Alternativa biotecnológica contra el cáncer: Parasporinas de *Bacillus thuringiensis***Biotechnological alternative against cancer: Parasporins of *Bacillus thuringiensis***

HERNANDEZ-SALAS, Yajaira^{1†}, HERNANDEZ-TERAN, Fernando¹, BALAGURURAMY, Nagamani², DE LA FUENTE-SALCIDO, Norma Margarita^{*1,2}

Universidad Autónoma de Coahuila, Facultad de Ciencias Biológicas, ¹Posgrado en Ingeniería Bioquímica, ²Dpto. Bioprospección y Bioprocesos.

ID 1^{er} Autor: Yajaira, Hernandez-Salas / ORC ID: 0000-0001-7981-9390, CVU CONACYT ID: 958630

ID 1^{er} Coautor: Fernando, Hernandez-Teran / ORC ID: 0000-0002-5984-4238

ID 2^{do} Coautor: Nagamani Balaguramy / ORC ID: 0000-0001-7818-2818, Researcher ID Thomson: M-7231-2015, CVU CONACYT ID 120942

ID 3^{er} Coautor: Norma, De La Fuente-Salcido / ORC ID: 0000-0001-8824-9529, CVU CONACYT ID: 295304

DOI: 10.35429/JBEB.2019.7.3.8.17

Recibido 12 de Enero, 2019; Aceptado 30 Marzo, 2019

Resumen

Actualmente el cáncer es una de las principales causas de muerte en todo el mundo. Los últimos reportes de la Organización Mundial de la Salud (OMS) del 2018 muestran cifras alarmantes que indican 18.1 millones de casos nuevos y registraron 9.6 millones de muertes por cáncer, con una prevalencia a 5 años de 43.8 millones de pacientes. La baja eficiencia de tratamientos convencionales contra el cáncer, ha generado investigaciones científicas enfocadas en identificar nuevos productos con especificidad para tratar eficientemente esta enfermedad. Diversos metabolitos bacterianos como las parasporinas (PS), proteínas citotóxicas de *Bacillus thuringiensis* (*Bt*), se han aplicado exitosamente contra diferentes líneas celulares de cáncer en los últimos 19 años. Por lo anterior, es importante en este trabajo contextualizar el cáncer como una problemática de salud global, y mencionar brevemente los tratamientos convencionales utilizados. Se describen las investigaciones más relevantes para aislar cepas de *Bt* productoras de PS, así como la clasificación, producción y purificación de estos metabolitos. Finalmente se menciona la naturaleza de la alta citotoxicidad de las 19 PS reportadas a la fecha, enfatizando la factibilidad de su aplicación como una terapia oncológica alternativa de alta citotoxicidad, y con gran potencial para tratar diversos tipos de cáncer.

Cáncer, Metabolitos, *Bacillus thuringiensis*

Abstract

Currently, cancer is one of the leading causes of death worldwide. The latest reports from the World Health Organization (WHO) of 2018 show alarming figures that indicate 18.1 million new cases and recorded 9.6 million deaths from cancer, with a 5-year prevalence of 43.8 million patients. The low efficiency of conventional cancer treatments has generated scientific research focused on identifying new products with specificity to efficiently treat this disease. Various bacterial metabolites such as parasporins (PS), cytotoxic proteins of *Bacillus thuringiensis* (*Bt*), have been successfully applied against different cancer cell lines in the past 19 years. Therefore, it is important in this work to contextualize cancer as a global health problem, and briefly mention the conventional treatments used. The most relevant investigations to isolate *Bt* strains producing PS are described, as well as the classification, production and purification of these metabolites. Finally, the nature of the high cytotoxicity of the 19 PS reported to date is mentioned, emphasizing the feasibility of its application as an alternative high-cytotoxicity cancer therapy, and with great potential to treat various types of cancer.

Cancer, Metabolites, *Bacillus thuringiensis*

Citación: HERNANDEZ-SALAS, Yajaira, HERNANDEZ-TERAN, Fernando, BALAGURURAMY, Nagamani, DE LA FUENTE-SALCIDO, Norma Margarita. Alternativa biotecnológica contra el cáncer: Parasporinas de *Bacillus thuringiensis*. Revista de Ingeniería Biomédica y Biotecnología. 2019. 3-7: 8-17

* Correspondencia del autor (Correo electrónico: normapbr322@gmail.com)

† Investigador contribuyendo como primer autor

Introducción

El cáncer se considera la segunda causa de muerte a nivel mundial, engloba a un grupo de más de 200 diferentes tipos de la enfermedad caracterizada por el acelerado y desordenado crecimiento de células anormales (Bustamante, Marín y Cardona, 2012), algunas con mayor incidencia en mujeres que en hombres y viceversa, y otras exclusivas por género. Las estadísticas mundiales del 2018 de la Organización mundial de la Salud (OMS, 2018) registraron 8.1 millones de casos nuevos y 9.6 millones de muertes por cáncer con una prevalencia a 5 años de 43.8 millones de pacientes. Se reportaron los más comunes tipos de cáncer responsables de fallecimientos considerando al cáncer pulmonar (1,69 millones de muertes), cáncer hepático (788 000 defunciones), cáncer colorrectal (774 000 muertes), cáncer gástrico (754 000 defunciones) y de mama (571 000 muertes) (OMS, 2017).

En México la problemática epidemiológica del cáncer es alarmante, incluye a dos de cada 100 000 pacientes de 0 a 17 años fallecidos anualmente por tumores hematopoyéticos (principalmente leucemia) y también diferenciando por género se mencionan jóvenes de 18 a 29 años, mueren tres de cada 100 000 hombres y dos de cada 100 000 mujeres por esta causa. También registraron tres de cada 10 muertes por cáncer en la población de 30 a 59 años, por cáncer en órganos digestivos. Para la población de 60 y más años, de 2011 a 2016, cuatro de cada 10 defunciones por cáncer en mujeres es consistente con tumores en órganos digestivos, contra tres de cada 10 en varones, por esta causa. Con respecto al temido y cada vez más común cáncer de mama, ocasionó 16 defunciones por cada 100 000 mujeres de 20 años y más, de acuerdo a reportes del Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI, 2018).

Tratamientos actuales contra el cáncer

Actualmente existen numerosos tipos de tratamientos contra el cáncer cuya administración se decide de acuerdo al tipo y avance de la enfermedad, sin embargo, la mayoría de los pacientes pueden recibir una combinación de tratamientos como cirugía con quimioterapia (aplicación de fármacos para atacar las células malignas) o con radioterapia (dosis de radiación para reducir/eliminar tumores).

Un tratamiento convencional por quimioterapia es reconocido como terapia estándar, tradicional o citotóxica que utiliza diversos fármacos fuertes, pero en los tratamientos novedosos se incluyen la *terapia dirigida (personalizada)* y la *inmunoterapia (terapia biológica)*.

Los tratamientos dirigidos o personalizados utilizan fármacos dirigidos para inhibir los genes y/o sus fusiones con oncogénico (NTRK, ROS1, ALK), o las proteínas (TRK) involucradas en la señalización y el crecimiento de las células malignas (Cocco et al. 2018; Amatu et al. 2016). Algunos de los productos involucrados en terapia personalizada son Entrectinib, LOXO-101, Altiratinib, TSR-011, PLX7486, DS-6051b, cabozantinib, sitravatinib, entre otros (Hong et al. 2019; Kheder y Hong 2018; Burris et al. 2015).

La inmunoterapia es un ejemplo de cómo las proteínas de las células inmunes pueden usarse para manipular el sistema inmunitario para que ataque el cáncer (Caltesvecchi et al. 2016), principalmente a los inhibidores del punto de control inmunitario (PCI) y las células T del receptor de antígeno quimérico (RAQ). El tratamiento por inmunoterapia utiliza hormonas y fármacos que actúan conjuntamente con determinadas partes del sistema inmune causando efectos como detener/retrasar el crecimiento celular, evita la diseminación del cáncer y fortalece el sistema inmunitario para destruir las células cancerosas (ACS 2016, www.cancer.org).

Es evidente que la inhibición de la regulación inmune negativa generada por la terapia biológica, ha mejorado el pronóstico de muchos pacientes con diversas neoplasias malignas hematológicas y sólidas. Principalmente la inmunoterapia utiliza fármacos como los *anticuerpos monoclonales* (proteína artificiales o diseñadas para atacar una parte muy específica de una célula cancerosa); *inhibidores del punto de control inmunitario* (modifican al sistema inmunitario para que reconozca y ataque las células cancerosas) (Tang et al. 2018); *virus oncolíticos* genéticamente modificados (se replican selectivamente en tumores, pero no en tejidos normales, y libera antígenos tumorales utilizados por el sistema inmune para lisar tumores) (Suhail et al. 2019)

Vacunas (aplicadas *in situ*, inician la respuesta inmune para prevenir o tratar el cáncer) (Hammerich et al. 2019); células T del receptor de antígeno quimérico (cT-RAQ) (células extraídas del enfermo, modificadas en el laboratorio y al aplicarlas al paciente, se auto-amplifican y destruyen células cancerígenas) (Hartmann et al. 2017). La inmunooncología tiene un panorama alentador pues una gran cantidad de drogas pueden aplicarse específicamente en diversas inmunoterapias, tal como reportó Tang en 2017 incluyendo los inmuno-moduladores para células T, anticuerpos monoclonales (Ipilimumab, Nivolumab, Pembrolizumab, Atezolizumab, Avelumab y Durvalumab) (NCCN 2018); algunos virus oncolíticos (Oncorine, Talimogene laherparepvec); vacunas (BCG, ImmuCyst, Immuno BCG, Mycidac-C, Sipuleucel-T, TICE BCG, Uro-BCG); y productos para terapia celular (Tisagenlecleucel, Axicabtagene ciloleucel).

Para hacer frente a una enfermedad tan terrible como el cáncer que sigue aumentando su incidencia mundialmente, se necesitan nuevas estrategias o tipos de fármacos además de los mencionados anteriormente, y esas estrategias pueden derivarse de ampliar las investigaciones biotecnológicas apoyadas económica y políticamente por el gobierno de los países para continuar la lucha contra el cáncer.

Tratamientos alternativos contra el cáncer

Los avances en la biotecnología han permitido generar múltiples soluciones a problemáticas de salud humana, y el cáncer no es la excepción. En la búsqueda de nuevas alternativas a tratamientos contra el cáncer, se ha puesto especial atención en principios activos de origen natural (Demain y Arnold, 2014), específicamente los compuestos producidos por microorganismos como las bacterias. Los compuestos de importancia farmacéutica obtenidos de microorganismos son el resultado de múltiples estudios e investigaciones de su potencial como fuente de compuestos bioactivos llevados a cabo por un gran número de laboratorios en todo el mundo. Uno de los esfuerzos más sobresalientes consiste en producir metabolitos microbianos que ejerzan un efecto contra diversas células cancerosas, como es el caso de las parasporinas sintetizadas por el *Bacillus thuringiensis* (*Bt*), la bacteria entomopatógena más famosa y efectiva en todo el mundo.

Generalidades de *Bacillus thuringiensis*

Bacillus thuringiensis se considera una bacteria cosmopolita aislada de un sinnúmero de lugares y ambientes, como zonas desérticas, bosques templados y tropicales, selvas, cultivos agrícolas, árboles, entre otros (Sauka et al. 2008). Este bacilo gram positivo, aerobio, móvil (peritrica) y formador de esporas se caracteriza bioquímicamente por la fermentación de carbohidratos (glucosa, fructosa, trealosa, maltosa y ribosa), hidrólisis de gelatina, almidón, glucógeno, esculina y N-acetilglucosamina (Schnepf et al. 1998). La principal característica fenotípica distintiva de *Bt* es la síntesis de un cristal parasporal de naturaleza proteica, constituida por cuerpos cristalinos denominados delta-endotoxinas efectivas contra invertebrados como las larvas de insectos (Vilas-Bôas et al. 2007).

Potencial biotecnológico de *Bacillus thuringiensis*

La versatilidad del metabolismo de *Bt* lo han posicionado como uno de los microorganismos más utilizados en diversas aplicaciones biotecnológicas (Figura 1). Las proteínas tóxicas (Cry) son los productos metabólicos más conocidos de *Bt* seguidas de las proteínas citotóxicas (Cyt) por su aplicación para desarrollar bioinsecticidas contra plagas de dípteros, lepidópteros, coleópteros, ácaros, entre otras. Hasta el día de hoy, un gran número de cepas de *Bt* se han aislado y clasificado en 71 serotipos H de acuerdo a las reacciones inmunológicas flagelares agrupando más de 300 holotipos de toxinas.

Se han reportado 73 familias de toxinas cristalinas (Cry) que incluyen 732 toxinas, tres familias de proteínas citotóxicas (Cyt) que comprenden 30 toxinas y 4 familias de proteínas insecticidas vegetativas (Vip) con 125 integrantes (Crickmore et al. 2014; Okumura et al. 2010).

Figura 1 Versatilidad metabólica y aplicaciones biotecnológicas de *Bacillus thuringiensis*.

La aplicación biotecnológica de *Bt* y/o sus metabolitos se ha expandido significativamente y ya no solo se limita al control biológico como bioplaguicida por las proteínas Cry, Cyt y Vip.

Lo anterior se debe al descubrimiento de otras moléculas proteicas como las quitinasas (Chi que actúan sinérgicamente con las proteínas Cry para potenciar el efecto insecticida, cuya sinergia con las proteínas Cry potencian el efecto insecticida, pero además, atacan diversos microorganismos fitopatógenos ejerciendo un biocontrol como herbicida (De la Fuente-Salcido et al. 2016). Se han aislado bacteriocinas (thuricinas) potentes antimicrobianos proteicos que inhiben patógenos en áreas de la biocorservación de alimentos, la salud humana y animal.

Algunas cepas también sintetizan sideróforos e hidrolasas que intervienen en la biorremediación de metales e hidrocarburos. Además producen diversos promotores crecimiento vegetal (ACC-desaminasa, fenilalanina amonoliasa, peroxidasa, sideróforos, entre otras) que le confieren a *Bt* una aplicación agronómica como bioestimulantes y biofertilizantes (Azizoglu 2019; García-Fraile et al. 2012), además del efecto bioherbicida reportado para los antibióticos (zwittermicina), antifúngicos (bacteriocinas, quitinasas) y lipopolipéptidos (iturinas) sintetizados como metabolitos secundarios (Sansinenea y Ortíz 2011).

Además sintetizan las proteínas citotóxicas conocidas como parasporinas (PS) cuya aplicación a futuro como bioterapéuticos (biomedicina) es muy prometedora debido a la actividad específica que ejercen contra células de cáncer en humanos (López-De la Cruz et al. 2018; Hollensteiner et al. 2016; Palma et al. 2014).

Generalidades de las parasporinas de *Bacillus thuringiensis*

Diversas cepas de *Bt* aisladas de nichos ecológicos en Canadá, Japón, Vietnam, India, México, Isla Trinidad en el Caribe e Irán (Velázquez et al. 2018), se han seleccionado en los últimos 19 años para investigar dos características particulares como son la nula producción de hemólisis y la síntesis de proteínas Cry sin actividad insecticida pero con capacidad citocida única contra diversas líneas celulares de cáncer, las parasporinas. Una *parasporina* (PS) se define formalmente como una proteína parasporal bacteriana que es capaz de matar discriminadamente las células cancerosas (Periyasamy et al. 2016; Mizuki et al. 2000).

Como se observa en la Tabla 1, a la fecha existen reportadas 19 PS clasificadas taxonómicamente en 6 familias (PS1, PS2, PS3, PS4, P5 y PS6) con base en la identidad de aminoácidos, además son nombradas de acuerdo al Comité de Clasificación y Nomenclatura de Parasporinas y definidas con su correspondiente número de acceso en el GenBank del Centro Nacional de Información Biotecnológica (National Center for Biotechnology Information: NCBI) (www.ncbi.nlm.nih.gov; Okumura et al. 2010).

Es conveniente mencionar que aunque existen 29 secuencias parciales o completas de PS reportadas pero únicamente las mencionadas en la Tabla 1 son consideradas por la clasificación y nomenclatura oficial que utiliza el mismo sistema de letras y números para las toxinas Cry, Cyt y Vip de *Bt*, denominando a las PS como una nueva clase de proteínas que incluye cuatro rangos, por ejemplo PS100Aa1 (Okumura et al. 2010).

Familia	Tipo	Cepa productora <i>Bacillus thuringiensis</i>	Definición GenBank*	Línea celular blanco	No. Acceso GenBank*	Referencia
PS 1	Aa1	A1190	81-kDa Toxina de leucemia	Linfocitos T	AB031065	Mizuki et al. 2000
	Aa2	M 15	83-KDa Proteína cristalina	Varios tipos cáncer (hepatocitos, cérvix, células T)	AY081052	Jung et al. 2007
	Aa3	B195	81-kDa Proteína	Cáncer uterino (células de cuello uterino)	AB250922	Uemori et al. 2008
	Aa4	Bt 79-25	Proteína hipotética	Leucemia (MOLT-4)	AB274826	Yasutake et al. 2008
	Aa5	Bt 92-10	Proteína hipotética	Leucemia (MOLT-4)	AB274827	Yasutake et al. 2008
	Aa6	64-1-94 M 15 M019	M019CP78A (plásmido)	Hepatocitos, cérvix	AB375062	Nagatsuo et al. 2010
	Ab1	B0195	82-kDa Proteína like-Cry31	Cáncer uterino (células de cuello uterino)	AB250923	http://parasporin.fittc.pref.fukuoka.jp/index.html
	Ab2	Bt 31-5	Proteína hipotética	Leucemia (MOLT-4)	AB274825	Hayakawa et al. 2007
	Ac1	Bt 87-29	Proteína hipotética	Leucemia (MOLT-4)	AB276125	Yamashita et al. 2005
	Ac2	B0462	Gene proteína like-parasporina 1	ND	AB731600	Yamashita et al. 2005
	Ad1	64-1-94 M 15 M019	M019CP78B (plásmido)	Hepatocitos, cérvix	AB375062	Nagatsuo et al. 2010
	Aa1	A1547	Proteína cristalina	Varios tipos cáncer	AB099515	Itoh et al. 2004
	Aa2	A1470	Parasporina 2	ND	AB454419	http://parasporin.fittc.pref.fukuoka.jp/index.html
PS 2	Ab1	TK-E6	Proteína cristalina	Leucemia (MOLT-4)	AB186914	Hayakawa et al. 2007
PS 3	Aa1	A1462	Proteína Cry aniquila células cancerosas parasporina-3	Leucemia mieloide (HL60) Cáncer de hígado (HepG2)	AB116649	Yamashita et al., 2005
	Ab1	A1462	Proteína Cry aniquila células cancerosas	Leucemia mieloide (HL60) Cáncer de hígado (HepG2)	AB116651	Yamashita et al., 2005
PS 4	Aa1	A1470 T98	1470 Da Gene parasporina	Leucemia (MOLT-4)	AB180980	Okumura et al., 2004
PS 5	Aa1	A1100	Proteína cristalina Gen ps-5	ND	AB555650	http://parasporin.fittc.pref.fukuoka.jp/index.html
PS 6	Aa1	64-1-94 M 15 M019	M019CP84 (plásmido)	Hepatocitos, cérvix	AB375063	Nagatsuo et al., 2010

Tabla 1 Clasificación de las parasporinas sintetizadas por *Bacillus thuringiensis*. (Adaptada: <http://parasporin.fittc.pref.fukuoka.jp>)

Un ejemplo de PS ausentes en la clasificación formal pero importantes por su actividad anticancerígena es la PS Malasia que no causa hemólisis en eritrocitos humanos, pero es tóxica y efectiva en el control de insectos (*Aedes aegypti*) (Chan et al. 2007; Nadarajah et al. 2006). Todas las proteínas PS aisladas y purificadas de distintas cepas de Bt, se diferencian en los pesos moleculares, estructuras, especificidad, receptores celulares y el rango citotóxico de actividad (Velázquez et al. 2018; Katayama et al. 2011).

La confirmación de la capacidad de una cepa para producir PS requiere una varios estudios que incluyen análisis preliminares y pruebas de hemólisis con eritrocitos humanos o de ovejas (Chubicka et al. 2018), además de bioensayos en larvas de insectos específicos previamente ensayados con proteínas insecticidas Cry para descartar la toxicidad (Chubicka et al. 2018; Uemori et al. 2007). Posteriormente se ensaya la toxicidad de las PS contra diversas líneas celulares de cáncer y el efecto hacia células sanas que debe ser nulo o muy bajo (Ohba et al. 2009).

Recientes análisis *in silico* sugieren que las PS son ligeramente ácidas en función de sus puntos isoeléctricos (pI) que varían de 5.12 a 6.19, con los índices alifáticos altos (62.54 a 94.75) que indican termoestabilidad. También *in silico* se realizó la predicción de la localización celular de las PS principalmente en el citoplasma, excepto las PS3 y PS4 que se ubican en membrana celular y son hidrosolubles (hidrofobicidad media negativa). No poseen sitios de anclaje GPI (glicosidil-fosfatidil inositol) porque carecen de sitios fosfatidil-inositol (Aktar et al. 2019) y no poseen un péptido señal (proteína secretora), pero las PS de tres dominios contienen algunas hélices transmembranales y las demás proteínas tienen ínfimas hélices transmembrana. (Tabla 1).

Las PS en general son sintetizadas por *Bt* como protoxinas que requieren activarse a su forma tóxica mediante la solubilización a pH ácido o alcalino y posteriormente por hidrólisis con serín-proteasas específicas (proteínaasa K, tripsina) (Chengchen et al. 2014).

La especificidad citotóxica de las PS contra células cancerígenas blanco, sugiere la presencia de alguna proteína o lípido similar a un receptor en la superficie celular. Por esta razón, la identificación del receptor puede proporcionar algún conocimiento sobre el mecanismo de especificidad de la célula blanco y citotoxicidad de la PS (Okumura et al. 2005).

Mecanismos de acción y receptores de las parasporinas

En general, los reportes de la acción de la PS indican una alta actividad citotóxica contra diversas líneas celulares de cáncer humano, y en baja o nula intensidad contra células humanas normales (Costa Argôlo-Filho y Lopes-Loguercio 2014) (Tabla 2). Las PS pueden requerir diferentes tiempos para inducir la toxicidad, pues se ha reportado que los tipos PS2Aa1, PS3Aa1 y PS4Aa, inducen la citotoxicidad durante una hora y la PS1Aa1 de 8 a 10 horas, lo que sugiere la existencia de diferentes mecanismos de acción (Okassov et al. 2015).

Se ha sugerido modo de acción muy similar a las proteínas Cry para las PS de mayor peso molecular (PS1, PS3, PS6), mientras que las PS de mas bajo peso molecular (PS2, PS4 y PS5) muy relacionadas estructuralmente con las proteínas de *Bt* formadoras de poros (epsilón, aerolisinas, citolisinas) y con su mecanismo de acción, y con poca relación con las proteínas Cry (Akiba et al. 2009; Knapp et al. 2010). De acuerdo a lo anterior y a los reportes revisados se puede decir que la PS1Aa1 actúa sin formación de poros en membrana (Katayama et al. 2005), la PS2Aa se considera toxina formadora de poros que incrementa la permeabilidad de las células cancerígenas (HepG2) que ataca (Akiba et al. 2009; Kitada et al., 2006), y la PS3Aa1 tiene actividad muy similar formando poros permeabilizando la membrana de células cancerosas (Ohba et al. 2009).

Para la PS4 se estableció una acción de lisis por pérdida de integridad de membrana mediante estudios de inserción, oligomerización y afinidad a las membrana plasmáticas (MOLT-4 y Caco-2) (Okumura et al. 2005; 2008; 2011). Se ha sugerido que la PS5 actúa formando canales en membrana celular, debido a la similitud de la acción de la toxina epsilón de *Clostridium perfringens* (Knapp et al. 2009). La única integrante de tipo PS6, la PS6Aa1 presenta un modo de acción muy similar a la PSI, lo cuál se debe a que comparten un secuencia conservada en los primeros 50 aminoácidos en sus forma de protoxinas (Gonzalez et al. 2011); la PS6Aa1 es la menos estudiada de las PS y por lo tanto, se conoce poco de su mecanismo de acción y del efecto citotóxico. (Velásquez et al. 2018)

Como se puede observar existen pocas publicaciones que confirmen hasta el día de hoy los mecanismos de acción de las PS, incluso para algunas son totalmente desconocidos o se tienen solamente deducciones. Sin embargo, la información reportada sugiere que cada PS posee un mecanismo particular para inducir la muerte selectiva de las células cancerígenas blanco (Krishnan 2013). Con respecto a los estudios de los receptores de membrana para las PS, el panorama no es muy diferente a las investigaciones del modo de acción, y solamente se infiere que al igual que en las proteínas Cry insecticidas, debe existir una interacción particular de cada PS con el receptor para conferirle la especificidad característica hacia las células blanco (Pigott y Ellar, 2007).

Aplicación de las Parasporinas y su heterogéneo espectro de actividad

El espectro de actividad anticancerígena o efecto citotóxico de las PS es específico o selectivo contra un determinado tipo de línea celular, más que a una clase de cáncer y se realiza sin afectar a las celular normales (Okumura et al. 2011; Chengchen et al. 2014) (Tabla 2).

La mayoría de las proteínas Cry agrupadas como PS no actúan de la misma manera sobre las células cancerígenas susceptibles, siendo las más susceptibles aún en bajas concentraciones de PS las líneas HL-60 (leucemia) y HepG2 (cáncer hepático) (Velásquez et al. 2018).

Tipo Células/ Cáncer	Células									
	T	Hepáticas	Uterinas	Pulmón	Leucemia	Cáncer de hígado	Cáncer cervical	Cáncer de endometrio	Cáncer de pulmón	Cáncer de colon
Línea celular ensayada	Linfocitos T	HC	USMC	MRC-5	MOLT-4 Jurkat HL-60 CEM-SS U937-DE4 K562	HepG2	HeLa TSC	Sawano	A549	CACO-2
Parasporina citotóxica	PS1Aa1 PS2Aa1 PS3Aa1 PS4Aa1	PS1Aa1 PS2Aa1 PS3Aa1 PS4Aa1	PS1Aa1 PS2Aa1 PS3Aa1 PS4Aa1	PS1Aa1 PS2Aa1 PS3Aa1 PS4Aa1	PS1Aa1, PS2Aa1, PS3Aa1, PS4Aa1, PS5Aa1, PS6Aa1	PS1Aa1 PS2Aa1 PS3Aa1 PS4Aa1 PS5Aa1 PS6Aa1	PS1Aa1, PS2Aa1, PS3Aa1, PS4Aa1, PS5Aa1, PS6Aa1	PS1Aa1 PS2Aa1 PS3Aa1 PS4Aa1 PS5Aa1 PS6Aa1	PS2Aa1 PS3Aa1 PS4Aa1 PS5Aa1 PS6Aa1	PS1Aa1 PS2Aa1 PS3Aa1 PS4Aa1 PS5Aa1 PS6Aa1
					PS1Aa1, PS2Aa1, PS3Aa1, PS4Aa1, PS5Aa1, PS6Aa1					

Tabla 2 Líneas celulares de cáncer susceptibles a las parasporinas de *Bacillus thuringiensis*

El Instituto Nacional del Cáncer en Estados Unidos (NIH) establece claramente la imperiosa necesidad de desarrollar investigaciones sobre los tratamientos contra el cáncer y aplicar los conocimientos adquiridos para mejorar los efectos de los agentes anticancerosos y permitir a los pacientes recibir un tratamiento efectivo (www.cancer.gov).

En México el Instituto Nacional de Cancerología (INCan) proporciona servicios médicos especializados a enfermos oncológicos, siendo el centro de referencia en los tratamientos y la investigación del cáncer en nuestro país (www.incan.salud.gob.mx). Los esfuerzos de estas y otras Instituciones en el mundo para promover el incremento de la investigación a corto plazo de las PS de *Bt* permitirá ampliar el conocimiento de la naturaleza biológica, la actividad y el modo de acción de estas toxinas y acelerar su aplicación como una alternativa bioterapéutica para tratar esta terrible enfermedad.

Sin embargo, es importante recordar que de acuerdo a los datos de la Organización mundial de Salud (OMS), al menos un tercio de todos los casos de cáncer pueden prevenirse, y la prevención también constituye una estrategia a largo plazo muy eficaz para el control del cáncer (www.who.int/cancer).

Mecanismos de acción de las Parasporinas

Los mecanismos estudiados para tratar de explicar la acción anticancerígena de las PS son diversos y los más reconocidos y reportados son la apoptosis y la necrosis. La apoptosis o muerte celular programada, es un mecanismo celular controlado genéticamente caracterizado por la inducción de la muerte por las mismas células, como una respuesta a varios estímulos. Un proceso apoptótico también se conoce como un "suicidio celular" (Ellis et al. 1991). Las células cancerosas no sufren apoptosis por sí mismas y la evolución del cáncer elige las células por su alta actividad proliferativa y elevada capacidad de supervivencia (Ryan 2011).

La PS1 produce apoptosis al desarrollar un mecanismo para destruir células cancerosas mediante un rápido incremento de la concentración intracelular de Ca^{++} en las células HeLa (Ohba et al. 2009). Este mecanismo también se ha reportado para la acción de la PS Malasia que genera modificaciones morfológicas típicos de la apoptosis en las células de leucemia susceptibles (Chan et al. 2012), además, Katayama en 2007 reportó la muerte de las células cancerosas HeLa y CEM-SS por inducción de la apoptosis por las PS1 y PS Malasia.

La necrosis se caracteriza por la destrucción de la membrana citoplasmática como son la formación de poros, sugiriendo la unión secuencial en dos etapas de la PS al receptor específico (pre-poro) y posteriormente se oligomeriza e inserta la toxina para formar poros que causan un desequilibrio osmótico celular que causa la. Como se mencionó anteriormente, este mecanismo se propuso para las PS por su semejanza con las toxinas Cry formadoras de poros (TFP) que causan la muerte en insectos y nematodos por necrosis de las células epiteliales intestinales (Fernández-Chapa et al. 2019).

Las PS2 (PSAa1) realizan este mecanismo uniéndose específicamente al receptor Hep27 ubicado en la membrana plasmática de las células cancerosas, originando la formación de poros, lisis celular y posterior muerte por necrosis (Okassov et al. 2015). Este mecanismo de muerte celular confirmado experimentalmente para las PS2 y PS4 de acuerdo a la similitud con las toxinas β -TFP (aerolisinas, citolisina) como se mencionó anteriormente en los mecanismos de acción y receptores (Mahalakshmi y Shenbagarathai 2010; Okumura et al. 2011).

Conclusiones

Las parasporinas sintetizadas por *Bacillus thuringiensis* que ejercen una actividad citotóxica específica contra células cancerosas, representan un reto muy interesante para los investigadores que estudian las proteínas no insecticidas de esta multifacética bacteria entomopatógena. Es imperativo conocer a detalle las características estructurales, determinar los mecanismos de acción contra diversas líneas celulares cáncer en humanos y determinar la especificidad de estas parasporinas, para lograr aprovechar el gran potencial biotecnológico que poseen como bioterapéuticos. La alarmante problemática epidemiológica del cáncer requiere productos alternativos novedosos y eficientes como las parasporinas, para afrontar el gran desafío que representan las más de 200 distintas patologías a nivel mundial.

Referencias

- Akiba, T., Abe, Y., Kitada, S., Kusaka, Y., Ito, A., Ichimatsu, T., ... Harata, K. (2009). Crystal Structure of the Parasporin-2 *Bacillus thuringiensis* Toxin That Recognizes Cancer Cells. *Journal of Molecular Biology*, 386(1), 121–133.
- Amatu, A., Sartore-Bianchi, A., & Siena, S. (2016). NTRK gene fusions as novel targets of cancer therapy across multiple tumour types. *ESMO Open*.
- American Cancer Society. (2017). What is Breast Cancer? Recuperado el 20 de octubre de 2017, disponible en: <https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer/about/what-is-breast-cancer>

Argôlo-Filho, R. C., & Loguercio, L. L. (2014). *Bacillus thuringiensis* is an environmental pathogen and host-specificity has developed as an adaptation to human-generated ecological niches. *Insects*, 5(1), 62-91

Azizoglu, U. (2019). *Bacillus thuringiensis* as a Biofertilizer and Biostimulator: a Mini-Review of the Little-Known Plant Growth-Promoting Properties of *Bt*. *Current Microbiology*. Springer New York LLC.

Burris, H. A., Shaw, A. T., Bauer, T. M., Farago, A. F., Doebele, R. C., Smith, S., ... Brose, M. S. (2015). Abstract 4529: Pharmacokinetics (PK) of LOXO-101 during the first-in-human Phase I study in patients with advanced solid tumors: Interim update. *Cancer Research*, 4529–4529.

Bustamante, L. M., Marín S.J., Cardona D. (2012). Mortalidad por cáncer: segunda causa de muerte del adulto mayor en Medellín, 2002-2006. *Rev. Fac. Nac. Salud Pública* 30, 17-25.

Chan, K. K., Wong, R. S. Y., Mohamed, S. M., Ibrahim, T. A. T., Abdullah, M., & Nadarajah, V. D. (2012). *Bacillus thuringiensis* parasporal proteins induce cell-cycle arrest and caspase-dependant apoptotic cell death in leukemic cells. *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology*, 31(1), 75–86.

Chan, K.K., Nadarajah, V.D. & Ju Lee T. (2007). Development of a Purification Method of Pure Primary Lymphocytes for cell Viability Assays. *Malays J Med Sci*, 14(1), 38–45.

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

Chengchen, X., Bi-cheng, W. & Ming, S. (2014). Structural Insights into *Bacillus thuringiensis* Cry, Cyt and Parasporin Toxins. *Toxins* 6: 2732-2770.

Chubicka, T., Giriya, D., Deepa, K., Salini, S., Meera, N., Raghavamenon, A. C., ... Babu, T. D. (2018). A parasporin from *Bacillus thuringiensis* native to Peninsular India induces apoptosis in cancer cells through intrinsic pathway. *Journal of Biosciences*, 43(2), 407–416.

Ciccarese, C., Alfieri, S., Santoni, M., Santini, D., Brunelli, M., Bergamini, C., ... Massari, F. (2016). New toxicity profile for novel immunotherapy agents: Focus on immune-checkpoint inhibitors. *Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology*. 12, 57–75.

Cocco, E., Scaltriti, M., & Drilon, A. (2018). NTRK fusion-positive cancers and TRK inhibitor therapy. *Nature Reviews Clinical Oncology*. 15: 731–747.

Crickmore N., Zeigler D.R., Schnepf E., van Rie J., Lereclus D., Baum J., Bravo A., Dean D.H. *Bacillus thuringiensis* Toxin Nomenclature. Accessed 2019. Available online: http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt

De la Cruz D, L. de, Castro CM, V., Teran F, H., Corona JE, B., & Salcido NM, de la F. (2018). Antibacterial Activity of Native *Bacillus thuringiensis* Strains from Fernandez Canyon State Park, Mexico. *Journal of Antimicrobial Agents*, 04(01), 1-5.

De la Fuente-Salcido, N. M., Casados-Vázquez, L. E., García-Pérez, A. P., Barboza-Pérez, U. E., Bideshi, D. K., Salcedo-Hernández, R., ... Barboza-Corona, J. E. (2016). The endochitinase ChiA Btt of *Bacillus thuringiensis* subsp. *tenebrionis* DSM-2803 and its potential use to control the phytopathogen *Colletotrichum gloeosporioides*. *MicrobiologyOpen*, 5(5), 819–829.

Demain, A. L. (2014). Importance of microbial natural products and the need to revitalize their discovery. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 41: 185–201

Ellis, R.E., Yuan, J.Y. & Horvitz, H.R. (1991). Mechanisms and functions of cell death. *Annual Review of Cell Biology*, 7, 663–698.

Estadísticas a propósito del día mundial contra el cáncer (4 de febrero). Boletín informativo. <https://www.inegi.org.mx/>

Fernández-Chapa, D., Ramírez-Villalobos, J., & Galán-Wong, L. (2019). Toxic Potential of *Bacillus thuringiensis*: An Overview . *IntechOpen*.

- García-Fraile, P., Carro, L., Robledo, M., Ramírez-Bahena, M. H., Flores-Félix, J. D., Fernández, M. T., ... Velázquez, E. (2012). Rhizobium promotes non-legumes growth and quality in several production steps: Towards a biofertilization of edible raw vegetables healthy for humans. PLoS ONE, 7(5).
- Gonzalez, E., Granados, J. C., Short, J. D., Ammons, D. R., & Rampersad, J. (2011). Parasporins from a Caribbean Island: Evidence for a globally dispersed *Bacillus thuringiensis* strain. Current Microbiology, 62(5), 1643–1648.
- Hartmann, J., Schübler-Lenz, M., Bondanza, A., & Buchholz, C. J. (2017). Clinical development of CAR T cells—challenges and opportunities in translating innovative treatment concepts. EMBO Molecular Medicine, 9(9), 1183–1197.
- Hideki Katayama, Munakata-shi; Yoshitomo Kusaka, Kurume-shi ; Eiichi Mizuki, Kurume-shi. (2011) PARASPORIN-1 RECEPTOR AND USE THEREOF. Patent Application Publication.
- Hollensteiner, J., Wemheuer, F., Harting, R., Kolarzyk, A. M., Diaz Valerio, S. M., Poehlein, A., ... Liesegang, H. (2017). *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus weihenstephanensis* inhibit the growth of phytopathogenic *Verticillium* species. Frontiers in Microbiology, 7(2171)
- Hoq, Md. M. (2019). In silico Studies of Parasporin Proteins: Structural and Functional Insights and Proposed Cancer Cell Killing Mechanism for Parasporin 5 and 6. Microbial Bioactives, 2(1), E082–E090.
- Katayama, H., Yokota, H., Akao, T., Nakamura, O., Ohba, M., Mekada, E., & Mizuki, E. (2005). Parasporin-1, a novel cytotoxic protein to human cells from non-insecticidal parasporal inclusions of *Bacillus thuringiensis*. Journal of Biochemistry, 137(1), 17–25.
- Kheder, E. & Hong, D. (2018). Emerging Targeted Therapy for Tumors with NTRK Fusion Proteins. Clin. Cancer Research 24: 5807-5814
- Kim, D. H., Ahn, J. S., Han, H. J., Kim, H.-M., Hwang, J., Lee, K. H., ... Kim, B. Y. (2019). Cep131 overexpression promotes centrosome amplification and colon cancer progression by regulating Plk4 stability. Cell Death & Disease, 10(8).
- Kitada, S., Abe, Y., Shimada, H., Kusaka, Y., Matsuo, Y., Katayama, H., ... Ito, A. (2006). Cytocidal actions of parasporin-2, an anti-tumor crystal toxin from *Bacillus thuringiensis*. Journal of Biological Chemistry, 281(36), 26350–26360.
- Knapp, O., Stiles, B. & Popoff, M. (2010) The Aerolysin-Like Toxin Family of Cytolytic, Pore-Forming Toxins. The Open Toxinology Journal, 3 (1), 53 - 68.
- 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.
- Mahalakshmi, A., & Shenbagarathai, R. (2010). Homology modeling of cry10aa toxin from *B. thuringiensis israelensis* and *B. thuringiensis subsp. LDC-9*. Journal of Biomolecular Structure and Dynamics, 28(3), 363–378.
- Mizuki, E., Park, Y. S., Saitoh, H., Yamashita, S., Akao, T., Higuchi, K., & Ohba, M. (2000). Parasporin, a human leukemic cell-recognizing parasporal protein of *Bacillus thuringiensis*. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, 7(4), 625–634.
- Nadarajah, V. D., Chai, S. H., Mohammed, S. M., Chan, K. K., & Kanakeswary, K. (2006). Malaysian mosquitocidal soil bacterium (*Bacillus thuringiensis*) strains with selective hemolytic and lectin activity against human and rat erythrocytes. Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health, 37(1), 67–78.
- National Center for Biotechnology Information 2019: NCBI www.ncbi.nlm.nih.gov
- Ohba, M., Mizuki, E., & Uemori, A. (2009). Parasporin, a new anticancer protein group from *Bacillus thuringiensis*. Anticancer Research, 29(1), 427–433.
- Okassov, A., Nersesyan, A., Kitada, S. & Ilin, A. (2015). Parasporins as new natural anticancer agents: A Review. JBUON, 20(1), 5-16.

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

Okumura, S., Saitoh, H., Ishikawa, T., Inouye, K., & Mizuki, E. (2011). Mode of action of parasporin-4, a cytotoxic protein from *Bacillus thuringiensis*. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1808(6), 1476–1482.

Okumura, S., Saitoh, H., Ishikawa, T., Mizuki, E., & Inouye, K. (2008). Identification and characterization of a novel cytotoxic protein, parasporin-4, produced by *Bacillus thuringiensis* A1470 strain. *Toxins*, 6(9), 2732–277.

Okumura, S., Saitoh, H., Ishikawa, T., Wasano, N., Yamashita, S., Kusumoto, K. I., ... Inouye, K. (2005). Identification of a novel cytotoxic protein, Cry45Aa, from *Bacillus thuringiensis* A1470 and its selective cytotoxic activity against various mammalian cell lines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(16), 6313–6318.

Organización Mundial de la Salud [OMS]. (2017). Cáncer. Press release. Recuperado el 19 de septiembre de 2017, Disponible en: <https://www.who.int/cancer/about/facts/es/>

Organización Mundial de la Salud [OMS]. (2018). Cáncer. Press release. Recuperado el 12 de septiembre de 2018, Disponible en: <https://www.who.int/cancer/about/facts/es/>

Palma, L., Muñoz, D., Berry, C., Murillo, J. & Caballero P. (2014) *Bacillus thuringiensis* Toxins: An Overview of Their Biocidal Activity. *Toxins* 6(12): 3296–3325.

Periyasamy, A., Kkani, P., Chandrasekaran, B., Ponnusamy, S., Viswanathan, S., Selvanayagam, P., & Rajaiah, S. (2016). Screening and characterization of a non-insecticidal *Bacillus thuringiensis* strain producing parasporal protein with selective toxicity against human colon cancer cell lines. *Annals of Microbiology*, 66(3), 1167–1178.

Pigott, C. R., & Ellar, D. J. (2007). Role of Receptors in *Bacillus thuringiensis* Crystal Toxin Activity. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 71(2), 255–281.

Ryan, K. M. (2011). P53 and autophagy in cancer: Guardian of the genome meets guardian of the proteome. *European Journal of Cancer*, 47(1), 44–50.

Sansinenea, E. & Ortiz, A. (2011). Secondary metabolites of soil *Bacillus spp.* *Biotechnology Letters*, 33(8): 1523–1538.

Sauka, D. H., & Benintende, G. B. (2008). *Bacillus thuringiensis*: Generalidades. Un acercamiento a su empleo en el biocontrol de insectos lepidópteros que son plagas agrícolas. *Revista Argentina de Microbiología*, 40: 124–140.

Schnepf, E., Crickmore, N., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Feitelson, J., Dean, D. H. (1998). *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(3), 775–806.

Suhail, Y., Cain, M.P., Vanaja, K., Kurywchak, P.A., Levchenko, A., Kalluri, R. & Kshitiz. (2019). Systems Biology of Cancer Metastasis. *Cell Systems*, 9, 109–127.

Tang, F., Zheng, P. (2018). Tumor cells versus host immune cells: whose PD-L1 contributes to PD-1/PD-L1 blockade mediated cancer immunotherapy? *Cell & Bioscience* 8: 34.

Uemori, A., Maeda, M., Yasutake, K., Ohgushi, A., Kagoshima, K., Mizuki, E. & Ohba M. (2007). Ubiquity of Parasporina-1 producers in *Bacillus thuringiensis* natural population of Japan. *Naturwissenschaften*, 94, 34–38.

Velásquez, L.F., Rojas, T., Daníthza, S. & Ceron, J.A. (2018). Proteínas de *Bacillus thuringiensis* con actividad citotóxica: Parasporinas. *Rev. colomb. Biotecnol.* 20(2): 89–100.

Vilas-Bôas, G. T., Peruca, A. P. S., & Arantes, O. M. N. (2007). Biology and taxonomy of *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis*, and *Bacillus thuringiensis*. *Canadian Journal of Microbiology*, 53, 673–687.