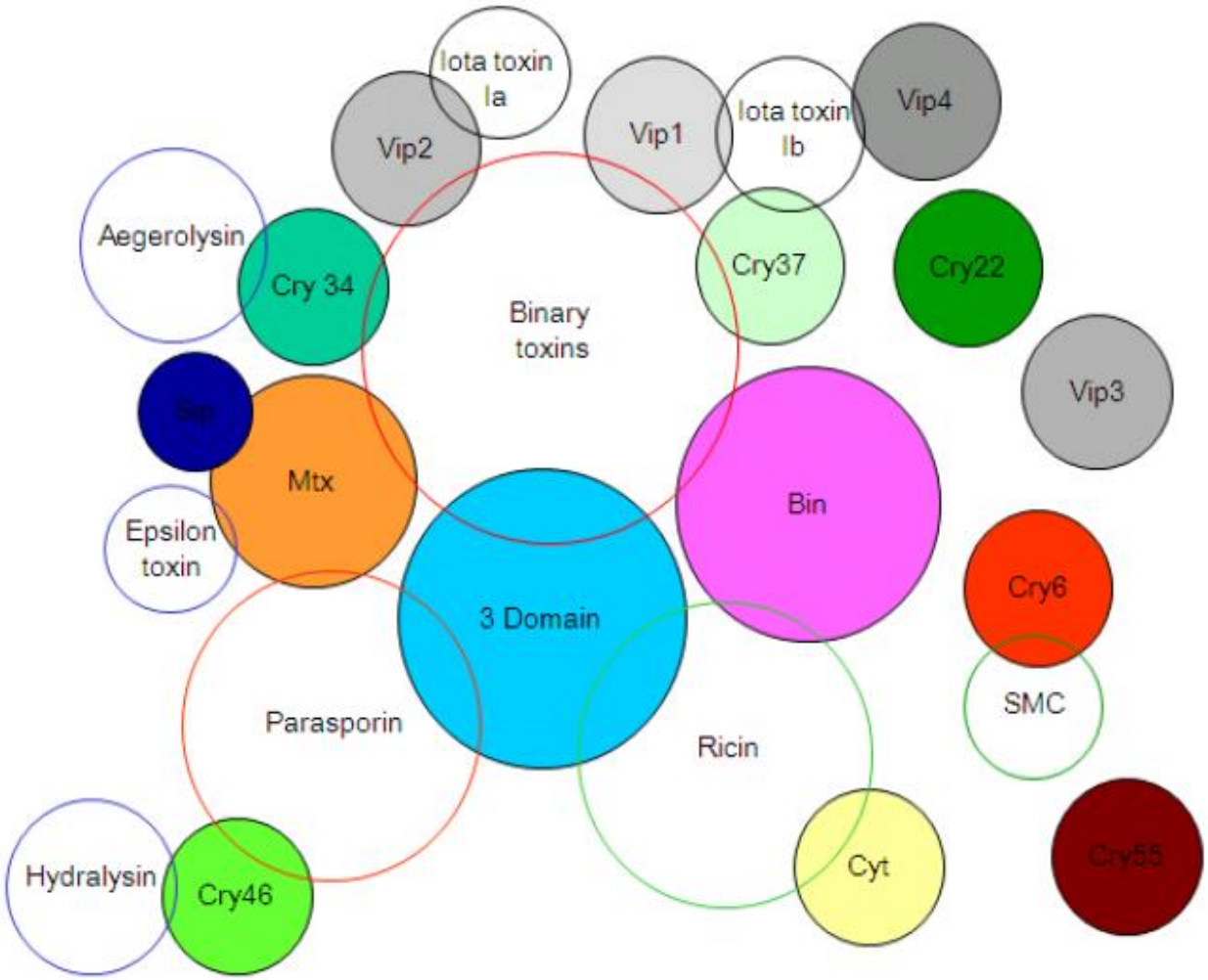

Figura 3. Diagrama de Venn que muestra las relaciones estructurales o funcionales entre toxinas. Los círculos coloreados representan los diferentes grupos estructurales identificados en la tabla 1. Los círculos azules superpuestos indican similitud de secuencias con las toxinas o proteínas que no son del *Bt*. Los círculos rojos abiertos indican cuál de los grupos estructurales contienen miembros que comparten esas características particulares de toxina binaria, parasporina o dominio ricina. Adang et al. (26).

Toxinas de los tres dominios

Grupo de toxinas Bin

Grupo de toxinas Mtx-Etx

Parasporinas

Cry1Aa	Cry1Ab	Cry1Ac	Cry1Ad	Cry1Ae	Cry1Af	Cry1Ag	Cry1Ah	Cry1Ai	Cry1Ba	Cry1Bb				
Cry1Bc	Cry1Bd	Cry1Be	Cry1Bf	Cry1Bg	Cry1Bh	Cry1Bi	Cry1Ca	Cry1Cb	Cry1Da	Cry1Db	Cry1Dc	Cry1Ea		
Cry1Eb	Cry1Fa	Cry1Fb	Cry1Ga	Cry1Gb	Cry1Gc	Cry1Ha	Cry1Hb	Cry1Ia	Cry1Ib	Cry1Ic				
Cry1Id	Cry1Ie	Cry1If	Cry1Ig	Cry1Ja	Cry1Jb	Cry1Jc	Cry1Jd	Cry1Ka	Cry1La	Cry1Ma	Cry1Na	Cry1Nb		
Cry2Aa	Cry2Ab	Cry2Ac	Cry2Ad	Cry2Ae	Cry2Af	Cry2Ag	Cry2Ah	Cry2Ai	Cry2Aj	Cry2Ak	Cry2Ba			
Cry3Aa	Cry3Ba	Cry3Bb	Cry3Ca	Cry4Aa	Cry4Ba	Cry4Ca	Cry4Cb	Cry4Cc						
Cry5Aa	Cry5Ab	Cry5Ac	Cry5Ad	Cry5Ba	Cry5Ca	Cry5Da	Cry5Ea	Cry6Aa	Cry6Ba	Cry7Aa	Cry7Ab	Cry7Ba	Cry7Bb	
Cry7Bb	Cry7Ca	Cry7Cb	Cry7Da	Cry7Ea	Cry7Fa	Cry7Fb	Cry7Ga	Cry7Gb	Cry7Gc	Cry7Gd	Cry7Ha	Cry7Ia	Cry7Ja	Cry7Ka
Cry8Aa	Cry8Ab	Cry8Ac	Cry8Ad	Cry8Ba	Cry8Bb	Cry8Bc	Cry8Ca	Cry8Da	Cry8Db	Cry8Ea	Cry8Fa	Cry8Ga		
Cry8Ha	Cry8Ia	Cry8Ib	Cry8Ja	Cry8Ka	Cry8Kb	Cry8La	Cry8Ma	Cry8Na	Cry8Pa	Cry8Qa	Cry8Ra	Cry8Sa	Cry8Ta	
Cry9Aa	Cry9Ba	Cry9Bb	Cry9Ca	Cry9Da	Cry9Db	Cry9Dc	Cry9Ea	Cry9Eb	Cry9Ec	Cry9Ed	Cry9Ee	Cry9Fa	Cry9Ga	
Cry10Aa	Cry11Aa	Cry11Ba	Cry11Bb	Cry12Aa	Cry13Aa	Cry14Aa	Cry14Ab	Cry15Aa	Cry16Aa	Cry17Aa	Cry18Aa	Cry18Ba	Cry18Ca	
Cry19Aa	Cry19Ba	Cry20Aa	Cry20Ba	Cry21Aa	Cry21Ba	Cry21Ca	Cry21Da	Cry22Aa	Cry22Ab	Cry22Ba	Cry22Bb	Cry23Aa	Cry24Aa	
Cry24Ba	Cry24Ca	Cry25Aa	Cry26Aa	Cry27Aa	Cry28Aa	Cry29Aa	Cry30Aa	Cry30Ba	Cry30Ca	Cry30Da	Cry30Db	Cry30Ea	Cry30Fa	Cry30Ga
Cry31Aa	Cry31Ab	Cry31Ac	Cry31Ad	Cry32Aa	Cry32Ab	Cry32Ba	Cry32Ca	Cry32Cb	Cry32Da	Cry32Ea	Cry32Eb	Cry32Fa	Cry32Ga	
Cry32Ha	Cry32Hb	Cry32Ia	Cry32Ja	Cry32Ka	Cry32La	Cry32Ma	Cry32Mb	Cry32Na	Cry32Oa	Cry32Pa	Cry32Qa	Cry32Ra	Cry32Sa	Cry32Ta
Cry32Ua	Cry33Aa	Cry34Aa	Cry34Ab	Cry34Ac	Cry34Ba	Cry35Aa	Cry35Ab	Cry35Ac	Cry35Ba	Cry36Aa	Cry37Aa	Cry38Aa	Cry39Aa	Cry40Aa
Cry40Ba	Cry40Ca	Cry40Da	Cry41Aa	Cry41Ab	Cry41Ba	Cry42Aa	Cry43Aa	Cry43Ba	Cry43Ca	Cry43Cb	Cry43Cc	Cry44Aa	Cry45Aa	
Cry46Aa	Cry46Ab	Cry47Aa	Cry48Aa	Cry48Ab	Cry49Aa	Cry49Ab	Cry50Aa	Cry50Ba	Cry51Aa	Cry52Aa				
Cry53Aa	Cry53Ab	Cry54Aa	Cry54Ab	Cry54Ba	Cry55Aa	Cry56Aa	Cry57Aa	Cry58Aa	Cry59Aa	Cry59Ba				
Cry60Aa	Cry60Ba	Cry61Aa	Cry62Aa	Cry63Aa	Cry64Aa	Cry65Aa	Cry66Aa	Cry67Aa	Cry68Aa	Cry69Aa	Cry69Ab			
Cry70Aa	Cry70Ba	Cry70Bb	Cry71Aa	Cry72Aa										
Cyt1Ab	Cyt1Aa	Cyt1Ba	Cyt1Ca	Cyt1Da	Cyt2Aa	Cyt2Ba	Cyt2Bb	Cyt2Bc	Cyt2Ca	Cyt3Aa				
Vip1Ab	Vip1Aa	Vip1Ac	Vip1Ba	Vip1Bb	Vip1Ca	Vip1Da			Sip1					
Vip2Ab	Vip2Aa	Vip2Ac	Vip2Ad	Vip2Ae	Vip2Af	Vip2Ba	Vip2Bb							
Vip3Ab	Vip3Aa	Vip3Ac	Vip3Ad	Vip3Ae	Vip3Af	Vip3Ag	Vip3Ah	Vip3Ba	Vip3Bb	Vip3Ca	Vip4Aa			

Tabla 1.Lista de toxinas del *B. thruringiensis* y su clasificación basada en la homología que estas presentan con otros grupos de toxinas encontrados en diversos grupos de organismos. La lista de las toxinas del Bt se tomó de la base de datos de nomenclatura *Bt* (http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/).Las Parasporinas, un subgrupo de las toxinas del Bt, se tomó de la nomenclatura de las parasporinas (http://parasporin.fitc.pref.fukuoka.jp/list.html). La clasificación de homológica de grupos se tomó del articulo (de Maagd et al., 2003).Y finalmente las proteínas Cry filogenéticamente no relacionadas son subrayadas con diferentes colores. Adang et al. (26).

Las proteínas Cry de los tres dominios constituyen el grupo más grande de toxinas Cry con 249.Curiosamente, miembros de proteínas Cry de los tres dominios también están presente en otras bacterias como por ejemplo *Penibacillus popilliae,* un agente causante de la enfermedad lechosa que se presenta en larvas de escarabeidos una de las grandes familias de coleòpteros, la proteína del cristal parasporal que contiene el *Penibacillus popilliae* es la CryBP1 (Cry18Aa1) que muestra 40% de identidad en la secuencia de aminoácidos con respecto a la proteína Cry2 del *B. thuringiensis* (22).Y por último las proteínas de los tres dominios Cry16 y Cry17 que son encontrados en el *Clostridium bifermentans* (23). El grupo de toxinas Mtx contituye la segunda clase de toxinas Cry más grande compuesta por 9 miembros. Los miembros del grupo Mtx presentan dominios conservados a la toxina *Epsilon* de *Clostridium* (ETX) y toxinas mosquitocidales de la superfamilia MTX2 del *Bacillus* (ETX/MTX2).Las toxinas Bin constituyen el tercer gran grupo con tres miembros diferentes (primer rango) y siete subtipos. Adicionalmente, las otras toxinas Cry filogenéticamente sin relación a las anteriormente incluidas son Cry6, Cry22, Cry37, Cry55 and Cry46) (24). Los miembros de la toxina Cry34 no están relacionados con las otras proteínas Cry del *Bt*; sin embargo, ellas presentan homologia a las toxinas binarias del *B. sphaericus* con un porcentaje de identidad en la secuencia de aminoácidos de 26-29%.La Cry46, es una toxina que presenta actividad citotóxica contra células de mamíferos, esta toxina es una β-formadora de poros como la hydralysina (25). No todas las proteínas Cry aisladas hasta ahora son insecticidas, recientemente se han aislado unas proteínas Cry que no presentan actividad insecticida conocida, pero si poseen actividad contra líneas celulares de càncer. Estas toxinas Cry con actividad anticancerígena se clasificaron en un nuevo grupo conocido como parasporinas (PS) (4). Hasta la fecha se conocen seis grupos de parasporinas: la parasporina -1 (Cry 31), parasporina -3 (Cry 41) y parasporina -6 (Cry 63), que son toxinas que presentan los tres dominio en su estructura citotóxica.La parasporina -2 (Cry 46) es semejante a la toxina hydralisina, y finalmente la parasporina -4 (Cry 45) y parasporina - 5 (Cry 64) que son semejantes a las toxinas Mtx.De todas estas parasporinas se hablarà más adelante ya que son la parte central de esta monografía.

1.5.1 Grupo Mtx

Las toxinas Mtx2 and Mtx3 están altamente distribuidas entre cepas mosquiticidas de *Lysinibacillus sphaericus.* Estas a la vez se relacionan con las toxinas de otras bacterias como las citotoxinas de *Pseudomonas aeruginosa*, la toxina epsilon de *Clostridium perfringens*, la alfa toxina de *Clostridium septicum* y la aerolisina de *Aeromonas hydrophila*. Las toxinas del *B. thuringiensis* que están clasificadas en este grupo son la Cry15Aa, Cry23Aa, Cry33Aa, Cry38Aa, Cry45Aa, Cry51Aa, Cry60Aa, Cry60Ba and Cry64Aa. La mayoría de las toxinas del *Bt* pertenecientes a este subgrupo necesitan caracterizaciones adicionales ya que no todos los fragmentos que ayudan toxicidad se han caracterizado completamente (27). La Cry45 es una toxina de *Bacillus thuringiensis* conocida como parasporina -4 y presenta actividad citotóxica hacia lineas células cancerígenas de mamíferos, y no se le ha encontrado actividad insecticida conocida (27). La Cry64 es conocida como parasporina-5 y tampoco tiene actividad insecticida conocida. Aunque estas proteínas presentan baja similitud en sus secuencias de aminoacidos, todas comparten un motivo conservado que comprende de una región loop anfipatica rodeada por dos regiones ricas en Serina (Ser) / Treonina (Thr) (28).

1.5.2 Grupo Bin

Las toxinas Bin constituyen el tercer gran grupo de las toxinas del *Bt* con tres miembros diferentes (primer rango), lo anterior basado en la homología de grupos. Dado que estas secuencias de las toxinas Cry comparten componentes similares a las toxinas binarias mosquitocidales del *L. sphaericus,* y son ellas mismas en su mayoría parte de una toxina binaria, han sido clasificadas dentro de este grupo de toxinas Bin. La actividad mosquitocida de L. *sphaericus* es debida a la presencia de la toxina 'Bin' (binario) producida durante la esporulación. La proteína Bin mosquitocida consta de dos proteínas, la tóxico Bin A de 42 kDa y Bin B de 52 kDa (29). Los dos componentes son necesarios para producir la actividad tóxica de la toxina, implicando así un modo de acción binario. Los miembros del grupo de Bin son Cry35, Cry36 y Cry49.Las tres toxinas Cry35A tienen un dominio Ricina tipo β-trébol de unión a carbohidratos en el N terminal. La Cry49Aa es una toxina binaria y parece depender de la presencia de una segunda proteína, la Cry48Aa que posee los tres dominios. Y finalmente la Cry36 que posee tóxicidad por sí misma (30).

1.5.2.1 Toxinas binarias

Son proteínas Cry que muestran toxicidad cuando están acompañadas de otras toxinas Cry, pero cuando están solas no lo son, todas estas toxinas son conocidas como toxinas binarias. La toxicidad parece basarse en la presencia de la segunda proteína Cry. Por ejemplo se observa dicha asociación entre la proteína de los tres dominios Cry48Aa del *Bt*, y la proteína Bin Cry49Aa derivada del *L. sphaericus*. Estos dos componentes son los que producen la toxicidad sobre los insectos y solo se consigue si está presente la segunda proteína accesoria. Otros ejemplos de complejos de toxinas binarias son Cry34 / Cry35; Cry23 / Cry37 y VIP1 / Vip2 (24).

1.5.3 Proteinas Cry de los tres dominios

Una de las proteínas Cry que más se conoce es la Cry1, esta forma parte de la familia de los tres dominios que representan el 90% de las proteínas Cry que produce el *Bt* y por lo tanto son las que más se han estudiado, en general las proteínas Cry de esta familia son sintetizadas en forma de pro-toxinas, y deben ser procesadas por proteasas para dar lugar a la toxina activa. De esta manera, se incluyen en esta familia pro-toxinas de dos rangos de tamaño diferentes, unas de aprox. 70 KDa y otras de 130 KDa alargadas en su C-terminal (27). La extensión del C-terminal de las proteínas de mayor peso molecular está probablemente implicada en la formación del cristal y no está involucrada en la toxicidad. Se conocen las estructuras tridimensionales de tres toxinas activadas por la tripsina, la Cry1Aa es una de ellas, su estructura se muestra a continuación (figura 4).

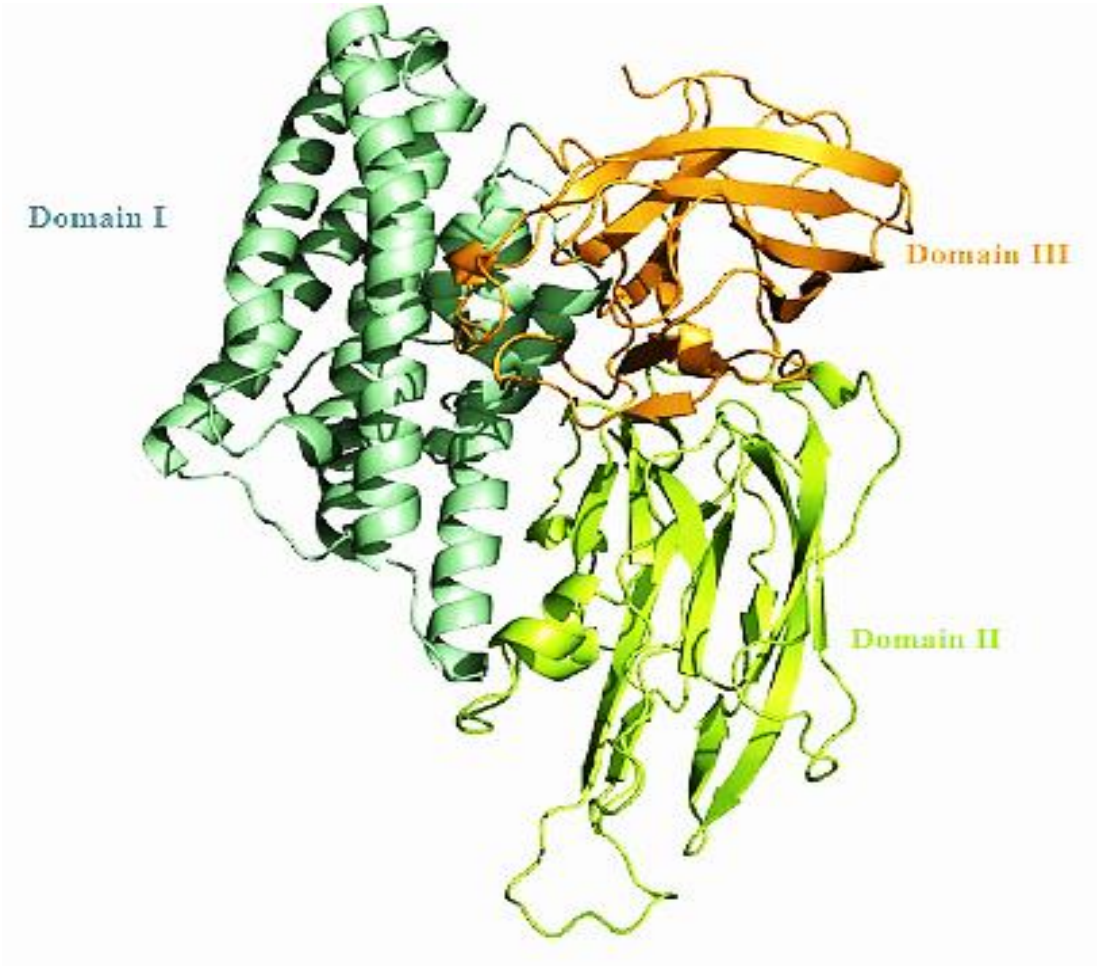

Figura 4. Diagrama de cintas de la estructura tridimensional de la toxina Cry1Aa.Chengchen et al. (27).

El dominio I se encuentra en el extremo N-terminal y està conformado por siete α-helices, este juega un rol importante en la formación del poro en la membrana de las células del tubo digestivo del insecto. El dominio II y III se componen en su mayoría por hojas β, el primero es el más variable, y está implicado en la interacción con el receptor de membrana y probablemente es determinante en la especificidad, mientras que el segundo se cree que también está relacionado con la unión al receptor y la especificidad, y probablemente con la formación del poro (27).

2. Capitulo 2: Mecanismo de acción de las proteínas Cry bioinsecticidas.

En este capitulo se describirà los diferentes mecanismos de acción que se han propuesto para las proteínas cry de los tres dominios, las cuales son las toxinas mas distribuidas en cepas de Bacillus thuringiensis y por lo tanto, las que mas se han estudiado y utilizado en plantas trangenicas y formulaciones industriales de biopesticidas.

2.1 Modo de acción de las proteinas Cry de los tres dominios.

El mecanismo de acción reportado para las proteínas Cry de los tres dominios ha sido descrito en varias etapas, los modelos de formación de poros (MFP) (31) y transducciòn de señales (MTS) (32), son las dos hipótesis que han sido presentadas y desarroladas por algunos investigadores. El modelo de formación de poros es el más aceptado, ya que ha sido compatible con diversos estudios. Los pasos preliminares como la solubilizacion del cristal en el intestino medio del insecto, la activación por proteasas digestivas y la unión a un primer receptor llamado cadherina son compartidos por los dos modelos. El modelo de formación de poros sugiere además que la unión al primer receptor generalmente cadherina en la microvellosidades de las células del intestino medio produce un cambio de conformación de la proteína, que induce la escisión proteolítica de la hélice α1en el dominio I, facilitando de esta manera la oligomerización y la formación de un pre-poro. Una vez formado el oligòmero, este se une a receptores segundarios como aminopeptidasa N (APN) o fosfatasa alcalina (ALP).Esto ocurre porque el oligòmero tiene alta afinidad hacia estos, permitiendo así la inserción de este en la membrana celular y la posterior formación del poro. Recientemente, sea planteado la posibilidad de un mecanismo "ping-pong" para la unión de los receptores aminopeptidasa N y cadherina, lo cual permitiría la acción de la toxina. Pacheco et al. (33), sugiere que la toxina Cry se une primero a la abundante pero de baja afinidad APN facilitando la concentración de esta en la membrana del borde de cepillo del intestino medio.Esto mejora la unión de la toxina con la cadherina dando como resultado la oligomerización de esta.Finalmente el oligòmero formado en el paso anterior se une con mayor afinidad a la APN, producìendose la inserción del oligómero en la membrana

celular de insecto blanco y la formación del poro (33).El modelo de transducción de señales fue producto de estudios realizados en líneas celulares de insectos, este propone que la interacción de la toxina Cry con el receptor primario cadherina desencadena una vía de cascada que activa la proteína G dependiente de Mg^{+2}, produciendo así una cascada de señalizacion. La activación de la proteína G, conlleva a la síntesis de adenilato ciclasa que promueve la producción intracelular de adenosin monofosfato cíclico (cAMP). Las altas concentraciones de este mensajero activan la proteína quinasa A (PKA) que desencadena la muerte celular (34). Este modelo en ningún momento considera la interacción con receptores segundarios ni la formación de oligòmeros o poros en la membrana plasmática. Las dos teorías son esquematizadas en la figura 5.

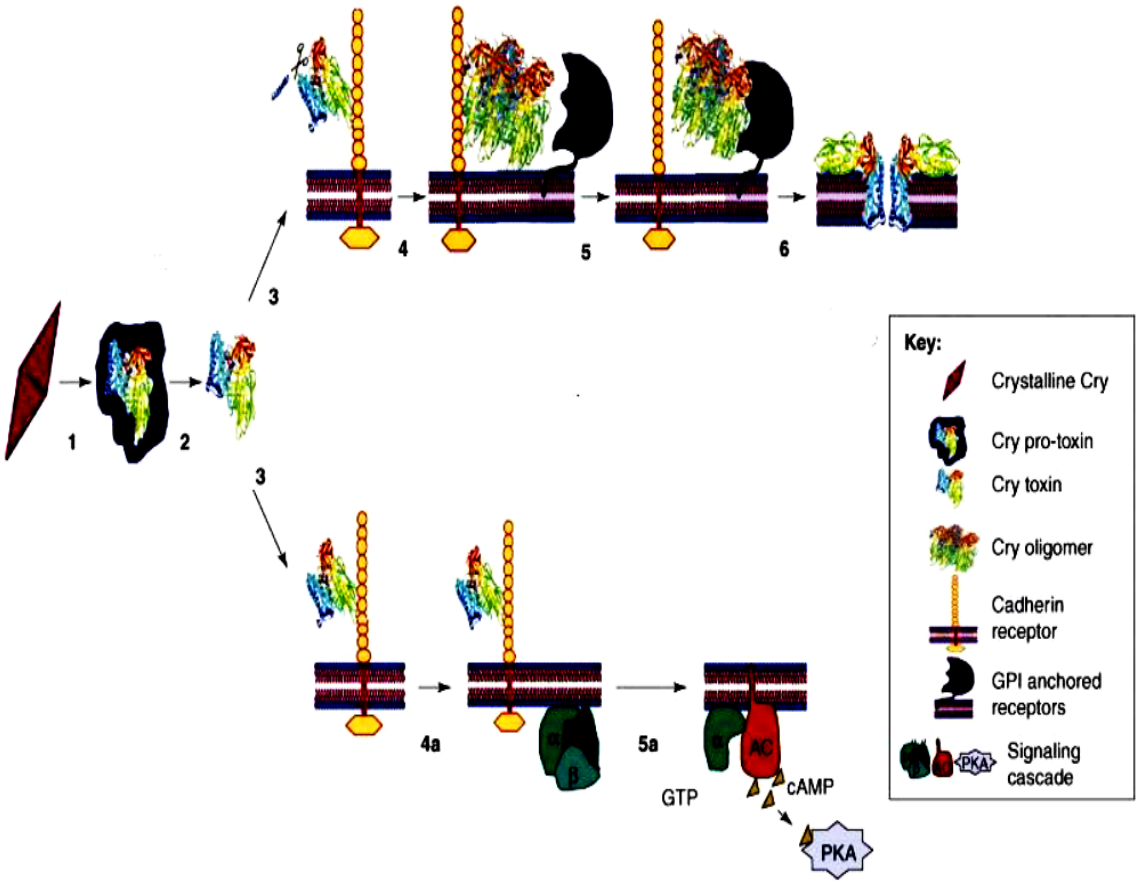

Figura 5.Los dos modelos planteados para explicar el mecanismo de acción de las proteinas Cry del Bt. La solubilización de la pro-toxina en el lumen del intestino medio (1),

la activación por proteasas del intestino (2) y la unión al receptor primario cadherina (3) son pasos compartidos por los dos modelos. El modelo de formación de poros sugiere además que la unión al receptor primario en la microvellosidades de las células del intestino medio induce la escisión proteolítica de la hélice α1 (3) que conlleva a la oligomerización de la toxina (4),facilitando de esta manera la unión a un receptor secundario (5). Finalmente el oligomero se inserta en la membrana, formando el poro (6). El modelo de traducción de señales propone que la interacción de la toxina Cry con el receptor primario cadherina desencadena una cascada de señalizacion que media en la actividad de la proteína G (4a) que a su vez activa la adenilato ciclasa (5a) que incrementa la produccion de adenosin monofosfato ciclico el cual tiene un efecto en la actividad de la proteína quinasa A, lo que conduce a la muerte celular. (Tomado de Bravo y Soberón) (35).

2.1.1 solubilizacion de las proteínas Cry

Una vez ingeridas por un insecto susceptible las protoxinas Cry son solubilizadas debido a las condiciones reductoras y el pH particular del tubo digestivo, produciéndose el rompimiento de la estructura de los cristales y la estructura tridimensional de las proteínas Cry, haciéndolas accesibles a la acción de las proteasas digestivas responsables de su activación. No obstante, en pocos casos se ha podido demostrar que la solubilidad sea determinante de la especificidad (36).

2.1.2 Procesamiento de las protoxinas Cry

Las protoxinas solubilizadas son procesadas por proteasas digestivas del insecto, dando lugar a una toxina en cierta medida resistente a la acción de las proteasas, que tiene un peso molecular aproximado de 60-70 KDa (31). El procesamiento de las pro-toxinas a toxinas viene determinado por un corte en el N-terminal y, generalmente, por otro en el C-terminal. En la figura 6 se muestra el procesamiento de la proteína Cry1Ac que tiene los tres dominios y los 8 bloques conservados típicos de las proteínas Cry insecticidas.

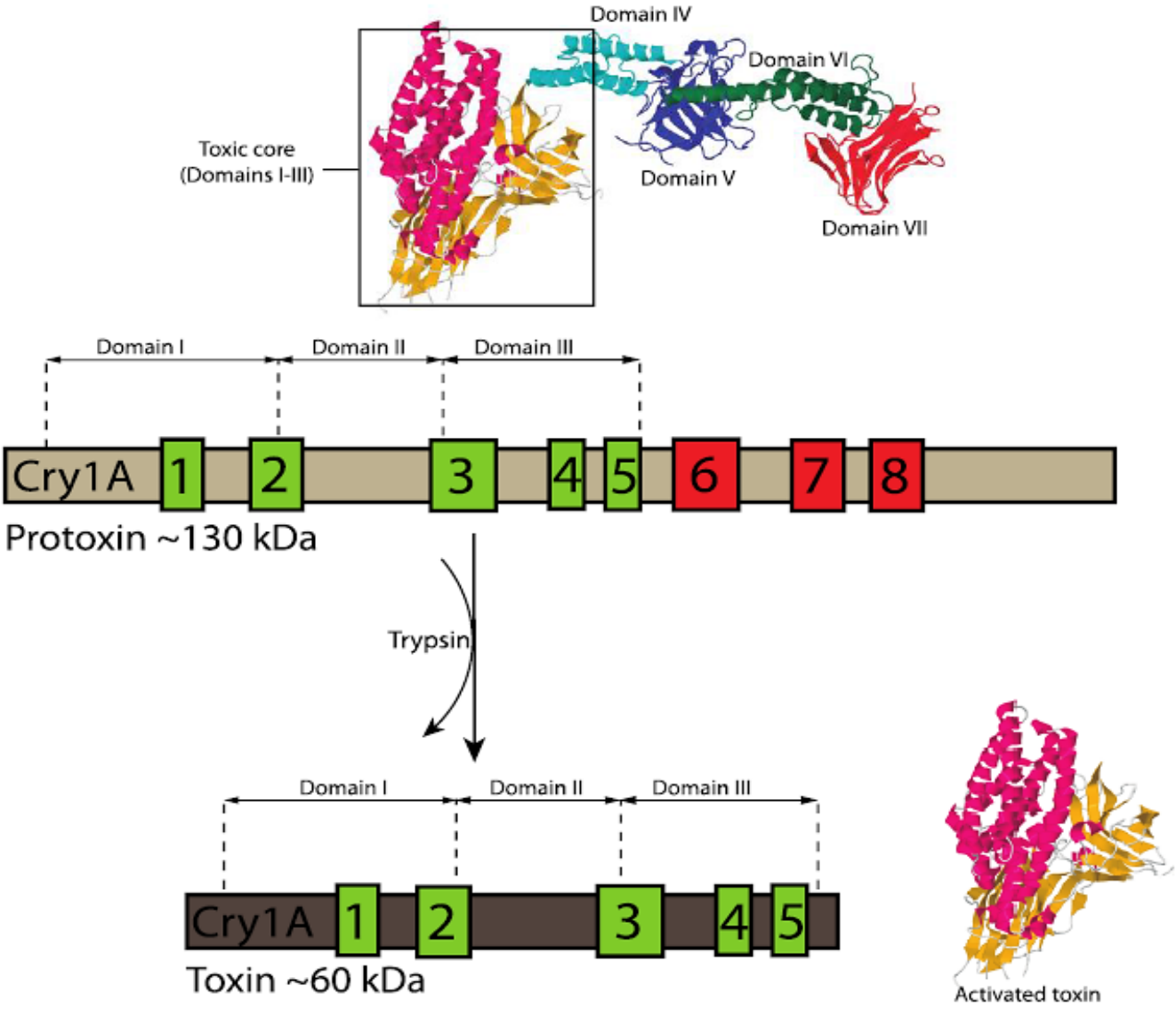

Figura 6. Esquema del procesamiento y activación de la protoxina Cry1Ac. Protoxina (130 kDa) y toxina activa (60 kDa).Palma et al. (24).

El procesamiento de las protoxinas Cry a toxinas mediado por la acción de las proteasas digestivas es un paso crítico no sólo para la activación de la toxina, si no también para su especificidad. Se debe considerar, que distintos órdenes de insectos, o distintas especies dentro de algunos órdenes difieren en el pH de su tubo digestivo y en la familia de proteasas mayoritaria en su digestión proteolítica (37).Aunque se conoce muy poco sobre

las enzimas implicadas en el procesamiento de las protoxinas, muchos autores sugieren que las principales responsables son tripsinas y quimotripsinas. Es importante mencionar que las enzimas proteasas son polímeros de aminoácidos que dirigen la actividad catalítica en distintos sistemas biológicos, gracias a su capacidad de acelerar reacciones químicas, las más conocidas para activar δ-endotoxinas Cry son las serin-proteasas entre ellas se destacan la tripsina y quimotripsina cuyas estructuras tridimensionales se muestran a continuación en la figura 7 y 8 respectivamente.

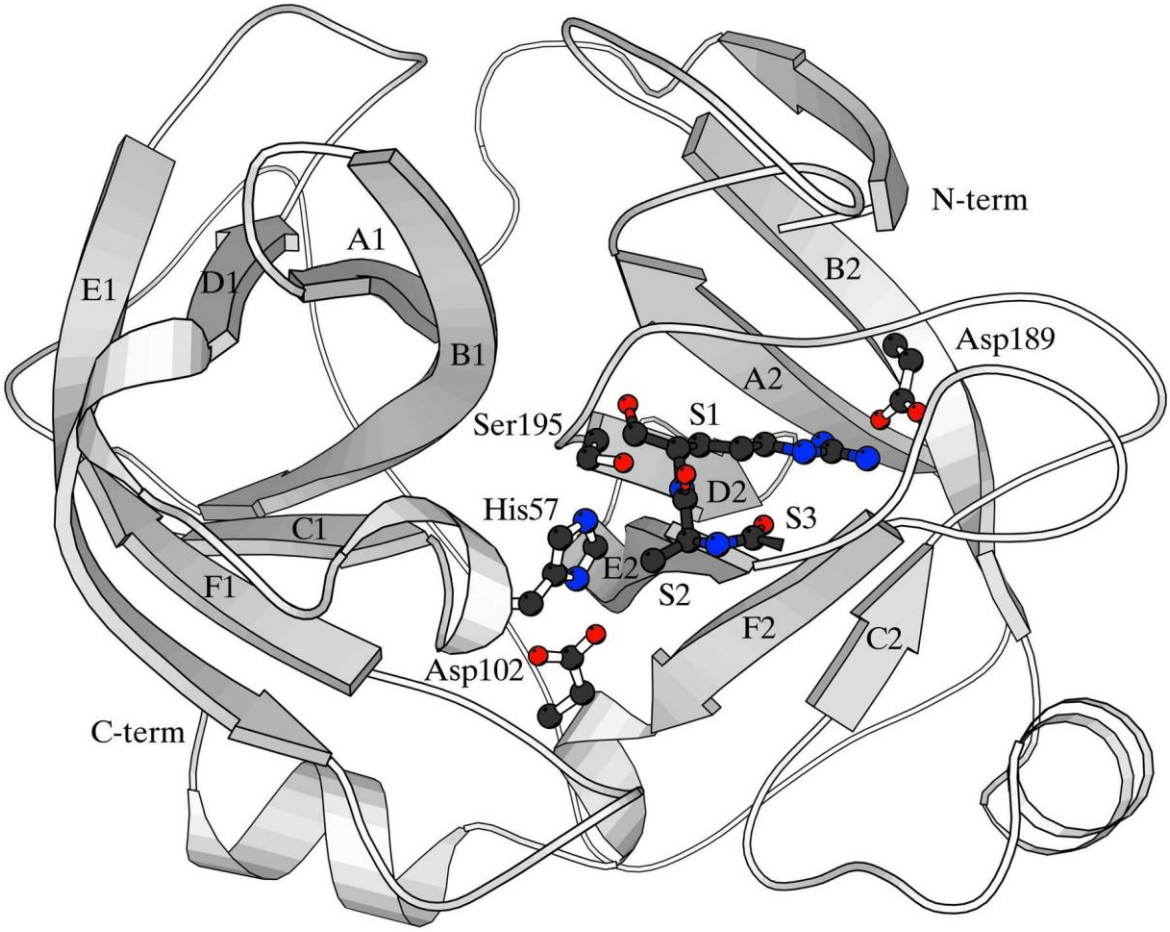

Figura 7. Representación de la estructura terciaria y la triada catalítica de la enzima tripsina (http://journals.iucr.org/). La triada catalítica esta conformada por los residuos histidina 57 (His57), serina 195 (Ser195) y aspártico 102 (Asp102).El Asp189 juega un papel importante en la especificidad de la tripsina, ya que este permite el acoplamiento de aminoácidos con carga positiva con cadenas laterales grandes como lisina y arginina.

Figura 8. Estructura terciaria de la quimotripsina. Se puede observar el predominio de conformación β respecto a la hélice α (PDB: 1YPH).

La mayoría de estos experimentos de interacción de proteasas digestivas con proteínas Cry, se han llevado a cabo utilizando tripsinas comerciales de vertebrados o extractos digestivos de insectos (7).

2.1.3 Union al receptor

La toxina activa se une a receptores específicos de proteínas, ubicados en la membrana del epitelio intestinal de los insectos susceptibles. El proceso de unión ocurre en dos etapas que implican pasos reversibles e irreversibles. La unión reversible implica una interacción de baja afinidad entre la toxina y el receptor de membrana, mientras que la unión irreversible incluye una unión fuerte entre el receptor y la toxina, que conlleva a la inserción del oligòmero en la membrana celular (38). Los mejores receptores de

proteínas identificados y caracterizados hasta ahora son: aminopeptidasa N (APN) anclada a glicosilfosfatidil-inositol (GPI) (39), la cadherina como receptor en lepidopteros (CADR) (40), los glicolípidos una clase importante de receptores de toxinas Cry en los nemàtodos (41), fosfatasa alcalina anclada a GPI (ALP) (42), un glicoconjugado 270-kDa y una proteína de 252-kDa (43).

La presencia o ausencia de receptores específicos para una determinada toxina en una especie, en muchos casos es determinante para su toxicidad. Algunos autores afirman que los dominios II y III de la toxina Cry1Ab participan en la interacción con el receptor. Experimentos de mutagénesis realizados al dominio II de la toxina Cry1Ab, sustituyendo el residuo asparagina 372 por un aminoácido como alanina o glicina, hace que la toxina mutante presente mayor afinidad por los receptores de membrana de algunos insectos (27) .

La teoría más aceptada es que la toxina activa se inserta en la membrana del insecto y forma poros después de la interacción con receptor. Según lo propuesto por Knowles y Ellar (1987), el poro produce la muerte de los insectos. Bravo et al. Desarrollaron aún más este modelo de formación de poros, sugiriendo que la oligomerizacion de una toxina precede a la formación de poros tóxicos (44).

2.1.4 Insercion en la membrana, formación de poro y lisis celular.

El modelo de formación de poros de las toxinas Cry de los tres dominios fue basado principalmente en la interacción de la toxina Cry1Ab y las vesículas de membrana de borde de cepillo (BBMV) del gusano del tabaco, *Manduca sexta* (44). Este modelo consta de varios pasos secuenciales. En el primer paso las inclusiones cristalinas son digeridas por las larvas susceptibles en el ambiente alcalino del intestino, donde las proteínas solubilizadas e inactivas son clivadas por las proteasas del intestino medio en el N o C terminal produciendo un monómero de tres dominios resistente a la proteasa activa. Antes de la inserción en la membrana, la toxina activa se une a múltiples receptores específicos localizados en la superficie de la membrana del intestino. En las especies de lepidópteros como por ejemplo *M. sexta*, al menos dos tipos de receptores específicos

están involucrados en esta unión.La Aminopeptidasa (APN) y fosfatasa alcalina (ALP), han sido propuestos como receptores primarios, ya que la toxina activa Cry1Ab primero se une con baja afinidad a estas, para promover la localización y la concentración de la toxina en la membrana del intestino medio, lo anterior se realiza antes de interacciòn con el segundo receptor cadherina (45). La interacción de la toxina con cadherina, facilita el clivaje proteolítico de la hélice α1 en el N terminal, que induce la formación de un oligòmero conocido como pre-poro (45) .Este clivaje proteolítico aumenta la afinidad de unión entre oligómeros y APN o ALP, conduciendo a la inserción del oligómero en la membrana, y por ende la formación de poros y lisis celular (46) (figura 9).

En el modelo de formación de poros, monómeros se oligomerizan por la unión secuencial a los receptores específicos antes de penetrar la membrana. Polémicas evidencias han propuesto que las toxinas Cry se insertan en la membrana celular de las células blanco como monómeros, y luego se agregan y reúnen formando oligómeros dentro de èsta. Como se describió anteriormente, el dominio I de las toxinas Cry de los tres dominios se cree que es necesario para la oligomerización y el proceso de formación de poros. El modelo del paraguas propuesto para explicar cómo funciona el dominio I, presenta gran similitud con el modelo propuesto para explicar el modo de acción de la colicina A (47).

Recientemente, se ha encontrada que la toxina colicina ɪa contiene un dominio de formación de poros similar a colicina A. Estudios realizados para determinar el mecanismo de acción de esta, han arrojado evidencias claras de que existe un estado multimérico (6-8 monómeros) en la bicapa lipídica. Asimismo, los resultados electrofisiológicos han indicado la coexistencia de monómeros, dímeros, trímeros, e incluso hexámeros, apoyando la hipótesis de que colicina ɪa se puede insertar en la bicapa lipídica como monómero (48). También se han obtenido resultados similares con Cry1Aa, donde se ha observado coexistencia de monómeros, dímeros, trímeros y tetrámeros, durante el proceso de oligomerización de Cry1Aa, proporcionando así una evidencia clara de que el monómero Cry1Aa se inserta en la bicapa lipídica antes de la oligomerización (49).

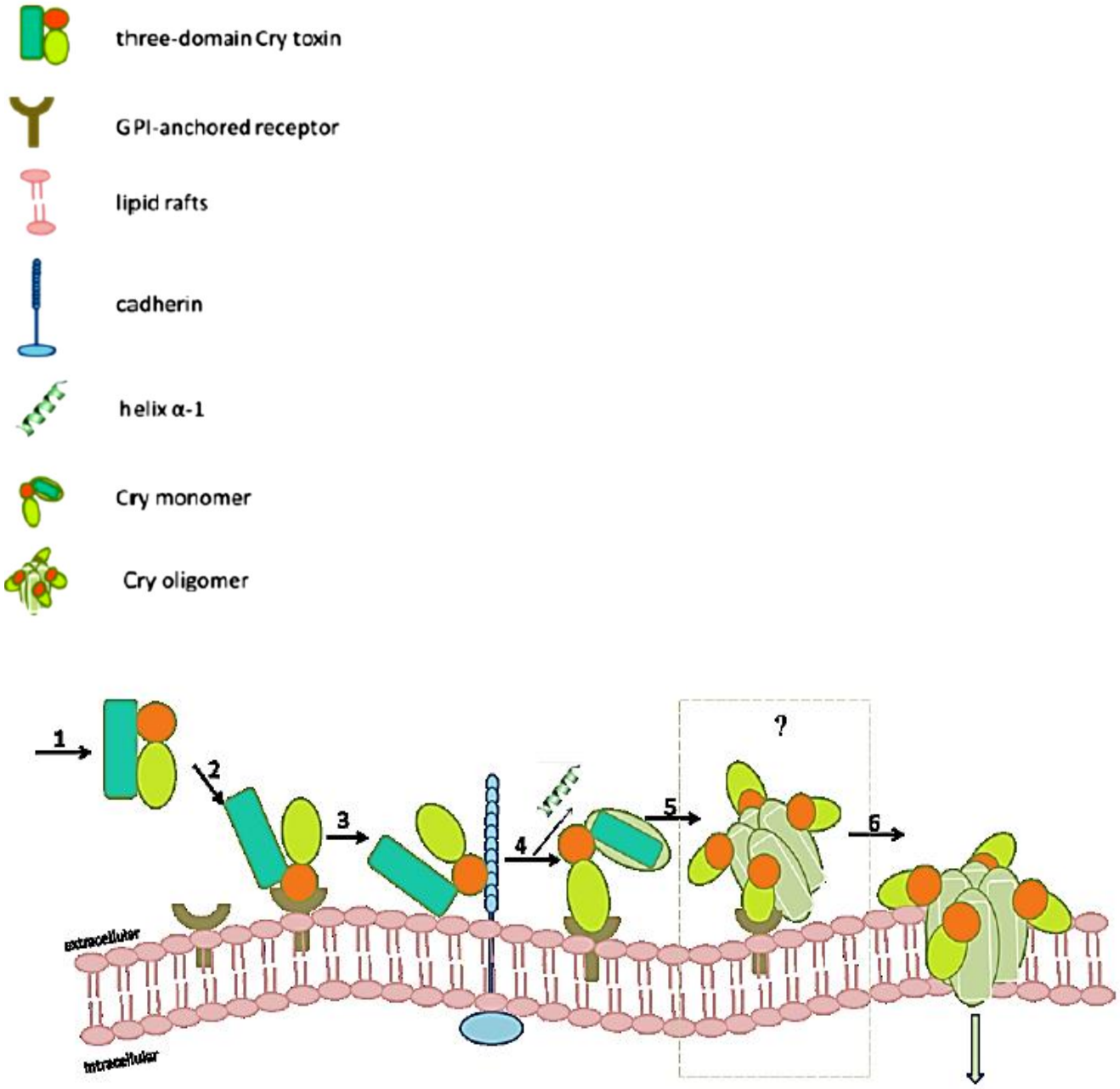

Figura 9. Pasos secuenciales del modelo de formación de poros. Chengchen et al. (27).

3. Capitulo 3: Parasporinas (PS)

Actualmente los productos hechos a base de estas proteínas Cry bioinsecticidas integran la mayor parte de sustancias empleadas para el control biológico de plagas. No obstante, en años más recientes se han encontrado proteínas Cry con propiedades igualmente interesantes y con un enorme potencial para otras áreas económicas (62). Entre ellas, se encuentran la actividad hacia hongos, nemàtodos, protozoarios y células cancerígenas de diferentes orígenes (55).

En este capitulo se hablarà de un grupo de proteínas Cry conocidas como parasporinas (PS), que representan una nueva clase de proteínas de los cristales de *Bacillus thuringiensis* con actividad biológica hacia lineas celulares de diferentes tipos de cáncer, y se caracterizan por presentar baja o nula citotoxicidad hacia células normales (52).

3.1 Generalidades del càncer

El cáncer se ha definido como un amplio grupo de enfermedades que pueden afectar cualquier parte del organismo y presentan diferentes etiologías, pronósticos y tratamientos. Se caracterizan por el excesivo y descontrolado crecimiento celular, que invade y daña tejidos, provocando la muerte de los organismos. La falta de control en la proliferación celular es el resultado de múltiples alteraciones en el ADN (Ácido Desoxirribonucleico) de las células, las cuales resultan en mutaciones de los genes que codifican para proteínas reguladoras de apoptosis y reconocimiento del sistema inmune, disminuyenyo de esta manera su expresión, dando como resultado una no activación de la muerte celular programada o la disminución en el reconocimiento por parte del sistema inmune de aquellas células con mutaciones o problemas en su material genético (54).

Debido a que los tumores están constituidos por células que alteran su división, porque tienen descontrolado el ciclo celular o presentan resistencia a los estímulos fisiológicos que inducen la muerte, se han impulsado nuevas e innumerables investigaciones que

conduzcan al desarrollo de tratamientos específicos contra las células tumorales, y no presenten los efectos colaterales de la quimioterapia y radioterapia (55) (56)(57).

Los resultados de estas investigaciones han arrojado nuevos métodos de detección, diagnóstico y tratamiento del cáncer. Entre los más importantes se encuentran: 1) la inmunoterapia, que utiliza moléculas que estimulan el sistema inmune para la destrucción de ciertos tipos de tumores (58).

2) La terapia genética, que se basa en la introducción de genes funcionales en células somáticas para corregir defectos genéticos o ejercer un efecto terapéutico (1).

3) El desarrollo de nuevos fármacos (59).

Dentro de la investigación de nuevos fármacos, existe una rama dedicada al descubrimiento e implementación de compuestos de origen natural para combatir células cancerosas (60,61). Específicamente, toxinas bacterianas con actividad citotóxica hacia células cancerígenas, y con baja o nula actividad hacia células normales como las proteínas parasporinas, de las que se hablaràn a continuaciòn.

3.2 Descubrimiento de las parasporinas (PS)

En 1999, Mizuki et al. (16).Fueron los primeros en estudiar las inclusiones parasporales proteínicas de un total de 1744 cepas (1700 cepas japonesas de la colección de la universidad de Kyushu y 44 cepas tipo referencia del instituto Pasteur) de *Bacillus thuringiensis* con actividad anticancerìgena.Lo primero que estos investigadores hicieron fue purificar, solubilizar y activar con proteinasa K todas y cada una de las 1744 inclusiones parasporales. Luego de que estas inclusiones parasporales estuvieron activas, se ensayaron contra erictrocitos de oveja para determinar su actividad hemolítica, encontradose que, las proteínas parasporales de 60 cepas indujeron alta hemòlisis. En este momento fue claro que esta hemòlisis fue causada por el gran espectro de acción de las citolisinas (proteínas Cyt) activas en un gran rango de células de invertebrados y vertebrados (27). A las 1684 cepas de *Bacillus thuringiensis* que no poseían proteínas parasporales hemolíticas,se les ensayò su actividad citotòxica *in vitro* contra Celulas T humanas con leucemia (MOLT-4).La citotoxicidad fue medida en términos de viabilidad celular y efecto citopàtico, mediante la prueba MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol) y observación bajo microscopia de contraste de fases, respectivamente. El ensayo de citotoxicidad arrojò que las proteínas

parasporales de 42 cepas no hemolìticas eran tòxicas contra MOLT-4. Interesantemente, estas 42 cepas tòxicas contra células T humanas con leucemia no mostraron significativa actividad insecticida contra 11 especies de insectos en las cuales fueron ensayadas, lo que llevò a los investigadores a realizar ensayos de SDS-PAGE e immunonoblot, a cepas insecticidas tipo referencia para demostrar de alguna manera que las proteínas de las cepas anticancerígenas y insecticidas, posiblemente no estaban relacionadas. Finalmente tres cepas fueron escogidas por una caracterización adicional de actividad anticancerígena asociada con estas proteínas parasporales, luego de ser ensayadas en lineas celulares cancerígenas de MOLT-4, A549 (Càncer de pulmón humano) y Hela (cáncer de cuello uterino humano). Las proteínas parasporales de las tres cepas exhibieron alta actividad citòtoxica con diferentes espectros de toxicidad y variedad en el nivel de actividad. Siendo de especial interés dos cepas la 84-HS-1-11(más tarde designada A1190) y 89-T-26-17 (A1462) que fueron capaces de discriminar entre las células T sanas y las que contenían leucemia, matando solo a estas últimas.

En el 2000, Mizuki et al. (4).Clonaron y secuenciaron el gen *cry31Aa1* de la cepa 84-HS-1-11 (llamada en este estudio A1190),dando como resultado una proteína Cry con actividad anticancerígena de masa molecular 81 kDa y una baja identidad en la secuencia de aminoácidos de (< 25 %) con respecto a las proteínas Cry y Cyt insecticidas del *Bacillus thuringiensis*.Ademas de lo ya mencionado, estos investigadores también demostraron que al tratar esta proteína de 81 kDa con las proteasas tripsina y proteinasa K, esta se degrada en 4 proteinas con masas moleculares de 66, 58,56 y 44 kDa, que son las responsables de la actividad citotóxica preferencial contra células T con leucemia.Lo anterior, hizo que se creara una nueva categoría de proteínas Cry, las parasporinas (PS), las cuales fueron definidas como un nuevo grupo de proteínas Cry sintetizadas por *B. thuringiensis* o bacterias relacionadas,que no presentan actividad hemolitica, pero presentan actividad biológica específica contra células de cáncer y tienen baja o nula actividad hacia células normales (4). Las PS son clasificadas y nombradas por el “Comité para la Clasificación y Nomenclatura de Parasporinas” (http://parasporin.fitc.pref.fukuoka.jp), en base al mismo principio de clasificación de proteínas Cry, fundamentado en el grado de identidad de sus secuencias de aminoácidos (64). Por lo tanto, estas proteínas poseen dos claves, PS y Cry.

Las principales características de las PS son: 1) no presentan actividad insecticida conocida contra especies de insectos ensayadas hasta ahora (65); 2) son sintetizadas como protoxinas, es decir, necesitan ser hidrolizadas por proteasas en puntos específicos para su activación (27); 3) presentan alta citoxicidad hacia células humanas con cáncer, pero baja o nula hacia células sanas (52) y 4) poseen bajos porcentajes de identidad con proteínas Cry insecticidas (63).

La proteína de 81kDa constituye la familia de la parasporina - 1Aa (PS1Aa), esta es un polipéptido de 723 residuos de aminoácidos codificada por un gen de 2,169 bp, la secuencia de aminoácidos de la parasporina contiene los 5 bloques conservados comúnmente observado en las proteínas Cry insecticidas del *Bacillus thuringiensis;* pero con una muy baja identidad (<25%) entre las dos. De acuerdo al comité de clasificación y nomenclatura en parasporinas (http://parasporin.fitc.pref.fukuoka.jp) (66), existen actualmente, seis grupos o familias de parasporinas (PS1-PS6). Estas fueron identificadas y purificadas de distintas cepas de *Bacillus thuringiensis*, y presentan entre ellas diferencias en los pesos moleculares, estructuras, especificidad celular y rango citotóxico (52).

3.3 Tipos de parasporinas (PS)

Como ya se mencionó anteriormente existen en la actualidad seis grupos o familias de parasporinas (PS1-PS6), y aunque hay 29 secuencias parciales o completas de PS reportadas en el Gen Bank, solo 19 cuentan con nomenclatura oficial (66), estas se pueden observar en la figura 10.

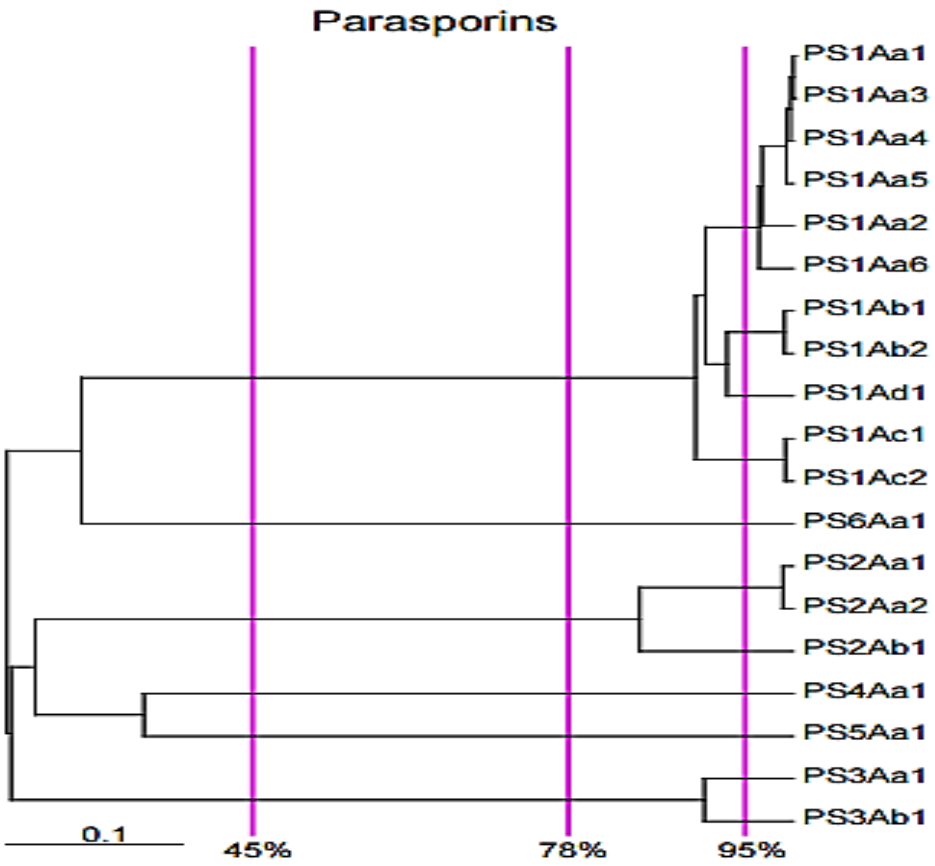

Figura 10. Dendrograma que ilustra la relación entre las parasporinas pertenecientes a las seis familias, PS1, PS2, PS3, PS4, PS5 Y PS6. Tomado del comité de clasificación y nomenclatura de parasporinas (http://parasporin.fitc.pref.fukuoka.jp) (66) revisado el 20 de septiembre del 2016.

Las diferentes parasporinas fueron aisladas principalmente de Japón (67), Vietnam (68) y Canadá (69). Pero también se ha reportado el hallazgo de parasporinas en Malasia (70) e India (71); y recientemente se han encontrado cepas productoras de parasporinas en el continente americano, específicamente en islas del Caribe (72), y México (73).

Las PS son sintetizadas como protoxinas y para adquirir su conformación tóxica, primero necesitan ser solubilizadas a pH alcalino (4) o ácido (74) y posteriormente ser digeridas por serín proteasas, como la proteinasa K (52). En la tabla 2 se muestran los fragmentos tóxicos de algunas PS que han sido determinados experimentalmente mediante digestión con proteasas especificas, ensayos *in vitro* y secuenciación aminoacídica.

Parasporina	Nº. Cry	Cepa	Gen (pb)	Pro-toxina (kDa)	Punto isoeléctrico	Toxina (kDa)	País	Referencia
PS1Aa1	Cry31Aa1	A1190	2,169	81	5,95	15 y 56	Japón, Estados únicos.	(Mizuki et al. 2000)
PS1Aa2	Cry31Aa2	M15	2,226	83	5,93		Canadá	(Jung et al.2008)
PS1Aa3	Cry31Aa3	B195	2,169	81	5,95		Japón	(Uemori et al.2008)
PS1Aa4	Cry31Aa4	Bt79-25	2,169	81	5,95		Vietnam	(Yasutake et al.2008)
PS1Aa5	Cry31Aa5	Bt92-10	2,169	81	5,95		Vietnam	(Yasutake et al.2008)
PS1Aa6	Cry31Aa6	64-1-94,M15,M019	2,262	84	5,97	15 y 55	Japón, Caribe, Canadá.	(Nagamatsu et al.2010)
PS1Ab1	Cry31Ab1	B195	2,178	82	5,97		Japón	(Uemori et al.2008)
PS1Ab2	Cry31Ab2	Bt-31-5	2,178	82	5,97			(Yasutake et al.2008)
PS1Ac1	Cry31Ac1	Bt-87-29	2,331	87	5,92		Vietnam	(Yasutake et al.2008)
PS1Ac2	Cry31Ac2	B0462	2,331	87	5,96	15 y 60	Japón	(Kuroda et al.2013)
PS1Ad1	Cry31Ad1	64-1-94,M15,M019	2,262	84	5,92	15 y 55	Japón, Caribe, Canadá.	(Nagamatsu et al.2010)
PS1Ad2	Cry31Ad2	64-1-94^{+}	2,277	85	5,92		Caribe	(GenBank AGO577671)
PS2Aa1	Cry46Aa1	A1547, 4R2	1,014	37	5,91	28	Japón, Estados únicos.	(Ito et al.2004) (Brasseur et al.2015)
PS2Aa2	Cry31Aa2	A1470	1,011	37	5,90	30	Japón	(Okomura et al.2013)
PS2Ab1	Cry31Ab1	TK-E6	912	33	5,91		Japón	(Hayakawa et al.2007)
PS3Aa1	Cry41Aa1	A1462	2,475	94	6,00	64	Japón	(Yamashita et al.2005)
PS3Ab1	Cry41Ab1	A1462	2,487	94	6,00		Japón	(Nagamatsu et al.2010)
PS4Aa1	Cry45Aa1	A1470,T98^{+}	2,487	30	5,99	26.8	Japón	(Okomura et al.2004)
PS5Aa1	Cry64Aa1	A1100	918	34	5,79		Japón	(Ekino et al. 2014)
PS6Aa1	Cry63Aa1	64-1-94,M15,M019	2,259	85	5,98	14 y 59	Japón, Caribe, Canadá.	(Nagamatsu et al.2010)

*no ha sido publicado.

Tabla 2.Principales características de las parasporinas reportadas. (http://parasporin.fitc.pref.fukuoka.jp./list.html) (66).

A manera de resumen tenemos que las PS-1 (Cry31), PS-3 (Cry41) and PS-6 (Cry63) son toxinas de los tres dominios como la mayoría de las proteínas Cry insecticidas, pero PS-3 tiene una fracción adicional conformada por un dominio similar al que posee la fitotoxina ricina .La PS-2 (Cry46) tiene similitud con la toxina aerolisina, mientras la PS-4 (Cry 45) y PS- 5 (Cry64) son toxinas Mtx similares a la toxina épsilon producida por *Clostridium perfringens* cuyo mecanismo de muerte celular involucra la oligomerizacion de la toxina en la membrana lipídica de las células formando poros (24).Estas características se resumen en la tabla 3.

Parasporina	Nomenclatura Cry	Tipo
Parasporina-1	Cry31Aa/b/c/d	Toxina Cry de los tres dominios
Parasporina-2	Cry 46Aa	Similar a la toxina aerolisina
Parasporina-3	Cry 41Aa/b	Toxina Cry de los tres dominios
Parasporina-4	Cry45Aa	Mtx similar a la toxina épsilon
Parasporina-5	Cry64Aa	Mtx similar a la toxina épsilon
Parasporina-6	Cry63Aa	Toxina Cry de los tres dominios

Tabla 3. Diversidad de las parasporinas y tipo de grupo al que pertenece. (http://parasporin.fitc.pref.fukuoka.jp/list.html) y Palma et al. (24)

A continuación se detallarán las PS mejor caracterizadas en cuanto a su estructura y conformación tóxica.

3.3.1 Parasporina –1(PS1) (Cry31A)

La PS1Aa1 fue la primera toxina descubierta e identificada de los cristales de la cepa A1190 de *Bacillus thuringiensis*.Esta PS1Aa1 corresponde a la proteína Cry31Aa1, que es un polipéptido constituido por 723 residuos de aminoácidos con un peso molecular estimado de 81,045 Da. El gen que lo codifica es de 2,169 bp .En su forma nativa, la constituye una protoxina de 81 kDa con la estructura típica de los tres dominios de proteínas Cry, cuya secuencia aminoacídica contiene los cinco bloques conservados, comúnmente descritos para las Cry insecticidas. Sin embargo, la identidad en la secuencia de aminoácidos de PS1Aa1 con respecto a las proteínas Cry y Cyt bioinsecticidas es menos del (<25 %) (52).

Katayama et al. (75).En el 2005 realizaron un estudio para identificar cual de los cuatro fragmentos (66, 58,56 y 44 kDa) encontrados previamente por Mizuki et al. (4) luego de la digestion con proteasas de la PS1Aa1, era el responsable de la actividad anticancerígena.Lo primero que hicieron estos investigadores fue realizar una digestiòn de las inclusiones parasporales purificadas de la cepa A1190 con diferentes concentraciones de proteinasa K y tripsina, observando mediante estudios de citotoxicidad contra células HeLa, que los mejores resultados se obtenían cuando se hacia digestiòn con tripsina. Cuando la pro-PS1Aa1 es decir la proteína Cry sin actividad, se trataba con la proteasa tripsina (figura 11), se generaban tres péptidos, dos de ellos tóxicos: uno pequeño de 15 kDa y otro de 56 kDa. Estos dos fragmentos fueron estudiados mediante cromatografía y SDS-PAGE, encontrándose que los dos fragmentos formaban un heteródimero muy difícil de disociar, que no podían ser separado incluso en presencia de detergentes o agentes desnaturalizantes dèbiles, por lo que los autores sugerieron que posiblemente este heterodìmero componía el fragmento tóxico de la PS1Aa1 (75).

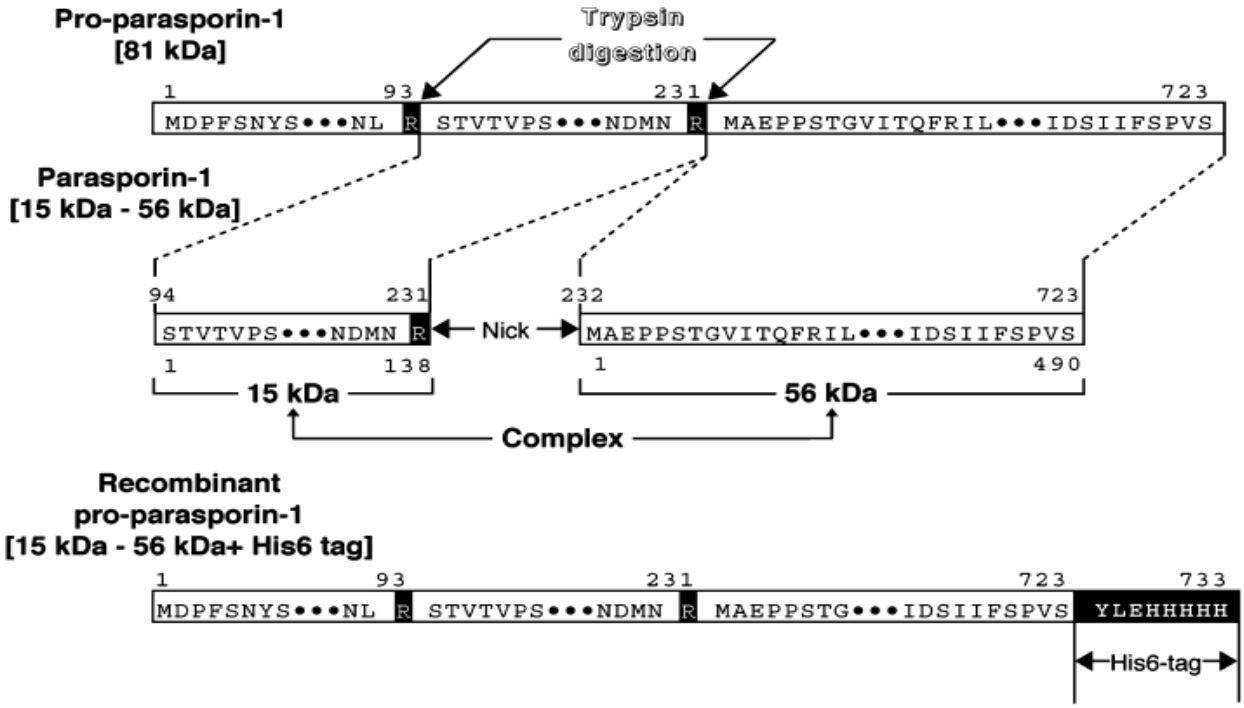

Figura 11.Esquema del corte de la pro-parasporina -1 por tripsina y la formación del heterodimero. Katayama et al. (75).

Este procesamiento proteolítico es un pre-requisito para que la toxina sea activa contra líneas celulares de cáncer (76). La actividad citotóxica de PS1Aa1 parece ser proteo-específica. Debido a que, cuando se trata la PS1Aa1 con tripsina y proteinasa K, esta exhibe actividad citotóxica. Sin embargo, la actividad citotóxica contra células Hela, disminuye fuertemente cuando se utilizan concentraciones de proteinasa K por encima de 60 µg/ml, esto posiblemente se da porque la proteinasa K tiene baja especificidad, produciendo otros cortes de la cadena polipeptìdica y por lo tanto otros fragmentos de la PS1Aa1.Esto se pudo evidenciar mediante un ensayo de viabilidad celular utilizando MTT [3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H tetrazolium bromide] (75).Cuando esta pro-parasporina fue tratada con quimotripsina no se observó actividad citotóxica (75). En el caso de PS1Aa2 (Cry31Aa2) solo tripsina genera el fragmento tòxico. La proteína tratada con quimotripsina o proteinasa K no exhibe actividad citotóxica. La activación con tripsina ocurre por procesamiento en el N-terminal (63,88).

En 2008 Uemori et al (77). Descubrieron dos nuevos genes de paraporinas-1 el ps1Aa3 y ps1Ab1, en la cepa B0195 .El primer gen era de 2,169 pb de largo y codificaba para una proteína de 81kDa (PS1Aa3), 100% idéntica en su secuencia de aminoácidos a PS1Aa1 proteína de referencia. El segundo gen tenía 2,178 pb de largo y codificaba para una proteína de 82 kDa (PS1Ab1), 86.4% idéntica en su secuencia de aminoácidos a PS1Aa1 proteína de referencia. Recientemente Kuroda et al (78). Descubrieron la PS1Ac2 que presenta 100% de identidad con PS1Aa1 y 99% con PS1Ac1. Las principales características de las otras PS1, se mostraron en la tabla 2.

Las PS1 ejercen efectos citotóxicos preferiblemente contra ciertas líneas celulares especialmente Hela (cáncer de cuello uterino humano), MOLT-4 (leucemia de células T) y HL60 (células de leucemia mieloide). Se ha demostrado un efecto citotóxico moderado hacia células Sawano (Células con cáncer endometrial) and HepG2 (células de cáncer de hígado), pero no son tòxicas contra células obtenidas de tejidos normales, células T de la sangre y líneas celulares MRC-5 (Tabla 4).Lo anterior sugiere que se necesita un receptor específico para las PS1, el cual ha sido patentado en 2009 por Katayama et al. y es conocido como beclina-1 (79).

3.3.2 Parasporina–2 (PS2) (Cry46Aa)

De acuerdo alto et al (51).La PS2Aa1 (Cry46Aa1) es un polipéptido de 338 residuos de aminoácidos con un peso molecular estimado de 37,446.El gen es 1,014 bp de largo. Esta parasporina no contiene los tres dominios ni los cinco bloques típicos de las proteínas Cry insecticidas. La proteína comparte una identidad con Cry15Aa tan solo del 23.5%, siendo a la única que se parece dentro del grupo de las proteínas Cry y Cyt del *B.thuringiensis*. Es importante señalar que la proteína Cry15Aa tiene alta identidad con las dos toxinas mosquitoxidales (Mtx2 y Mtx3) del B.sphaericus (21). Aún más interesante, es el hecho de que estas dos toxinas mosquitocidales muestran similaridad a la aerolisina de *Aeromonas hydrophila* que presenta en su estrucrura barriles β formadoras de poros (TFP) (80).

Las dos principales parasporinas del grupo 2, son producidas por las cepas A1547 (PS2Aa1) y A1470 (PS2Aa2). Estas son proteínas pequeñas de 37 kDa en su forma nativa (81), y se diferencian tan solo en cuatro residuos de aminoácidos y en el sitio de digestión con proteinasa K ; donde al ser cortadas hacia los extremos amino y carboxilo terminal, se genera un fragmento de aproximadamente 30 kDa que exhibe un notable efecto citotóxico hacia ciertas líneas celulares humanas cancerígenas (82). La proteína activa es citotóxica a líneas celulares como HepG2 y Jurkat, y poco tòxica hacia células de HeLa y hepatocitos normales (51).

La estructura cristalina de la toxina PS2 activa, ha sido determinada por difraccion de rayos x con una resolución de 2.38 Å. Identificàndose que la toxina està conformada principalmente por hebras o bandas β; que se retuercen y alargan sobre el eje de la molécula impartiendo una forma alargada inusual, por lo que muchas de estas hebras son notablemente largas y parecidas a las que se presentan en la toxina aerolisina tipo β formadora de poros. Aunque también existen α-helices son pocas y cortas. Tres dominios diferentes pueden ser identificados en la molécula. El primer dominio está conformado por cortos sándwiches de α-helices y una pequeña hoja β, que probablemente sirve como módulo de unión a las células diana (figura 12).Los dominios 2 y 3 son β-

sandwiches que posiblemente están involucrados en la oligomerizacion y formación del poro (80).

El dominio 1 está compuesto por cuatro α-helices cortas (H1-H4) y cuatro hebras pequeñas unidas antiparalelamente, llamadas hojas β (S2-3 and S11-12).La helice H1 limita con el dominio 2, mientras H2 and H3 forman el sándwich de la hoja β.El dominio 1 es rico en residuos aromáticos particularmente histidina, fenilalanina, triptófano y tirosina. Como si hubieran sido puestos allí por la toxinas epsilon del *Clostridium perfringens,* estos residuos aromáticos expuestos podrían ser el sitio putativo de unión de PS2 a las células cancerígenas susceptibles (80).

El dominio 2 es un dominio β sándwich que contiene una horquilla β (S8-9) y una hoja β de cinco hebras torcidas (S5-6, S7, S10-11 y S13) que son antiparalelas. En la interface del dominio 2 y 3, la quinta hebra de la hoja β esta reorganizada dentro de tres y dos hebras antiparalelas a las hojas β. Estas dos hojas β forman un β-sandwich que constituyen el dominio 3.

A pesar de la baja similitud (26%) de la PS2 con otras secuencias, la parasporin-2 comparte una similitud estructural notable con las aerolisinas tipo β-TFP (toxinas β formadoras de poros). (Figure 13 a,b y c).

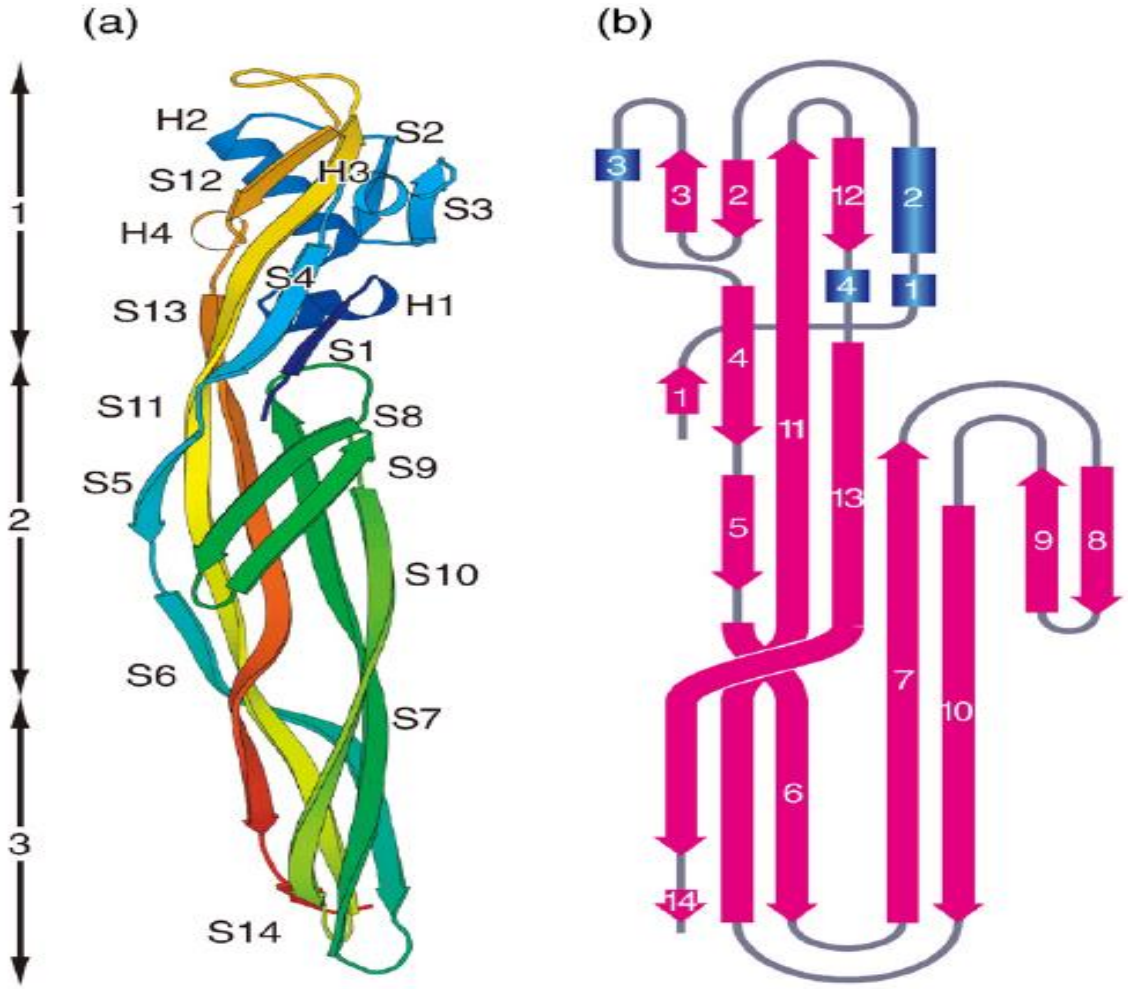

Figura 12. Estructura de la PS2 activada. (a) Representación en forma de citas del monómero de la PS2.Las estructuras secundarias son designadas con H1 – H4 para α-helices y S1- S14 para hebras β.Las flechas verticales indican las regiones de los dominios 1-3. La cadena polipéptida se muestra en colores, azul para el N-terminal y rojo para el C-terminal. (b) Diagrama topológico del monómero. α-helices y hebras β son representadas como rectángulos de azul oscuro y flechas de color magenta, respectivamente. Akiba et al. (80).

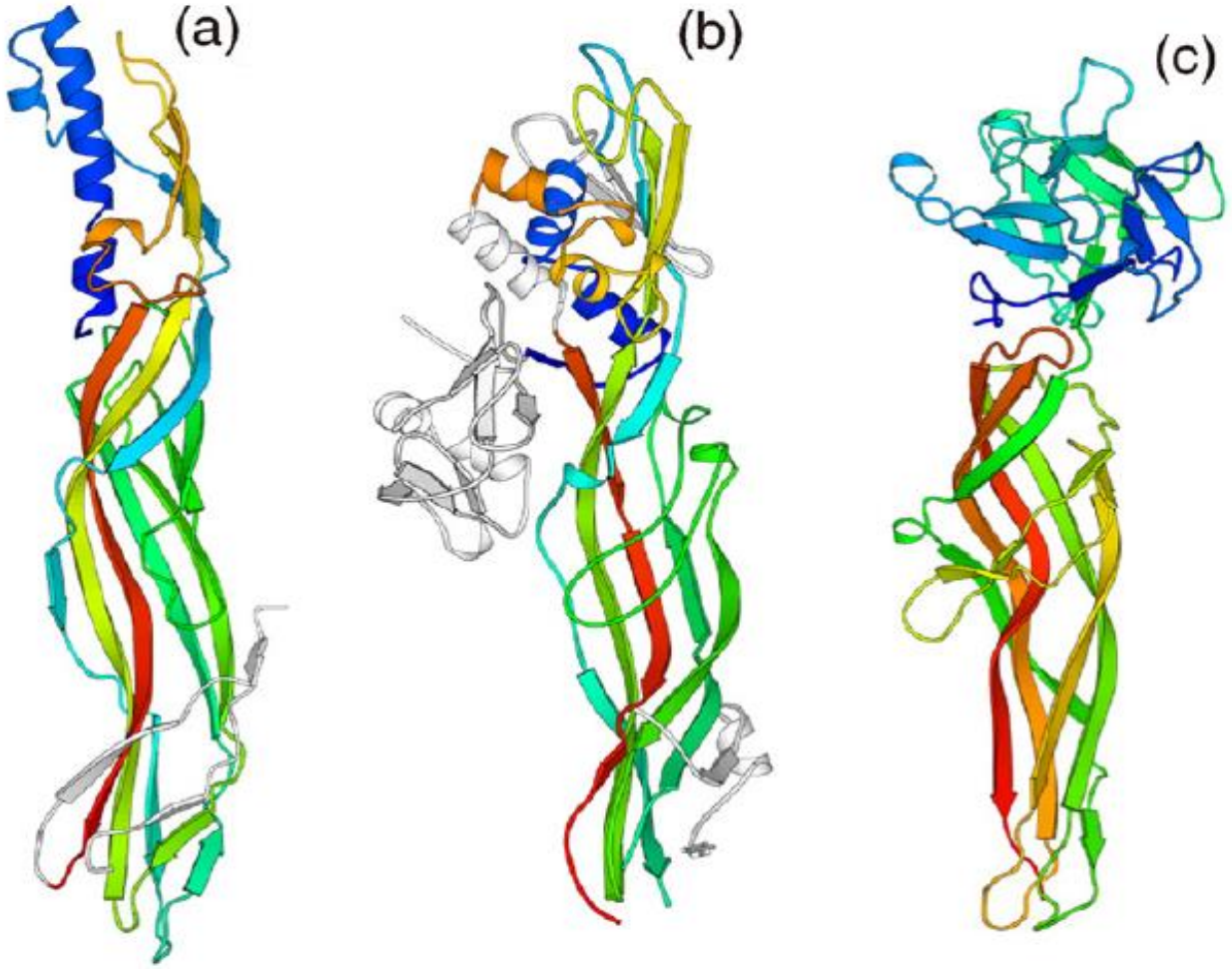

Figura 13. Representacion en forma de cintas de las estructuras similares a la PS2 (a) Toxina epsilon del *C. perfringens*. (b) toxina aerolisina de *A. hydrophila* y (c) Lectina hemolítica del *L. sulphurous.* Akiba et al. (80).

3.3.3 Parasporina –3 (PS3) (Cry41Aa y Cry41Ab)

Las dos parasporinas del grupo 3 (Cry41Aa1 y Cry41Ab1) presentan una masa molecular de 88 kDa en su forma nativa, y son sintetizadas por la cepa A1462 que fue aislada de los suelos de Tokio en Japón por Yamashita et al. (50). Estos investigadores reportaron que estas proteínas al ser digeridas con proteinasa K hacia sus dos

extremos, generan tres fragmentos, en donde el más grande, corresponde a la toxina de 64 kDa (50).Las dos toxinas exhiben una fuerte actividad citotòxica contra dos líneas celulares de cáncer humano, la HL60 (células de leucemia mieloide) y HepG2 (células de cáncer de hígado), mientras que se observaron bajas o nulas toxicidades contra 11 líneas celulares humanas y tres de mamíferos, entre ellas cuatro líneas de células no cancerosas. La secuencia de aminoácidos de las PS-3 derivadas de la cepa A1462 tienen una considerable similitud a las toxinas Cry insecticidas de Bt de los tres dominios, ya que estas poseen dominios conservados de las toxinas insecticidas Cry1 según lo descrito por Schnepf et al (83). Y por lo tanto se prevé que posean una estructura típica de los tres dominios. La PS-3 se encuentran en el segundo gen (ORF2) en un operón de tres genes, similar a lo que ocurre con varias toxinas de *B. thuringiensis*. La representación esquemática de las toxinas PS-3 y Cry 1, se muestra a continuación en la figura 14, en esta se puede observar los bloques conservados de las dos proteínas.

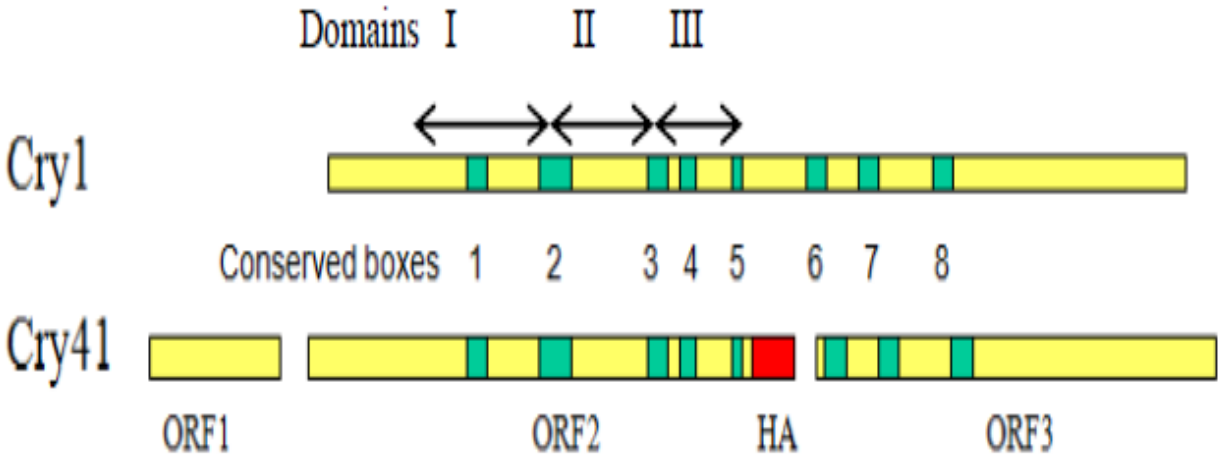

Figura 14. Bloques conservados de las proteínas insecticidas del Bt encontrados en Cry1 y PS-3(Cry 41).Los cuadros verdes denotan los ocho bloques conservados de las toxinas Cry. El cuadro rojo muestra el dominio conservado de la toxina ricina (84).

Además el ORF2 posee un dominio conservado que pertenece a la superfamilia de ricina. Este es mucho más similar al dominio HA-33 (hemaglutinina) presente en *Clostridium botulinum* tipo C una neurotóxina de mamíferos que causa la enfermedad del botulismo, caracterizada por parálisis muscular en seres humanos y animales (85). El componente HA-33 es responsable de la hemaglutinación y la agregación de eritrocitos causados por el complejo de la toxina de Clostridium botulinum. La presencia de un residuo glutamina-triptofano (QxW) es un patrón que se observa en la secuencia del gen de ORF2. Esta es la principal característica que existe en los dominios como lectina-ricina, donde los dominios $(QxW)_3$ (es sucesivo en el dominio ricina) y QxW se repiten internamente (86). Todavía no se conoce si el dominio ricina juega un papel importante en la citotoxicidad del PS-3, o tan solo se presenta como un dominio no funcional en ORF2.

3.4.4 Parasporina –4 (PS4) (Cry45Aa)

La PS4 es una proteína citotóxica que presenta similitud con la toxina épsilon producida por *Clostridium perfringens*. Aunque existen reportadas tres secuencias nucleotídicas y aminoacídicas correspondientes a parasporinas del grupo 4 en el Gen Bank (No. Acceso: AB180980.1; KC832500.1; KC832499.1), solo una ha sido descrita y caracterizada. Esta corresponde a la PS4Aa1 producida por la cepa A1470, esta es una proteína de 30 kDa en su forma nativa y de 27 kDa en su forma tóxica (88). La proteína parasporal activa exhibe una fuerte actividad citotóxica contra lineas células humanas con cáncer como MOLT-4, CACO-2 (cáncer humano de colon), TCS (cáncer humano de cuello uterino), y células HL60 (células con leucemia mieloide) (27). Esta parasporina no posee los bloques conservados, ni la estructura típica de los tres dominios de las proteínas Cry insecticidas (89). La PS3 es la única parasporina que ha sido estandarizada a pH ácido, ya que tras ser solubilizada en HCl 10 mmol, se observó un incremento del 25% en su efecto citotóxico hacía varias líneas celulares, en comparación a su actividad tras la solubilización en buffer de carbonatos. También se ha visto que puede ser activada tanto con proteinasa K como con Pepsina (90).

3.3.5 Parasporina –5(PS5) (Cry64Aa)

La PS5 fue aislada y purificada de la cepa tohokuensis A1100 del *B.thuringiensis* por Ekino y Shin, ellos la identificaron gracias a la actividad citotóxica que presentaba esta contra células T humanas con leucemia (MOLT-4).La PS5 presenta una masa molecular de 33.8 kDa en su forma inactiva pero cuando es cortada por proteinasa K se produce un fragmento activo de 29.8kDa. Aunque PS5 no muestre una significativa identidad con las parasporinas conocidas, un estudio con la herramienta (PSI-BLAST) revelò que la proteína muestra poca identidad con las proteínas Cry del *Bacillus thuringiensis* y las toxinas aerolisinas del tipo β-formadoras de poros (β-TFPs).También se pudo determinar que la PS5 contiene un dominio conservado similar al de la toxina épsilon producida por *Clostridium perfringens*, el cual es el causante de la formación del canales en la membrana lipídica de las células. La PS5 muestra alta actividad citotóxica contra siete de 18 líneas celulares de mamíferos ensayadas, y baja o ninguna citotoxidad hacia las otras (91). No se ha publicado mucho sobre esta parasporina, por ello se conoce muy poco sobre el mecanismo de acción y su espectro citotóxico.

3.3.6 Parasporina –6(PS6) (Cry63Aa)

La PS6 (Cry63Aa) se aisló de dos cepas de *Bacillus thuringiensis* la M109 y CP84 (92). Las pro-toxinas de las PS1 y PS6 están relacionadas entre sí en algunos aspectos. Estas comparten una secuencia conservada en sus primeros 50 residuos de aminoácidos y tras ser activadas por proteólisis, dos de sus tres péptidos generados, conforman un heterodímero tóxico (72). Análisis realizados a la secuencia de aminoácidos de la PS6 sugieren que es una toxina Cry de tres dominios, que presenta 56.4% de identidad con las proteínas insecticidas Cry2 (27).La PS6 presenta mayor actividad citotóxica hacia células de hepatocitos humanos con càncer (HepG2) y células humanas con cáncer de cuello uterino (HeLa) (92).Desafortunadamente no se ha investigado mucho sobre esta parasporina, por ende se conoce poco sobre su mecanismo de acción y efecto citotóxico.

Además de las parasporinas mencionadas anteriormente, se ha identificado una PS producida por la cepa Bt 18 originaria de Malasia, la cual no cuenta con numeración de PS o Cry, ya que se desconoce la secuencia completa de la proteina. Esta presenta actividad preferencial hacia células de cáncer, y aunque también tiene actividad contra *Aedes aegypti*, no fue tóxica hacia eritrocitos humanos o de rata (70). Tras la solubilización y digestión de los cristales de Bt18 con tripsina, se generan dos péptidos de 68 y 28 kDa, que al parecer se encuentran asociados formando un heterodímero tóxico, como en el caso PS1 (93). Las secuencias N-terminales parciales de ambos fragmentos demostró que la proteína de 68 kDa presenta similitud con las proteínas Cry24Aa y Cry25Aa producidas por *B. thuringiensis* serovariedad *jegathesan*, mientras que el péptido de 28 kDa fue similar a la Cry15Aa de *B. thuringiensis israelensis* (70).

Después de haber nombrado y discutido sobre cada parasporina, se puede hacer un resumen organizándolas en dos grupos principales. El primero integrado por las PS de mayor peso molecular (PS1, PS3, PS6), que tiene relación estructural con las proteínas Cry insecticidas, ya que contienen los tres dominios y los cinco bloques conservados. Y que en su conformación tóxica pueden estar constituidas por dos fragmentos de distinto peso molecular. El segundo grupo que puede ser identificado, está integrado por las parasporinas de menor peso molecular (PS2, PS4 y PS5), que no tienen relación con las proteínas Cry bioinsecticidas clasicas, pero si están relacionadas estructuralmente y en modo de acción a las toxinas formadoras de poros (TFP) de otras especies como la toxina épsilon, la citolisina y la aerolisina.

4. Capitulo 4: Espectro citotóxico de las PS y su mecanismo de acción.

4.1 Espectro citotoxico de las parasporinas

Como se puede observar en la tabla 4, cada parasporina estudiada hasta ahora tiene efecto citotóxico preferencial hacia cierto tipo de línea celular, más que por un tipo de cáncer en particular.

La PS1 no fue tóxica hacia la mayoría de las líneas celulares contra las que fue ensayada; sin embargo presenta alta toxicidad hacia las células HeLa (75) (cáncer cervical uterino) y HL-60 (leucemia meloide).Recientemente Kurona et al. (78) aisló una nueva proteína Cry de la cepa B0462 de Bt clasificada como PS1Ac2 la cual presenta alta toxicidad contra células HeLa, pero no presenta actividad citotóxica contra células MOLT-4.

En 2006 Kitada et al (81), evaluaron la citotoxicidad de la PS2 en 12 líneas celulares, encontrando que esta es la parasporina que presenta mayor espectro citotóxico, ya que produjo un importante efecto citotóxico en cinco de las doce líneas celulares probadas. No obstante, también presentó toxicidad alta hacia las células T normales, lo cual indica que su selectividad no es tan buena. En 2015 Brasseur et al. (103), encontraron que la PS2Aa1 aislada de la cepa 4R2 de *Bacillus thuringiensis* es altamente citotóxica contra las siguientes líneas celulares cancerígenas: MCF-7(células con cáncer de seno), PC3 (células con cáncer de próstata) y HepG2 (células con cáncer de hígado), solo cuando la proPS2Aa1 purificada es digerida por proteinasa K, y no presenta toxicidad cuando se trato con tripsina. La toxina PS2Aa1 activa presentò en todos los casos nula o muy baja citotoxicidad contra lineas celulares humanas normales ensayadas.

La PS3 es activa solo contra células HL 60(leucemia mieloide) y HepG2 (cáncer hepático) (50).

En 2004 Okomura et al. (88) reportaron que la cepa A1470 (antes designada 89-T-34-22) exhibía actividad citotóxica contra células MOLT-4, y que esta cepa producía dos proteínas con esta actividad. Una de estas proteínas fue identificada y nombrada como PS4. Reciente se encontró que esta PS4 es una toxina β-formadora de poros (82).En un estudio realizado en el 2008 por Okumura et al. (90) se evidencio que la PS2 presentaba alta toxicidad contra células CACO-2 (cáncer de colon), Sawano (cáncer endometrial), MOLT-4(leucemia),TCS (cáncer cervical de útero) y HL60 (leucemia mieloide).

En cuanto a la PS5 se conoce muy poco sobre su actividad citotóxica, solo hasta 2014 Ekino et al. (91) publicaron un estudio donde se muestra que la PS5 es toxica contra células Jurkat (leucemia de células T), HepG2 (cáncer hepático) y HeLa (cáncer cervical de útero). No obstante, también presento toxicidad moderada contra células MRC-5 (células normales de pulmón), y UtSMC (células normales de útero), lo cual sugiere que su selectividad no es tan buena.

La citotoxicidad de PS6 hacia las líneas celulares ensayadas fue nula o baja (92) presentando poco citotoxicidad hacia HepG2 (cáncer hepático) y HeLa (cáncer cervical de útero). Aunque no se descarta una mayor citotoxicidad hacia otras líneas celulares que no han sido ensayadas aùn. Finalmente, la PS de Malasia, parece tener selectividad hacia las células de leucemia (70).

Líneas celulares humanas	Descripción	PS1Aa1 CL_{50} (µg/ml)	PS2Aa1 CL_{50} (µg/ml)	PS3Aa1 CL_{50} (µg/ml)	PS4Aa1 CL_{50} (µg/ml)	PS5Aa1 CL_{50} (µg/ml)	PS6Aa1 CL_{50} (µg/ml)
Linfocitos T	Células T	>10	0.148	>10	>2	Nd	Nd
HC	Células hepáticas	>10	>10	>10	>2	>10	>10
UtSMC	Células de útero	>10	9.28	>10	>2	0.223	Nd
MRC-5	Células de pulmón	>10	7.15	>10	>2	0.273	Nd
MOLT-4	Leucemia	2.2	0,044	>10	0.472	0,075	Nd
Jurkat	Leucemia	>10	0,015	>10	>2	0.124	Nd
HL-60	Leucemia	0.32	0.066	1.25	0.725	1.079	Nd
CEM-SS	Leucemia	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
U937-DE4	Leucemia	Nd	Nd	Nd	0.980	>10	Nd
K562	Leucemia	Nd	Nd	Nd	>2	4.249	Nd
HepG2	Cáncer hepático	3.0	0.023	1.86	1.9	0.049	2.3
HeLa	Cáncer cervical	0.12	>10	>10	>2	0.080	7.2
Sawano	Cáncer endometrial	>10	0.041	>10	0.245	0.065	Nd
TCS	Cáncer cervical	Nd	>10	>10	>2	0.046	Nd
A549	Cáncer pulmonar	>10	>10	>10	>2	4.41	Nd
CACO-2	Cáncer de colon	>10	4.86	>10	0.124	0.30	>10

Tabla 4. Espectro citotóxico de las principales parasporinas. CL_{50}, Concentración letal cincuenta (µg ml-1).Adaptado de Ohba et al. (52).

4.2 Mecanismo de acción de las parasporinas

El mecanismo de acción de las PS ha sido poco reportado en la literatura, aunque la información existente es suficiente para dejar en evidencia que cada parasporina estudiada hasta ahora está dotada de su propio mecanismo para inducir la muerte celular sobre las células cancerígenas susceptibles.

4.2.1 Receptores de membrana

La alta especificidad hacia un solo tipo de célula blanco, parece ser un comportamiento típico de las proteínas Cry. Esta característica ha sido muy estudiada en las proteínas Cry insecticidas, y es determinada por la interacción de las toxinas con un receptor de membrana específico. El receptor se define como una molécula, generalmente una proteína, que se encuentra en la superficie celular y actúa en el primer paso de reconocimiento y unión de la toxina Cry a su célula blanco (45). La identificación de receptores ha sido poco estudiado en las PS, pero se cree que al igual que las Cry insecticidas, existe una interacción específica de PS-Receptor que confiere la especificidad hacia las células de cáncer.

En el 2011 Katayama et al.(79) identificaron y patentaron la molécula que actúa como receptor de la PS1Aa1,esta molécula es la beclina-1, que es una proteína que en células normales actúa intracelularmente en procesos como la autofagia y apoptosis; pero en las células HeLa, fue localizada extracelularmente y es reconocida de manera específica por la PS1Aa1(94).

En el 2011 Kitada et al. (104) identificaron y patentaron la molécula que actúa como receptor de la PS2, esta molécula es la proteína Hep27, un miembro de la familia deshidrogenasa/reductasa de cadena corta, dependiente de NADPH.

En 2010 Krishnan et al. (93) identificaron en células de leucemia CEM-SS el receptor para la PS de Malasia (Bt18), este es el Gliceraldehído 3-Fosfato Deshidrogenasa (GADPH) que fue identificado como una proteína de unión en la membrana plasmática de las células CEM-SS para la proteína paraesporal de la cepa Bt18 (95). El GADPH es una enzima glicolítica, de gran importancia en el metabolismo celular, y recientemente GAPDH se ha asociado a procesos de cáncer y muerte celular por apoptosis (93).

No se conoce con certeza por qué estas moléculas (receptores) se localizan en la membrana de las células blanco, y lo que es más importante si tienen una función biológica que desempeñar en esta, ya que la ausencia o baja proporción de estos receptores en la superficie de las células normales, podría ser la razón de la poca actividad de las parasporinas sobre las células sanas, en otras palabras son los responsables de que las parasporinas presenten actividad citotóxica hacia células con cáncer y presenten baja o nula citotoxicidad hacia células sanas(79).

4.2.2 Apoptosis

El mecanismo de acción reportado para las PS1 y PS malasia (Bt 18), es muy diferente al exhibido por las proteínas bioinsecticidas Cry y Cyt del *Bacillus thuringiensis*, las cuales como ya se menciono anteriormente forman un poro en la membrana celular de las células del insectos blanco produciendo un desbalance osmótico que produce la muerte de este. Las PS1 y PS Bt 18, desencadenan la muerte de las células cancerígenas HeLa y CEM-SS, via apoptosis (96,95).

En 2007 Katayama et al. (96) propucieron un modelo del mecanismo de acción de la PS1Aa1 en células HeLa (Fig. 15) el cual comienza por la unión al receptor (beclina 1), seguido por un aumento del Ca^{2+} intracelular desde los primeros minutos de exposición (1-2min) y en consecuencia una disminución de la síntesis global de DNA y proteínas. La muerte celular programada es puesta en evidencia a las 8 h por la activación de pro-Caspasa 3 y poli (ADP-ribosa) polimerasa (PARP). En este proceso, el Ca^{2+} parece ser un factor importante en el modo de acción, ya que tanto la inhibición de Caspasa 3, como del Ca^{2+} por agentes quelantes o eliminación del medio de cultivo, disminuyen considerablemente la actividad de la PS1Aa1. Un aspecto muy importante de esta investigaciòn fue que en ningún punto de los experimentos se detectaron cambios en el potencial de membrana, por lo que se demuestra que en ningún momento hubo lisis de la membrana de las células HeLa (96).

En 2012 Chan et al (97) determinaron a través de análisis bioquímicos, ultraestructurales y Western blots, el mecanismo de acción de la PS Bt 18, encontrando que la muerte de las células cancerígenas CEM-SS se da por apoptosis, esta muerte celular programada

inicia con un aumento de células en la fase S, lo que demuestra el detenimiento del ciclo celular. Posteriormente, ellos confirmaron mediante ensayos de Caspasa 3 y estudios morfológicos por microscopía electrónica; la activación de Caspasa 3 la cual alcanzó su mayor concentración a las 72 horas post-tratamiento,tiempo en el cual se observaron los cambios morfológicos típicos de la apoptosis en estas células de leucemia susceptibles (97).

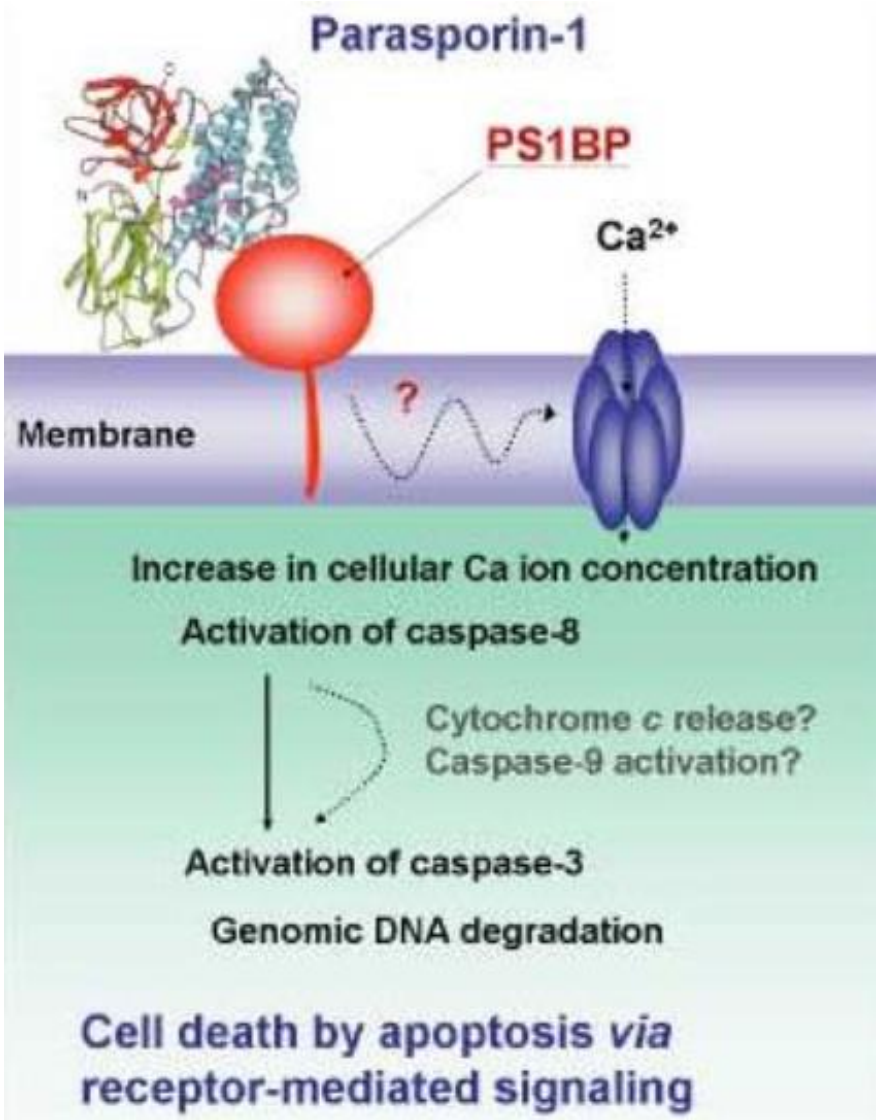

Figura 15. Modelo del mecanismo de acción de la parasporina -1 (98,105).

4.2.3 Necrosis

El modelo propuesto para el mecanismo de acción de la parasporina-2 se muestra en la figura 16, la necrosis de las células suceptibles a esta parasporina se da como resultado de daños irreparables en la membrana plasmática. Este es el clásico mecanismo descrito para las proteínas Cry catalogadas como TFP (Toxinas formadoras de poros), que en insectos y nematodos, lisan las células epiteliales del intestino medio (21).

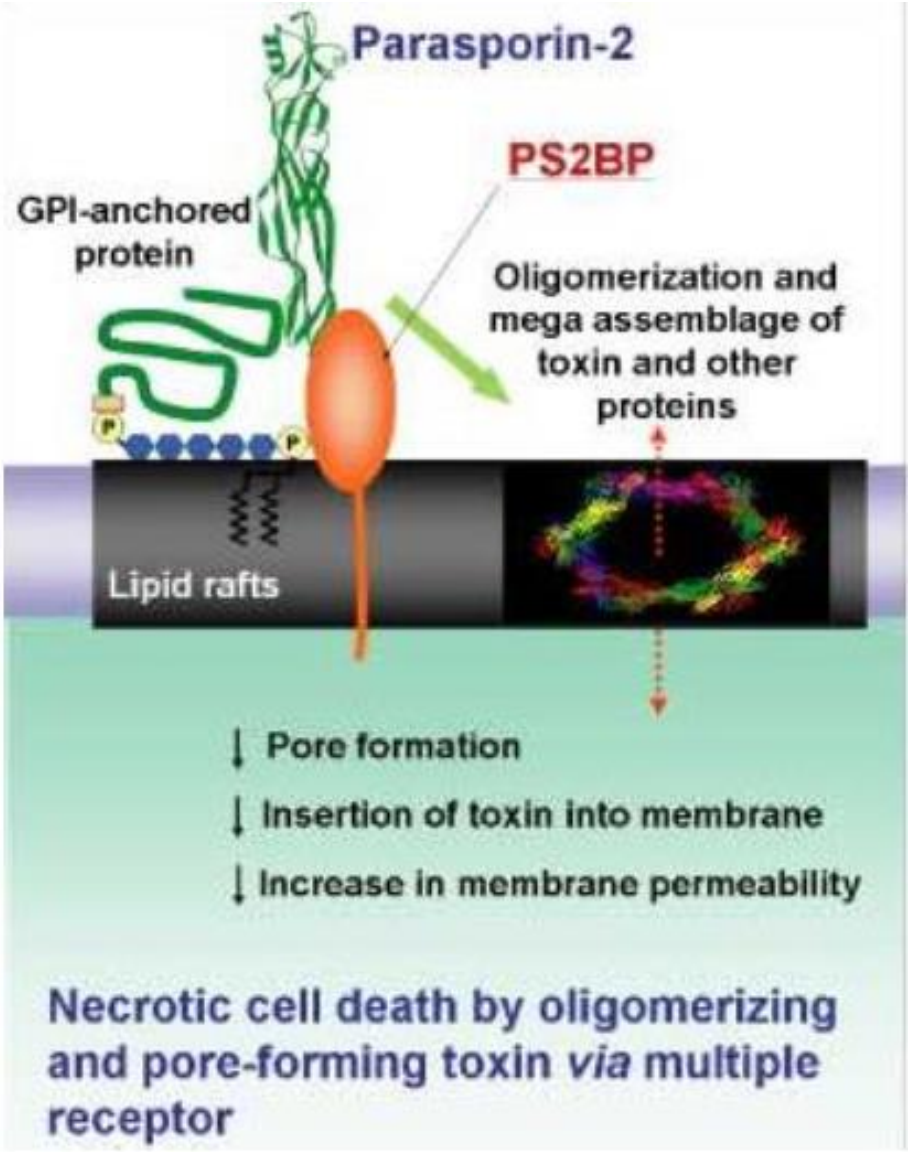

Figura 16. Modelo del mecanismo de acción de la parasporina -2(63,105).

Investigaciones sobre la acción citotóxica de PS2Aa1 muestran que, a diferencia de PS1Aa1, la PS2Aa1 produce permeabilidad de la membrana plasmática de las células tumorales (52). El paso inicial en la actividad citotóxica de PS2Aa1 es la unión específica de la toxina al receptor Hep27 situado en la balsa lipídica de la membrana plasmática de las células tumorales, luego de esta interacciòn se produce la formación de oligómeros de PS2Aa1 en la membrana plasmática, dando lugar a la formación de poros y la lisis celular (63). La oligomerización se produce en presencia de proteínas de membrana, lípidos de la bicapa y colesterol. Es importante mencionar que existe una considerable identidad entre las secuencias de aminoácidos de la PS2Aa1 y la toxina épsilon producida por el *Clostridium perfringens* cuyo mecanismo de muerte implica la oligomerización de la toxina en las balsas lipídicas y la formación de poros en la membrana plasmática (63).

En 2005 Abe et al. (99) estudiaron el modo de acción de la PS2, encontrando que la toxina se une a la superficie de las células diana y aumenta la permeabilidad de la membrana plasmática. Cuando se realizó fraccionamiento subcelular y análisis de inmunotransferencia de las células tratadas con la toxina PS2, se descubrió que la toxina estaba unida a las balsas lipidicas y formaban oligómeros resistentes a dodecilsulfato sódico (SDS) (99).

Debido a lo interesantes hallazgos en contrados en el 2005, Abe et al. En el 2008 (100) continuan con sus investigaciones en el modo de acción de PS2 pero esta vez en la línea celular humana HepG2 (cáncer de higado), demostrando que esta toxina Cry se dirige a las balsas lipídicas y se ensamblan en la membrana de las células HepG2 formando oligòmeros complejos . Con esta evidencia los autores concluyeron que la PS2 es una toxina formadora de poros que se acumula en las balsas lipídicas de las células tumorales. Recientemente, Brown et al. (101), demostraron que la toxina épsilon producida por *Clostridium perfringens* (el agente etiológico de la disentería en los corderos recién nacidos y la enteritis e enterotoxemia en cabras, terneros y potros) formaba poros heptamèricos en las membranas celulares de las células blanco como la PS2.

Los estudios nombrados anteriormente sobre el mecanismo de acción de la PS2 apuntaban a que esta toxina causaba la muerte de células cancerígenas por necrosis. Pero un estudio reciente realizado por Brasseur et al. (103) En el 2015 demuestran mediante análisis de western blot, citometria de flujo y ensayos especificos para determinar la activación de las caspasas 3/7 y el clivaje de poly (ADP-ribose) polimerasa (PARP) que la muerte de las celulares HepG2 no ocurria por necrosis. Ademàs, estos investigadores en ningún momento observaron cambios morfológicos; como hinchazón, ruptura de membrana y difusión del citoplasma en las diferentes líneas celulares cancerígenas ensayadas con la toxina, lo que los llevo a sugerir que debido a que se observò activación de las caspasas y la liberación de citrocromo c, la PS2Aa1 podrìa inducir apoptosis en líneas celulares cancerígenas (103).

La parasporina menos investigada en cuanto a su mecanismo de acción es la PS3Aa1, esta es una proteína que contiene los tres dominios típicos de las proteínas Cry insecticidas. Por lo que sea ha planteado la hipótesis que la PS3 produce muerte necrótica por la formación de poros en la membrana plasmática de las células cancerígenas, como evidencia de lo anterior, en ensayos *in vitro* se ha observado una progresiva liberación de LDH (lactato deshidrogenasa), que fue inversamente proporcional a la tasa de sobrevivencia de células HepG2 (50).

En cuanto al modo de acción de la PS4 se conoce que el tratamiento con esta provoca inflamación, y lisis de las células cancerígenas 24 horas después de la administración. Según estudios bioinformàticos la PS4 tiene una considerable similitud con la aerolisina β formadora de poros. Sin embargo, se diferencia de las toxinas tipo aerolisina dependientes de Colesterol (CDC), por qué esta actúa sin presencia de colesterol (102). Al igual que en la PS2, hay formación de oligómeros resistentes a SDS, de 90–200 kDa, de forma exclusiva en la membrana de células susceptibles. En 2011 Okumura et al. (102) demostraron que las células MOLT-4 cuando son tratadas con PS4 además de presentar las características mencionadas anteriormente, también sufren encogimiento nuclear y formación de ampollas en la periferia celular y nuclear.

Estos investigadores tambien realizaron ensayos que le permitieron medir la liberación de lactato deshidrogenasa (LDH) y la internalización de dextranos de diferentes pesos moleculares, logrando con esto, observar la permeabilización de la membrana de las células MOLT-4. Finalmente ellos realizaron estudios que mostraron que no había una considerable activación de las caspasas afectoras 3/7, demostrando de esta manera que el mecanismo de acción de la PS4 podria ser necrosis (102).

Dentro de todas las parasporinas identificadas hasta ahora, las que muestran mayor similitud son la PS4 y PS5. Esto se pudo evidenciar gracias a los resultados bioinformàticos obtenidos utilizando la herramienta PSI-BLAST. Esta además, fue de gran ayuda para demostrar que la PS5 puede incluirse dentro de la familia de las aerolisinas β formadoras de poros. Lo que abriría la posibilidad a que esta toxina presente un mecanismo de acción de necrosis, producto de la formación de poros en la membrana citoplasmática de las células cancerígenas (91).Y finalmente, para la PS6 no existen evidencias experimentales que permitan elucidar su mecanismo de acción.

Krishnan en un reporte reciente hace un resumen de los mecanismos de acción de las parasporinas (84). El concluye en su estudio que la PS1 activa la cascada de señalización de apoptosis debido al incremento en los niveles de iones de calcio.Diferente a lo que ocurre con la PS1, la PS2 actúa como una citolisina que causa la permeabilización de la membrana plasmática de la célula diana con especificidad. Mientras que la PS4 es una toxina formadora de poros independiente de colesterol. Finalmente el investigador menciona que el mecanismo de acción de las PS3, PS5 y PS6, necesita aún más investigación (84).

5.0 Analisis y conclusiones

En esta monografía se realizò una revisión bibliográfica sobre las proteínas Cry del *Bacillus thuringiensis* que han presentado actividad *in vitro* contra lineas celulares de càncer, las cuales se han clasificado como parasporinas. Describiéndose sobre estas: su clasificación según el comité de parasporinas, el descubrimiento, la diversidad, la activación, el espectro citotóxico y su mecanismo de acción. Todo esto con el fin de mostrar lo que se ha realizado hasta la fecha entorno al estudio de estas proteínas con potencial actividad anticàncerigena, y por lo tanto dar a conocer en lo que más se ha trabajado, y lo que necesita más investigación aún. Lo que si queda claro con esta búsqueda bibliográfica es que las parasporinas se presentan como una alternativa clara, natural y eficaz para el tratamiento del cáncer.Estudios de citotoxicidad *in vitro* realizados con cada una de las parasporinas purificadas en líneas celulares cancerígenas y normales, han demostrado que las parasporinas tienen un gran espectro citotóxico de acción y son altamente selectivas, por lo que son capaces de discriminar entre células sanas de las cancerígenas. Según lo reportado en la literatura hasta ahora esta selectividad se debe principalmente a los receptores de membrana que se encuentran en las células cancerígenas y que por alguna razón no entendida aún, no se observan en las células sanas. En la identificacion y estudio de estos receptores de membrana, es en lo que menos se ha avanzado. Ya que a la fecha solo se han encontrado tres, la beclina-1 para la PS1, la proteína Hep27 para la PS2 y el 3-gliceraldehido para la Bt 18 malasia. Por lo que el objetivo de futuras investigaciones debe ser el estudio de cada uno de los receptores de membrana para las otras parasporinas identificadas hasta ahora.

En el espectro citotóxico desplegado por cada una de las parasporinas es en lo que más se ha avanzado, aunque faltarìa ensayar estas proteinas sobre nuevas líneas celulares cancerìgenas, lo que permitiría conocer con más detalle el espectro citotóxico de cada parasporina, y de esta forma utilizarlas en el futuro como principios activos para el tratamiento de cànceres especìficos.

Por ùltimo, el tratamiento del cáncer con parasporinas podría ser utilizado con ayuda de la terapia genética, especialmente transferencia genètica viral, lo que permitirìa una mayor eficiencia en el tratamiento de este. Por todo esto y lo ya mencionado anteriormente, las parasporinas surgen como una alternativa real para el tratamiento del cáncer, ya que en el tratamiento con estas se producirìan menos efectos colaterales de los que se produncen con los tratamientos actuales, aumentando de esta manera la calidad de vida de los pacientes, y por lo tanto la expectativa de vida de los mismos.

6.0 Bibliografia

1. Rodríguez,J., Martínez, L.,Cruz, N., y Cómbita, A. 2014. Terapia génica para el tratamiento del cáncer. Revista colombiana de cancerología. 18(1):27-40.

2. Demain, L. Arnold. 2014. Importance of microbial natural products and the need to revitalize their Discovery. J Ind Microbiol Biotechnol 41: 185–201.

3. Sauka, D., Benintende, G, .2008. Bacillus thuringiensis: generalidades.Un acercamiento a su empleo en el biocontrol de insectos lepidópteros que son plagas agrícolas. Rev. Argentina de Microbiología 40: 124-140.

4. Mizuki, E., Park, Y., Saitoh, H., Yamashita, S., Akao, T., Higuchi, K., and Ohba, M. 2000. Parasporin, a human leukemic cell-recognizing parasporal protein of Bacillus thuringiensis. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology 7: 625–634.

5. Zhou, G., Zheng ,D.,Dou , L.,Cai, Q., Yuan,Z. 2010. Occurrence of psychrotolerant Bacillus cereus group strains in ice creams. International Journal of Food Microbiology 137. 143–146.

6. Thorsen, L., Hansen, V., Nielsen.K., Hendriksen, N., Phipps, R., and Budde, B. 2006. Characterization of Emetic Bacillus weihenstephanensis,a New Cereulide-Producing Bacterium. Aplied and Environmental Microbiology, P. 5118–5121.

7. Ceron, J., Bravo, A. 2004. Bacillus thuringiensis en el control biológico. Bogotá, Colombia. Universidad nacional de colombia.

8. Somerville, H.1970.Formation of the parasporal inclusión of Bacillus thuringiensis.Eur.J.Biochem.18.226-237.

9. Pusztai, M., Fast, P., Gringorten L.,Kaplan,J., Lessard, T. And Carey, P.1991. The mechanism of sunlight-mediated inactivation of Bacillus thuringiensis crystals.Biochem, J.273, 43-47.

10. López, J., Ibarra J.1996. Characterization of a Novel Strain of Bacillus thuringiensis. Aplied and Environmental Microbiol 62:1306-10.

11. Vachon, V., Laprade, R. And Schwartz, J. L. 2012. Current models of the mode of action of Bacillus thuringiensis insecticidal crystal proteins: A critical review. J Invertebr Pathol, 111, 1-12.

12. Stabb, E., Jacobson, L., Handelsman J. 1994. Zwittermicin A-producing strains of Bacillus cereus from diverse soils. Applied and Environmental Microbiology 60:4404–4412.

13. Abriouel H., Franz C., Omar N., Gálvez A. 2011. Diversity and applications of Bacillus bacteriocins. FEMS Microbiology Reviews 35:201-232.

14. Selvapandiyan, A., Arora, N., Rajagopal, R., Jalali, S., Singh, S., Bhatnagar R., Venkatesan, T. 2001. Toxicity analysis of N- and C-terminus-deleted vegetative

insecticidal protein from Bacillus thuringiensis. Applied and Environmental Microbiology 67:5855-5858.

15. Perani, M., Bishop, A. And Vaid, A. 1998. Prevalence of beta-exotoxin, diarrhoeal toxin and specific delta-endotoxin in natural isolates of Bacillus thuringiensis. FEMS Microbiology Letters 160:55–60.

16. Mizuki, E., Ohba, M., Akao, T., Yamashita, S., Saitoh, H. And Park, Y. 1999. Unique activity associated with non-insecticidal Bacillus thuringiensis parasporal inclusions: in vitro cell-killing action on human cancer cells. Journal of Applied Microbiology 86:477–486.

17. Bravo, A.,Soberon , M., And Gill,S.S. 2005 .Bacillus thuringiensis. Mechanisms and use Comprehensive Molecular Insect science.6:175-205.

18. Crickmore, N., Zeigler, D., Feitelson, J., Schnepf, E., Van Rie J.,Lereclus,D., Baum , j. And Dean, D. 1998. Revision of the Nomenclature for the Bacillus thuringiensis Pesticidal Crystal Proteins. Microbiology And Molecular Biology. Reviews, P. 807–813.

19. Wasano N., Kim, K., And Ohba, M.1998. Delta-endotoxin proteins associated with spherical parasporal inclusions of the four Lepidoptera-specific Bacillus thuringiensis strains. Journal of Applied Microbiology. 84, 501–508.

20. Crickmore, N., Zeigler, D., Schnepf, E., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J. And Bravo, A. 2005 Bacillus thuringiensis toxin nomenclature (http://www.biols.susx.ac.uk/Home /Neil-crickmore/Bt/iidex.htmo).

21. de Maagd, R. A., Bravo, A., Berry, C., Crickmore, N. And Schnepf, H. E. 2003. Structure, diversity, and evolution of protein toxins from spore-forming entomopathogenic bacteria. Annual Review of Genetics, 37, 409-433.

22. Zhang, J., Hodgman, T. C., Krieger, L., Schnetter, W. And Schairer, H. U. 1997. Cloning and analysis of the first cry gene from Bacillus popilliae. Journal of Bacteriology, 179, 4336-4341.

23. Barloy, F., Lecadet, M. And Delecluse, A. 1998. Distribution of clostridial cry-like genes among Bacillus thuringiensis and Clostridium strains. Curr Microbiol, 36, 232-237.

24. Palma, L., Muñoz, D., Berry, C.,Murillo, J. and Caballero, P.2014. Bacillus thuringiensis Toxins: An Overview of Their Biocidal Activity. Toxins 6,3296-3325.

25. Ito, A., Sasaguri, Y., Kitada, S., Kusaka, Y., Kuwano, K., Masutomi, K., Mizuki, E., Akao, T. And Ohba, M. 2004. A Bacillus thuringiensis Crystal Protein with Selective Cytocidal Action to Human Cells. Journal of Biological Chemistry, 279, 21282-21286.

26. Adang, M., Crickmore, N. And Jurat, L. 2014. Diversity of Bacillus thuringiensis Crystal Toxins and Mechanism of Action. In: Tarlochan S. Dhadialla and Sarjeet S. Gill, editors, Advances in Insect Physiology, Vol. 47, Oxford: Academic Press, pp. 39-87.

27. Chengchen, X.,Bi-cheng,W., y Ming S. 2014. Structural Insights into Bacillus thuringiensis Cry, Cyt and Parasporin Toxins. Toxins 6, 2732-2770.

28. Wirth, M., Berry, C., Walton, W. And Federici, B.2014. Mtx toxins from Lysinibacillus sphaericus enhance mosquitocidal cry-toxin activity and suppress cry-resistance in Culex quinquefasciatus. J Invertebr Pathol.115: 62–67.

29. Wirth, M., Walton, W. And Federici, B. 2010. Evolution of resistance to the Bacillus sphaericus Bin toxin is phenotypically masked by combination with the mosquitocidal proteins of Bacillus thuringiensis subspecies israelensis. Environmental Microbiology, 12, 1154-1160.

30. Baumann, P., Clark, M.,Baumann, L. And Broadwell, A.1991. Bacillus sphaericus as a Mosquito Pathogen: Properties of the Organism and Its Toxins. Microbiological Reviews, vol. 55,425-436.

31. Bravo, A., Gillb,S., Soberon, M. Mode of action of Bacillus thuringiensis Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. 2006. Elsevier.Toxicon 49.423-435.

32. Zhang, X., Candas, M., Griko, N. B., Taussig, R. & Bulla, L. A., Jr. 2006. A mechanism of cell death involving an adenylyl cyclase/PKA signaling pathway is induced by the Cry1Ab toxin of Bacillus thuringiensis. Proc Natl Acad Sci U S A, 103, 9897-9902.

33. Pacheco, S., Gómez, I., Arenas, I., Saab-Rincon, G., Rodríguez-Almazán, C., Gill, S. S., Bravo, A. And Soberón, M. 2009. Domain II Loop 3 of Bacillus thuringiensis Cry1Ab Toxin Is Involved in a “Ping Pong” Binding Mechanism with Manduca sexta Aminopeptidase-N and Cadherin Receptors. Journal of Biological Chemistry, 284, 32750-32757.

34. Gomez, I., Pardo, L., Muñoz, C., Fernandez, L., Pérez, C. And Sanchez J. 2007. Role of receptor interaction in the mode of action of insecticidal Cry and Cyt toxins produced by Bacillus thuringiensis. Peptides 18,169-173.

35. Bravo, A. and Soberón, M. 2008. How to cope with insect resistance to Bt toxins? Trends in biotechnology, 26, 573-579.

36. Tounsi, S., Dammak, M. Zouari. N., Rebai, A, and Jaoua S. 2006. Evidence of the effect of δ-endotoxin ratio in Bacillus thuringiensis crystals on the toxicity against Ephestia kuehniella. Science direct. Biological control 37,243-246.

37. Soares, A.,Dias, A.,dellama, M., Fonseca, F., Carmona, A., Terra, W, and Henrique, F. 2011. Digestive physiology and characterization of digestive cathepsin L-like proteinase from the sugarcane weevil Sphenophorus levis. Journal of Insect Physiology 57, 462–468.

38. Ihara, H. And Himeno, M. 2008. Study of the irreversible binding of Bacillus thuringiensis Cry1Aa to brush border membrane vesicles from Bombyx mori midgut. J Invertebr Pathol, 98, 177-183.

39. Sarjeet, G., Cowles, E. And Francis, V.1995. Identification, Isolation, and Cloning of a Bacillus thuringiensis CryIAc Toxin-binding Protein from the Midgut of the Lepidopteran Insect Heliothis virescens. The Jurnal of Biological Chemestry .Vol. 270, 27277–27282.

40. Nagamatsu, Y., Koike, T., Sasaki, K., Yoshimoto, A. And Furukawa, Y. 1999. The cadherin-like protein is essential to specificity determination and cytotoxic action of the Bacillus thuringiensis insecticidal CryIAa toxin. FEBS Lett, 460, 385-390.

41. Lucena, W., pelegrini, P.,Martins, Diogo.,Fonseca, F., Gomes, J., de Marcelo, L., da Silva, M., Oliveira,R. And Grossi-de-sa, M. 2014. Molecular Approaches to Improve the Insecticidal Activity of Bacillus thuringiensis Cry Toxins. Toxins 6, 2393-2423.

42. Fernandez, L. E., Aimanova, K. G., Gill, S. S., Bravo, A. And Soberón, M. 2006. A GPI-anchored alkaline phosphatase is a functional midgut receptor of Cry11Aa toxin in Aedes aegypti larvae. Biochem J, 394, 77-84.

43. Hossain, M.D., Shitomi, Y., Moriyama, K.,Higuchi, M.,Hayakawa, T.Mitsui, T., Sato R. And Hori, H. 2004. Characterization of a Novel Plasma Membrane Protein, Expressed in the Midgut Epithelia of Bombyx mori, That Binds to Cry1A ToxinsAplied and environmental Microbiology. Vol 70, 4604-4612.

44. Bravo, A., Gomez, I., Conde, J., Munoz-Garay, C., Sanchez, J., Miranda, R., Zhuang, M., Gill, S. S. And Soberon, M. 2004. Oligomerization triggers binding of a Bacillus thuringiensis Cry1Ab pore-forming toxin to aminopeptidase N receptor leading to insertion into membrane microdomains. Biochim Biophys Acta, 1667, 38-46.

45. Pigott, C. R. And Ellar, D. J. 2007. Role of receptors in Bacillus thuringiensis crystal toxin activity. Microbiol Mol Biol Rev, 71, 255-281.

46. Bravo, A., Likitvivatanavong, S., Gill, S. S. And Soberon, M. 2011. Bacillus thuringiensis: A story of a successful bioinsecticide. Insect Biochem Mol Biol, 41, 423-431.

47. Padmavathi, V. L.P. And Steinhoff, J.H.2007. Conformation of the Closed Channel State of Colicin A in Proteoliposomes: An Umbrella Model. J. Mol. Biol. 378, 204–214.

48. Greig L.S.,Radjainia, M. And Mitra, K. A.2009. Oligomeric Structure of Colicin Ia Channel in Lipid Bilayer Membranes.The journal of biological chemestry.Vol 284,16126-16134.

49. Groulx, N.,McGuire, H. Laprade, R.,Shwartz, J. L. And Blunck, R.2011. Single Molecule Fluorescence Study of the Bacillus thuringiensis Toxin Cry1Aa Reveals Tetramerization. The journal of biological chemestry.Vol 286,42274-42282.

50. Yamashita, S., Katayama, H., Saitoh, H., Akao, T., Shin, Y., Park, Mizuki, E., Ohba, M, and Ito, A.2005. Typical Three-Domain Cry Proteins of Bacillus thuringiensis Strain A1462 Exhibit Cytocidal Activity on Limited Human Càncer Cells. J. Biochem. 138, 663–672.

51. Ito, A.,Sasaguri, Y., Kitada, S., Kusaka, Y.,Kuwano, K.,Masutomi, k., Mizuki, E., Akao, T., end Ohba, M. 2004. A Bacillus thuringiensis Crystal Protein with Selective Cytocidal Action to Human Cells. The Journal of Biological Chemistry Vol. 279, No. 20.

52. Ohba, M., Mizuki, E., and Uemori, A. 2009. Parasporin, a New Anticàncer Protein Group from Bacillus thuringiensis. Anticàncer Research 29: 427-434.

53. Kitada, S., Abe, Y., Ito, A., Kuge, O., Akao, T., Mizuki E, and Ohba, M. 2005. Molecular identification and cytocidal action of parasporina, a protein group of novel crystal toxins targeting human cáncer cells. 6th Pacific Rim Conference on the Biotechnology of Bacillus thuringiensis and its Environmental Impact.

54. Weinberg RA.2007. The nature of càncer. In: The biology of càncer. New York.Garland Sciencenh; 25-56.

55. Beltrán, E., Vázquez, D. And Peña, A. 2014. El cáncer, una epidemia silenciosa. Revista Infociencia Vol.18, No.1.

56. Ferlay, J., Soerjomataram, I., Ervik, M., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D., Forman, D., Bray, F. GLOBOCAN [Internet] 2013. Càncer Incidence and Mortality Worldwide: IARC Càncer Base No. 11 .Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2013. Disponible en el sitio de red: http://globocan.iarc.fr.

57. Siegel, R., Desantis, C., Virgo, K., Stein, K., Mariotto, A., Smith, T., Fedewa, S. 2013. Càncer treatment and survivorship statistics, 2012. American Càncer Society, 62:220–241.

58. SatofuKa, H., Okabe, Y.,Takano, Y.,Utsugi, Takahiko., Ohtsu, M. And Murakami, Y. 2014. Immunization method for multi-pass membrane proteins using highly metastatic cell lines. Biochemical and Biophysical Research Communications 450, 99–104.

59. Rajan, R., Chandran, K.,Haper, L. S. Yun, S. And Kalaichelvan, T. 2015. Plant extract synthesized silver nanoparticles: An ongoing source of novel biocompatible materials. Industrial Crops and Products 70, 356–373.

60. Chinembiri, N. T., du Plessis, H. L. Gerber, M. Hamman, H. J. And du Plessis, J. 2014. Review of Natural Compounds for Potential Skin Càncer Treatment. Molecules 19, 11679-11721.

61. Demain, L. Arnold. 2014. Importance of microbial natural products and the need to revitalize their Discovery. J Ind Microbiol Biotechnol 41: 185–201.

62. Akao, T., Mizuki, E. Yamashita, S., Saitoh, H. And Ohba, M.1999. Lectin activity of Bacillus thuringiensis parasporal inclusión proteins. FEMS Microbiology Letters 179, 415-421.

63. Okassov, A., Nersesyan, A., Kitada, S.,Ilin, A. 2015. Parasporins as new natural anticàncer agents. Review Article. JBUON 2015; 20(1): 5-16.

64. Crickmore, N., Baum, J., Bravo, A., Lereclus, D., Narva, K., Sampson, K., Schnepf, E., Sun, M. and Zeigler, D.R. "Bacillus thuringiensis toxin nomenclature" (2014) http://www.btnomenclature.info/.

65. Lee, D. W., Akao, T., Yamashita, S., Katayama, H., Maeda, M., Saitoh, H., Mizuki, E. And Ohba, M.2000. Noninsecticidal Parasporal Proteins of a Bacillus thuringiensis Serovar shandongiensis Isolate Exhibit a Preferential Cytotoxicity against Human Leukemic T Cells. Biochemical and Biophysical Research Communications 272, 218–223.

66. Okumura, S., Ohba, M., Mizuki, E., Crickmore, N., Côté, J.-C., Nagamatsu, Y., Kitada, S., Sakai, H., Harata, K. and Shin, T. "Parasporin nomenclature" (2010) http://parasporin.fitc.pref.fukuoka.jp/.

67. Uemori, A., Maeda, M, Yasutake, K., Ohgushi, A., Kagoshima, K., Mizuki, E. And Ohba, M. 2007. Ubiquity of parasporin-1 producers in Bacillus thuringiensis natural populations of Japan. Naturwissenschaften 94:34–38.

68. Yasutake, K., Uemori, A., Binh, N.D, Mizuki, E. And Ohba M. 2008. Identification of parasporin genes in Vietnamese isolates of Bacillus thuringiensis. Zeitschrift Für Naturforschung 63c :139–143.

69. Jung, Y. C., Mizuki, E., Akao, T. And Cote, J. C. 2007. Isolation and characterization of a novel Bacillus thuringiensis strain expressing a novel crystal protein with cytocidal activity against human càncer cells. Journal of Applied Microbiology, 103, 65-79.

70. Nadarajah, V.D., Ting, D., Chan, K., Mohammed, S., Kanakeswary, K., Lee, H. And Mohamed S. 2008. Selective Cytotoxic activity against leukemic cell lines from mosquitocidal Bacillus thuringiensis parasporal inclusions. Southeast Asian Journal of Tropic Medical Publication Health 39:235–245.

71. Lenina, N.K., Naveenkumar, A., Sozhavendan, A. E., Balakrishnan, N., Balasubramani, V. And Udayasuriyan, V. 2014. Characterization of parasporin gene harboring Indian isolates of Bacillus thuringiensis. Biotech 4:545–551.

72. Gonzalez, E. Granados, J.C., Short, J.D., Ammons, D.R. And Rampersad, J. 2011. Parasporins from a Caribbean island: Evidence for a globally dispersed Bacillus thuringiensis strain. Current Microbiology 62:1643–1648.

73. Espino, A., Gomez, A., Galan, L. And Pereyra, B. 2012. Isolation of Bacillus thuringiensis strains with cytotoxic activity against MOLT-4, a leukemia cell line. In Microbes in Applied Research: Current Advances and Challenges, A. Mendez-Vilas (ed.), World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd. Málaga, España pp. 147–151.

74. Saitoh, H., Okumura, S., Ishikawa, T., Akao, T., Mizuki, E. And Ohba, M.2006.Investigation of a novel Bacillus thuringiensis Gene Encoding a Parasporal Protein, Parasporina -4, That preferentially Kills Human Leukemia T Cells. Biocis. Biotechnol. Biochem, 70 (12), 2935-2941.

75. Katayama, H., Yokota, H., Akao, T., Nakamura, O., Ohba, M., Mekada, E. And Mizuki, E. 2005. Parasporin-1, a novel cytotoxic protein to human cells from non-insecticidal parasporal inclusions of Bacillus thuringiensis. J Biochem, 137, 17-25.

76. Lightwood, D. J., Ellar, D. J. And Jarrett, P. 2000. Role of proteolysis in determining potency of Bacillus thuringiensis Cry1Ac delta-endotoxin. Appl Environ Microbiol, 66, 5174-5181.

77. Uemori, A., Ohgushi, A., Yasutake, K., Maeda, M., Mizuki, E. And Ohba, M. 2008. Parasporin-1Ab, a novel Bacillus thuringiensis cytotoxin preferentially active on human càncer cells in vitro. Anticàncer Res, 28, 91-95.

78. Kuroda, S., Begum, A., Saga, M., Hirao, A., Mizuki, E., Sakai, H. And Hayakawa, T. 2013. Parasporin 1Ac2, a novel cytotoxic crystal protein isolated from Bacillus thuringiensis B0462 strain. Current Microbiology 66:475–80.

79. Katayama, H., Kusaka, Y. And Mizuki E. 2011. Parasporin-1 receptor and use thereof. European Patent Application. US20090935513. 2009-03-30. Fukuoka Prefectural Government.

80. Akiba, T., Abe, Y., Kitada, S., Kusaka, Y., Ito, A., Ichimatsu, T., Katayama, H., Akao, T., Higuchi, K., Mizuki, E., Ohba, M., Kanai, R. And Harata, K. 2009. Crystal Structure of the Parasporin-2 Bacillus thuringiensis Toxin That Recognizes Càncer Cells. Journal of Molecular Biology, 386, 121-133.

81. Kitada, S., Abe, Y., Shimada, H., Kusaka, Y., Matsuo, Y., Katayama, H., Okumura, S., Akao, T., Mizuki, E., Kuge, O., Sasaguri, Y., Ohba, M. And Ito, A. 2006. Cytocidal Actions of Parasporin-2, an Anti-tumor Crystal Toxin from Bacillus thuringiensis. Journal of Biological Chemistry, 281, 26350-26360.

82. Okumura, S., Ishikawa, T., Saitoh, H., Akao, T. And Mizuki E. 2013. Identification of a second cytotoxic protein produced by Bacillus thuringiensis A1470. Biotechnology Letters 35:1889–1894.

83. Schnepf, E., Crickmore, N., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Feitelson, J. And Dean, D.H. 1998. Bacillus thuringiensis and its pesticidal crystal proteins. Microbiology and Molecular Biology Reviews 62:775–806.

84. Krishnan, V. 2013. Investigation of parasporins, the cytotoxic proteins from the bacterium Bacillus thuringiensis. Thesis: Department of Biochemistry, School of Life Sciences, University of Sussex.

85. Tsuzuki, K., Kimura, K., Fujii, N., Yokosawa, N., Indoh, T., Murakami, T.And Oguma K. 1990. Cloning and complete nucleotide sequence of the gene for the main component of hemagglutinin produced by Clostridium botulinum type C. Infection and Immunity 58:3173–3177.

86. Hazes, B. 1996. The (QxW)3 domain: A flexible lectin scaffold. Protein Science, 5, 1490-1501.

87. Jung, Y. C., Mizuki, E., Akao, T. And Cote, J. C. 2007. Isolation and characterization of a novel Bacillus thuringiensis strain expressing a novel crystal protein with cytocidal activity against human càncer cells. Journal of Applied Microbiology, 103, 65-79.

88. Okumura S, Akao T, Higuchi K, Saitoh H, Mizuki E, Ohba M, Inouye K. 2004. Bacillus thuringiensis serovar shandongiensis strain 89-T-34-22 produces multiple cytotoxic proteins with similar molecular masses against human càncer cells. Letters in Applied Microbiology 39:89–92.

89. Okumura, S., Saitoh, H., Wasano, N., Katayama, H., Higuchi, K., Mizuki, E. And Inouye, K. 2006. Efficient solubilization, activation, and purification of recombinant Cry45Aa of Bacillus thuringiensis expressed as inclusion bodies in Escherichia coli. Protein Expression and Purification, 47, 144-151.

90. Okumura, S., Saitoh, H., Ishikawa, T., Mizuki, E. And Inouye K. 2008. Identification and characterization of a novel cytotoxic protein, parasporin-4, produced by Bacillus thuringiensis A1470 strain. Biotechnology Annual Review 14:225–252.

91. Ekino, K., Okomura, S.,Ishikawa, T., Kitada, S., Saitoh, H., Akao, T., Oka, T.,Nomura, Y., Ohba, M., Shin, T. And Mizuki, E. 2014. Cloning and Characterization of a Unique Cytotoxic Protein Parasporin-5 Produced by Bacillus thuringiensis A1100 Strain. Toxins, 6, 1882-1895.

92. Nagamatsu, Y., Okamura, S., Saitou, H., Akao, T. And Mizuki, E. 2010. Three Cry toxins in two types from Bacillus thuringiensis strain M019 preferentially kill human hepatocyte càncer and uterus cervix cancer cells. Biosci Biotechnol Biochem, 74, 494-498.

93. Krishman, K., Ker, E. K., Mohammed, M. S. And Nadarajah, D. V.2010. Identification of Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) as a binding protein for a 68-kDa Bacillus thuringiensis parasporal protein cytotoxic against leukaemic cells. Journal of Biomedical Science 2010, 17:86.

94. Zhong, Y., Wang, Q.J., Li, X., Yan, Y., Backer, J.M., Chait, B.T., Heintz, N.And Yue , Z. 2009. Distinct regulation of autophagic activity by Atg14L and Rubicon associated with Beclin 1-phosphatidylinositol 3-Kinase complex. Nature Cell Biology 11:468–476.

95. Shin Yee Rebecca Wong. 2010. Bacillus Thuringiensis Parasporal Proteins And Their Effect On Human Càncer Cells. Review Article. IeJSME 2010: 4(2): 3-9.

96. Katayama, H., Kusaka, Y., Yokota, H., Akao, T., Kojima, M., Nakamura, O., Mekada, E. And Mizuki, E. 2007. Parasporin-1, a novel cytotoxic protein from Bacillus thuringiensis, induces Ca2+ influx and a sustained elevation of the cytoplasmic Ca2+ concentration in toxin-sensitive cells. J Biol Chem, 282, 7742-7752.

97. Chan, K.K., Wong, R.S., Mohamed, S.M., Ibrahim, T.A., Abdulla, M. And Nadarajah, V.D. 2012. Bacillus thuringiensis parasporal proteins induce cell cycle arrest and caspase-dependant apoptosis cell death in leukemic cells. Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology 31:75–86.

98. Espino, A. N. 2014.Caracterizacion biológica de parasporinas en cepas nativas de Bacillus thuringiensis. Tesis; Facultad de ciencias biológicas, Universidad autónoma de nuevo león.

99. Abe, Y., Kitada, S., Kuge, O., Ohba, M. And Ito A. 2005. Oligomerization of parasporin-2, a new crystal protein from non-insecticidal Bacillus thuringiensis, in lipid rafts. In Coté, J., Otvos, I., Scwartz, J., Vincent C (Eds.). 6th Pacific Rim Conference on the Biotechnology of Bacillus thuringiensis and its Environmental Impact 113–115.

100. Abe, Y., Shimada, H. And Kitada, S. 2008. Raft-targeting and oligomerization of parasporin-2, a Bacillus thuringiensis crystal protein with anti-tumor activity. Journal of Biochemistry 143:269–275.

101. Brown, M. B.,Savva, C. G., Fernandes da costa, S.P. Naylor, C.L.,Basak, A.K. And Titball, R.W.2011. Molecular basis of toxicity of Clostridium perfringens epsilon toxin. FEBS Journal 278,4589–460.

102. Okumura, S., Saitoh, H., Ishikawa, T., Inouye, K. And Mizuki, E. 2011. Mode of action of parasporin-4, a cytocidal protein from Bacillus thuringiensis. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, 1808, 1476-1482.

103. Brasseur, K., Auger, P., Asselin, E., Parent, S., Cote, J.C. And Sirois, M. 2015. Parasporin-2 from a New Bacillus thuringiensis 4R2 Strain Induces Caspases Activation and Apoptosis in Human Cancer Cells.Plos One/DOI:10.1371/journal.pone.0135106.

104. Kitada, S., Abe, Y., And Shimada, H. 2011. Parasporin-2 receptor active on cáncer, and use thereof. European Patent Application.JP20090218868. 2009-09-24. Univ.Kyushu.

105. Elias Ferreira Sabia.2015. Detecção e Caracterização de Proteínas Parasporinas em *Bacillus thuringiensis*.Tesis.