



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

**Modelamiento de la Parasporina-6 de
Bacillus thuringiensis y su
interacción con proteínas de una línea
de cáncer de cuello uterino en
perspectiva de una biofábrica**

Estefania Rojas Burgos

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Maestría en Ciencias-Microbiología
Bogotá-Colombia

2022

Modelamiento de la Parasporina-6 de *Bacillus thuringiensis* y su interacción con proteínas de una línea de cáncer de cuello uterino en perspectiva de una biofábrica

Estefania Rojas Burgos

Tesis o trabajo de investigación presentada(o) como requisito parcial para optar al título
de:

Magister en Ciencias-Microbiología

Director:

Ph.D., Silvio Alejandro López Pazos

Codirector:

Ph.D., Alejandro Chaparro-Giraldo (Q.E.P.D.)

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Maestría en Ciencias-Microbiología

Bogotá-Colombia

2022

“Un científico en su laboratorio no es sólo un técnico: es también un niño colocado ante fenómenos naturales que le impresionan como un cuento de hadas.”

Marie Curie

Declaración de obra original

Yo declaro lo siguiente:

He leído el Acuerdo 035 de 2003 del Consejo Académico de la Universidad Nacional. «Reglamento sobre propiedad intelectual» y la Normatividad Nacional relacionada al respeto de los derechos de autor. Esta disertación representa mi trabajo original, excepto donde he reconocido las ideas, las palabras, o materiales de otros autores.

Cuando se han presentado ideas o palabras de otros autores en esta disertación, he realizado su respectivo reconocimiento aplicando correctamente los esquemas de citas y referencias bibliográficas en el estilo requerido.

He obtenido el permiso del autor o editor para incluir cualquier material con derechos de autor (por ejemplo, tablas, figuras, instrumentos de encuesta o grandes porciones de texto).

Por último, he sometido esta disertación a la herramienta de integridad académica, definida por la universidad.

Nombre

Estefania Rojas Burgos

Fecha

06/05/2022

Agradecimientos

A Dios por darme la oportunidad de cumplir a cabalidad con este proceso formativo y profesional, y por darle salud a mis padres para que sean partícipes de mis crecimientos personales.

A mi director el Doctor Silvio Alejandro López Pazos quien dedicó tiempo y esfuerzo para culminar esta investigación, siendo una guía indispensable en este camino.

A mi codirector el Doctor Alejandro Chaparro Giraldo (Q.E.P.D) quien con sus aportes y experiencias permitió que este trabajo fuera un proceso exitoso y aunque la vida tenga giros inesperados, sus avances científicos y su ser nos permitirá recordarlo por muchos años.

Al Ministerio de Ciencia Tecnología e Innovación por la financiación del proyecto (contrato 802-2018, código 123380763011) que cobijó el desarrollo de esta tesis de maestría.

A la Universidad Nacional de Colombia - Facultad de Ciencias, Programa Maestría en Ciencias - Microbiología, por construir año tras año un programa completo y de calidad capaz de formar profesionales integrales y amantes a la ciencia.

Resumen

Modelamiento de la Parasporina-6 de *Bacillus thuringiensis* y su interacción con proteínas de una línea de cáncer de cuello uterino en perspectiva de una biofábrica

La quimioterapia es una de las principales opciones de terapia hacia cáncer, capaz de detener el crecimiento tumoral utilizando fármacos, sin embargo, estos tratamientos no tienen alta selectividad ya que causan toxicidad a células tumorales y a células que recubren los órganos sanos. Las parasporinas son una clase de proteínas de *Bacillus thuringiensis* con actividad citotóxica y selectiva hacia células cancerígenas que no afectan la viabilidad de las células normales. La elaboración de nuevos medicamentos utilizando componentes biotecnológicos tiene una alternativa en la utilización de plantas transgénicas como biofábricas. En el presente trabajo se realizó la caracterización de la parasporina-6 de *B. thuringiensis* y se evaluó su interacción con proteínas de una línea celular de cáncer de cuello uterino, bajo un modelo de biofábrica vegetal, en un marco de Derechos de Propiedad Intelectual. Se identificaron 18 patentes que presentan reivindicaciones que protegen el uso de las parasporinas como terapia de cáncer. Se desarrolló un modelo tridimensional que confirma la estructura de tres dominios funcionales de la parasporina-6. Adicionalmente, se identificaron, utilizando el sistema de doble híbrido en levadura, 11 proteínas de la línea celular HeLa que generaron interacción con la parasporina-6, y a través de *docking* molecular se encontró que los aminoácidos relevantes en esta interacción son leucina, isoleucina, tirosina y asparagina. El gen codificante de la parasporina-6 fue clonado en un vector pCAMBIA y transformado en una cepa LBA4400 de *Agrobacterium tumefaciens*. Este es un punto de partida para la identificación de las patentes asociadas al uso de parasporinas en terapia de cáncer, establecer características de la parasporina-6, determinar posibles proteínas de la línea celular HeLa que interactúan con esta, y establecer una perspectiva de su producción en plantas.

X Modelamiento de la Parasporina-6 de *Bacillus thuringiensis* y su interacción con proteínas de una línea de cáncer de cuello uterino en perspectiva de una biofábrica

Palabras clave: Parasporina-6, *Bacillus thuringiensis*, cáncer de cuello uterino, estudio de libertad de operación, transformación genética de plantas.

Abstract

Modeling of Parasporin-6 from *Bacillus thuringiensis* and its interaction with proteins of a cervical cancer cell line from a biofactory perspective

Chemotherapy is one of the main cancer therapy options, capable of stopping tumor growth using drugs; however, these treatments do not have high selectivity since they cause toxicity to tumor cells and cells that cover healthy organs. Parasporins are a class of *Bacillus thuringiensis* proteins with cytotoxic and selective activity towards cancer cells that do not affect the viability of normal cells. The development of new drugs using biotechnological components has an alternative in the use of transgenic plants as biofactories. In the present work, the characterization of parasporin-6 of *B. thuringiensis* was carried out and its interaction with proteins of a cervical cancer cell line was evaluated, under a plant biofactory model, within a framework of Intellectual Property Rights. Eighteen patents with claims protecting the use of parasporins as cancer therapy were identified. A three-dimensional model was developed that confirms the structure of three functional domains of parasporin-6. Additionally, using the yeast two hybrid system, 11 proteins of the HeLa cell line that generated interaction with parasporin-6 were identified, and through molecular docking it was found that the relevant amino acids in this interaction are leucine, isoleucine, tyrosine and asparagine. The *parasporin-6* gene was cloned into a pCAMBIA vector and transformed into *Agrobacterium tumefaciens* LBA4400. These are basis for the identification of patents associated with the use of parasporins in cancer therapy, *in silico* parasporin-6 characteristics, possible HeLa cell line proteins interacting with parasporin-6, and a perspective of plant parasporin-6 production.

Keywords: Parasporin-6, *Bacillus thuringiensis*, cervical cancer, freedom-to-operate study, genetic transformation of plants.

Contenido

	Pág.
Resumen	IX
Abstract	XI
Lista de figuras	XV
Lista de tablas	XVII
Introducción	1
Justificación	5
1. Marco teórico	9
1.1 <i>Bacillus thuringiensis</i>	9
1.1.1 Proteínas Cry.....	10
1.1.2 Parasporinas	11
1.1.2.1. Descubrimiento de las Parasporinas.....	12
1.1.2.2. Estructura de las Parasporinas	14
1.1.2.3. Tipos de Parasporinas	15
1.1.2.3.1. Parasporina-1 (PS1) (Cry31Aa).....	15
1.1.2.3.2. Parasporina-2 (PS2) (Cry46Aa).....	17
1.1.2.3.3. Parasporina-3 (PS3) (Cry41Aa y Cry41Ab)	19
1.1.2.3.4. Parasporinas-4 (PS4) (Cry45Aa)	19
1.1.2.3.5. Parasporina-5 (PS5) (Cry64Aa).....	20
1.1.2.3.6. Parasporina-6 (PS6) (Cry63Aa).....	20
1.2 Transformación genética de plantas.....	21
1.3 Análisis de libertad de operación.....	23
1.4 Sistema de doble híbrido en levadura	24

1.5	Casetes de expresión génica.....	26
1.5.1	Región codificante.....	27
1.5.2	Promotor.....	28
1.5.3	Terminador.....	29
1.6	Vectores de expresión.....	30
2.	Objetivos.....	31
3.	Metodología.....	33
3.1	Estudio de libertad de operación.....	33
3.2	Modelo tridimensional de la parasporina-6.....	34
3.3	Interacciones de la parasporina-6 en el modelo de cáncer de cuello uterino.....	34
3.4	Casete de expresión modelo para producción de parasporinas en plantas.....	36
3.4.1	Diseño <i>in silico</i> del casete de expresión.....	36
3.4.2	Transformación genética de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	37
4.	Resultados y discusión.....	39
4.1	Estudio de propiedad intelectual enfocado al uso de parasporinas como terapia de cáncer.....	39
4.2	Modelo tridimensional de la parasporina-6.....	46
4.3	Interacciones de la parasporina-6 en el modelo de cáncer de cuello uterino.....	54
4.4	Casete de expresión modelo para producción de parasporinas en plantas.....	61
5.	Conclusiones y recomendaciones.....	69
5.1	Conclusiones.....	69
5.2	Recomendaciones.....	70
	Bibliografía.....	71

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1: Micrografía de <i>B. thuringiensis</i> var. <i>thuringiensis</i> Berliner 1715 durante la esporulación. Es: espora; CP: Cristal parasporal (41).	10
Figura 2: Modelos de proteínas insecticidas según la nomenclatura basada en la estructura para <i>B. thuringiensis</i> y otras proteínas insecticidas derivadas de bacterias (43).....	13
Figura 3: Diagrama del corte por tripsina de la Pro-PS-1 (53).	15
Figura 4: Modelo del mecanismo de acción de PS1 (57).....	16
Figura 5: Representación de las estructuras similares a la PS2 (a) Toxina epsilon del <i>C. perfringens</i> . (b) toxina aerolisina de <i>A. hydrophila</i> . (c) Lectina hemolítica de <i>L. sulphurous</i> (59).	17
Figura 6: Modelo del mecanismo de acción de la PS-2 (62).....	18
Figura 7: Esquema de los fragmentos tóxicos de las principales PS (55).....	20
Figura 8: Proceso de transformación de plantas mediado por <i>Agrobacterium tumefaciens</i> (79).....	23
Figura 9: Pipeline para secuenciación de interacción de próxima generación (NGS) (86).....	25
Figura 10: Principio de detección y aplicaciones para secuenciación de interacción de próxima generación (86).....	26
Figura 11: A. Diseño del casete de expresión. B. Vector Binario pCAMBIA2300.....	37
Figura 12: Número de patentes con relación a PS identificadas en bases de datos especializadas.....	40
Figura 13: Distribución geográfica de patentes relacionadas a PS.....	42
Figura 14: Alineamiento entre las proteínas PS6 y Cry2Aa, resaltando los residuos asociados a alfa hélices (rojo) y beta láminas (verde).	47
Figura 15: Modelo generado por Swiss-Model con la plantilla 1I5P.....	48

Figura 16: A. Estimación de la calidad global del modelo obtenido por QMEAN. B. Gráfico de comparación con estructuras de PDB para el modelo obtenido por Swiss-Model.....	49
Figura 17: Diagrama de Ramachandran para el modelo.....	50
Figura 18: Comparación del modelo refinado de PS6 con el modelo generado por Swiss-Model. A. Modelo original; B. Modelo refinado. C. Modelos superpuestos, se observa algunos residuos que aún tienen baja calidad en su distribución.....	51
Figura 19: Métricas de calidad del modelo después del refinamiento con QMEAN. A. Valor de Q-MEAN. B. Comparación del modelo refinado con proteínas incluidas en PDB. C. Ramachandran plot.	52
Figura 20: A. Modelo tridimensional de la PS6. B. Estructura de las proteínas Cry de tres dominios.	53
Figura 21: Casete de expresión modelo (2834 pb).	62
Figura 22: Cepa recombinante LBA4404 de <i>A. tumefaciens</i> que crecieron en 50 mg/mL de kanamicina y rifampicina (A), y secuencia a amplificar del gen <i>ps6</i> (B).	63
Figura 23: Amplificación del casete de expresión en cepas con características fenotípicas positivas de <i>A. tumefaciens</i> . Carril 1:PPM (1Kb Plus DNA Ladder Invitrogen), Carril 2: Control negativo (Agua), Carril 3: Colonia positiva con amplificación de fragmento de 951 pb.	65

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1: Características estructurales y funcionales de los dominios de las proteínas Cry (46).....	11
Tabla 2: Lista de PS, modificado de Okumura et al., 2010 (51).....	13
Tabla 3: Diversidad de las parasporinas y tipo de grupo al que pertenece (51).....	14
Tabla 4: Patentes relacionadas a la temática de PS de <i>B. thuringiensis</i> . Aquellas que directamente tienen relación con uso de PS en cáncer estén en negrilla.	40
Tabla 5: Clasificación Internacional de patentes.....	45
Tabla 6: Proteínas que interactúan con la línea celular HeLa.....	54
Tabla 7: Aminoácidos de PS6 que interactúan con proteínas de la línea celular HeLa.....	57
Tabla 8: Datos de estadísticos provenientes de la prueba de Shapiro Wilk.	58

Introducción

El cáncer ha sido descrito como un grupo variado de enfermedades consideradas multifactoriales que se caracteriza por la modificación estructural del genoma originando alteraciones a nivel molecular, seguido de un desbalance celular que conlleva a transformaciones fisiológicas (1). Esto se debe a la necesidad de la célula tumoral por producir y procesar una señal que inhibe su crecimiento en condiciones normales, evadiendo las restricciones normales que impiden la proliferación descontrolada de estas (2). Las alteraciones genéticas de los sistemas que regulan los procesos celulares son el pilar de la carcinogénesis (3).

La acumulación de mutaciones en diferentes genes es el mecanismo causal de las alteraciones en las células humanas, incluyendo los mecanismos de mantenimiento y reparación del DNA (4). Se han determinado distintos tipos de modificaciones que conllevan a la formación de células cancerosas, entre estas alteraciones se encuentran: las deleciones o inserciones de distintos nucleótidos en la secuencia que codifica un gen, la pérdida o ganancia de cromosomas completos, las translocaciones cromosómicas, entre otros. Los rasgos característicos de las vías que se encuentran alteradas en las células cancerosas están determinados principalmente por la inestabilidad genética, la apoptosis, el ciclo celular, y por la proliferación, angiogénesis y metástasis (5).

Los genes causantes del cáncer se pueden dividir en cuatro categorías: los que activan la proliferación celular (oncogenes), los que inhiben la proliferación (supresores de tumores), los que intervienen en la reparación del DNA y los que producen telomerasas (6).

La mayoría de los oncogenes provienen de un protooncogén; que intervienen en los reguladores del crecimiento celular normal (factores de crecimiento, receptores de factores de crecimiento, moléculas de transducción de señales y factores de transcripción nuclear) (7). Cuando se producen mutaciones en estos genes se forma un oncogén, que

tiene un producto excesivamente activo que organiza toda la maquinaria de la célula para estimular una división descontrolada (6). Una gran parte de oncogenes actúan como mutaciones de ganancia de función que estimulan la proliferación o la inhibición de la apoptosis (4).

Para controlar el crecimiento celular existe una familia de genes que se conocen con el nombre de genes supresores de tumores (GST). Estos tienen como función principal, bloquear el desarrollo de tumores al regular la transformación celular por los puntos de control existentes en el ciclo divisional (4). Las mutaciones que se presentan en los GST, a diferencia de las que producen oncogenes, es la pérdida de función, que es capaz de inactivar las dos copias del gen supresor de tumor causando la proliferación celular no controlada (7).

Cuando el ciclo celular se encuentra bloqueado a causa de los GST, se debe evaluar el daño y la posible reparación del material que se encuentra alterado. Los genes reparadores del DNA son los encargados de corregir y reparar los errores generados durante la transcripción del ADN, además de funcionar como GST. Cuando los genes involucrados en el sistema de reparación presentan variantes que modifican la función de la proteína codificada, se producen inestabilidades genómicas que aumentan la carcinogénesis y promueve el desarrollo de tumores (8).

Tras evadir la inactivación por parte de los genes supresores de tumores y la eliminación por los genes reparadores del DNA, la célula tumoral debe superar un último desafío: la limitación del número de divisiones que puede experimentar la célula. Habitualmente, una célula realiza unas 50-70 divisiones mitóticas; y apenas alcanza esta cifra se convierte en senescente impidiéndole continuar con las divisiones (9). Uno de los mecanismos que cuentan y controlan este proceso es el realizado por los telómeros. Son los extremos terminales de los cromosomas, y son acortados en cada proceso divisional, ya que la DNA polimerasa no puede replicarlos (10). Son un control temporal para la célula pues determina la edad de esta, y al mismo tiempo controla la cantidad de ciclos celulares que puede llevar a cabo sin perjudicar partes codificantes del DNA cromosomal (11). Las células tumorales evaden este proceso activando un gen que codifica para una telomerasa, una ribonucleoproteína cuya función principal es adicionar fragmentos de DNA repetitivo encontrados en los telómeros, esto con el fin de mantener un tamaño adecuado durante los ciclos replicativos (12). La activación de esta enzima permite que la

célula tumoral se divida ilimitadamente permitiéndole adquirir un gran tamaño y posibilitando la acumulación de mutaciones adicionales que contribuyen con la agresividad del tumor (13).

Debido al diagnóstico precoz, a los tratamientos quirúrgicos más especializados y a los fármacos anticancerígenos, los pacientes oncológicos sobreviven más tiempo. Sin embargo, los efectos secundarios causados en estos pacientes disminuyen su calidad de vida, ya que estos medicamentos, no solamente afectan células tumorales sino tejidos sanos (14). La gran mayoría de los agentes quimioterápicos, producen toxicidad hematológica, digestiva, cardíaca, vesical, pulmonar, dermatológica, neurológica y gonadal, desencadenando enfermedades secundarias que aumentan la gravedad de estos pacientes (15).

La posibilidad de nuevas terapias anticancerígenas ha enfocado a los investigadores a ampliar la búsqueda de nuevos fármacos que sean capaces de eliminar el flagelo del cáncer y al mismo tiempo disminuir los efectos adversos causados en los pacientes. Una de estas nuevas líneas que se dedica a la investigación de nuevos fármacos, está dedicada a descubrir y desarrollar compuestos de origen natural, específicamente toxinas bacterianas que presenten actividad citotóxica hacia líneas celulares cancerígenas, sin efectos adversos hacia las células normales (16). La idea de obtener productos biológicos como proteínas bacterianas (parasporinas) utilizando ingeniería genética de plantas, promete ser un método efectivo y económico que permite el desarrollo de principios activos para la elaboración de nuevos medicamentos con propiedades anticancerígenas.

Un grupo de proteínas denominado parasporinas (PS), clasificadas en PS1 a PS6, han despertado interés en el área de la terapia anticancerígena, estas son producidas por *Bacillus thuringiensis*. Estas son capaces de ejercer acción sobre células tumorales sin afectar a las sanas (17). Las PS son proteínas producidas por *B. thuringiensis* que se caracterizan por no presentar actividad insecticida conocida, ser sintetizadas como una protoxina que requiere la presencia de una proteasa para su activación, y su alta afinidad hacia células humanas cancerosas reconociendo receptores específicos de estas y generando una acción selectiva (18). La especificidad de estas proteínas sugiere que la unión a las células cancerígenas esta mediana por receptores de la membrana plasmática (beclina-1) (17), desencadenando diferentes vías de respuesta (incremento

del Ca²⁺ intracelular, disminución de la síntesis de ADN y proteínas celulares, pérdida de la enzima lactato deshidrogenasa y formación de oligómeros en las membranas plasmáticas) que desestabilizan el citoesqueleto, afectando la membrana celular y sus canales iónicos, llevando a la célula a la muerte (19).

El reto de la elaboración de nuevos medicamentos anticancerígenos utilizando componentes biotecnológicos es la incorporación de nuevas formas de contrarrestar los efectos de las células tumorales y en la producción de estas, ya que la obtención estándar de proteínas está relacionada netamente con producción en masa a través de biorreactores o fermentadores microbianos (20). Por tal razón, el uso de ingeniería genética en plantas es una opción práctica, pues los sistemas vegetales son más económicos que la infraestructura industrial utilizada en los biorreactores. La biotecnología vegetal, ha sido usada para producir desde proteínas que hoy son la base de productos farmacéuticos (albúmina sérica humana) (21) hasta anticuerpos monoclonales llamados “planticuerpos”, y vacunas (22). El modelo *Agrobacterium tumefaciens* ha sido de impacto en el desarrollo de plantas genéticamente modificadas, ya que este microorganismo es capaz de infectar células vegetales integrando en su genoma una porción de material genético denominado ADN-T, generando una perspectiva de biofábricas vegetales (23). Dentro de este grupo de plantas modificadas genéticamente, el tabaco cumple con las expectativas de producción de medicamentos ya que genera biomasa en grandes cantidades de la cual se pueden extraer las proteínas de interés, además de que ha sido utilizado para producir medicamentos como la artemisinina, un antimalárico muy efectivo (24). Dentro de la ingeniería genética de plantas, se deben realizar estudios de libertad de operación con el fin de evitar problemas legales, que involucren las patentes que estén relacionadas con el proceso biotecnológico que se quiera desarrollar. Este estudio debe describir adecuadamente el riesgo de que se considere una infracción en la comercialización de un producto deconstruyéndolo, revisando los derechos de propiedad intelectual y concluyendo con la utilización de cada material dentro de la producción (25).

Teniendo en cuenta lo descrito en este estudio se determinó el modelo tridimensional de PS6 de *B. thuringiensis* y se evaluó su interacción con biomarcadores de cáncer de cuello uterino. Se realizó un estudio de libertad de operación, y se estableció una perspectiva de biofábrica vegetal para esta proteína.

Justificación

En Colombia, el cáncer se considera un problema de salud pública creciente. Según las estimaciones de incidencia realizadas por el Ministerio de Salud y Protección Social, se reportan más de 70.000 nuevos casos de cáncer anualmente (26), seguido de valores de prevalencia de 42.000 casos aproximadamente (27); que conllevan a la muerte en el 16,9% de los registros respectivamente (33.000 casos). En adultos, las principales causas de muerte por cáncer son los localizados en: estómago, pulmón, próstata, colon-recto, cuello uterino, mama y pulmón; mientras que en niños están relacionados con leucemias, tumores del sistema nervioso central y linfomas (26); esto sin tener en cuenta los efectos adversos que presentan los pacientes al momento de llevar a cabo su tratamiento.

A pesar de que los datos muestran un descenso importante en las tasas de incidencia y mortalidad en tipos de cáncer que se asocian a agentes infecciosos o a consumo de tabaco, se ha visualizado el aumento de los que se relacionan con detecciones tempranas (mama, próstata, colon) y los que requieren nuevas técnicas diagnósticas (tiroides) (28).

Los tratamientos para el cáncer están basados en procedimientos de extirpación del tejido tumoral, altas dosis de radiación que reducen el tamaño del tumor y destruyen las células cancerígenas y quimioterapia (1). Esta última tiene mayor uso ya que su distribución a nivel celular corporal es mayor, logrando tener mayor alcance en tumores que son de difícil acceso. Existen tres formas de uso de la quimioterapia: inducción, adyuvante y primaria (3). La quimioterapia de inducción, es utilizada en pacientes con enfermedades avanzadas que no presentan tratamientos alternativos; la adyuvante, que es utilizada después de la realización de una intervención primaria (cirugía o

radioterapia), y la primaria, que es indicada en pacientes que presentan un tumor localizado, con tratamientos locales, pero sin ser completamente efectivos (3). Asimismo, se realizan seguimientos a los pacientes con el fin de evaluar la respuesta del tumor frente al fármaco, teniendo en cuenta variables como: supervivencia, toxicidad asociada al tratamiento e impacto sobre la calidad de vida. Sin embargo, estos tratamientos no tienen alta selectividad ya que causan toxicidad tanto a células tumorales como a las células que recubren los órganos sanos. Estos efectos adversos influyen directamente con el estilo y la calidad de vida que llevan estos pacientes, ya que las toxicidades producidas por estos fármacos, pueden causar desde emesis y diarrea que afectan el estado nutricional de los pacientes, hasta disminución del componente celular sanguíneo que induce a la adquisición de infecciones y susceptibilidad a enfermedades secundarias (29).

Ciertas proteínas bacterianas han demostrado efectos citotóxicos en células cancerosas como lo son las parasporinas del *B. thuringiensis*. Estas proteínas han generado una perspectiva amplia por su especificidad hacia células cancerosas sin afectar a las células normales. Por esta razón, es indispensable pensar en la obtención en masa de estas proteínas llevando a abordar a la biotecnología de producción en microorganismos que es llevada a cabo mediante la utilización de las bacterias como fuentes de productos que son utilizados tanto a nivel industrial como para la salud (30). Estos cultivos requieren de un biorreactor que proporciona el ambiente óptimo para que el organismo aumente su biomasa y se pueda obtener el producto deseado (31). Sin embargo, el costo que requieren este tipo de tecnologías es muy alto, además del tiempo que se necesita para obtener la cantidad requerida. No obstante, la utilización de plantas transgénicas ha sido una forma de producir compuestos de una forma más económica y eficiente (32). Se han desarrollado vacunas en plantas de papa, banano, arroz y trigo; y se han obtenido productos como el ácido salicílico, la colchicina y otros medicamentos que han mejorado la calidad de vida de los humanos (33). El tabaco, es una planta usada en la industria tabacalera para la producción de cigarrillos y tintes (34). Su alta reproducibilidad y productividad es la principal ventaja que tiene esta planta; por esta razón, diversas investigaciones se han enfocado en la utilización de este vegetal con fines beneficiosos (35).

La problemática planteada en este trabajo logra abordarse desde el área de la biología celular y molecular, ya que esta ciencia permite conocer realmente todos los procesos

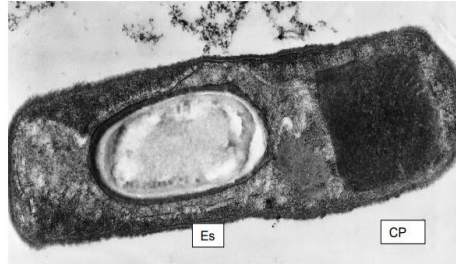
que se llevan a cabo dentro de las células, teniendo en cuenta que están compuestas por un material genético (ADN) que puede ser copiado por medio de genes y, por consiguiente, obtener un producto específico (proteína). Los avances científicos, están orientados a utilizar técnicas de biología molecular, que permitan obtener toda la información de las células descifrando la constitución de su DNA (36). Utilizando estos avances, se logra organizar toda la información obtenida mediante ensayos, permitiendo realizar el análisis estructurado, obteniendo el modelamiento de sistemas biológicos (11), y utilizando técnicas computacionales, matemáticas y estadísticas (37).

1. Marco teórico

1.1 *Bacillus thuringiensis*

Es un bacilo Gram positivo, aerobio facultativo, productor de esporas, nativo del suelo y catalogado como cosmopolita. Pertenece al reino Eubacteria, a la familia Bacillaceae, y al género *Bacillus* (38). Los distintos aislamientos de *B. thuringiensis* presentan características bioquímicas comunes como: fermentación de glucosa, fructosa, trealosa, maltosa y ribosa (39). Durante su ciclo de vida presenta dos fases: el crecimiento vegetativo, donde la bacteria realiza su división por bipartición, y la esporulación, una fase de diferenciación enfocada a la producción de una espora (40). Se caracteriza por producir en la fase de esporulación, un cuerpo paraesporal catalogado como cristal de naturaleza proteica (Figura 1), y con alta toxicidad en invertebrados (larvas de insectos). Existen diferentes fases que describen los cambios presentados durante la esporulación de *B. thuringiensis*: 1. Formación del filamento axial de la cromatina y detención del crecimiento celular; 2. Generación de una mitosis asimétrica que forma la pre-espora y el esporangio; 3. El cristal empieza a ser visible por la formación de las dos membranas de la pre-espora y se genera el hundimiento del septo; 4. Se visualiza la pared de la célula y se forma el córtex. Esta inclusión, denominada delta-endotoxina, está conformada por distintas proteínas (Cry o Cyt) (38).

Figura 1: Micrografía de *B. thuringiensis* var. *thuringiensis* Berliner 1715 durante la esporulación. Es: espora; CP: Cristal parasporal (41).



1.1.1 Proteínas Cry

Las proteínas Cry son definidas como cualquier proteína paraesporal presente en *B. thuringiensis* que tenga un efecto tóxico hacia algún organismo y que pueda ser verificable utilizando ensayos biológicos; son altamente específicas y poseen una gran variabilidad entre las diferentes cepas. Estas presentan una forma estructural que es determinante para su actividad biológica contra insectos (42) (43). El cristal proteico es ingerido por el insecto. Este cristal, es solubilizado con ayuda de las proteasas presentes en el intestino medio del insecto, causando una escisión en una sección de aminoácidos en la región N-terminal y en el extremo C-terminal dependiendo la característica de la proteína Cry que actúe; dejando una proteína activa de 49 a 70 kDa. Una vez activa esta toxina, debe reconocer receptores específicos en las membranas de células columnares del intestino del insecto. Al darse la inserción dentro de la membrana celular, la proteína induce la formación de poros con diámetros de 1 a 2 nanómetros, que rompen el potencial de membrana aumentando la permeabilidad y permitiendo el ingreso de agua, aniones, cationes y moléculas de alto peso molecular que llevan a la ruptura de la célula (44). Las proteínas Cry han sido utilizadas ampliamente como insecticidas biológicos considerados como los más inofensivos para humanos, vertebrados, insectos no susceptibles y plantas. Diversos factores han incrementado el éxito en el uso de proteínas Cry en la agricultura, siendo su alta especificidad la más importante. El dominio I es el causante de la formación del poro, que adquiere esta forma por acción de las α -hélices que lo conforman juntándose en forma de bucle en la parte externa de la

estructura, insertándose en la membrana de las células intestinales de los insectos susceptibles. El dominio II está ampliamente relacionado con la conformación β -laminar que se asemejan a regiones de unión antígeno-anticuerpo en otras proteínas. Este dominio, es altamente variable, y es considerado el determinante de la especificidad, pues es quien reconoce el receptor celular del insecto (aminopeptidasa N, fosfatasa alcalina caderina), y finalmente, el dominio III mantiene la estructura de la proteína (44). Las proteínas Cry son sintetizadas como protoxinas inactivas. Estas deben estar en un ambiente reductor que desestabilice los puentes disulfuro que unen su estructura; teniendo en cuenta la naturaleza de la proteína, pues han observado que las proteínas Cry1 presentan aminoácidos básicos que se solubilizan más fácilmente en un pH básico, mientras que proteínas Cry3 presentan cuatro puentes salinos intercatenarios que estabilizan la estructura y permiten que se solubilice a pH ácidos (45) (Tabla 1).

Tabla 1: Características estructurales y funcionales de los dominios de las proteínas Cry (46).

Dominio	Secuencia de aminoácidos		Estructura secundaria	Función
	Cry1Aa	Cry3A		
I	33-252	58-290	Siete α -hélices	Formación de poros
II	265-461	291-500	Tres láminas- β antiparalelas dobladas en tres bucles	Unión al receptor y determinación de la especificidad
III	463-609	501-644	β -sándwich de 2 láminas- β antiparalelas	Unión al receptor, regulación de canales iónicos y especificidad con insectos.

1.1.2 Parasporinas

Las parasporinas (PS) son definidas como un grupo de proteínas paraesporales bacterianas que no son hemolíticas ni insecticidas pero que tienen actividad citotóxica frente a células cancerígenas sin causar daño a las células normales (47). Las principales características de las PS son no presentar actividad insecticida conocida hasta el momento; ser sintetizadas como protoxinas y necesitar ser hidrolizadas para su activación; presentar alta citotoxicidad selectiva hacia células humanas tumorales; y

poseer bajos porcentajes de identidad con proteínas Cry insecticidas (menor del 25%) (48).

▪ 1.1.2.1. Descubrimiento de las Parasporinas

En el año 1999, Mizuki *et al.*, (49) fueron los primeros en estudiar un cribado de 1744 cepas de *B. thuringiensis* provenientes de la Universidad de Kyushu en Japón y 44 cepas de referencia del Instituto Pasteur en París, cuyas proteínas de inclusión paraesporal no son hemolíticas sino anticancerígenas (19). Realizaron un ensayo preliminar con eritrocitos de oveja; las proteínas paraesporales extraídas de 60 cepas produjeron una fuerte hemólisis; mientras que las 1728 cepas restantes se examinaron para actividad citotóxica frente a células MOLT-4 (Células T leucémicas humanas), arrojando resultados de 42 cepas positivas. Estas cepas eran formadoras de cristales sin actividad insecticida (50).

Seguido a este descubrimiento, en el año 2000, Mizuki *et al.*, obtuvieron de la cepa A1190 de *B. thuringiensis* una proteína Cry con un peso molecular de 81 kDa, que exhibe actividad citotóxica frente a células tumorales al ser degradada por proteasas (tripsina y proteinasa K) en moléculas pequeñas de 40 a 60 kDa (50). Además, mostraron una fuerte actividad citotóxica contra células T leucémicas humanas (MOLT-4) y células cancerosas del cuello uterino humano (HeLa), pero no presentaron actividad citotóxica frente a las células T normales (50). Esta investigación, llevó a la formación de una nueva categoría de proteínas Cry denominadas PS, que fueron definidas como un nuevo grupo de proteínas paraesporales bacterianas que son capaces de erradicar células cancerosas discriminadamente (50). Las proteínas de *B. thuringiensis* son clasificadas y nombradas por el "Comité para la Clasificación y Nomenclatura de Parasporinas" teniendo en cuenta el grado de identidad de aminoácidos compartidos, y basando la nomenclatura revisada en grupos estructurales para que las proteínas con estructuras homólogas compartan nombres similares. La clasificación realizada por el grupo en el año 1998 clasificaba 6 familias de Parasporinas PS1 (Cry31), PS2 (Cry46), PS3 (Cry 41), PS4 (Cry 45), PS5 (Cry 64) y PS6 (Cry 63), sin embargo, en el año 2020 se realizó una actualización de la nomenclatura teniendo en cuenta las similitudes mencionadas

previamente y se estableció la siguiente clasificación (Figura 2) (Tabla 2) reportada en la base de datos *Bacterial Pesticidal Protein Database* (BPPRC) (<https://www.bpprc-db.org/>) (43). Las parasporinas se encuentran incluidas dentro de la clasificación de las proteínas Cry y de las Mpp (Proteínas insecticidas con homología a la familia Etx_Mtx2).

Figura 2: Modelos de proteínas insecticidas según la nomenclatura basada en la estructura para *B. thuringiensis* y otras proteínas insecticidas derivadas de bacterias (43).

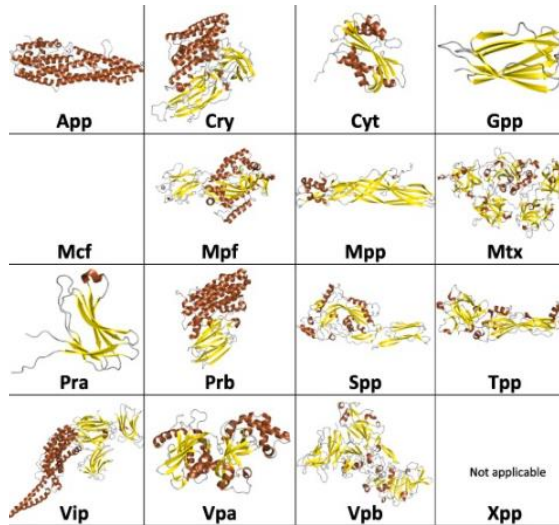


Tabla 2: Lista de PS, modificado de Okumura et al., 2010 (51).

Nombre	Nomenclatura Cry	Gen	Pro-toxina KDa	Toxina(s) KDa
PS1Aa1	Cry31Aa1	2169	81	15 y 56
PS1Aa2	Cry31Aa2	2226	83	
PS1Aa3	Cry31Aa3	2169	81	
PS1Aa4	Cry31Aa4	2169	81	
PS1Aa5	Cry31Aa5	2169	81	
PS1Aa6	Cry31Aa6	2262	84	15 y 55
PS1Ab1	Cry31Ab1	2178	82	
PS1Ab2	Cry31Ab2	2178	82	
PS1Ac1	Cry31Ac1	2331	87	
PS1Ac2	Cry31Ac2	2331	87	15 y 60
PS1Ad1	Cry31Ad1	2262	84	15 y 55
PS2Aa1	Cry46Aa1	1014	37	28
PS2Aa2	Cry46Aa2	1011	37	30
PS2Ab1	Cry46Ab1	912	33	
PS3Aa1	Cry41Aa1	2475	94	64
PS3Ab1	Cry41Ab1	2487	94	
PS4Aa1	Cry45Aa1	2487	30	26.8
PS5Aa1	Cry64Aa1	918	34	30
PS6Aa1	Cry63Aa1	2559	85	14 y 59

▪ 1.1.2.2. Estructura de las Parasporinas

Las PS presentan dos tipos de estructuras: las PS de 3 dominios (Similares a las proteínas Cry) y las PS tipo MTX formadoras de poros. Las PS1, PS3 y PS6 presentan dominios similares a los visualizados en las proteínas Cry, siendo el dominio I (formado por siete α -hélices), el responsable de formar el poro en la membrana de las células; y los dominios II y III (formados por β -láminas), presentan acción en el reconocimiento al receptor (17).

Las PS2, PS4 y PS5 (toxinas Mtx), no presentan las estructuras típicas de tres dominios, sin embargo, han sido ampliamente relacionadas a otras toxinas formadoras de poros que involucran la oligomerización de la toxina en la membrana de las células formando un poro (52).

Tabla 3: Diversidad de las parasporinas y tipo de grupo al que pertenece (51).

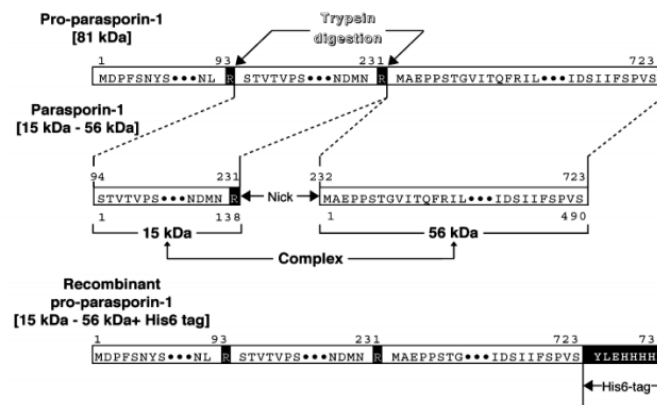
Parasporina	Nomenclatura Cry	Tipo
Parasporina-1	Cry31Aa/b/c/d	Toxina Cry de los tres dominios
Parasporina-2	Cry46Aa	Toxina formadora de poros de tipo aerolisina
Parasporina-3	Cry41Aa/b	Toxina Cry de los tres dominios
Parasporina-4	Cry45Aa	Mtx similar a la toxina épsilon
Parasporina-5	Cry64Aa	Mtx similar a la toxina épsilon
Parasporina-6	Cry63Aa	Toxina Cry de los tres dominios

1.1.2.3. Tipos de Parasporinas

1.1.2.3.1. Parasporina-1 (PS1) (Cry31Aa)

Según el Comité de Clasificación de PS y su nomenclatura, corresponde a la proteína de 81 kDa y nombrada PS1Aa1 (Cry31Aa1) aislada de la cepa A1190 de *B. thuringiensis* (53). Es un polipéptido constituido por 723 residuos de aminoácidos codificada por un gen de 2,169 pb (53). En su forma inactiva (protoxina) está formada con la estructura típica de cualquier proteína Cry, sin embargo, la identidad de la secuencia de aminoácidos de PS1Aa1 con respecto a las proteínas Cry insecticidas es menor del 25% (17). En el 2005, Katayama *et al.*, realizaron un estudio para identificar cual fragmento resultante de la digestión por proteasas era el causante de la actividad anticancerígena (Figura 3) (53).

Figura 3: Diagrama del corte por tripsina de la Pro-PS-1 (53).



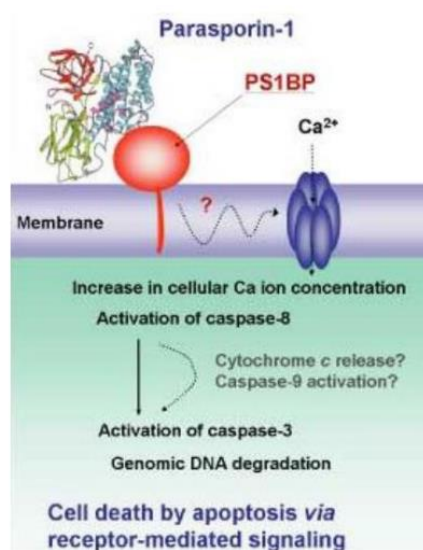
Obtuvieron tres fragmentos, dos de ellos con actividad tóxica: uno pequeño de 15 kDa y otro de 56 kDa. Estos investigadores, trataron de separar la unión de estos dos fragmentos, concluyendo que formaban un heterodímero muy difícil de disociar, sugiriendo que posiblemente era la composición activa del fragmento tóxico (53).

Seguido al hallazgo de la PS1Aa1; se realizaron más descubrimientos de nuevas secuencias que codifican para proteínas PS de este grupo. En el 2008, Uemori *et al.*, (54) reportaron dos genes: el gen *ps1Aa3* que codifica para una proteína de 81 kDa con un porcentaje de identidad del 100% frente a PS1Aa1; y el gen *ps1Ab1* que codifica para

una proteína de 82 kDa con un porcentaje de identidad del 86,4% utilizando como referencia a la PS1Aa1.

La alta especificidad hacia un solo tipo de células susceptible, determinando la interacción de las toxinas con un receptor de membrana (55). Para la PS1Aa1, la molécula que actúa como receptor es la beclina-1, proteína localizada principalmente dentro de las estructuras citoplasmáticas, incluyendo las mitocondrias, el retículo endoplasmático y la membrana perinuclear y que en células normales actúa en procesos como autofagia, desarrollo y apoptosis; pero en las células tumorales HeLa fue encontrado extracelularmente (56) (47). Seguido a esto, Katayama *et al.*, propusieron un modelo del mecanismo de acción iniciando desde el reconocimiento del receptor ya mencionado, seguido por un aumento del Ca^{2+} intracelular conllevando a la célula a la disminución de la síntesis del DNA y proteínas (57). La apoptosis y autofagia es puesta en evidencia a las 8 horas por la activación de la caspasa 3 (57). Esta proteína no induce a la despolarización de la membrana, ni al aumento de la permeabilidad de la membrana.

Figura 4: Modelo del mecanismo de acción de PS1 (57).

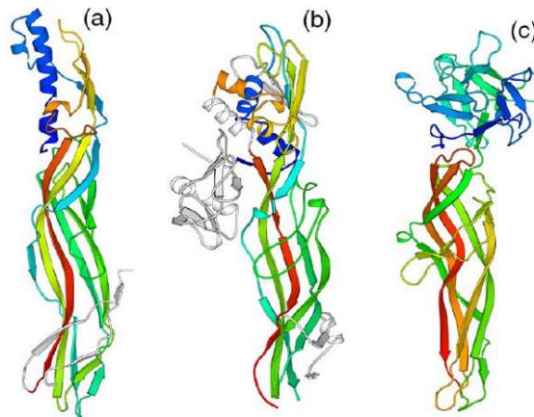


Esta proteína presenta alta toxicidad hacia las células HeLa (cáncer cervical uterino) y HL-60 (leucemia mieloide) (53).

1.1.2.3.2. Parasporina-2 (PS2) (Cry46Aa)

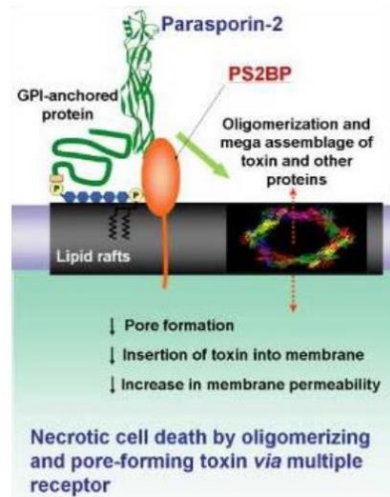
Las dos principales PS del grupo 2 son producidas por las cepas A1547 (PS2Aa1) y A1470 (PS2Aa2). Estas dos proteínas con un peso de 37 kDa, se diferencian solamente en cuatro residuos de aminoácidos y en el sitio de digestión con proteinasa K; generando una proteína activa de 30 kDa que ejerce un efecto citotóxico hacia diversas líneas celulares (58). La estructura tridimensional indica que está compuesta por tres dominios formados por dominios β ; diferenciándose de las proteínas Cry convencionales e integrándose al grupo de las toxinas formadoras de poros similares a las aerolisinas (TFP) (59).

Figura 5: Representación de las estructuras similares a la PS2 (a) Toxina epsilon del *C. perfringens*. (b) toxina aerolisina de *A. hydrophila*. (c) Lectina hemolítica de *L. sulphurous* (59).



El receptor identificado y patentado de la PS2, es la proteína Hep27, una molécula de la familia deshidrogenasa-reductasa de cadena corta, dependiente de NADPH (60). Además, su mecanismo de acción está propuesto hacia la necrosis de células dando como resultado el daño irreparable de la membrana celular (61).

Figura 6: Modelo del mecanismo de acción de la PS-2 (62).



Después de reconocer el receptor Hep27, situado en la balsa lipídica de la membrana plasmática de las células tumorales, se produce la formación de oligómeros producidos en presencia de lípidos y colesterol de la PS2 en la membrana, formando poros (63). La formación de poros da como resultado alteraciones de las estructuras del citoesqueleto, fragmentación de organelos, alteraciones de la morfología celular, y finalmente generando la lisis celular.

Kitada *et al.*, (58), evaluaron la citotoxicidad de la PS2 en 12 líneas celulares, demostrando que esta es la PS que presenta mayor espectro, ya que actuó sobre cinco de las doce líneas celulares probadas. Sin embargo, tiene una baja selectividad causando toxicidad hacia las células T normales. Brasseur *et al.*, (61) identificaron que la cepa 4R2 de *B. thuringiensis* es altamente tóxica frente a células cancerígenas como: MCF-7 (células con cáncer de seno), PC3 (células con cáncer de próstata) y HepG2 (células con cáncer de hígado). Además, en este ensayo realizado se presentó que PS2Aa1 tiene actividad baja o nula frente a líneas celulares normales ensayadas (61).

1.1.2.3.3. Parasporina-3 (PS3) (Cry41Aa y Cry41Ab)

Las dos PS identificadas en este grupo presentan una masa molecular de 88 kDa, y son sintetizadas por la cepa A1462 aislada de los suelos de Tokio en Japón por Yamashita *et al* (64). A diferencia de las clases anteriores mencionadas, presenta la estructura de cinco bloques de secuencias conservadas típicas de las proteínas Cry y se predice una estructura tridimensional de tres dominios (55). Este grupo de PS ha sido el menos estudiado en cuanto a su mecanismo de acción, pero se ha planteado la hipótesis de que la PS3 produce muerte necrótica por la formación de poros en la membrana plasmática, observando *in vitro* una liberación progresiva de lactato deshidrogenasa (LDH) (50). Además, la PS3 es activa solo contra células HL 60 (leucemia mieloide) y HepG2 (cáncer hepático) (64).

1.1.2.3.4. Parasporinas-4 (PS4) (Cry45Aa)

Solo una secuencia ha sido descrita y caracterizada: la PS4Aa1 producida por la cepa A1470 (52). Es una proteína que presenta similitud con la toxina épsilon producida por *C. perfringens*. Esta proteína no posee la estructura típica de los tres dominios de las proteínas Cry insecticidas (65). En cuanto al modo de acción, se conoce que la acción de esta produce inflamación y lisis de las células cancerígenas 24 horas después de la administración. Según estudios *in silico*, la PS4 tiene una similitud considerable con la aerolisina β formadora de poros, con única diferencia de la dependencia de colesterol, ya que PS4 tiene actividad sin presencia de colesterol (66). Además de esto, Okuruma *et al.*, (66), demostró que las células afectadas por esta PS sufren encogimientos nucleares y formación de ampollas en el exterior del núcleo, demostrado que el mecanismo de acción de la PS4 puede ser la necrosis, debido a una baja activación de caspasas efectoras 3/7 y a la permeabilización de la membrana liberando LDH (66). Esta proteína presenta alta toxicidad contra células CACO-2 (cáncer de colon), Sawano (cáncer endometrial), MOLT-4 (leucemia), TCS (cáncer cervical de útero) y HL60 (leucemia mieloide) (67).

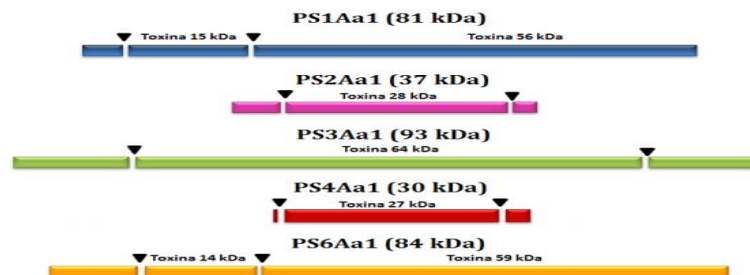
1.1.2.3.5. Parasporina-5 (PS5) (Cry64Aa)

Fue aislada y purificada de la cepa A1100 por Ekino y Shin. Presenta una masa molecular de 33.8 kDa en su forma inactiva, que luego de ser digerida por proteinasa K produce un fragmento activo de 29.8 kDa (68). Dentro de la familia de PS, las que presentan mayor similitud son PS4 y PS5, esto permitió incluir a la PS5 dentro de las proteínas formadoras de poro generando la posibilidad de que su mecanismo de acción sea la necrosis (68). En este mismo estudio, se reportó la toxicidad hacia líneas celulares como: Jurkat (leucemia de células T), HepG2 (cáncer hepático) y HeLa (cáncer cervical de útero). Además, presento toxicidad moderada contra células MRC-5 (células normales de pulmón) y UtSMC (células normales de útero).

1.1.2.3.6. Parasporina-6 (PS6) (Cry63Aa)

Solo se ha reportado una secuencia correspondiente a la PS6Aa1; proteína que presenta aspectos relacionados con la PS1 como lo son las cepas que las codifican (M109 y CP84) con la diferencia que pueden ser plásmidos diferentes (69). En análisis realizados a la secuencia de aminoácidos, se sugiere que PS6Aa1 es una toxina Cry de tres dominios (70). Esta proteína presenta actividad citotóxica hacia células HepG2 y HeLa (69); no se conoce su mecanismo de acción ni receptor celular.

Figura 7: Esquema de los fragmentos tóxicos de las principales PS (55).



1.2 Transformación genética de plantas

La ingeniería genética de plantas está enfocada en la producción de diversos genotipos que expresen proteínas de interés integrando segmentos de DNA externos provenientes de cualquier origen (71). Se usa modificando el genoma de las plantas, transformando o eliminando genes y sus ventajas principales son la utilización de genes entre diferentes especies/géneros/reinos eliminando las barreras de incompatibilidad sexual y fertilidad (71) y que no implica la transferencia de cientos de genes, sino que optimiza la introducción de pocos genes que expresen la característica de interés (72).

Para obtener plantas transgénicas se deben tener en cuenta los siguientes procesos principales: identificación y aislamiento de del gen de interés, desarrollar el casete de expresión o construcción quimérica utilizado para la introducción del DNA de manera estable, sistemas de cultivo que permitan la proliferación de plantas, procedimientos de diferenciación entre células transformadas y no transformadas, y métodos analíticos que detecten el gen extraño y sus productos (71).

Estas plantas fueron desarrolladas por primera vez en los años 80 al producir plantas de tabaco y petunia con resistencias a kanamicina y se han utilizado para producir vacunas y sustancias terapéuticas para la producción de materias primas como plásticos biodegradables (73).

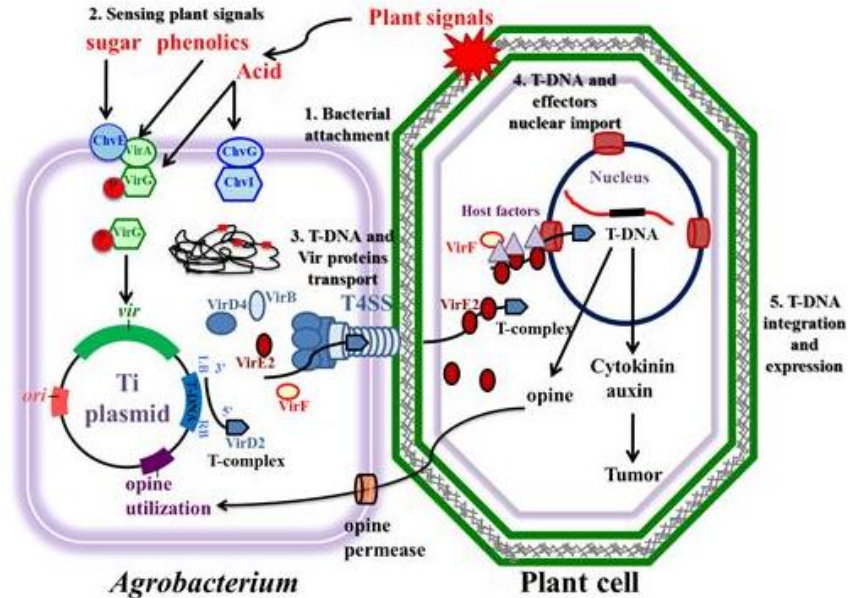
Se han descrito dos métodos útiles para producir plantas genéticamente modificadas: los métodos indirectos, basados en la utilización de vectores biológicos que emplean sus características patogénicas para introducir los genes de interés al genoma vegetal (74), y los métodos directos, que transforman células utilizando procedimientos de naturaleza química, fisicoquímica y mecánica (74).

El descubrimiento de virus que infectan células vegetales ha ampliado el panorama de la transformación genética de plantas. Los Geminivirus y Caulimovirus, han sido utilizados para estos fines, ya que son virus DNA que pueden ser clonados directamente con el fin de transferir genes específicamente de resistencia a antibióticos; generando como ventajas principales la facilidad de infección, el amplio rango de hospedadores y su alta capacidad de producción de proteínas; sin embargo, presentan desventajas que sesgan la utilización de estos como son: el tamaño del gen de interés ya que no puede disminuir

la capacidad infectiva del virus, la letalidad sobre la planta huésped y la alta tasa de errores dado durante la síntesis del ARN vírico generando una expresión incorrecta del gen introducido (71).

En 1977, Chilton *et al.* (75), demostraron la presencia de un fragmento de DNA de la bacteria *Agrobacterium tumefaciens* al aislar tumores de la planta de tabaco, evidenciando la capacidad de esta bacteria de transferir DNA a diferentes reinos. El mecanismo de acción de esta bacteria está enfocado en la capacidad de integrar parte de su DNA-T dentro del genoma de su hospedero generando tumores (23). El DNA-T está localizado en el plásmido Ti (plásmido inductor de tumor) junto a los genes *vir*, necesarios en la transferencia del DNA bacteriano a la planta (76). En investigaciones realizadas, se identifican siete procesos fundamentales en la interacción *A. tumefaciens*-planta: 1. El reconocimiento y la adherencia, 2. La identificación de señales de la planta, 3. La activación de genes *vir*, 4. La generación del DNA-T, 5. La exportación del DNA-T hacia la planta, 6. Integración en el núcleo, y 7. Integración del DNA-T dentro del genoma del hospedero (Figura 8) (77). *Agrobacterium* reconoce compuestos fenólicos y monosacáridos liberados por la célula permitiendo su adhesión, generando la activación del sistema de dos componentes VirA/VirB, capaz de activar la transcripción del regulón *vir*. Se produce la síntesis del DNA-T que forma un complejo con las proteínas VirD1, VirD2, VirE2, y es translocado al hospedero utilizando el sistema secretor tipo IV, donde inserta su DNA-T en el genoma vegetal (76). Este sistema ha sido empleado ampliamente en el momento de producir plantas transgénicas, ya que son simples y sencillos a nivel técnico, no requiere de equipos con altas tecnologías, utiliza diferentes tejidos vegetales, entre otros (78).

Figura 8: Proceso de transformación de plantas mediado por *Agrobacterium tumefaciens* (79).



1.3 Análisis de libertad de operación

La propiedad intelectual (PI) se refiere a los derechos otorgados por el Estado sobre creaciones del intelecto humano (invenciones, obras literarias y artísticas, signos y diseños, etc.) (80). La PI se divide en dos grupos principales: la propiedad industrial y los derechos de autor. Los derechos de propiedad industrial comprenden las patentes de invención, los diseños industriales, las marcas de fábrica, las marcas de servicio, los nombres y denominaciones comerciales, etc.; y los derechos de autor que se relacionan con obras literarias y artísticas (81).

En los descubrimientos científicos las patentes son la forma más común de propiedad intelectual. Son un derecho exclusivo otorgado por el Estado concedido a una invención. Esta otorga el derecho de impedir la fabricación, utilización, venta, entre otros, sin autorización del titular. Es concedida por un periodo aproximado de 20 años, y la

expiración de esta, concede la invención al dominio público (80) La concesión de las patentes es deber de las oficinas nacionales denominadas fase nacional (82). Cuando se quiere proteger una invención en distintos países, es necesario: solicitar en los países respectivos la protección de la invención, presentar la solicitud en un país que se encuentre dentro del Convenio de París para la Protección de la Propiedad Intelectual o presentar una solicitud de virtud del tratado de Cooperación en materia de Patentes (PCT) (82).

Es necesario realizar un estudio de libertad y operación con el fin de conocer las patentes actuales que apliquen para el desarrollo biotecnológico. Se debe realizar la deconstrucción del producto en elementos que puedan ser analizados; en este caso casetes de expresión, región del gen de interés, vectores de transformación o cepas bacterianas. Luego se deben investigar las patentes vigentes en el estado donde se pretenda realizar la investigación y si está en planes de comercialización, teniendo en cuenta el análisis de reivindicaciones de las patentes con el fin de tener claro que se encuentra protegido (83).

Este análisis otorga claridad y tranquilidad sobre la tecnología que se vaya a utilizar puesto que se conoce cuales se encuentran dentro del dominio público y cuales tienen patentes registradas. Además de esto, se evita la infracción de derechos a terceros.

1.4 Sistema de doble híbrido en levadura

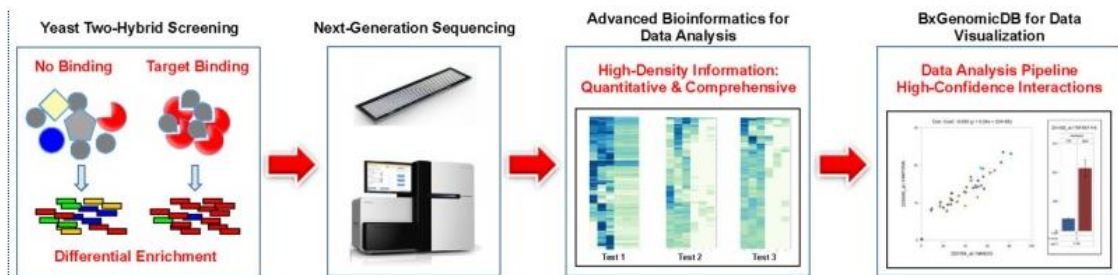
Los mecanismos de interacción de proteínas son componentes clave dentro de los sistemas biológicos, siendo cruciales para entender los mecanismos de función celular como son la arquitectura, el metabolismo y otras herramientas clave de las células (84). Para lograr determinar estas interacciones, se han desarrollado técnicas moleculares que describen un sistema genético utilizando levaduras. Fields and Song (85), lograron revolucionar el análisis de interacción de proteínas con el desarrollo de un sistema de doble híbrido en levadura (Y2H), que consiste en la división de un factor de transcripción en los dominios de unión al ADN y de activación; seguido por el anclaje de una proteína “cebo” al dominio de unión al ADN y la unión de la proteína “presa” con el dominio de

activación (86). Cuando la proteína “cebo” y la proteína “presa” se reconocen por medio de una interacción física se genera la activación del factor de transcripción expresándose por medio de genes indicadores que permiten seleccionar las células de levadura en donde se llevó a cabo la interacción. Seguido a esto, se procede a realizar el enriquecimiento de las células prevalentes, generando un sistema de selección genética que puede identificarse por secuenciación del ADN que codifica para las proteínas en mención (87).

La incorporación de secuenciación de próxima generación para la determinación de sistemas de interacción de proteínas aumentó la sensibilidad aportando datos cuantificables, consistentes y reproducibles.

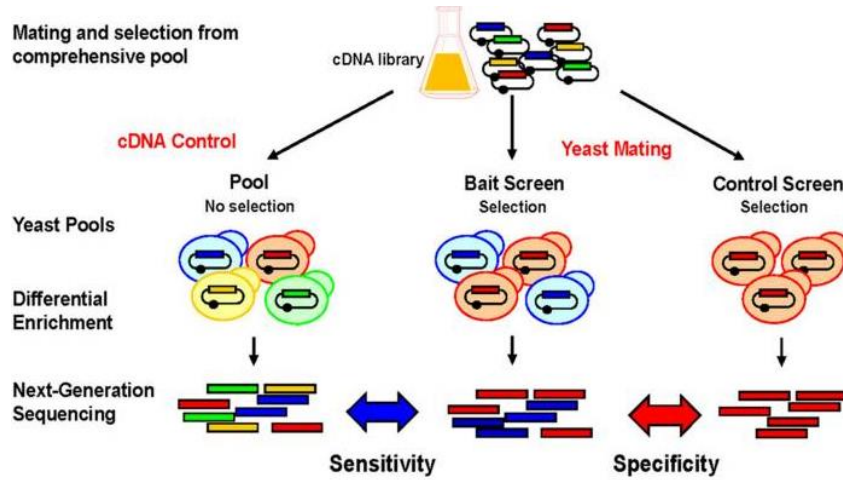
El principio técnico de esta técnica está dado por la clonación de vectores “presa” que se combinan con cepas “cebo” individuales a través de procesos de transformación y apareamiento, seguido por un enriquecimiento en medios de cultivo. Se proceden a amplificar los clones de ADNc “presa” y se realiza la preparación de las librerías iniciando con la fragmentación del ADNc amplificado para llevarse a cabo la secuenciación (86) (Figura 9).

Figura 9: Pipeline para secuenciación de interacción de próxima generación (NGS) (86).



La unión específica en esta técnica da como resultado diferentes poblaciones de ADNc que son identificados y cuantificados a través de la secuenciación. Estas interacciones son interpretadas por medio de estadísticas cuantitativas. Las librerías de ADNc derivadas de líneas celulares son clonadas en vectores presas que son combinadas con un cebo individual a través de procesos de transformación y apareamientos y después son cultivadas en medios selectivos. Luego se amplifican los clones seleccionados y estos productos son fragmentados y secuenciados (Figura 10).

Figura 10: Principio de detección y aplicaciones para secuenciación de interacción de próxima generación (86).



Los beneficios que otorgan estas técnicas están dados por una reducción sustancial de costos, la disminución de interacciones no específicas y la generación de datos de detección que pueden ser analizados como perfiles de interacción y que su vez permiten extraer datos de predicciones para la función de ciertos genes.

1.5 Casetes de expresión génica

Para lograr expresar genes en organismos heterólogos es necesario diseñar un constructo genético funcional que logre sintetizar los genes de interés. Estos han sido de gran utilidad en el uso de variantes herbicidas Genéticamente Modificadas (GM) que confieren resistencia a herbicidas no selectivos de amplio espectro, mejorando las condiciones de las cosechas (88). Un casete de expresión o constructo genético sintético, es una tecnología de DNA recombinante que permite que el DNA sea producido a través de medios artificiales (89). Este procedimiento consiste en el aislamiento y amplificación de un gen específico para clonarlo en otra molécula de DNA que sirve como vehículo o vector (Ejemplo: plásmido) utilizando enzimas de restricción, llevando a la replicación en nuevas células. Para poder aplicar las tecnologías de DNA recombinante, es necesario diseñar un constructo genético (89). Estos constructos

genéticos se han creado mediante técnicas de biología molecular, sin embargo, las herramientas bioinformáticas otorgan la posibilidad de probar este constructo *in silico* para evaluar su expresión (90)

Los constructos genéticos son una parte de un vector de DNA necesarios para clonar o transformar utilizando fragmentos codificantes que participan en pasos moleculares de expresión de genes, y a su vez contienen secuencias que regulan esta expresión (91) Sus componentes principales son: una secuencia promotora, un marco de lectura abierto (ORF), y una región terminadora. Seguido a esto, se debe realizar la optimización del constructo, realizando modificaciones en la secuencia codificante (optimización de uso codónico y remoción de secuencias indeseables) (91).

1.5.1 Región codificante

La traducción es el proceso de trasladar información que originalmente estaba integrada a un genoma en forma de DNA, que luego de ser transcrito se encontrara en forma de RNA mensajero (RNAm); y es convertida a proteína. Se hace referencia a la misma información, simplemente expresada en código de aminoácidos en una proteína (92). El código genético es el conjunto de reglas que establece como una secuencia de RNAm es expresada en secuencias de aminoácidos. Se encuentra almacenada en secuencias de tres nucleótidos denominados codones; que representan uno de los veinte aminoácidos existentes para la formación de una proteína. Son 64 codones disponibles para la producción de proteínas, de los cuales, 61 codones codifican aminoácidos y los 3 restantes son sitios que establecen la parada (93). Un codón codifica para más de un aminoácido, demostrándose que el código genético es “degenerado”. Por consiguiente, un ser vivo puede utilizar codones diferentes para expresar la misma proteína de interés denominándose sesgo codónico (91). En los procesos de síntesis de genes artificiales, es necesaria la optimización por uso codónico, ya que esto permite la modificación de una secuencia favoreciendo los codones preferidos por el organismo huésped. Si un gen contiene codones que el huésped raramente usa, el nivel de expresión será muy bajo (94). La optimización de uso codónico se basa en intercambiar el codón que el huésped no usa frecuentemente, por un codón que se vea reflejado en el huésped, sin alterar los aminoácidos que expresan la proteína de interés (94).

Para medir el proceso de optimización, se utilizan dos índices: adaptación codónica (CAI) y número efectivo de codones (ENc). El CAI, utiliza un conjunto de genes de referencia que han sido expresados ampliamente en una especie para evaluar el nivel de expresión de un gen (95). Sus valores oscilan entre 0 (cuando se presenta una alta diferencia entre el gen de referencia y el analizado) y 1 (cuando los codones son iguales). Este índice es la más efectiva forma de medir el sesgo de los codones (94). El ENc, arroja valores que varían de 20 (si solo se usa un codón por aminoácido) a 61 (si se usan todos los codones sinónimos). Se espera que el ENc sea bajo por el reconocimiento de las RNA de transferencia (94). Se han reportado diferentes genes con modificación de uso codónico bacteriano para expresión en plantas con diferentes fines como lo son: la resistencia a sequía y glufosinato (96), resistencia a *Tecia solanivora* en papa (97), tolerancia a fosfotricina (88), resistencia a plagas de tipo lepidóptero en arroz (98), resistencia al coleóptero *Conotrachelus aguacatae* (99) entre otros.

1.5.2 Promotor

Para expresar genes semisintéticos y realizar transformación genética es necesario el promotor. Es una secuencia de DNA no codificante situada al inicio de un gen, y sirve para que las enzimas involucradas en la transcripción (RNA polimerasa y los factores de transcripción) se posicionen y den inicio al proceso transcripcional (36). En el promotor se encuentran regiones consenso en posiciones (-35 y -10) corriente arriba del sitio inicial de la transcripción, con abundancia de A/T que proveen la fácil ruptura de puentes de hidrógeno. Estas secuencias dependen del tipo de células. En eucariotas se conoce como caja TATA (TATAAA) y secuencia CAAT (GGCCAATCT); y en procariontes se conoce como la Pribnow Box (TATAAT) y la secuencia consenso TTGACA (100). Además, contienen tanto sitios de unión a factores que promueven la adición de la RNA polimerasa (factor sigma en procariontes y los factores de transcripción en eucariotas) como reguladores adicionales (represores y potenciadores) (101). El interés de los promotores está enfocado a la capacidad de controlar la expresión de genes de interés en organismos prueba. Diversas investigaciones están enfocadas en el estudio de los promotores con el fin de regular los niveles de expresión transgénica en modelos

vegetales haciendo posible la introducción de transgenes evitando el silenciamiento genético (102).

Los promotores usados en Ingeniería Genética de Plantas se han clasificado en: promotores constitutivos, inducibles, y espaciotemporales que pueden ser tejido específico o con actividad etapa-específica (102). Los promotores constitutivos han sido usados para el diseño de transgenes para expresión en vegetales, y su característica principal es inducir altos niveles de expresión independiente el tejido o estadio. Estos promotores provienen generalmente de virus de plantas y genes constitutivos de plantas, y son utilizados por que reconocen la maquinaria celular vegetal permitiendo la expresión del transgén de interés (103). Uno de los promotores virales más utilizados en vectores de transformación es el CamV35S aislado en los años 80 del virus del mosaico del coliflor y ha sido utilizado en diferentes protocolos: En la transformación de algodón con el gen *cry1A* otorgándole resistencia a insectos (104), en la intensificación de la regulación de la expresión del gen *csr1-1* que confiere resistencia al clorosulfurón en café (105), en la estandarización de los parámetros de transformación del café mediante biobalística (106), al transformar repollo chino con el gen *cry1ac* son secuencias intensificadoras (107), al regular la expresión en tomate del gen reportero *gus* transformando *Agrobacterium rhizogenes* (108), entre otros.

1.5.3 Terminador

En un gen se encuentra una región que determina el punto de terminación de la transcripción denominada secuencia terminadora o terminador. En procariontes, la señal de parada es una región palindrómica, mientras que, en eucariotes, se reconoce una secuencia TTATTT que produce la separación del RNA de la RNA polimerasa (36). El sitio de poliadenilación de RNA de la secuencia T-nos del plásmido Ti de *A. tumefaciens*, obtenida del gen Nopalina sintasa (102) es utilizado ampliamente en genética vegetal.

1.6 Vectores de expresión

Para lograr transformar plantas se necesita introducir un fragmento de DNA que pueda replicarse de manera autónoma y como resultado se obtienen copias de la molécula recombinante de interés. Para esto, es necesaria la selección de un vector de transformación, siendo un fragmento de DNA de doble cadena capaz de insertar el fragmento de DNA de interés o exógeno (109). Para insertar un fragmento de DNA, se utiliza una enzima de restricción capaz de evitar junto a la fosfatasa alcalina, la recircularización del vector adicionando un extremo 3'fosfato que impide la unión por complementariedad de los extremos. Seguido a esto, se da la inserción del DNA de interés, generando la unión y regresando el vector a su orientación normal (36).

Los vectores pCAMBIA fueron desarrollados por los laboratorios CAMBIA, con el fin de abordar problemas como: orígenes de replicación de copias bajas disminuyendo la producción de DNA de interés. Estos vectores, otorgan diferentes ventajas sobre los convencionales: presentan un alto número de copias en *E. coli* generando altos rendimientos, presenta alta estabilidad en *A. tumefaciens*, son de tamaño pequeño (7 a 12 pb), ofrecen diversos sitios de restricción para modificar el plásmido, adecuados "polilinker" para introducir el DNA de interés, efectos antimicrobianos con cloranfenicol o kanamicina, selección de plantas con higromicina (110) y como ventaja principal, es creada sobre el concepto de "libre operación", puesto que la compañía se ha enfocado en el objetivo de los complejos y cerrados regímenes de la propiedad intelectual (111). Este vector ha sido utilizado en transformaciones de cepas de *E. coli* y *A. tumefaciens* (96) (98) (88) (97).

2. Objetivos

Objetivo General

Caracterizar la parasporina-6 (PS6Aa1) de *Bacillus thuringiensis* y evaluar su interacción con proteínas de una línea celular de cáncer de cuello uterino como modelo de biofábrica vegetal.

Objetivos Específicos

- Realizar un estudio de propiedad intelectual enfocado al uso de parasporinas como terapia de cáncer en Colombia.
- Establecer el modelo tridimensional de la Parasporina-6.
- Determinar las interacciones de la Parasporina-6 en el modelo de cáncer de cuello uterino.
- Diseñar un casete de expresión modelo para producción de parasporinas en plantas.

3. Metodología

3.1 Estudio de libertad de operación

La búsqueda fue realizada en las siguientes bases de datos internacionales de acceso público: “Patentscope” de la Organización Mundial de la Propiedad Intelectual (<http://www.wipo.int/patentscope>), “Espacenet” unido a “LatiPat” de la Oficina Europea de patentes (<http://espacenet.com>) y las oficinas de patentes de España y Latinoamérica, “The Lens” de la organización australiana sin ánimo de lucro enfocada a propiedad intelectual Cambia (<https://www.lens.org/>), “Uspto” de la Oficina de Patentes y Marcas de Estados Unidos (<https://www.uspto.gov/>), “Google patents” de Google (<https://patents.google.com/>) que indexa 17 oficinas de patentes que incluyen: la Administración Nacional de Propiedad Intelectual de China, Oficina de Patentes de Japón, Oficina de Propiedad Intelectual de Corea, Oficina Canadiense de Propiedad Intelectual, Oficina de Propiedad Intelectual del Reino Unido, Instituto Nacional de Propiedad Industrial de Francia, Oficina de Patentes de los Países Bajos, entre otros. Además, se utilizó la base de datos “SIC” de la Superintendencia de Industria y Comercio (<https://www.sic.gov.co/>) para la búsqueda de patentes en Colombia.

Las palabras clave utilizadas para la búsqueda fueron: “Parasporin”, “Protein anticancer *Bacillus thuringiensis*”, “Protein Cry Anticancer”, “*Bacillus thuringiensis* anticancer”. Además de esto, se revisaron las citas dentro de las patentes identificadas, y el análisis de patentes familiares que estuvieran en relación con esta temática. Esta búsqueda fue realizada a través de un periodo que comprende enero del 2021 hasta enero del 2022 con el fin de tener actualizados los datos.

3.2 Modelo tridimensional de la parasporina-6

La secuencia de aminoácidos de la PS6 fue obtenida de la página del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) con el código de acceso M019CP84. Con el fin de determinar la estructura que sirviera como molde para la generación del modelo tridimensional se utilizó el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) del NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), específicamente el algoritmo BLAST-P en la base de datos de Protein Data Bank (PDB) (<https://www.rcsb.org/>), usando como criterio un valor de error estimado (e-value) cercano al cero, el porcentaje de identidad >20% y un porcentaje de cobertura >60% (112). Se usó el programa Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) para hacer un alineamiento entre la PS6 y la secuencia molde obtenida por BLAST-P. Seguido a esto, se procede a obtener tanto la estructura secundaria, utilizando J-PRED (<http://www.compbio.dundee.ac.uk/jpred/>).

La estructura tridimensional de la PS6 se llevó a cabo utilizando el modelamiento por homología empleando Swiss-Model (<https://swissmodel.expasy.org/>); teniendo en cuenta modelos tridimensionales de proteínas homologas depositadas en PDB, que son aquellos modelos que ya se encuentran determinados por cristalografía de rayos X o resonancia magnética nuclear. Con el fin de conocer las métricas de calidad del modelo, se utilizó Q-MEAN (<https://swissmodel.expasy.org/qmean/>) que otorga datos de ángulos de torsión, distancia e interacción entre átomos y solventación de los residuos. Para el refinamiento del modelo se utilizó REFOLD3 (<https://www.reading.ac.uk/bioinf/ReFOLD/>).

3.3 Interacciones de la parasporina-6 en el modelo de cáncer de cuello uterino

Para el análisis de Y2H se utilizó un fragmento de la PS6 de *B. thuringiensis* CP84 de 300 aminoácidos (K356-A655), y RNA total de células humanas tipo HeLa (Clontech). Para la preparación de librerías de ADNc se aplicó el protocolo que genera $\pm 2.5 \times 10^6$ clones primarios con longitud promedio de 550 pb. El cebo fue probado en cuanto a

autoactivación y toxicidad antes de la selección. Además, la biblioteca de ADNc fue seleccionada con un vector vacío para controlar la activación del indicador Y2H no específico. Se realizó la secuenciación de nueva generación de librerías de ADNc originales con el fin de comparar resultados de la detección sin una selección previa (denominado Y2HHeLa); junto con muestras de cebo (denominado CP84_X_HeLa) y vector control (denominado pGBKT7_X_HeLa). Se realizó la identificación de regiones de interacción usando las coberturas de fragmentos en marco de las muestras cebo determinando los picos de todas las transcripciones para cada cebo. Se generaron recuentos de lecturas de todas las muestras para cada región de pico candidata. Por último, partiendo de recuentos normalizados, se ejecutó un análisis de enriquecimiento diferencial frente a la librería y el vector; identificando regiones que se enriquecieron contra ambos. Los criterios para este proceso fueron que el recuento de cebos sea al menos 16 veces mayor que en los vectores control, que el recuento de cebos sea al menos 16 veces mayor que en las librerías de ADNc control, que el pico no tenga una señal fuerte en los controles vectoriales, y que en el cebo el pico tenga al menos 10 fragmentos. Se realizó una secuenciación “paired end” del transcriptoma (utilizando secuencias de ADNc de GRCh38, según la versión 93 de Ensembl). Con el fin de disminuir el sesgo dado por las múltiples isoformas de empalme existentes para muchos genes, se permitió que cada “read” se mapeara hasta en 15 ubicaciones de coincidencia. Este servicio fue facilitado por la compañía Next Interactions Inc.

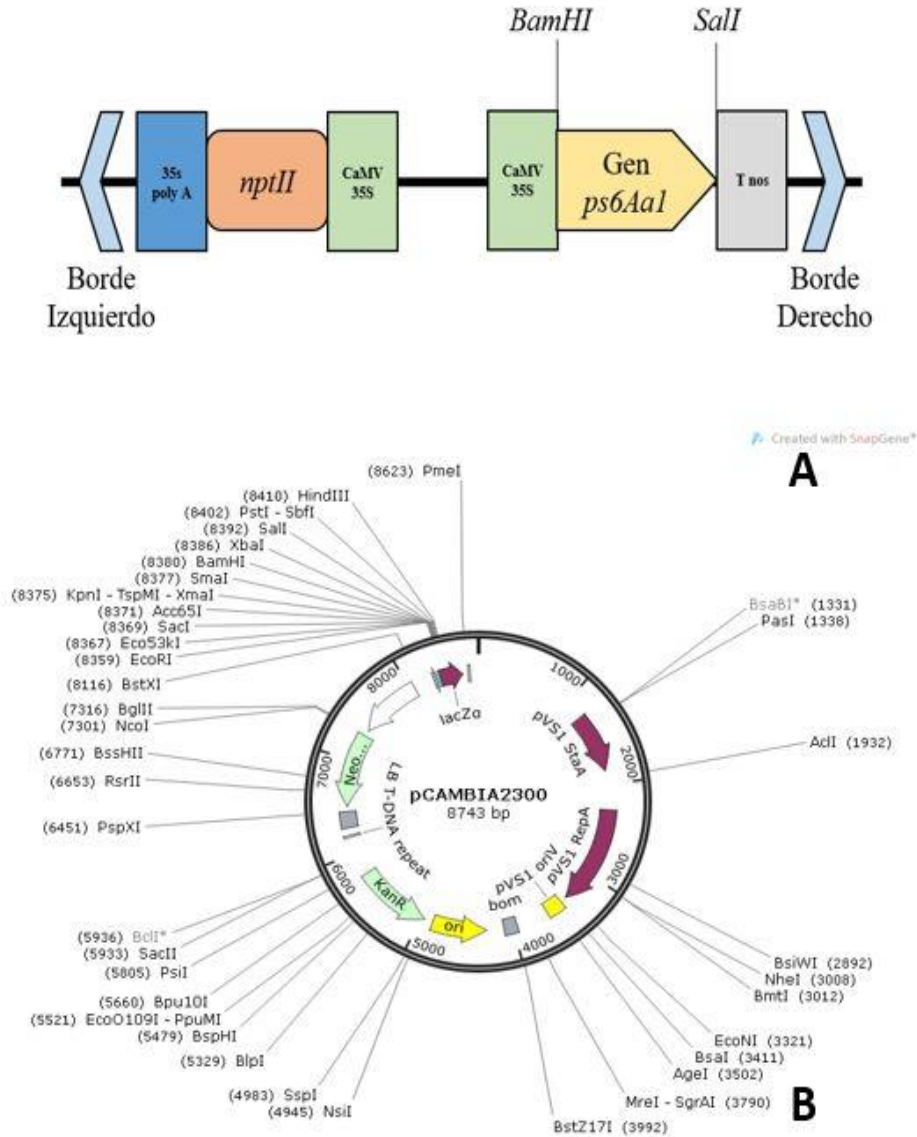
Con el fin de evaluar las interacciones resultantes del Y2H entre la línea celular HeLa y la PS6 se utilizó la herramienta de acoplamiento del servidor HDock (<http://hdock.phys.hust.edu.cn/>). Se basa en el acoplamiento híbrido de modelado basado en *templates*, permitiendo determinar interacciones proteína-proteína y proteína-ADN/ARN; teniendo como flujo de trabajo la entrada de datos seguido por la búsqueda de similitud de secuencias utilizando bases de datos de secuencias como PDB, continuando con la comparación de conjuntos de plantillas y finalizando con el acoplamiento global (113). A partir de esta herramienta de *docking* molecular se determinaron los aminoácidos que presentan interacción.

3.4 Casete de expresión modelo para producción de parasporinas en plantas

3.4.1 Diseño *in silico* del casete de expresión

Se realizó el diseño de un constructo usando la secuencia del gen *ps6Aa1* obtenido de la base de datos de nucleótidos del NCBI con número de acceso AB375063.1. Se realizó la selección de la región codificante utilizando la herramienta ORF Finder del NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>). El vector de transformación seleccionado fue pCAMBIA 2300 que contiene genes de resistencia a kanamicina (*nptII*) para selección de bacterias transformadas, y el gen reportero de resistencia a neomicina como marcador de selección en plantas; además, presenta un replicón pVS1 que otorga estabilidad en *Agrobacterium*. Se obtuvieron las secuencias del promotor CaMV35S (número de acceso NCBI AF234316.1) y del terminador T-nos (número de acceso NCBI AET75772.1) y se ensamblaron utilizando ApE-A plasmid Editor 2.0 (biologylabs.utah.edu/jorgensen/wayned/ape/). Adicionalmente se introdujeron secuencias de reconocimiento de las enzimas BamHI y Sall presentes en la región polilinker del vector pCAMBIA 2300 que no generaran cortes en la secuencia del gen analizado. Seguido al diseño del casete se contrató la síntesis y clonación en el vector con Shanghai Generay Biotech Co Ltd (China).

Figura 11: A. Diseño del casete de expresión. B. Vector Binario pCAMBIA2300.



3.4.2 Transformación genética de *Agrobacterium tumefaciens*

Se seleccionó la cepa LBA4404 de *A. tumefaciens*, y se realizó la transformación de esta por electroporación con el plásmido pCAMBIA2300 que contenía el casete de expresión

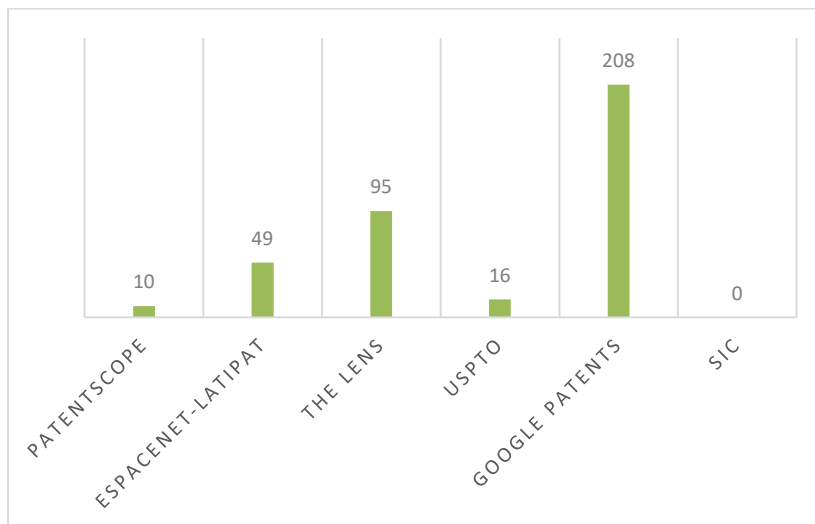
sintetizado. Se tomaron 25 µl de células transformadas más 1 µl de vector (100 ng/µl) en medio SOC (2 % de triptona, 0,5 % de extracto de levadura, 10 mM de NaCl, 2,5 mM de KCl, 10 mM de MgCl₂, 10 mM de MgSO₄ y 20 mM de glucosa) y se incubaron durante 3 horas a 28°C. Seguido a esto, se realizó la siembra en medio Luria Bertani (LB) con kanamicina (50 mg/mL) y se incubaron a 28°C por 48 horas. La selección de las colonias bacterianas transformadas fue realizada por crecimiento en medio sólido LB con kanamicina (50 mg/mL). Se realizó la confirmación de la selección anterior mediante PCR, obteniendo la colonia bacteriana y diluyéndola en agua hirviendo para llevar a cabo la extracción del ADN. Los primers fueron diseñados con el fin de amplificar el casete de expresión o el gen *ps6Aa1*, con un primer forward (5'-GAACCGTAATTCCAGGAGGA-3') y un reverse (5'-GTTCAACGGTTCCAGCAAAT-3'). La reacción de PCR se realizó utilizando Buffer PCR 1X, dNTP MIX 0.5 uM, Mg 2,5 mM, 1µM de primers, y Taq polimerasa 0,3 U. Los ciclos de temperaturas se dividieron en tres fases: denaturación inicial (5 minutos a 95°C), síntesis (1 minuto a 95°C-2.5 minuto a 57°C-1 minuto a 72°C x 30 ciclos) y extraelongación (5 minutos a 72°C). Por último, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1%, con el fin de verificar el tamaño del fragmento del gen.

4.Resultados y discusión

4.1 Estudio de propiedad intelectual enfocado al uso de parasporinas como terapia de cáncer

Se evidenció que, en las bases de datos utilizadas para la búsqueda de patentes, Google patents arrojó mayor número de resultados (208), seguido por The Lens (95), Espacenet-Latipat (49), Uspto (16) y por último patentscope (10). Este resultado determina que Google patents al incluir más de 17 oficinas internacionales indexadas en su buscador arroja un mayor número de patentes. De igual forma, The Lens proporciona la información de patentes de Estados Unidos, Australia, Europa, Tratado de Cooperación de Patentes (PCT), China, Corea del sur, Japón, Francia, Alemania, Reino Unido y Canada, siendo un recurso significativo. Espacenet-Latipat generó un número significativo de publicaciones ya que este además de arrojar resultados de Europa, tiene la opción de realizar una búsqueda en Latinoamérica. El bajo número de resultados obtenidos en Patentscope confirma que esta solo incluye las patentes que tienen solicitud dentro del PCT y que buscan protección internacional mientras se logra la protección regional adecuada. Es necesario mencionar que al realizar la búsqueda de patentes a través de la base de datos de la SIC no se encuentran resultados, determinando que a nivel Colombia no hay registro de patentes que protejan el uso de PS como terapia de cáncer (Figura 12).

Figura 12: Número de patentes con relación a PS identificadas en bases de datos especializadas.



Al analizar las patentes arrojadas por las bases de datos, se seleccionaron aquellas que tenían reivindicaciones que protegen el uso de PS como terapia de cáncer. Se filtraron aquellas que mencionaban las proteínas, los receptores, el cristal de donde se obtienen las proteínas, los genes que codifican para las mismas, las cepas de donde se obtienen estas moléculas, diseño de mecanismos utilizados para la administración de productos terapéuticos para cáncer, métodos para fabricar y utilizar esporas de *B. thuringiensis*, entre otros. En este punto fueron identificadas 18 patentes (Tabla 4) que se concentran en Estados Unidos (16%), China (12%), Japón (12%), Europa (12%), Canadá (10%), México (8%) y otros países (8%). El 22% de las patentes encontradas en las bases de datos presentaron solicitud para protección internacional por medio del PCT (Figura 13).

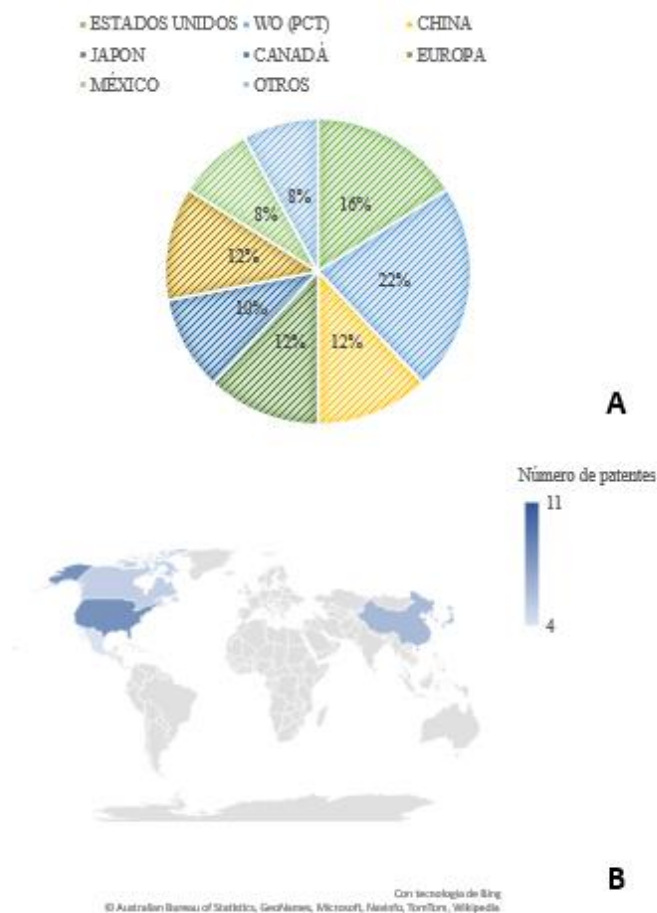
Tabla 4: Patentes relacionadas a la temática de PS de *B. thuringiensis*. Aquellas que directamente tienen relación con uso de PS en cáncer estén en negrilla.

Reivindicación principal	Número de patente	Nombre de la patente	Propietario
Proteínas	MX2011000894A, WO2012/080985A3, WO2012/080985A2, US20140073582A1	Proteínas Cry insecticidas de <i>Bacillus thuringiensis</i> con actividad anticancerígena	Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California
	WO2013/098755A2, US2014/0377216A1,	Proteínas de fusión contra el cáncer	Zoológico Adamed Sp

	AU2012/360086A1, EP2797950B1, SG11201403282QA, PL223487B1, RS56758B1, KR20140110017A, HUE035794T2, MX352796B, LT2797950T, BR112014015922A2 DK2797950T3, EA201491277 A1 UA115436C2, NZ627445A SI2797950T1, CA2859494A1, ES2655828T3		
	CN102408472A, CN102408472B	Proteína Cry62Aa1 de Bt (<i>Bacillus thuringiensis</i>) y gen codificante, así como su aplicación	University Sichuan Agricultural
	WO2020/211782A1	Proteínas Cry diseñadas para la administración de productos terapéuticos	Xinjiang Academy Of Agricultural Sciences Institute Of Nuclear Tech Biotech Xinjiang Uygur Autonomou
	WO2012080985A2, MX2011000894A US20140073582A1	Proteinas insecticidas Cry de <i>Bacillus thuringiensis</i> con actividad anticancerígena	Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE)
	WO1996038477A9	Nueva proteína antiproliferativa de <i>bacillus thuringiensis</i> var. <i>thuringiensis</i>	Research Development Foundation
Receptores	US2011/0038880A1, EP2273266A4 JPWO2009123145A1, WO2009/123145A1	Receptor de Parasporina 1 y uso del mismo	Fukuoka Prefectural Government (Fukuoka-shi)
	JP2011068568A	Receptor de Parasporina 2 activo en el cáncer y utilización del mismo.	Kyushu University
Cepas	CN102517228A CN102517228B	<i>Bacillus thuringiensis</i> ST7, gen anticanceroso y su aplicación.	University Sichuan Agricultural
	US2005089959A1 CA2410153A1	Nueva cepa de <i>Bacillus thuringiensis</i> , gen cristalino y proteína cristalina y uso de los mismos.	Agriculture Agroalimentaire Ca
	WO2020249811A1	Cepa de <i>Bacillus thuringiensis</i>	Bioinsectis SL
Cristal	JP4555928B2, JP2005263728A	Cristal de Parasporina-1 activado para expresar la actividad de destrucción del reconocimiento celular del Cáncer, Método para producir la estructura tridimensional del mismo.	Akao Tetsuyuki; Akiba Toshihiko; Harada Kazuaki; Ichimatsu Tokio; Katayama Hideki; Mizushiro Hidekazu; Nakamura Osamu; Oba Michio
Proceso de obtención	JP2010227015A	Dispositivo para separar células cancerosas y método para producir el mismo.	Seiko Epson Corp
	AU2012299142A1, EA201490480A,	Método integrado para la identificación de alto	Synthetic Genomics Inc

CN103946393A, EP2744920A4, US20130227743A1, MX2014002027A, JP6230125B2, CA2844913A1,	rendimiento de nuevas composiciones pesticidas y usos para las mismas.	
EP1778714A2	Métodos para fabricar y utilizar esporas de <i>Bacillus thuringiensis</i> recombinantes	PhylloM Llc
KR20170020537A, CN112546231A, AU2015286042B2, SG11201700079VA EP3166640A4, JP2017521421A CA2954443A1, WO2016004875A1, TW201628652A, AR101179A1, US20170056391A1	Composiciones de terapia combinada y métodos para tratar cánceres.	Lixin Li

Figura 13: Distribución geográfica de patentes relacionadas a PS.



Esta distribución demuestra que estos países han generado mayor interés que los demás territorios en el uso de proteínas bacterianas con actividad anticancerígena; además, buscan proteger sus invenciones tanto en su mercado local como internacional de interés económico (114). Dentro del análisis de libertad de operación se evidenció que las patentes solicitadas se encontraban agrupadas teniendo en cuenta las reivindicaciones de su invención (Tabla 4). Las patentes sombreadas incluyen asociaciones con PS de *B. thuringiensis*.

Dentro de las patentes que describen las proteínas se encontró: la solicitud de patente US20140073582A1 que protege ácidos nucleicos que codifican proteínas Cry insecticidas de *B. thuringiensis*, composiciones y proteínas que presentan actividad citotóxica frente a células cancerosas, pero no frente a células normales; la solicitud de patente WO2013/098755A2 que comprende una proteína de fusión terapéutica utilizada para agentes anticancerígenos; la solicitud de patente CN102408472A que proporciona una nueva proteína Cry62Aa1 de *B. thuringiensis* y su gen codificante teniendo en cuenta que esta proteína tiene un efecto anticancerígeno (esta proteína no ha sido clasificada como PS); la solicitud de patente WO2020/211782A1 que proporciona nuevas proteínas recombinantes con capacidad de autocristalización diseñadas para la administración de productos terapéuticos; y la solicitud de patente WO1996038477A9 que protege una proteína aislada y purificada derivada de *B. thuringiensis* subespecie *thuringiensis* con efectos antineoplásicos. También se encontraron patentes que protegen receptores de las proteínas como: US 2011/0038880A1 que menciona la invención de la beclin-1 como receptor de la PS1 y su método para inducir la muerte celular en células cancerígenas y JP 2011068568A que identifica a Hep27 como receptor de la PS2 junto a su modo de acción. En cuanto a las cepas bacterianas se encontraron 3 patentes que las protegen, la solicitud de patente CN102517228A protege una cepa ST7 de *B. thuringiensis* con número de colección CGMCC No 3922 que contiene un gen *cry62Aa1* que expresa una proteína con alta actividad hacia células de cáncer de mama. La solicitud de patente US2005089959A1 protege una cepa de *B. thuringiensis* depositada en el International Depository Authority of Health de Canadá con número de acceso IDAC010201-5, que presenta un gen que expresa una protoxina y toxina Cry31 utilizado para aplicaciones terapéuticas contra el cáncer. Se encuentra la solicitud de patente WO2020249811A1 que protege una cepa de *B. thuringiensis* anticancerígena depositada en la Colección Española de Cultivos CECT con el número de referencia CECT 9753 y sus posibles

usos. En cuanto al cristal de *B. thuringiensis* se encontró una única patente JP2005263728A que permite dilucidar la estructura tridimensional de la cadena lateral de aminoácidos mediante cristalografía de rayos X; proporcionando el método de producción del cristal para aplicaciones en cáncer. En cuanto a los procesos de manipulación, se encontró la patente JP2010227015A que demuestra la invención de un dispositivo para separar células cancerosas y el método para producirlo.

Teniendo en cuenta el análisis de las etapas del proceso de solicitud de las patentes, se evidenció que 11 de estas se encuentran abandonadas, es decir, el solicitante no completó los elementos faltantes o no se realizó el examen de patentabilidad. Por esta razón, los entes encargados de regular la propiedad intelectual recomiendan conocer como redactar y presentar la solicitud de las patentes con el fin de evitar abandonos (115). El 29% de las patentes relacionadas con proteínas anticancerígenas de *B. thuringiensis* se encuentran activas, 12% retiradas, 6% cesadas y 3% en ingreso a fase nacional. El 9% de las patentes se encuentran caducadas por no pago, teniendo en cuenta que al presentar una solicitud de patente el titular este encargado de realizar el pago de una anualidad; y si no se realiza esta pierde el derecho de exclusividad y pasa a ser de dominio público (115). Al año 2022, solo dos patentes relacionadas con PS se encuentran activas: WO2009/123145A1-Receptor de PS1 y uso de este, y JP4555928B2-Cristal de PS1 activado para expresar la actividad de destrucción del reconocimiento celular del cáncer, método para producir la estructura tridimensional del mismo.

Por último, se procedió a clasificar los campos patentados utilizando el sistema jerárquico de Clasificación Internacional de Patentes (IPC) autorizado por la Organización Mundial de Propiedad Intelectual. Este método proporciona un código que reúne tecnologías en común de las patentes solicitadas. Se evidenció que las solicitudes de patentes se encuentran agrupadas en: uso de la proteína de *B. thuringiensis* y su cristal con nueve aplicaciones, medicamentos para propósitos específicos no incluidos en A61P1/00-A61P41/00 con 5 aplicaciones, agentes antineoplásicos o agentes quimioterapéuticos con 7 aplicaciones, técnicas de cultivos celulares reproducción en plantas -proceso de selección que involucra marcadores genotípicos y fenotípicos – *B. thuringiensis* con 3 aplicaciones, entre otros (Tabla 5).

Tabla 5: Clasificación Internacional de patentes.

IPC	Tema central	Número de patentes
C07K14	Proteína de cristal de <i>B. thuringiensis</i> (delta-toxina)	JP2005263728A, JP2011068568A, US20140073582A1, CN102408472A, CN102517228A, US2005089959A1, WO2020/211782A1, WO2012080985A2
A61K38/00, A61K38/10, A61K38/1709	Medicamentos para propósitos específicos no incluidos en A61P1/00-A61P41/00, péptidos de 12 a 20 aminoácidos, péptidos de más de 20 aminoácidos.	US20140073582A1, US2005089959A1, WO2020/211782A1, WO2012080985A2, US2011/0038880A1.
A61P35/00, A61P31/00.	Agentes antineoplásicos. Agentes quimioterapéuticos.	WO2009/123145A1, JP2011068568A, WO2012/080985A2, CN102408472A, CN102517228A, WO2012080985A2, US20170056391A1
G01N33/50, G01N33/6851, G01N33/15.	Inmunoensayo, Métodos de análisis de proteínas que involucran espectrofotometría de masas, Preparaciones medicinales.	WO 2009/123145A1, JP 2011068568A
C07K14/4747 C07K14/4703.	Proteínas relacionadas con apoptosis, Inhibidores, traducción de productos de oncogenes.	WO2009/123145A1
A61K39/395 A61K45/06.	Anticuerpos.	WO 2009/123145A1, JP2011068568A, US20170056391A1
C12N15/00, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N1/32, C12N1/20.	Bacteria, Bacillus, Alga unicelular, Cultivos.	JP4555928B2, CN102517228A, US2005089959A1, WO2020249811A1
A01H1/00 A01N65/00 A01N37/46 A01N63/23	Técnicas de cultivos celulares reproducción en plantas, proceso de selección que involucra marcadores genotípicos y fenotípicos, <i>B. thuringiensis</i> .	US 2005089959A1, WO2020249811A1, WO2014159836A1.

Al realizar el análisis de toda la información encontrada en las solicitudes de patentes presentadas se determinó que en general las PS pueden ser utilizadas libremente para el diseño, creación y distribución de productos asociados a la terapia del cáncer, sin problemas de infracción de derechos de autor.

4.2 Modelo tridimensional de la parasporina-6

La secuencia de aminoácidos de la proteína PS6 (PS6Aa1/Cry63Aa1) fue obtenida en formato FASTA de la base de datos del Comité de Clasificación y Nomenclatura de PS, que redirecciona a la página del NCBI con el código de acceso M019CP84. Teniendo en cuenta que las PS son sintetizadas como una protoxina y que para ser tóxica primero debe ser solubilizada con cambios de pH y digerida con serin-proteasas (116), es necesario realizar los estudios bioinformáticos con la toxina activa. Se procedió a eliminar los primeros 99 aminoácidos de la secuencia FASTA, pues es el punto en el que la tripsina realiza la digestión y expone una proteína activada (69). Esta secuencia fue analizada por medio de Blastp en PDB que busca la similitud total a la proteína experimentalmente determinada (117), arrojando un porcentaje de identidad bajo (22,56 %), pero con porcentaje de cobertura del 85% y E-value de $9e-19$ para la proteína Cry2Aa con código de acceso 1I5P en PDB. Con el fin de validar si la proteína Cry2Aa es el molde adecuado para la construcción del modelo tridimensional fue necesario obtener la estructura secundaria para determinar los residuos asociados a alfa hélices, beta laminas y *loops* ya que la precisión a nivel de residuo es mayor del 80% generando mayor confiabilidad al momento de seleccionar un molde para obtener la estructura tridimensional (118). Se obtuvo la predicción de la estructura secundaria, utilizando J-PRED que determinó que la toxina activa de PS6 está conformada por 111 láminas beta (16,97%), 168 alfa hélices (25,68%) y 375 *loops* (57,33%). Para determinar el molde adecuado para la construcción del modelo, se realizó el alineamiento de la toxina activa de PS6Aa1 con la proteína Cry2Aa (1I5P) y, además de esto se incluyeron las proteínas PS2 (2ZTB) y PS4 (2D42) que son PS con estructuras tridimensionales conocidas incluidas en el PDB. Las alfa hélices fueron marcadas de color rojo, las láminas beta de color verde y los *loops* se mantuvieron de color negro (Figura 14).

Figura 14: Alineamiento entre las proteínas PS6 y Cry2Aa, resaltando los residuos asociados a alfa hélices (rojo) y beta láminas (verde).

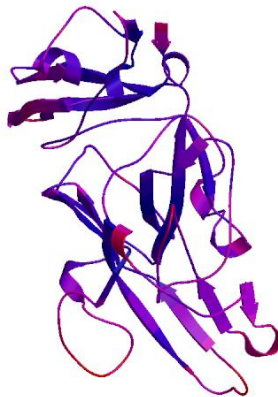
PS6 JPPE 1I5P_1 Chain	--TVIPGG-----VIFSVTGNK FV DSKFTAITYAAITKLTSS LITAAATA MNNVLNSGRITICDAYNVVAHDPF SFEHKSLDTIQKEWMEWKR TDHSLYVAP VVGTVSSF	43 60
PS6 JPPE 1I5P_1 Chain 113	ILGPIGTTIGGAI SGPIANALFGLIPGMKPLTPQEI IIDI AVEQSKLYTDEQITNLVITNA LLKKV GLIG----KRI LSELWGI I FPS ---G STNLMQDILRETEQFL NQRLN TDTLAR	103
PS6 JPPE 1I5P_1 Chain	TSELASIKAKIEDFNSQLNFALNSKNDNLNMRIDFETFLV TLENDIYGSIIKLMNFGYSK NAELIGLQANIREFNQQVDN FLNPTQNPVPLSI-- TSSVNTMQQLFLNRLPQFQIQGYQL	163 171
PS6 JPPE 1I5P_1 Chain	QLLPIITVCTLNLSFLRDAIFNSQTFNISTQ GKRVLTDT FERRTIEYSDKII NEYTL LF LLL PLFAQAANMHL S FIRDVIL NADEWGIS AATLR TYRDYLRNYTRDYSNYCINTY QTAF	223 231
PS6 JPPE 1I5P_1 Chain 283	NEIKLKENAKTTLD FRT FMSLQVLDQVDLW SVFKFSQFNIRN TRRLY TIPYQSENDVSK RGLN-- TRLHDMLEFR TY MFLNV FE VSIW SLFKY QSLM VSSGAN LYASGSG -----P	283
PS6 JPPE 1I5P_1 Chain	LDPTQIN-----GDWKF IN -----QILYGLPGNRISG QTQSFTA----- QNWPF LY----- SLFQVNSNYILSG	310 310
PS6 JPPE 1I5P_1 Chain	FAGTVEL-----YQP---- NKIR RINKL KALYS SN ETT GYVGKDANAMDSFD ISGTRLSIT ---- FPNIGGLPGS ---- TTTHSLNSARVNYS GGVSSGLIGATNLN-HN FN	353 361
PS6 JPPE 1I5P_1 Chain	THPIISQK PA I IN YASHV IVNLP PSSVQNLTL LD TIGPI----- FPGKYVI CST -----VL PL ST PFVRSW LDS GT DREGVAT STN W QTESFQT TL SL	399 404
PS6 JPPE 1I5P_1 Chain	NQQLY-----PGLNSLLEYEKFAIPDHKG VNV -----AGLPNIDSS-- RCGAF -----SARGNSNY---- FPDYFIRNI ----- SGVPLVIRNED	435 437
PS6 JPPE 1I5P_1 Chain	----YTSS TID NLRQNFITSK PI LGS VTA FQK---- DIP NYEQVN KEQIVH L CP TD T DQ L TRPLHY NQIRNI ---- ES PSGT PGGARAYLVS VHNRK NNIYAANENG TM IHLA PEDY--	487 491
PS6 JPPE 1I5P_1 Chain	KLLGFNIPALEYSKDRIAN F GF EETWMI IPSYSSSGD NLQ FK GT AGIK Y LL KS AQ N AYA -- TGFT IS PIHATQ ---- VNNQ TR TFISE KFG NQ GD SLR FE Q SN TTAR Y TLR NGNS YN	547 544
PS6 JPPE 1I5P_1 Chain	NYKIFIKIAYKPNNSGNKVQLN INMKD L TSSSIISATLN I QNT SL LK GT SE D N VK FIT FE LYLRVSSIGNS ----- TIRVT IN GRVYTVS ----- NV TT T N NDG V NDGARFSDIN	607 591
PS6 JPPE 1I5P_1 Chain	VPTNFPISNNT YELQLIFT NLQ Q ND DLRLNELILHP IN ND FINILNA 654 IGNIVASDN T NV TL LDI - NV TL NS GT PF DL MNIMFV PT N L PPLY ---- 633	

Este resultado demuestra que la proteína Cry2Aa (1I5P) es un molde adecuado para la construcción de un modelo tridimensional de la PS6, a pesar de tener un bajo porcentaje de identidad, ya que presenta similaridad estructural en cuanto a distribución de alfa hélices y beta laminas, además, demuestra ser una proteína de tres dominios tipo Cry (dominio I de alfa hélices, dominios II y III ricos en beta láminas) al igual que la PS6,

contrario de otras PS como PS2 (2ZTB) y PS4 (2D42) que se encuentran agrupadas dentro de las toxinas MTX formadoras de poros (119).

A continuación, se procedió a realizar el modelo tridimensional de la PS6 empleando Swiss-Model (Figura 15). Swiss-Model es uno de los servidores de modelado de estructuras más utilizado en todo el mundo, por la rapidez con la que otorga un modelo y, además, por su alto rendimiento evidenciado en el proyecto de evaluación de herramientas para determinación de modelos tridimensionales CAMEO (<https://cameo3d.org>). Swiss-Model genera un modelo tridimensional de una proteína extrapolando información experimental de una estructura que sirve como molde; transfiriendo primero las coordenadas conservadas definido por la alineación objetivo-molde. Las coordenadas residuales correspondientes a inserciones o deleciones generan un bucle y se obtiene un modelo de proteína de átomo completo mediante la construcción de las cadenas laterales de aminoácidos no conservadas (120).

Figura 15: Modelo generado por Swiss-Model con la plantilla 1I5P.

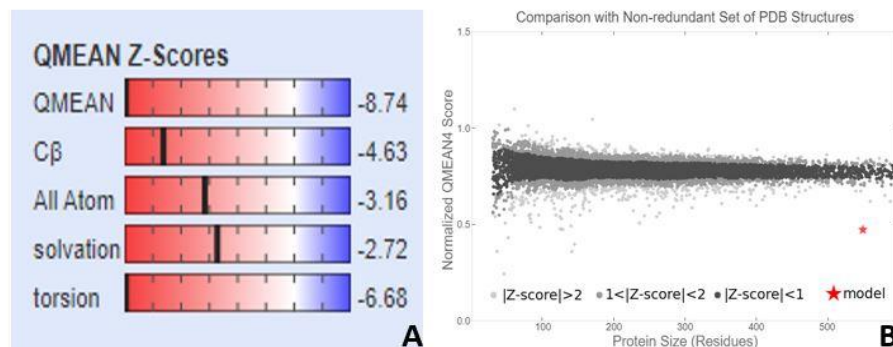


Se analizó el modelo basado en los valores de calidad otorgados por la función de puntuación QMEAN de Swiss-Model, que compara el modelo con distribuciones obtenidas de estructuras de alta resolución resueltas por cristalografía de rayos X. El resultado QMEAN Z-score proporciona una estimación del grado de natividad de las características estructurales observadas en un modelo, e indica si el modelo es comparable con estructuras experimentales. Para realizar la validación de un modelo se debe obtener un valor de Z-score óptimo de 0, aceptando variaciones de + o - 1 (121). Adicionalmente, QMEAN establece puntuación utilizando seis descriptores estructurales

que son: C β interaction (evalúa interacciones a nivel residuo), all-atom interaction (interacciones de largo alcance), solvation (potencial de solvatación para describir el estado de asociación química con el solvente para los residuos), torsión (potencial de ángulo de torsión sobre tres aminoácidos consecutivos para analizar la geometría de la columna vertebral de la estructura), SSE agreement (estructura secundaria predicha y calculada) y ACC agreement (accesibilidad al solvente) (121). En el gráfico de comparación, los puntajes de calidad del modelo están relacionados con los obtenidos para estructuras experimentales de tamaño similar; en donde el eje X muestra la longitud de la proteína y el Y la puntuación de QMEAN normalizada.

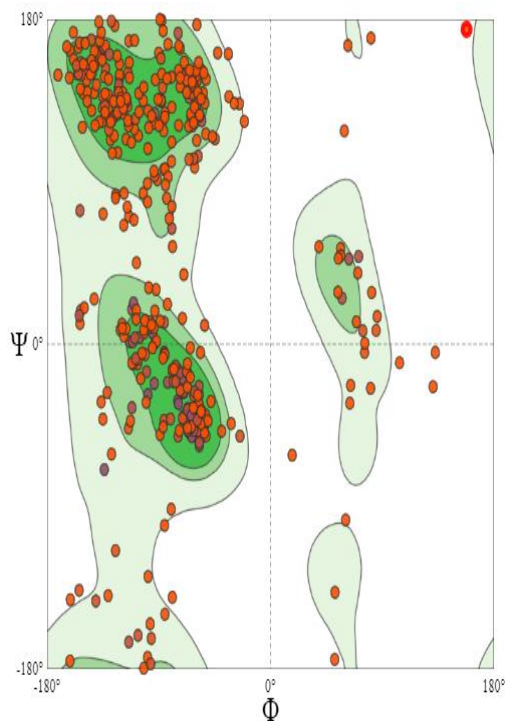
Los valores que se obtuvieron para el modelo construido presentaron valores negativos que indican que las puntuaciones del modelo son más bajas que las estructuras experimentales en promedio, evidenciándose que el QMEAN del modelo no se encuentra dentro de la media del valor esperado de las estructuras reportadas en PDB (Figura 16).

Figura 16: **A.** Estimación de la calidad global del modelo obtenido por QMEAN. **B.** Gráfico de comparación con estructuras de PDB para el modelo obtenido por Swiss-Model.



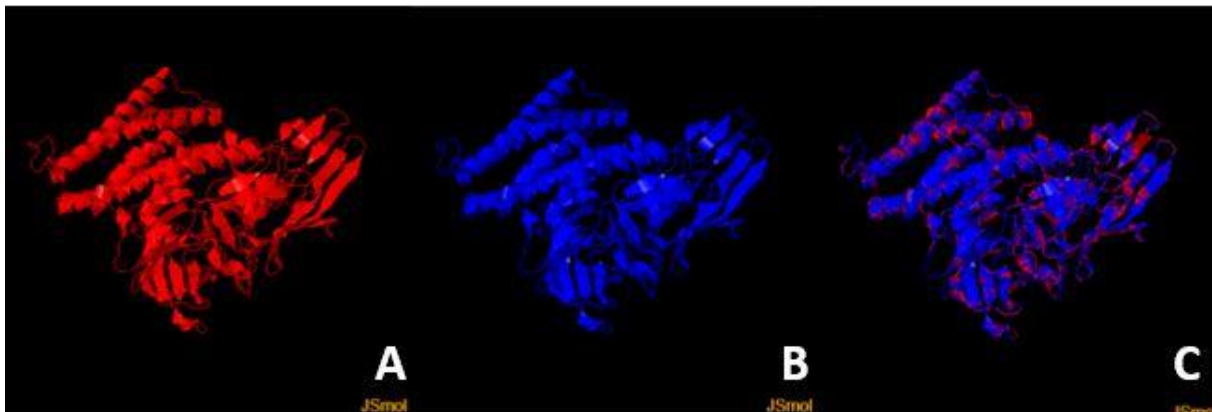
El diagrama de Ramachandran permite visualizar las regiones energéticamente favorecidas para los ángulos diédricos de la red troncal contra los residuos de aminoácidos en la estructura de la proteína (Carugo & Djinic Carugo, 2013). A partir del análisis del gráfico se puede concluir que en el modelo de PS6 se encuentran múltiples residuos tanto en regiones generosamente permitidas como en regiones no permitidas, evidenciándose regiones energéticamente desfavorecidas (Figura 17).

Figura 17: Diagrama de Ramachandran para el modelo.



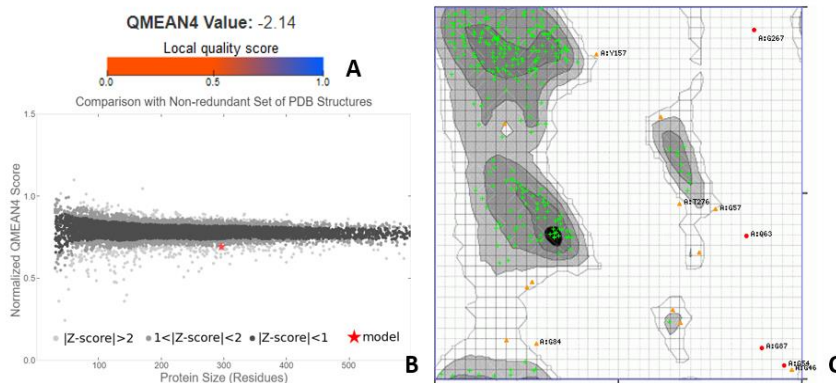
Al evidenciar que el modelo no tiene una estimación de calidad ideal se procedió a realizar el refinamiento y optimización de la estructura con el fin de corregir errores locales y mejorar la calidad del modelo tridimensional. El refinamiento de un modelo tiene como objetivo principal aumentar la precisión ajustando la estructura secundaria y las modificaciones de las interacciones de las cadenas laterales. Para realizar estas correcciones, se utilizó el servidor REFOLD3, que es uno de los principales servidores automatizados gratuitos para este fin. Este servidor, utiliza una estrategia de restricción gradual basada tanto en predicciones de contacto como en la estimación de la calidad local por residuo, esto con el fin de guiar el refinamiento del modelo, además, este servidor se presenta integrado junto con ModFOLD8 que provee datos de calidad (122). En la Figura 18 se puede observar la comparación del modelo sin refinamiento frente al modelo refinado por ReFOLD3.

Figura 18: Comparación del modelo refinado de PS6 con el modelo generado por Swiss-Model. **A.** Modelo original; **B.** Modelo refinado. **C.** Modelos superpuestos, se observa algunos residuos que aún tienen baja calidad en su distribución.



Los datos de calidad obtenidos demuestran la mejora presentada después del proceso de refinamiento con puntaje total de QMEAN DE -2.14, el modelo se ubica cercano a la distribución que poseen modelos experimentalmente determinados, y en el gráfico de Ramachandran se aprecia que la mayoría de residuos están en las zonas permitidas (Figura 19), sin embargo, se evidencia que ciertos residuos persisten con baja calidad. Esto refleja una de las desventajas presentadas al momento de refinar modelos tridimensionales, ya que los predictores suelen ser muy conservados en porciones de residuos, lo que limita la posibilidad de generar grandes modificaciones y mejoras en los modelos, además el refinamiento se ve limitado a cambios estructurales localizados y a que el modelo inicial se encuentre relativamente cercano del estado natural. (123).

Figura 19: Métricas de calidad del modelo después del refinamiento con QMEAN. **A.** Valor de Q-MEAN. **B.** Comparación del modelo refinado con proteínas incluidas en PDB. **C.** Ramachandran plot.

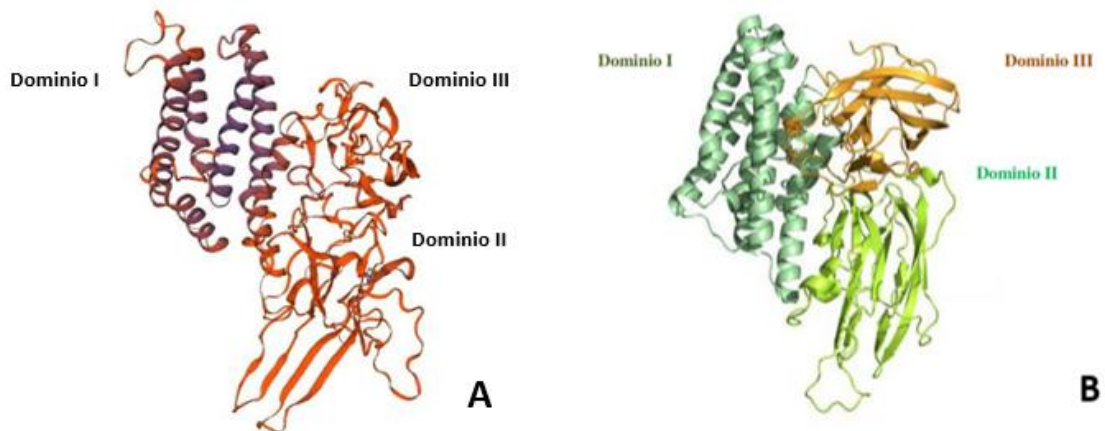


Otras desventajas detectadas al momento de refinar un modelo de proteínas computacionalmente, giran en torno a la incapacidad de clasificar de manera confiable modelos complejos, por esta razón es necesario determinar el objetivo del refinamiento, puesto que ciertas condiciones experimentales requieren un nivel más profundo de precisión, y para estos casos se puede utilizar un método de alta resolución que mejore la calidad de la estructura local incluyendo una estereoquímica más estable (124). Sin embargo, a pesar de los desafíos que representan los refinamientos de proteínas actualmente, los modelos refinados demuestran una utilidad al momento de ampliar la información de una proteína reemplazando los modelos experimentales de cristalografía de rayos X o de la resonancia magnética nuclear, por métodos moleculares y bioinformáticos siendo más costo-efectiva (125).

El modelo tridimensional de la PS6 muestra una estructura con tres dominios funcionales: el dominio I, compuesto en su totalidad por siete alfa hélices presenta la siguiente distribución de aminoácidos: la primera está compuesta por 13 aminoácidos y comprende de la Ala40 a la Gly 53, la segunda está conformada por 8 aminoácidos de la Ala61 a la Ile68, la tercera presenta 13 aminoácidos, del Glu a la Thr91, la cuarta comprende 28 aminoácidos de la Asn97 a la Leu125, la quinta está compuesta por 14 aminoácidos de la Phe141 a la Lys155, la sexta está compuesta por 23 aminoácidos de la Ser162 a la Phe185 y la séptima está conformada por 58 aminoácidos, de la Thr194 a

la Leu252. Este dominio se caracteriza por presentar un alto porcentaje de aminoácidos hidrofóbicos y anfipáticos (Met-Val-Ile-Pro-Phe-Leu-Val-Ala), de la misma forma que las proteínas Cry. El dominio II compuesto por tres laminas beta antiparalelas en bucles conformados por 159 aminoácidos distribuidos de la Arg307 a la Ser334 en la primera lámina, la segunda lámina comprende del Glu337 a la Thr354 y la tercera distribuida de la Leu383 a la Ile392. Este dominio expone *loops* de superficie que le otorgan la funcionalidad de unión a un receptor celular. El dominio III está conformado por 181 aminoácidos (Asn467 a Phe648) organizados en dos laminas beta antiparalelas formando una β sándwich (Figura 20A). Estos dominios se encuentran relacionados con la confirmación tridimensional de las proteínas Cry insecticidas (Figura 20B) que les confiere su actividad citotóxica, concluyendo que en la PS6 ejercen la misma función (126).

Figura 20: A. Modelo tridimensional de la PS6. B. Estructura de las proteínas Cry de tres dominios.



4.3 Interacciones de la parasporina-6 en el modelo de cáncer de cuello uterino

En el ensayo de doble híbrido en levadura (Y2H) realizado se identificaron 11 péptidos que interactúan con proteínas de la línea celular HeLa reportadas en el proteoma de esta línea celular (1200 proteínas), sin embargo, cinco de estas son específicas involucradas en el proceso biológico del cáncer de cuello uterino (127) (Tabla 6).

Tabla 6: Proteínas que interactúan con la línea celular HeLa.

Proteína	NCBI
Autocrine motility factor receptor (AMFR)	NM_001323511.2
CXXC Finger Protein 1 (CXXC1)	XM_017025718.2
COP9 signalosome subunit 5 (COPS5)	NM_006837.3
Carboxypeptidase A4 (CPA4)	NM_016352.4
ilvB acetolactate synthase like (ILVBL)	NM_006844.5
Proteoglycan 4 (PRG4)	NM_005807.6
KIAA1549	NM_020910.3
ATPase H⁺ transporting V1 subunit B2 (ATP6V1B2)	NM_001693.4
Lipin 1 (LPIN1)	NM_001349203.2
Tetratricopeptide repeat domain 38 (TTC38)	NM_017931.4
Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 1 (EIF4G1)	NM_198244.3

De los once productos proteicos, nueve se encuentran en diferentes células, sin embargo, tres de estos son específicos de células derivadas del cáncer de cuello uterino (línea celular HeLa). El receptor del factor de motilidad autocrina (AMFR) es una glicoproteína de 78kD que estimula la motilidad celular in vivo y la capacidad metastásica in vitro, correlacionándose con una alta incidencia de recurrencia y una supervivencia más corta en pacientes con cáncer (128). Estudios realizados utilizando inmunofluorescencia revelaron que esta proteína se distribuye uniformemente a través de la membrana de las células con una distribución polar y se encuentra involucrada en los procesos de degradación asociada al retículo endoplásmico (128). La proteína de unión a

CpG o también conocida como proteína de dedo de zinc tipo CXXC1 (CXXC1) regula la expresión génica reconociendo secuencias CpG no metilados a través de su dominio CXXC1; adicionalmente es un componente de complejo SETD1, esencial para el desarrollo de los vertebrados (129). La carboxipeptidasa A4 es una enzima exopeptidasa que contiene zinc catalizando la liberación de aminoácidos carboxi-terminales, lo que favorece un microambiente tumoral asociándose con la agresividad vista en ciertos tipos de cáncer (130). La 2-Hidroxiacil-CoA liasa 2 (ILVBL) es una proteína de unión a pirofosfato de tiamina identificada en bacterias, levaduras y plantas; y se encuentra asociada a cáncer renal y endometrial (131). El proteoglicano 4 (PRG4) es una proteína de 345 kD sintetizada por los condrocitos ubicados en la superficie del cartílago articular y por las células del revestimiento sinovial; además se encuentra relacionada con una supervivencia más prolongada en pacientes con carcinoma hepatocelular (132). El gen de fusión KIAA1549 es utilizado como marcador tumoral ya que expresa marcadores vasculares creando proteínas de fusión con actividad constitutiva de quinasa BRAF, encontrándose en diferentes tipos de cáncer (133). La lipina-1 (LPIN1) es una proteína que se expresa en una variedad de tejidos con mayor expresión en el tejido adiposo, el musculo esquelético y los testículos; actuando como enzima fosfatidato fosfatasa trasladándose desde el citosol a la membrana del retículo endoplásmico favoreciéndose la síntesis de ácidos grasos (134). Se ha reportado que la inhibición de la lipogénesis induce la apoptosis y reprime la proliferación de células cancerosas (135). La proteína de repetición de tetratricopéptido 38 (TTC38) se encuentra relacionada con el metabolismo de los lípidos y se ha usado como marcador pronóstico en cáncer de endometrio.

Las tres proteínas que se encuentran presentes en células HeLa y no en células normales son: COP9 signalosome subunit 5 (COPS5), la ATPase H⁺ transporting V1 subunit B2 (ATP6V1B2) y la Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 1 (EIF4G1). La subunidad 5 del signalosoma COP9 es una proteína multifuncional que actúa en los procesos de regulación de la inestabilidad cromosómica, el daño del ADN y el ciclo celular, adicional que dirige a la poliubiquitinación ligada a K48 y K63. La pérdida de función de esta proteína, se ha relacionado principalmente con la oncogénesis a través de la proliferación celular, además de verse relacionada dentro de los procesos de resistencia al tamoxifeno en el cáncer de seno. Adicionalmente, en estudios reportados se han evidenciado mejorías en líneas celulares cancerígenas al silenciar la expresión de COPS5 inhibiendo diferentes vías de señalización (136). Esta descrito que COPS5

presenta una sobreexpresión en diferentes procesos cancerígenos como son el cáncer de pulmón, carcinoma hepatocelular, respaldando la información de que esta proteína podría ser incluida dentro del grupo de los oncogenes (137), dándole una importancia significativa a la supresión de esta proteína como una nueva estrategia terapéutica.

La ATPasa H⁺ que transporta la subunidad B2 de V1 (ATP6V1B2) es una enzima de múltiples subunidades compuesta por un complejo periférico que hidroliza ATP y un complejo integral de membrana que transloca protones; encargada de acidificar y mantener el pH de los compartimientos intracelulares (138). Esta proteína se encuentra asociada con varios tipos de cáncer en cuanto a expresión evidenciándose que la expresión anormal de esta proteína se encuentra estrechamente relacionada con la aparición, proliferación e invasión de diferentes tumores (139). Un estudio funcional determinó que al suprimir la actividad de ATP6V1A *in vitro* se inhibe la capacidad de la proliferación de células tumorales (140), ya que promueve la formación de un microambiente alcalino alrededor de las células tumorales, lo que resulta ser beneficioso para la proliferación de estas. Adicionalmente esta proteína podría ser utilizada como un marcador de diagnóstico y pronóstico en el carcinoma oral de células escamosas (141).

El factor de iniciación de la traducción eucariota 4-gamma-1 (eIF4G1) sirve como andamio para el ensamblaje de componentes de traducción dependientes de cap en la formación del complejo eIF4G1 y se ha observado en secciones de tejidos de diferentes tipos de cáncer (142). La expresión eIF4G1 aumenta considerablemente en los cánceres de seno, pulmón de células escamosas, y se encuentra asociado con la progresión metastásica y la reducción de la supervivencia (143). Estudios previos determinaron que esta proteína regula la expresión de mTOR, una quinasa clave en la regulación de la apoptosis de células cancerígenas; demostrando que la inhibición de mTOR atenúa el desarrollo y la progresión de los tumores inducidos por eIF4G1, determinando que esta proteína es un nuevo objetivo molecular para el tratamiento del cáncer (144).

La mayoría de estas proteínas se encuentran relacionadas con el proceso celular del cáncer lo que permite determinar que la PS6 al generar una interacción específica sobre estas proteínas confirma la especificidad para células tumorales y su actividad anticancerígena. Adicionalmente, se pueden postular estos residuos proteicos como posibles receptores dentro del mecanismo de acción de esta proteína bacteriana.

Con el fin de determinar los residuos que puedan tener relación directa en la interacción entre las 11 proteínas de la línea celular HeLa descritas anteriormente y PS6 se realizó *docking* molecular utilizando el servidor HDOCK (ver metodología). Para identificar si un aminoácido presenta mayor representación en las interacciones se organizaron los datos resultantes del servidor por el número de veces que se repite el aminoácido de la PS6 al interactuar con la proteína de la línea celular HeLa como se visualiza en la Tabla 7.

Tabla 7: Aminoácidos de PS6 que interactúan con proteínas de la línea celular HeLa.

AMINOÁCIDOS PS6 PROTEÍNAS DE INTERACCIÓN	VAL	GLU	SER	PHE	PRO	THR	ASP	GLN	GLY	ALA	LYS	ARG	ILE	LEU	TYR	ASN
AMFR	1	-	-	1	2	1	1	1	1	3	2	4	3	3	6	4
CXXC1	1	-	3	2	1	3	2	1	1	2	5	3	5	4	2	5
COPS5	-	1	1	2	1	-	2	2	1	2	1	3	3	3	4	5
CPA4	1	1	1	1	2	2	2	4	3	-	2	-	3	5	2	5
ILVBL	-	-	2	1	2	4	-	1	3	4	3	3	1	3	6	6
PRG4	1	1	-	1	2	2	1	-	2	2	-	3	2	3	4	4
KIAA1549	-	-	-	1	2	-	2	2	2	-	3	2	3	4	-	3
ATP6V1B2	-	1	2	2	1	2	1	2	2	2	1	3	2	2	5	4
LPIN1	-	1	-	1	3	2	5	3	3	2	-	3	5	4	6	5
TTC38	-	1	2	2	-	-	2	1	1	2	4	1	5	2	4	3
EIF4G1	3	2	2	-	1	1	-	2	-	1	2	-	4	5	2	4
TOTAL	7	8	13	14	17	17	18	19	19	20	23	25	36	38	41	48
PROMEDIO	1,4	1,14	1,86	1,4	1,7	2,13	2	1,9	1,9	2,22	2,56	2,78	3,27	3,45	4,1	4,36
MEDIANA	1	1	2	1	2	2	2	2	2	2	2	3	3	3	4	4
MODA	1	1	2	1	2	2	2	1	1	2	2	3	3	3	6	4
DESV. EST	0,89	0,38	0,69	0,52	0,67	0,99	1,22	0,99	0,88	0,83	1,33	0,83	1,35	1,04	1,66	0,92
COE. VAR	0,64	0,33	0,37	0,37	0,4	0,47	0,61	0,52	0,46	0,38	0,52	0,3	0,41	0,3	0,41	0,21

Trp, Met, Cys e His no presentaron datos, por esta razón no son incluidos en la tabla mencionada previamente. Para evaluar la distribución de frecuencias agrupadas se obtuvieron los datos estadísticos de promedio, mediana, moda, desviación estándar y coeficiente de variación. Con el fin de contrastar la normalidad de los datos expuestos en la tabla, se realizó el test de Shapiro Wilk que plantea una hipótesis nula donde los datos de la población se encuentran normalmente distribuidos. Siendo la hipótesis nula que la población está distribuida normalmente, si el p-valor es menor a alfa (nivel de significancia) entonces la hipótesis nula es rechazada (se concluye que los datos no vienen de una distribución normal); y si el p-valor es mayor a alfa, se concluye que no se

puede rechazar dicha hipótesis. La frecuencia de interacción de cada aminoácido frente a las proteínas de la línea celular HeLa fueron analizadas independientemente (Tabla 8).

Tabla 8: Datos de estadísticos provenientes de la prueba de Shapiro Wilk.

AMINOÁCIDOS	W	p-Value
Val	0.5521	0.003277
Glu	0.4533	0.0002153
Ser	0.8405	0.1136
Phe	0.6402	0.0006282
Pro	0.8021	0.01897
Thr	0.872	0.1697
Asp	0.6899	0.00262
Gln	0.8291	0.03648
Gly	0.8049	0.02028
Ala	0.7869	0.01898
Lys	0.9218	0.4362
Arg	0.7869	0.01898
Ile	0.9047	0.2145
Leu	0.9035	0.2073
Tyr	0.8464	0.05621
Asn	0.9055	0.2191
Total	0.8723	6.94e-10

El resultado de esta prueba evidenció que los datos no se distribuyen normalmente, es decir que la diferencia entre la muestra de datos y la distribución normal es lo suficientemente grande como para ser estadísticamente significativa, lo que enfoca este estudio hacia la realización de un test no paramétrico.

Para determinar si un aminoácido es más importante en la interacción frente a los demás, se realizó la prueba de Kruskal Wallis que es un método no paramétrico para probar si un grupo de datos proviene de la misma población identificando la varianza entre los aminoácidos. El resultado de esta prueba indicó que algunos de los rangos medios de los

grupos se consideran no iguales, es decir que al seleccionar un valor de cada uno de los grupos hay algunos con mayor probabilidad de contener el valor más alto que otros. Al realizar las múltiples comparaciones se aplicó la corrección de Bonferroni que controla el nivel de confianza simultáneo evitando la aparición de un resultado falso positivo. Para este grupo de datos el método de corrección de Bonferroni es 0.0004167. Los rangos medios de los siguientes pares de aminoácidos mostraron una diferencia significativa: **Val₁ -Asn₁₆ Glu₂ -Ile₁₃ Glu₂ -Leu₁₄ Glu₂ -Tyr₁₅ Glu₂ -Asn₁₆ Phe₄ -Leu₁₄ Phe₄ -Tyr₁₅ Phe₄ -Asn₁₆ Pro₅ -Asn₁₆ Asp₇ -Asn₁₆ Gln₈ -Asn₁₆ Gly₉ -Asn₁₆**. Con este resultado se pudo determinar que la Ile, Leu, Tyr y Asn son los aminoácidos que presentan una probabilidad de generar la mayor interacción frente a las proteínas encontradas en las células HeLa y por ende en el modelo *in vivo* del cáncer de cuello uterino, con una puntuación de rango promedio de 98,59 para Ile, 106,59 para Leu, 112,95 para Tyr y 125,68 para Asn. La isoleucina (Ile) es un α -aminoácido alifático apolar ramificado, no cargado a pH neutro. Este aminoácido forma principalmente α -hélices igual que la leucina, alanina, glutamina y metionina, dispuestos en estructuras helicoidales dextrógiras. En ocasiones forma parte de las cremalleras de leucina (*leucine zipper*) y se encuentra observada en vertebrados con una frecuencia de 5,76% (145). Este aminoácido participa en el balance del nitrógeno positivo, favoreciendo la formación de tejido muscular además de ser necesaria para la formación de la hemoglobina. En estados febriles, traumatismos o estrés se incrementa la necesidad de este aminoácido ramificado. La leucina (Leu) es un α -aminoácido alifático no polar ramificado. Posee una cadena lineal de cinco átomos de carbono donde el primero constituye el grupo funcional carboxilo, el segundo enlaza el grupo amino y en el cuarto se enlaza un radical metil. Estudios de dicroísmo circular y titulación potenciométrica copolímeros aleatorios de leucina en soluciones acuosa indican que este aminoácido puede ser posiblemente el aminoácido con la mayor propensión a formar estructuras α helicoidales, sugiriendo que puede ser encontrada con mayor frecuencia en las regiones helicoidales de las proteínas permitiendo la generación de centros de nucleación de plegamiento de grandes moléculas de proteínas (146). Leu es importante para la estimulación de la síntesis de proteínas y la reducción de la degradación de proteínas musculares después de un trauma físico. Adicionalmente, la leucina también aumenta los niveles de insulina en sangre provocando un efecto similar en las proteínas del tejido muscular, actuando como fuente de gluconeogénesis en el hígado (147).

La Ile y la Leu hacen parte del grupo de los aminoácidos de cadena ramificada o BCAA junto a la Val, siendo fuentes alternativas de moléculas orgánicas que son involucradas en los procesos de obtención de energía como el ciclo del ácido tricarbóxico. Estos aminoácidos producen derivados que favorecen el crecimiento del cáncer y el potencial metastásico (148), pues las células cancerosas dependen de la síntesis de glucosa y del equilibrio de óxido-reducción generado durante los procesos metabólicos celulares; y adicionalmente, median la regulación epigenética y la modificación postranscripcional. Estos aminoácidos alimentan los intermediarios del ciclo TCA, lo que da como resultado la liberación de ATP y proporciona la energía necesaria para las actividades oncogénicas. En los eventos de acetilación de histonas que promueven la expresión génica y la progresión del cáncer es necesaria la presencia de Acetil-CoA que se deriva de los BCAA, involucrados en los procesos de crecimiento tumoral (149), jugando un papel importante en la autorrenovación de las células iniciadoras de tumores (TIC).

Se ha reportado que en el adenocarcinoma ductal pancreático humano se produce una elevación de los BCAA siendo un evento temprano del desarrollo del tumor (150), ya que pueden proporcionar sustratos anapleróticos en los tejidos. Leu es vital para la supervivencia de las células en el melanoma, ya que se genera una hiperactivación de la vía RAS-MEK haciéndolas dependientes a la Leu evidenciándose que con la privación de este aminoácido las células no activan adecuadamente la autofagia lo que conlleva a la muerte por apoptosis (151).

El sistema transportador de aminoácidos tipo L LAT1 media la entrada de los BCAA a la célula generando la salida de sustratos intracelulares y viéndose sobreexpresado en varios tipos de cáncer incluidos el cáncer de seno y de cuello uterino. La Leu es un activador de la señalización de mTOR, y la inhibición farmacológica de LAT1 suprime la expresión de mTOR y por consiguiente disminuye el crecimiento tumoral (152).

Tyr es un aminoácido ramificado aromático con un grupo fenólico, hidrofóbico no polar y no esencial. Es un aminoácido proteinogénico y se encuentra en proteínas que forman parte de procesos de transducción de señales, además, funciona como un receptor de grupos fosfatos que son transferidos a través de las proteínas quinasas. La tirosina es un aminoácido precursor de los neurotransmisores siendo útil en condiciones de estrés, frío, fatiga y demás (153). Este aminoácido se encuentra asociado a la formación de láminas

beta al posicionar en paralelo dos cadenas dentro de la proteína (154). El hígado es el principal órgano donde se lleva a cabo la degradación de la Tyr con el fin de producir intermediarios o precursores de la gluconeogénesis y la cetogénesis. La alteración en el metabolismo de la Tyr se ha relacionado con el cáncer de esófago y con carcinoma hepatocelular demostrándose un alza en la tirosina sérica de estos pacientes (155).

Asn es un aminoácido polar sin carga, con un residuo llamado carboxamida y tiene la característica de formar puentes de hidrógeno con facilidad. Este aminoácido ha sido ampliamente estudiado en procesos cancerígenos. Genera la inanición de la glutamina suprimiendo el estrés del retículo endoplásmico y la apoptosis además admite la biosíntesis de glutamina. Algunos estudios mencionan que la Asn puede ayudar a que las células epiteliales del cáncer de seno se proliferen en ausencia de glutamina exógena apoyando el crecimiento de las células tumorales (156). La Asn tiene funciones no metabólicas en la regulación de la señalización asociada a tumores, puesto que activa a mTORC1 impulsando la síntesis de proteínas y la biosíntesis de nucleótidos permitiendo que la célula tumoral mitigue el estrés. Dentro de los tratamientos antitumorales, se han utilizado compuestos como la L-asparaginasa con el fin de regular la expresión de este aminoácido.

Estos cuatro aminoácidos presentan una relación fuerte con los modelos biológicos y celulares del cáncer justificando la repetitiva interacción en todas las proteínas de la línea celular HeLa con la PS6 anticancerígena.

4.4 Casete de expresión modelo para producción de parasporinas en plantas

Se realizó el diseño de un casete de expresión para el gen *ps6Aa1* que traduce la proteína anticancerígena de *B. thuringiensis*: PS6. Está conformado por 362 pb del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor, utilizado con el fin de asegurar que el transgén se exprese de forma constitutiva en un modelo vegetal; 2179 pb que comprenden la región codificante “CDS” del gen *ps6Aa1* para la toxina activa, y 281 pb del terminador nos (Nopaline Synthase Terminator) un gen de *A. tumefaciens* que contiene la señal de terminación de la transcripción; además de los sitios de unión de las

enzimas de restricción *SalI* y *BamHI* para que se genere el corte en los sitios de restricción del vector y que no afecte el transgén, para un total de 2834 pb (Figura 21).

Figura 21: Casete de expresión modelo (2834 pb).



Para determinar los posibles ORF de la secuencia nucleotídica y la longitud de la proteína que codifica para cada uno de estos se utilizó la herramienta ORF del software Gene Designer 2.0, adicionalmente, se confirmó que este ORF predicho de cada uno de los genes fuera el correcto utilizando la herramienta ORF Finder del NCBI. Por último, se llevó a cabo el ensamblaje del casete de expresión.

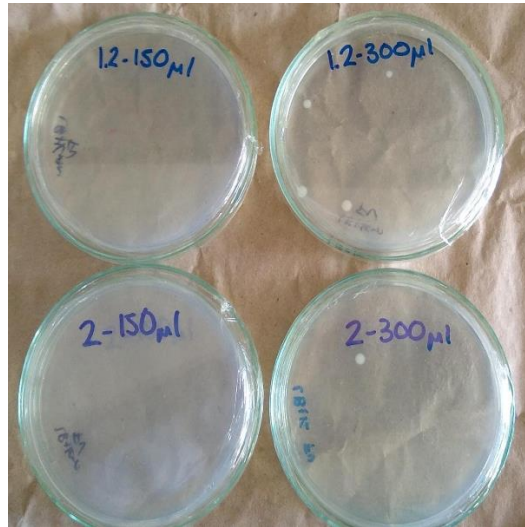
Estos casetes de expresión han sido utilizados ampliamente en el ámbito de la transformación genética de plantas demostrando resultados satisfactorios. Se ha reportado una línea transgénica de maíz tolerante a sequía y a glufosinato utilizando casetes de expresión (157). Otra investigación que incluye el uso de casetes de expresión tiene como objetivo la expresión en plantas de tabaco de la proteína GP5 del virus del síndrome reproductor y respiratorio porcino y su ectodominio modificados con la adición de una cisteína que aumenta la capacidad de conjugarse químicamente mejorando el sistema de vacunación (158). Adicionalmente se ha reportado el uso de vectores y casetes para la expresión de genes virales en cloroplastos con el fin de utilizar las plantas como biorreactores capaces de producir moléculas recombinantes siendo una alternativa segura por su alta producción de biomasa a un bajo costo (159).

Con el casete semisintético se realizó la transformación de *A. tumefaciens* LBA4404 por electroporación. Estas bacterias fueron sembradas en medio de selección con kanamicina 50 mg/mL y rifampicina 50 mg/mL con el fin realizar la caracterización molecular por medio de PCR. Los primers generados fueron específicos para el gen y las regiones de interés en el constructo diseñado.

Las colonias recombinantes presentaron un crecimiento positivo en el medio de selección, mientras que las bacterias no transformadas no evidenciaron crecimiento (Figura 22). Es importante mencionar que la cepa LBA4404 de *A. tumefaciens* es utilizada ampliamente en procesos de transformación de plantas por su alta eficiencia; adicionalmente esta cepa contiene un gen de resistencia a la rifampicina y un plásmido Ti capaz de integrarse en el ADN cromosómico de la planta huésped (160); y la kanamicina es utilizado como mecanismo de selección fenotípica ya que tiene un gen *nptII* transferido a las bacterias durante el proceso de transformación con el plásmido pCAMBIA2300 que les otorga una característica de resistencia natural. Las colonias que presentaron crecimiento, fueron criopreservadas para posteriormente realizar la caracterización molecular.

Figura 22: Cepa recombinante LBA4404 de *A. tumefaciens* que crecieron en 50 mg/mL de kanamicina y rifampicina (A), y secuencia a amplificar del gen *ps6* (B).

A



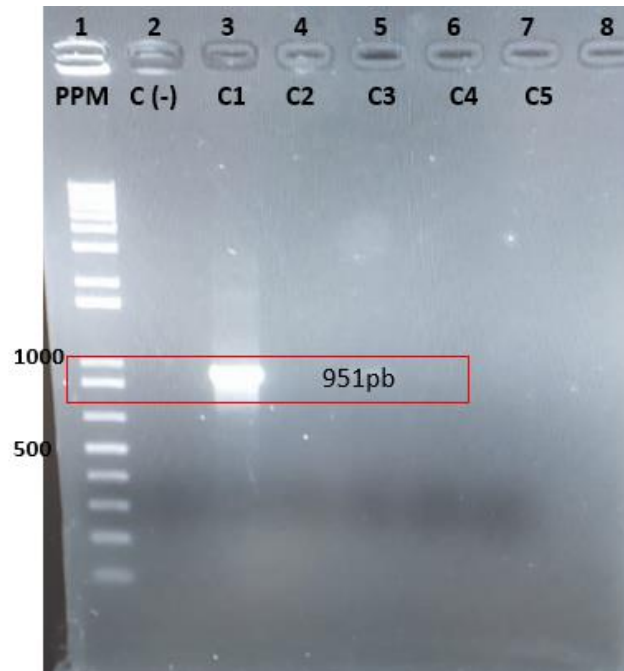
B

```
TCTAGATAAGAAGAAATTTGTAATAAAAAATGCTTGCTCTGCGCTGGTGAAATATCCAAGACGGTTTAAAT
ATTCATATTTGTCATTATAATCTGCACAAACCTCACCCGATCCATAGGCTTTTTCTTTTTTACCTATGAA
ATACTCTTCTCCACCAGACATTTTATTTAACATCTGTAAGCATGCTCTTTCTTCTTCTGAAATAACCA
CCTGTTTGTAATTGTTTCATAAATACTATCAATCTTTGCATCTCTTATTTTTCGCCTTTTTTTCAGCTTCTT
CAAAATCAATTACATTTTTCTTACTCATTTTTCTCTCCCTCACTGGAAGAAGTTAACCCACTTATGTTAG
AATACATAATATCAATAAATAAATAAAGGGATTACCCCTTCATAAATTTGTTAAAAGTAAGAAACCC
CTAAGTTTTGGTCGACGTGGGGTTTTTTACTTTTATAAAATCGCTTACTCGATAATCTTTTATAATCCT
TTTTTCAAGCGCTGGTCAAATACTAGCGTTTTTTTAAATTTTTCTTTTTCTATAAGGCCTTACCATACTA
```

TTTCGGGAAAATTTGACGTTTAAACACAATTTAAGCGTTTACTATACATTAAGGGACATTTGTTTCAGAAA
 ATCTTATATTTATGAACAGCGGATAAAAACCAATAATATCAACATTTTTTCAGCTATAATCATGTTTCATAA
 AGTGTGTATATAAATCAGTGTTCATTAACCTTAGTGTTTTATCTTTATAAACATATACTCATCTTTAA
 AACACTGTAATGATAAAGTTTATAATCTTTAGCGTACATTTTCCCGAAATGATGTCGTGAAGCCAG
 TAAGACATGAACATATCAATATTGTGGGGAGATATTCCTTCACTTAACGAAAAAGGTTGAAAAATAATC
 TTTACACCCATTTGATAAAAAAGGAAATAGATATATAAAGGGTTTGGTATGTTATTTGCCGTTTT
 TATTCATTACTACACAAACCCCTTAATCAATAGTTTTTTAATTAATTTATATATTTTGTATCAAT
 AATTCAAAAATTTCTCCTTGCTATGTCCATTTATACAAAAAGACGAGGACAATGTATATATTTATCT
 ATCTATCATAGAGTAAATGTAGACTGTATACATTTGTAGTCTTATCTTTACGGTTTTATATTTTTAAAG
 TTTGTTGTATCAATTTTCAACAAAAAGATCTCACCGACTTTTATATGTGGGGTCTGTGTAGTAATGGA
 AAAAAACGGCAATAAGACTTAATCGCATTATCAAAAAATCAAGTTTTTAATAATGATAAAAACTGTGTT
 AAATAAGCTTGGATACATTAATCTACATTTATCAAACTATTATCATAATCAAAATTAATAATAACACC
 GTTTTTGTATAAATTAATAAATATTTAGCTTTTAAATCAGTAAAAATTTTATTTTTTCGGATAAAAACTCT
 TTGTAGCTATGTTAAAGCAAAAATATAGGTTATTACCGTTTCTGTTCGGTTACTACACAAACCCCTATG
 TCGGTTGTTTACTATGTGAAGGTGGAGATATTATGGACCCGTTTTCTAATTGTTCTGAAAAAATACT
 CAGATTCAAATAATAACCAAGAACTAACTGTAGAATCCTCTTCATTTTATCGAATACTACTAATGAAAA
 TATGAAAAAATAATTCCTCCAATAAATAAAAAATTTTTCTAGAAATTCAAATGACACAGTATTAGACATA
 CTAATATATCCCAAAATAACAATAAGATATTTTTGACCTTATAATAATTTGCATAGCATAAAAAGATG
 AACTACAAATCA**GAACCGTAATTCAGGAGGA**GTAATATTAGCGTTACAGGAAATAAGTTTGTTCGATTC
AAAATTTACAGCTATAACTTATGCTGCTATAACTAAATTAACATCTTCACTTATTACAGCTGCTGCACT
GCAATATTAGGTCCAATAGGAACCACTATTGGAGGTGCAATATCTGGTCCAATAGCTAACGCTTTATTTG
GATTAATCCTGGAAATGAAGCCTCTAECTCCACAAGAAATTTGATATAGCAGTTGAACAAGTAAAT
ATATACAGATGAACAAATTACGAATCTTGTATTACTAATGCTACAAGCGAGTTAGCATCCATAAAAGCT
AAAATGAGGATTTAATAGTCAATTAATTTTGCCTTAAATTCAAAAATGATAATTTGATGAATCGAA
TAGATTTTGAACATTTTATGTTACTTTAGAAAAATGATAATTCAGGTTCAATTAATAAATTAATGAATTT
TGGTTATAGTAAACAAATTAATTTCTATAATTACAGTATGTTGCACTTTAACTTAAGTTTCTTAAGAGAT
GCTATATTTAATCTCAACATTTAATAATAGTACACAAGGTAAGAGATATTAACAGATACATTTGAAA
GAAGAACAATGAATATTCAGATAAAATTAATAACGAATATACATGCTATTTAATGAAATAAAAATAAA
AGAAAATGCTAAAACGACTTTAGATTTTGAACCTTCATGTCATTGCAAGTTTTAGATCAAGTAGATTTA
TGGAGCGTATTTAAATTTTCACAATTTAATATTCGCAATACTAGAAGATTATATACTATACTTTATCAAT
ATAGTAAAATGATGTGAGTAAGCTAGACCCAACCTCAAAATAAATGGTGAATGGAATTTTATTAATCAGAT
ATTATATGGATTACCAGGTAATAGAATTTCTGGATTGCTGGAACCGTTGAACTTTATCAACCCCAACAAA
 ATACGACGTATTAATAAATTAAGCCCTTATATTTCTAATAATGAGACTACAGGATATGTAGGTAAGATG
 CTAATGCTATGGATCTTTTGTACTCATCTTATAATAAGCCAAAAACCTGCAATAATTAATTTATGCTTC
 ACATGTAATAGTAAATCTTCTCCTTCATCTGTTCAAAATTTAACAAGTGTAGATACCATTGGCTCATA
 TTTCCAGGTAATATGTAATTAATCAACAATTATATCCAGGTCTTAACCTATTATAGAGTATGAAAAAT
 TTGCTATACCTGATCATAAAGGAGTAAATGTTGCTGGACTTCCAATATTGATTGCTGCTATACCTCCTC
 TACTATTGATAATTTACGACAAAATTTTATACATCTAAACCAATTTTAGGATCTGTTACCGCATTTCAA
 AAAGATATTTCTAATTTATGAGCAAGTCAACAACAAGAAACAATTTGATACATTTGTTGCCAACAGATACG
 ATCAAAAAATTTAGGATTTAACATTCAGCATTAGAATACTCTAAAGATCGAATAGCAAAATTTGGATT
 TGAAGAAACATGGATGATAATTCATCTTATTTCTCATCTGGAGATAATTTACAATTTAAAGGAACCTACT
 GCTGGTATTAAGTATTTTAAAATCAGCACAAAATGCATATGCAAAATTAATAAATTTTATAAAAAATG
 CATATAAACCAATAATTCAGGGAATAAAGTCCAAATTAATAATGAAAGATTTAAGTACTGTTCCCTC
 TATAATTTCTGCAACATTAACATTCAAAATACTAGCTTATTAAGGGAACATCTGAAGATAATGTTAAA
 TTTATAACATTTGAAGTTCTTACTAATTTTCCGATTTCTAATAACACATATGAATTACAATAATTTTAA
 CTAATTTACAACAAAATGATGATTTAAGATTAATGAACCTTATTTCTCATCTTATAAATAATGATTTTAT
 AAATATATTAACGCATAAAAAGATATGACAACATCGTCTAAGAAAAACCGGGGAACCCACCCGCTCTT
 TTTCTGCTAGCGAAAATCTGATAAATTATACATAATCCCAATCAATCCCATTTATAATTTCTGCGAATACATA
 TCTTACCACATCGTTACAGAAAAACCTAGGAGGGGTAGAACCAGCATTTCATTTGAAACGGACATTT
 TGTAATTTTTGAAAAATAAAGGGTTCTTCCACATTTAACCCAAATGCTAAAATAATTTATTCATTCAA
 AGCAACAACCTAATTTAGGTATTACCATTCCCTATTTCTTGAACACATGCATGAACAAAAAGTGACAC
 AGAATATTATTCTGTGTCACCTTCTAACTTAAATTAATAAGAAATAATCCTAATTTAATGAATTAATAG
 CTTAAAAAATGACATAGAATCAAAAATTTAGATTTTAAAGTCAAAAAACATAAAAAATCGTCAAAATTC
 AGAAAATTAATAAATCCCAATTTACTCAAAGATGTTAGTTTTGCCCTTATAAATGTTTAAAACCTCTT
 ATAATGATGTTTAAAACATCCAATAAATTTATAACTGACATGCAAGTGAATTTAGGCATGGTGAATTT
 CTAAGAGGACTTATATAATTTATATATCGAGGTAATCTAGTATCTTCAAGTGAATCGAGAATTTTTT
 AATTTCTAATAGATTAATATTTTATAATTTCAATTTGGAAATGTCTAATGTTTAACTTTTAA
 TATTTTAAATTTGATGAATTCATAGTTTGTGTTTATAATTTTATATGAATAGACAAAAATAAGAGATAAG
 CAGTGGTAACATAAAAAATAATTTGTTAGTTATATTATA

Después de seleccionar fenotípicamente las cepas recombinantes positivas con el casete de expresión sintetizado, se realizó PCR utilizando los primers dirigidos hacia la región específica del gen *ps6Aa1* (Rojo), considerándose una amplificación positiva aquella que presentaba un fragmento de aproximadamente 951 pb (Azul) (Figura 23).

Figura 23: Amplificación del casete de expresión en cepas con características fenotípicas positivas de *A. tumefaciens*. Carril 1: PPM (1Kb Plus DNA Ladder Invitrogen), Carril 2: Control negativo (Agua), Carril 3: Colonia positiva con amplificación de fragmento de 951 pb.



Con este resultado se puede inferir que se generó la modificación genética de la cepa LBA4404 de *A. tumefaciens* capaz de modificar genéticamente plantas de tabaco, con la perspectiva de continuar esta investigación determinando la inserción del ADN-T que contiene el gen de interés por parte de esta cepa generando una planta capaz de producir la proteína PS6, esta bacteria transfiere sus genes a una célula eucariota vegetal (161). Para entender como *A. tumefaciens* transfiere sus genes, es importante entender siete pasos fundamentales: (a) el reconocimiento de la bacteria y la adherencia a la planta, (b) la identificación de señales de la planta, (c) la activación de genes *vir*, (d) la generación del ADN-T, (e) la exportación del ADN-T hacia la planta, (f) importación del ADN-T dentro del núcleo de la planta y (g) y la integración del ADN-T dentro del genoma del hospedero. El proceso de transformación comienza con el reconocimiento por el sistema *VirA/VirG2* de las moléculas liberadas al generarse ruptura de la célula vegetal, permitiendo la adherencia de la bacteria a células sanas presentes en la pared activando los genes *vir* que producen endonucleasas de las secuencias extremo del ADN-T (*VirD1* y *VirD2*) con el fin de generar el plásmido Ti y liberar una cadena única de ADN-T. A

continuación, se da la generación del “inmature T-complex” que se dirige al núcleo de la célula vegetal y se integra con la cromatina del huésped; obteniéndose un resultado satisfactorio cuando se provoque la síntesis de proteínas bacterianas y por ende la oncogénesis (162). Por esta razón, *A. tumefaciens* ha sido ampliamente utilizado como herramienta biotecnológica para obtener plantas más resistentes, con mejoras genéticas o simplemente para su uso como biofábrica vegetal; ya que utilizando el modelo de transferencia de genes se pueden insertar transgenes de interés otorgando las características mencionadas a las plantas. Se han evidenciado diferentes modelos transgénicos utilizando *A. tumefaciens* como la transformación de frijol tolerante a la sal y al déficit hídrico; la modificación genética para el incremento de semillas de algodón y soya y otras aplicaciones que se han aplicado en el área de la transformación genética de plantas (163). En el campo agrícola el papel de *B. thuringiensis* ha sido ampliamente estudiado, ya que el uso de proteínas Cry y la modificación genética de plantas provee cultivos resistentes a insectos, plagas y a su vez mejora la calidad de estos. La primer planta transgénica reportada portadora de genes *cry* fue una planta de tabaco modificada por la compañía Plant Genetic Systems de Bélgica, seguida por una producción a escala de patata transgénica aprobada en Estados Unidos. El siguiente avance fue la comercialización de maíz resistente a insectos (164). Seguido a esto, se empezó a utilizar el modelo de *B. thuringiensis* para otorgar resistencia al glifosato en plantas de algodón incluyendo genes insecticidas como *cry1Ac* y *cry2A* (165); resistencia a insectos como la *Holotrichia parallela* utilizando el gen *cry8-like* en plantas de soya (166); la resistencia mediada por la proteína Cry1Ah1 con toxicidad altamente específica contra *Hyphantria cunea*; entre otras. Gracias a los avances reportados a través de la historia, se construye la hipótesis de una biofábrica vegetal, en el que se han reportado fitofármacos contra el cáncer como es el caso del Taxol, aislado del *Taxus* spp, teniendo en cuenta que, por su compleja estructura, la síntesis química resulta inviable (167). Otros usos de plantas transgénicas que han sido utilizadas para producir fármacos son la producción de anticuerpos monoclonales para terapia humana y vegetal, estos producidos en tabaco, papa, soya, alfalfa, arroz y trigo transgénico (168); adicionalmente, se han reportado antígenos utilizados para producción de vacunas contra epítomos de *Plasmodium falciparum*, rotavirus, hepatitis B expresadas en plantas transgénicas de plátano y jitomate (169). En las últimas décadas se han producido aproximadamente 95 productos biofarmacéuticos aprobados por agentes regulatorios para el tratamiento de

diferentes enfermedades humanas como la diabetes mellitus, trastornos del crecimiento, enfermedades neurológicas y genéticas, afecciones inflamatorias, entre otras, que utilizan estrategias de expresión génica que pueden ser utilizadas para producir proteínas específicas en las plantas, otorgando características como son la seguridad adicional de que estos productos se encuentran libres de patógenos humanos o animales; adicionando que las células vegetales son capaces de producir proteínas complejas evitando la expresión de endotoxinas bacterianas, demostrando que las biofábricas vegetales de productos farmacéuticos tiene un gran potencial y puede convertirse en un importante sistema de producción de biofármacos (170).

5. Conclusiones y recomendaciones

5.1 Conclusiones

- El estudio de libertad de operación para el diseño de casetes semisintéticos de expresión, determinó que en general las PS pueden ser utilizadas libremente para la creación y distribución de productos asociados a la terapia del cáncer en Colombia, sin problemas de infracción de derechos de autor; teniendo en cuenta que al año 2022, solo dos patentes relacionadas con PS se encuentran activas y no afectan los fines comerciales en el país.
- El modelo tridimensional de la PS6 indica que contiene tres dominios funcionales tipo proteína Cry, el dominio I posee siete alfa hélices de residuos hidrofóbicos y antipáticos, el dominio II tiene tres láminas beta antiparalelas con *loops* de superficie de posible interacción con receptores, y el dominio III tiene dos beta láminas antiparalelas a manera de beta sándwich.
- Se detectaron 11 proteínas que generan interacción con la PS6, sin embargo tres fueron específicas de la línea celular HeLa, concluyendo que esta proteína bacteriana puede ejercer su efecto anticancerígeno en esta línea celular y por ende en las células del cáncer de cuello uterino. Además, se identificaron cuatro aminoácidos que presentan mayor interacción lo que permite ampliar la línea investigativa al análisis de estos aminoácidos y su principal relación con receptores de las líneas celulares diana de la PS6, con el fin de determinar su papel dentro del proceso biológico de la muerte de células cancerígenas, y determinar posibles nuevos receptores.

- La expresión de la PS6 en la transformación de *A. tumefaciens* muestra un resultado satisfactorio que determina el avance de esta investigación que busca aplicar la transformación genética de plantas permitiendo el uso de estas como biofábrica capaces de producir en altas cantidades la proteína anticancerígena bacteriana dando un posible medicamento natural que mejore los tratamientos actuales del cáncer. Esta investigación tiene un acercamiento a la generación de proteínas anticancerígenas utilizando biofábricas vegetales con libertad de producción con fines comerciales.

5.2 Recomendaciones

Continuar con el refinamiento del modelo tridimensional de la PS6 con el fin de determinar dimensiones en las estructuras secundarias o en los *loops*, que puedan ser relevantes en su mecanismo de acción.

Realizar la transformación de tabaco utilizando la cepa LBA4400 de *A. tumefaciens* transformada con el casete de expresión que contiene el gen *ps6*, y la posterior caracterización fenotípica y molecular de los individuos transformados.

Bibliografía

1. **National Cancer Institute.** NIH. [En línea] 2019. [Citado el: 20 de 11 de 2019.] <https://www.cancer.gov/espanol>.
2. **Sociedad Española de Oncología Médica.** SEOM. [En línea] 2019. [Citado el: 20 de 11 de 2019.] <https://seom.org/>.
3. **Cajaraville, G., Carreras, M.J., Massó, J., Tamés, M.J.** Oncología. [ed.] J Bonal, y otros, y otros. *Libro de Farmacia Hospitalaria*. 2004, págs. 1171-1226.
4. *Bases moleculares del cáncer.* **Meza, J., Montaña, A., Aguayo, A.** 1, 2006, Revista de investigación clínica, Vol. 58, págs. 56-70. ISSN 0034-8376.
5. **Pérez, R., Cárdenas, E., Mondragón, P.** Biología molecular del cáncer y las nuevas herramientas en oncología. *Rev Esp Méd Quir*. 2017, Vol. 22, págs. 171-181.
6. **Thompson., Thompson &** *Genetics in Medicine*. [ed.] R., McInnes, R., Willard, H. Nussbaum. Octava. s.l. : El sevier., 2007.
7. **Jorde, L., Carey, J., Bamshad, J.** *Medical genetics*. [trad.] Estela Gutierrez Torres . Edición en español de la cuarta edición de la obra original en inglés. Barcelona : El Sevier, 2011. págs. 212-230. ISBN 978-0-323-05373-0.
8. *Principales mecanismos de reparación de daños en la molécula de ADN.* **Tafurt, M.** 2, 2014, Revista Biosalud, Vol. 13, págs. 95-110. ISSN 1657-9550.
9. *La mitosis y su regulación.* **Rodríguez, A., Frias, S.** 1, 2014, Acta pediátrica de México, Vol. 35, págs. 55-68. ISSN 2395-8235..
10. *Telomere: characteristics and functions.* **Mandeh, M., Maali, R.** 1, 2009, Genetics in the 3rd Millenium, Vol. 7, págs. 1589-1596.
11. **NHGRI.** National Human Genome Research Institute Home | NHGRI. [En línea] 2019. [Citado el: 15 de 11 de 2019.] <https://www.genome.gov/>.
12. *Importancia de los telómeros y la telomerasa en cáncer, envejecimiento y medicina regenerativa.* **Foronda, M., Donate, L., Blasco, M.** Madrid : Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO), 2015, Acta científica tecnológica, págs. 1-16.

-
13. *Telómeros y telomerasas*. **Hernández, R.** 2, 1999, Rev Cubana Invest Biomed, Vol. 18, págs. 121-129.
 14. **Asociación Española contra el Cáncer**. *¿Qué es la quimioterapia?* Madrid : AECC, 2009. Folleto.
 15. **Ferreiro, J., García, J.L., Barceló, R., Rubio, I.** Quimioterapia: efectos secundarios. *Gaceta Médica de Bilbao*. Enero de 2003, Vol. 100, 2, págs. 69-74.
 16. *Compuestos citotóxicos vegetales y su relación con las proteínas IAP*. **Munoz, L., Suarez, C.** 3, 2016, Revista Colombiana de Cancerología, Vol. 20, págs. 124-134.
 17. **Akiba T, Okumura S.** Parasporins 1 and 2: Their structure and activity. *J Invertebr Pathol*. Jan de 2017, Vol. 142, págs. 44-49.
 18. **Okassov A, Nersesyan A, Kitada S, Ilin A.** Parasporins as new natural anticancer agents: a review. *J BUON*. Jan-Feb de 2015, Vol. 20, págs. 5-16.
 19. *Parasporin, a New Anticancer Protein Group from Bacillus thuringiensis*. **Ohba, M., Mizuki, E., Uemori, A.** 1, 2009, Anticancer Research, Vol. 29, págs. 427-433.
 20. *Diseño de biorreactores para fermentación en medio sólido*. **Ruíz, H. A., Rodríguez, R., Rodríguez, R., Contreras, J. C.** 1, Distrito Federal : s.n., 2007, Revista Mexicana de Ingeniería Química, Vol. 6, págs. 33-40. ISSN: 1665-2738.
 21. **Farran Blanch, I.** *Producción de albúmina humana en tubérculos de plantas transgénicas de patata ("Solanum tuberosum L.")*. Ciencias Agronómicas, Universidad Pública de Navarra. Navarra : s.n., 2001. Tesis doctoral.
 22. *La producción de vacunas y otros compuestos farmacéuticos en plantas transgénicas*. **Gómez, M.** 3, 2002, Revista de la Sociedad Química de México, Vol. 46, págs. 264-270.
 23. *Transformación de plantas mediada por Agrobacterium: "Ingeniería Genética Natural Aplicada"*. **Valderrama, A., Arango, R., Afanador, L.** 1, 2005, Rev.Fac.Nal.Agr.Medellín, Vol. 58, págs. 2569-2585.
 24. **Chilebio**. Biotecnología para una agricultura sostenible. [En línea] 2019. [Citado el: 03 de 09 de 2019.] <https://www.chilebio.cl/2016/10/24/planta-de-tabaco-transgenico-produce-altas-cantidades-de-farmaco-anti-malaria/>.
 25. **Checa, B.** *Estudios sobre propiedad intelectual*. Barcelona : Grupo Español de la AIPPI, 2015. págs. 1040-1070, Folleto.
 26. **Ministerio de Salud y Protección Social-Instituto de Cancerología ESE**. *Plan decenal para el control del cáncer en Colombia, 2012-2021*. Equipo Técnico Subdivisión de Enfermedades No Transmisibles. Bogotá, D.C. : s.n., 2012.

27. **Ministerio de Salud y Protección Social.** *Observatorio Nacional de Cáncer.* Dirección de Epidemiología y Demografía, Ministerio de Salud y Protección Social. Bogotá : s.n., 2018. Guía metodológica.
28. *Epidemiología del cáncer en Colombia.* **Bravo, L y Muñoz, N.** 1, Cali : s.n., 2018, Colombia Médica, Vol. 49, págs. 09-12.
29. **Toral Peña, J.C.** Complicaciones debidas al tratamiento oncológico que afecta la nutrición. [aut. libro] Sociedad Medica de Oncología Española. *Soporte nutricional en el paciente oncológico.* Badajoz : s.n., 2006, págs. 184-196.
30. *Biotecnología industrial.* **Rendueles, M., & Díaz, M.** 768, 2014 de 2014, Arbor, Vol. 190.
31. *Diseño de biorreactores para fermentación en medio sólido.* **Ruíz-Leza, H. A., Rodríguez-Jasso, R. M., Rodríguez-Herrera, R., Contreras-Esquivel, J. C., Aguilar.** 1, Distrito Federal : s.n., 2007, Revista Mexicana de Ingeniería Química, Vol. 6, págs. 33-40. ISSN: 1665-2738.
32. **Sharma, A. K., & Sharma, M. K.** Plants as bioreactors: Recent developments and emerging opportunities. . *Biotechnology advances.* 27, 2009, Vol. 6, págs. 811–832.
33. **ArgenBio.** Consejo Argentino para la Información y el Desarrollo de la Biotecnología. [En línea] 2019. [Citado el: 20 de 11 de 2019.] <http://www.argenbio.org/index.php>.
34. *El tabaquismo: una adicción.* **Corvalán, MP.** 2017, Revista Chilena de Enfermedades Respiratorias, Vol. 33, págs. 186-189.
35. **Espinal, C., Martínez, H., Pinzón, N.** *La cadena del tabaco en Colombia.* Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural . Bogotá : s.n., 2005.
36. **Lodish., Berk., Kaiser., Krieger., Bretscher., Ploegh., Amon., Scott.** *Biología celular y Molecular.* [ed.] W. H. Freeman. 5th. s.l. : Editorial médica panamericana, 2005.
37. *La bioinformática como herramienta para la investigación en salud humana.* **Martínez Baretche, J.** Cuernavaca : s.n., 2007, Salud Pública de México, Vol. 49, págs. 64-66. ISSN: 0036-3634.
38. **Bel, Y., Ferré, J., Hernández-Martínez, P.** Bacillus thuringiensis Toxins: Functional Characterization and Mechanism of Action. . *Toxins.* 12, 2020, pág. 785.
39. *Bacillus thuringiensis: generalidades. Un acercamiento a su empleo en el biocontrol de insectos lepidópteros que son plagas agrícolas.* **Sauka, D y Benintende, G.** Buenos Aires : s.n., 2008, Revista Argentina de Microbiología, Vol. 40, págs. 124-140. ISSN 0325-7541.

40. **Soberón, M y Bravo, A.** Las toxinas Cry de *Bacillus thuringiensis*: modo de acción y consecuencias de su aplicación. *Biotecnología*. 2007, Vol. 14, págs. 303-314.
41. *How does Bacillus thuringiensis produce so much insecticidal crystal protein?* **Agaisse, H., & Lereclus, D.** 1995, *Journal of bacteriology*, págs. 6027–6032.
42. **Gonzalez, MC., Vela-Sanchez RA., Rojas-Ruiz NE., Carabarin-Lima A.** Importance of Cry Proteins in Biotechnology: Initially a Bioinsecticide, Now a Vaccine Adjuvant. *Life*. 2021, pág. 999.
43. **Crickmore, N., Berry, C., Paneerselvam, S., Mishra, R., Connor, T. R., and Bonning, B. C.** A structure-based nomenclature for *Bacillus thuringiensis* and other bacteria-derived pesticidal proteins. *Journal of Invertebrate Pathology*. 2020.
44. **Nair MS, Lee MM, Bonnegarde-Bernard A, Wallace JA, Dean DH, et al.** Cry Protein Crystals: A Novel Platform for Protein Delivery. *PLOS ONE*. *PLOS ONE*. 10, 2015, Vol. 6.
45. **Das, SK., Pradhan, S.K., Samal, K.C. et al.** Structural, functional, and evolutionary analysis of Cry toxins of *Bacillus thuringiensis*: an in silico study. *Egypt J Biol Pest Control*. 31, 2021, Vol. 41.
46. *Protein engineering of δ -endotoxins of Bacillus thuringiensis.* **Saraswathy, N. & Kumar, P.** 2004, *Electronic Journal of Biotechnology*., págs. 180-190.
47. *Paraporin-1 receptor and use thereof.* **Katayama, H., Kusaka, Y. And Mizuki E.** [ed.] Fukuoka Prefectural Government. US20090935513 : s.n., 2011, *European Patent Application*., págs. 03-30.
48. **Assaeedi, A. S., & Osman, G. H.** Isolation, Cloning, DNA Sequencing and Bioinformatics Analysis of the Parasporin–1 Gene of *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Proteomics & Bioinformatics*. 10, 2017, Vol. 5.
49. *Unique activity associated with non-insecticidal Bacillus thuringiensis parasporal inclusions: in vitro cell-killing action on human cancer cells.* **Mizuki, E., Ohba, M., Akao, T., Yamashita, S., Saitoh, H.** 1999, *Journal of Applied Microbiology*, Vol. 86, págs. 477-486.
50. *Parasporin, a human leukemic cell-recognizing parasporal protein of Bacillus thuringiensis.* . **Mizuki, E., Park, Y. S., Saitoh, H., Yamashita, S., Akao, T., Higuchi, K., & Ohba, M.** 4, 2000, *Clinical and diagnostic laboratory immunology*, Vol. 7, págs. 625-634.
51. *"Parasporin nomenclature".* **Okumura, S, y otros, y otros.** 2010.

52. *Toxicity of parasporin-4 and health effects of pro-parasporin-4 diet in mice.* . **Okumura, S., Koga, H., Inouye, K., Mizuki, E.** 7, 2014, *Toxins*, Vol. 6, págs. 2115-2126.
53. *Parasporin-1, a Novel Cytotoxic Protein to Human Cells from Non-Insecticidal Parasporal Inclusions of Bacillus thuringiensis.* **Katayama, H., Yokota, H., Akao, T., Nakaruma, O., Ohba, M., Mekada, E., Mizuki, E.** 1, 2005, *The Journal of Biochemistry*, Vol. 137, págs. 17-25.
54. *Parasporin-1Ab, a Novel Bacillus thuringiensis Cytotoxin Preferentially Active on Human Cancer Cells In Vitro.* **Uemori, A, y otros, y otros.** 2008, *Anticancer Research*, Vol. 28, págs. 91-96.
55. **Espino, A.** *Caracterización Biológica de Parasporinas en cepas nativas de Bacillus thuringiensis.* Ciencias biológicas, Universidad autónoma de Nuevo León. Nuevo León : s.n., 2014.
56. **Kang, R., Zeh, H. J., Lotze, M. T., & Tang, D.** The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis. . *Cell death and differentiation*. 18, 2011, Vol. 4, págs. 571–580.
57. *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.* **Katayama, H., Kusaka, Y., Yokota, H., Akao, T., Kojima, M., Nakamura, O., Mekada, E., Muzuki, E.** 10, 2007, *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 282, págs. 7742-7752.
58. *Cytocidal Actions of Parasporin-2, an Anti-tumor Crystal Toxin from Bacillus thuringiensis.* **Kitada, S, y otros, y otros.** 36, 2006, *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 281, págs. 26350-26360.
59. *Crystal Structure of the Parasporin-2 Bacillus thuringiensis Toxin That Recognizes Cancer Cells.* **Akiba, T, y otros, y otros.** [ed.] K. Morikawa. 1, 2009, *Journal of Molecular Biology*, Vol. 386, págs. 121-133.
60. *Parasporin-2 receptor active on cáncer, and use thereof.* **Kitada, S., Abe, Y. y And Shimada, H.** Univ.Kyushu. : s.n., 24 de 09 de 2009, European Patent Application JP20090218868.
61. *Parasporin-2 from a New Bacillus thuringiensis 4R2 Strain Induces Caspases Activation and Apoptosis in Human Cancer Cells.* **Brasseur, K., y otros, y otros.** 8, 2015, *PloS one*, Vol. 10.
62. *Parasporins as new natural anticàncer agents. Review Article.* **Okassov, A., y otros, y otros.** 1, 2015, *JBUON*, Vol. 20, págs. 5-16.

63. *Oligomerization of Parasporin-2, a New Crystal Protein from Non-Insecticidal Bacillus thuringiensis*, in *Lipid Rafts*. **Abe, Y., Kitada, S., Kuge, O., Ohba, M., Ito, A.** Victoria BC : s.n., 2005. 6th Pacific Rim Conference on the Biotechnology of *Bacillus thuringiensis* and its Environmental Impact.
64. *Typical Three-Domain Cry Proteins of Bacillus thuringiensis Strain A1462 Exhibit Cytocidal Activity on Limited Human Cancer Cells*. **Yamashita, S., Katayama, H., Saitoh, H., Akao, T., Park, Y.S., Mizuki, E., Ohba, M., Ito, A.** 6, 2005, *The Journal of Biochemistry*, Vol. 138, págs. 663-672.
65. *Efficient solubilization, activation, and purification of recombinant Cry45Aa of Bacillus thuringiensis expressed as inclusion bodies in Escherichia coli*. **Okumura, S., Saitoh, H., Wasano, N., Katayama, H., Higuchi, K., Muzuki, E., Inouye, K.** 1, 2006, *Protein Expression and Purification*, Vol. 47, págs. 144-151.
66. **Okumura, S., Saitoh, H., Ishikawa, T., Inouye, K., Mizuki, E.** Mode of action of parasporin-4, a cytotoxic protein from *Bacillus thuringiensis*. 2011, Vol. 1808, 6, págs. 1476-1482.
67. *Identification and characterization of a novel cytotoxic protein, parasporin-4, produced by Bacillus thuringiensis A1470 strain*. **Okumura, S., Saitoh, H., Ishikawa, T., Mizuki, E., Inouye, K.** 2008, *Biotechnology Annual Review*, Vol. 14, págs. 225-252.
68. *Cloning and characterization of a unique cytotoxic protein parasporin-5 produced by Bacillus thuringiensis A1100 strain*. **Ekino, K., Okumura, S., Ishikawa, T., Kitada, S., Saitoh, H., Akao, T., ... Mizuki, E.** 6, 2014, *Toxins*, Vol. 6, págs. 1882-1895.
69. *Three Cry Toxins in Two Types from Bacillus thuringiensis Strain M019 Preferentially Kill Human Hepatocyte Cancer and Uterus Cervix Cancer Cells*. **Nagamatsu, Y., Okamura, S., Saitou, H., Akao, T., Mizuki, E.** 3, 23 de 03 de 2010, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, Vol. 74, págs. 494-498. ISSN: 0916-8451.
70. *Structural insights into Bacillus thuringiensis Cry, Cyt and parasporin toxins*. **Xu, C., Wang, B. C., Yu, Z., Sun, M.** 9, 2014, *Toxins*, Vol. 6, págs. 2732–2770.
71. **Mackelprang R, Lemaux PG.** Genetic Engineering and Editing of Plants: An Analysis of New and Persisting Questions. *Annu Rev Plant Biol.* 71, 29 de Apr de 2020, págs. 659-687.
72. *The technologies for genetic transformation of cereals*. **Danilova, SA Russ J.** 5, 2007, *Russian Journal of Plant Physiology*, Vol. 54, págs. 569-581.
73. *A history of plant biotechnology: from the Cell Theory of Schleiden and Schwann to biotech crops*. **Vasil, I.** 2008, *Plant Cell Rep*, Vol. 27, págs. 1423-1440.

74. **PG., Lemaux.** Genetically Engineered Plants and Foods: A Scientist's Analysis of the Issues (Part I). *Annu Rev Plant Biol.* 2008, Vol. 59, págs. 771-812.
75. *Stable incorporation of plasmid DNA into higher plant cells: the molecular basis of crown gall tumorigenesis.* **Chilton, M., Drummond, M., Merlo, D...** 2, 1977, *Cell*, Vol. 11, págs. 263-271.
76. **Barton, IS., Fuqua, C., Platt, TG.** Ecological and evolutionary dynamics of a model facultative pathogen: *Agrobacterium* and crown gall disease of plants. *Environ Microbiol.* 20 de Jan de 2018, págs. 16-29.
77. *From host recognition to T-DNA integration: the function of bacterial and plant genes in the Agrobacterium-plant cell interaction.* **Tzfira, T., Citovsky, V.** 4, 2000, *Molecular Plant Pathology.*, Vol. 1, págs. 202-212.
78. **Simmons, CW., VanderGheynst, JS., Upadhyaya, SK.** A model of *Agrobacterium tumefaciens* vacuum infiltration into harvested leaf tissue and subsequent in planta transgene transient expression. *Biotechnol Bioeng.* 15 de Feb de 2009.
79. *Agrobacterium-mediated plant transformation: biology and applications.* **Hwang, H. H., Yu, M., & Lai, E. M.** 2017, *The arabidopsis book*, Vol. 15.
80. **OMPI.** Organización Mundial de la Propiedad Intelectual. [En línea] 2019. [Citado el: 17 de 11 de 2019.] <https://www.wipo.int/portal/es/>.
81. —. *Principios básicos de la propiedad industrial.* Organización Mundial de la Propiedad Industrial. Suiza : s.n., 2016. ISBN: 978-92-805-2590-8.
82. **SIC.** Superintendencia de Industria y Comercio. [En línea] 2019. [Citado el: 17 de 11 de 2019.] <https://www.sic.gov.co/>.
83. **García, AM., López-Moya, JR., Ramos P.** Key points in biotechnological patents to be exploited. *Recent Pat Biotechnol.* Aug de 2013, págs. 84-97.
84. *Yeast two-hybrid, a powerful tool for systems biology.* **Brückner, A., Polge, C., Lentze, N., Auerbach, D., & Schlattner, U.** 2009, *International journal of molecular sciences.*, págs. 2763-2788.
85. *A novel genetic system to detect protein-protein interactions.* **Fields S., Song O.** 1989, *Nature* 340, págs. 245-246.
86. *Next-Generation Sequencing for Binary Protein-Protein Interactions.* **Suter, B., Zhang, X., Pesce, CG., Mendelsohn, AR., Dinesh-Kumar, SP y Mao, JH.** 2015, *Frontiers in genetics*, Vol. 6, pág. 346.

87. *A comprehensive two-hybrid analysis to explore the yeast protein interactome.* **Ito, T., Chiba, T., Ozawa, R., Yoshida, M., Hattori, M., & Sakaki, Y.** s.l. : 98, 2001, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, págs. 4569-4574.
88. *Diseño in silico y evaluación funcional de genes semisintéticos que confieran tolerancia a fosfotricina.* **Jiménez, J., Chaparro, A.** 2, 2016, Revista Colombiana de Biotecnología, Vol. XVIII, págs. 90-96.
89. **Cajachagua, C.** *Elaboración de constructos genéticos para la expresión soluble de FimH de Salmonella enterica serovar Thyphimurium.* Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Ricardo Palma. Lima : s.n., 2018.
90. **Zhang, MJ., Jiang, CY., You, XY., Liu, SJ.** Construction and application of an expression vector from the new plasmid pLAtc1 of *Acidithiobacillus caldus*. *Appl Microbiol Biotechnol.* May de 2014.
91. **Edavettal, SC., Hunter, MJ., Swanson, RV.** Genetic construct design and recombinant protein expression for structural biology. *Methods Mol Biol.* 2012.
92. **Austin, C.** National Human Genome Research Institute. [En línea] 2019. [Citado el: 18 de 11 de 2019.] <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Traduccion>.
93. **Bioinnova.** Grupo de innovación sobre la Docencia en Diversidad Biológica. [En línea] 2019. [Citado el: 18 de 11 de 2019.] <http://www.innovabiologia.com/biodiversidad/diversidad-animal/el-codigo-genetico/>.
94. *OPTIMIZER: a web server for optimizing the codon usage of DNA sequences.* **Puigbò, P., Guzmán, E., Romeu, A., & Garcia-Vallvé, S.** 2007, Nucleic acids research, Vol. 35 (Web Server issue), págs. w126-131.
95. *The codon Adaptation Index--a measure of directional synonymous codon usage bias, and its potential applications.* **Sharp, P. M., & Li, W. H.** 3, 1987 , Nucleic acids research, Vol. 15, págs. 1281–1295.
96. *Diseño de casetes de expresión que confieran tolerancia a sequía y a glufosinato en maíz (Zea mays).* **Carreño, A., Chaparro, A.** 3, 2016, Acta Biológica Colombiana, Vol. 21.
97. **Mayorga, N.** *Desarrollo de casetes de expresión para variedades de papa (Solanum tuberosum L.), basados en el gen cryBa1 de Bacillus thuringiensis.* Facultad de Ciencias , Universidad Nacional de Colombia. Bogotá : s.n., 2016.
98. *Diseño de un gen semisintético cry1Ac y análisis de la estructura de la proteína traducida.* **Díaz Granados, C., Sandoval, A.M., Chaparro Giraldo, A.** 2013, Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial, Vol. Edición especial N°2, págs. 155-164.

99. **García-Díaz, E., Tafoya, F., Elizalde-González, MP.** Behavioral and Electroantennographic Responses of Adults of Guava Weevil, *Conotrachelus dimidiatus* (Coleoptera: Curculionidae), to Synthetic Host-Associated and Conspecific Volatiles. *Environ Entomol.* 20 de Aug de 2020, págs. 810-814.
100. **Karni, S., Felder, Y.** Analysis of Biological Networks: Transcriptional Networks - Promoter Sequence Analysis. [En línea] 2007. [Citado el: 18 de 11 de 2019.] <http://www.cs.tau.ac.il/~roded/courses/bnet-a06/lec11.pdf>.
101. **Nelson, DL., Cox, MM.** *Lehninger Lehninger Principios Principios de Bioquímica Bioquímica.* s.l. : Ed. Omega, 2000.
102. *Principales promotores utilizados en la transformación genética de plantas.* **Guglielmo, Z., Fernandez, R.** 2, 2016, Revista Colombiana de Biotecnología, Vol. XVIII, págs. 119-128.
103. **Partow, S., Siewers, V., Bjørn, S., Nielsen, J., Maury, J.** Characterization of different promoters for designing a new expression vector in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.* 27 de Nov de 2010, págs. 955-64.
104. *Insecticidal activity of a cry1Ac transgene in callus derived from regeneration recalcitrant cotton.* . **Steinitz, B, Gafni, Y, Cohen, Y, Tabib, Y, & Navon, A.** 1, 2002, In Vitro Cell Plant, Vol. 38, págs. 217-251.
105. *Genetically modified coffee plants expressing the B. thuringiensis cry1Ac gene for resistance to leaf miner.* **Leroy, T, Henry, A, Royer, M, Altosaar, I, Frutos, R, & Phillipe, R.** 1, 2000, Plant Cell Rep, Vol. 19, págs. 382-389.
106. *Optimización de los parámetros de transformación genética de café mediante biobalística con el gen reportero Gus.* **De Guglielmo, Z, Fernández, R, Hermoso, L, Altosaar, I, & Menéndez, A.** 1-2, 2010, Acta. Biol. Venez, Vol. 30, págs. 23-34.
107. *Control of lepidopteran insect pests in transgenic Chinese cabbage (*Brassica rapa* sp. *pekinensis*) transformed with a synthetic *Bacillus thuringiensis* cry1AC gene.* **Cho, H, Cao, J, Ren, J, & Earle, E.** 1, 2001, Plant Cell Rep, Vol. 20, págs. 1-7.
108. *Hairy root transformation using *Agrobacterium rhizogenes* as a tool for exploring celltype-specific gene expression and function using tomato as a model.* **Ron, M, Kajala, K, Pauluzzi, G, Wang, D, Reynoso, M, Zumstein, K, Garcha, J, Winte, S, Masson, H, Inagaki, S, Federici, F, Sinha, N, Deal, R, Bailey-Serres, J, & Brady, S.** 2014, Plant Physiology, Vol. 166.
109. **Sandoval Rodríguez, A.S., Mena Enríquez, M.G., Márquez Aguirre, A.L.** Vectores de clonación y expresión . [aut. libro] A., Sandoval Rodríguez, A.S., Armendariz, J.

Salazar Montes. *Biología Molecular. Fundamentos y aplicaciones en las ciencias de la salud*. México D.F : McGraw-Hill Medical , 2016, 15, pág. Capítulo 15.

110. **Marker Gene Technologies, Inc.** Marker Gene Technologies, Inc. [En línea] 2019. [Citado el: 19 de 11 de 2019.] <https://www.markergene.com/plant-molecular-biology/pcambia-vectors>.

111. **Cambia.** Solving the problem of problem solving. [En línea] 2019. [Citado el: 19 de 11 de 2019.] <https://cambia.org/>.

112. **George, R., Heringa, J.** Protein Domain Identification and Improved Sequence Similarity Searching Using PSI-BLAST. *PROTEINS: Structure, Function, and Genetics*. 2002, Vol. 48, págs. 672-681.

113. **Yan, Y., Zhang, D., Zhou, P., Li, B., & Huang, S. Y.** HDOCK: a web server for protein-protein and protein-DNA/RNA docking based on a hybrid strategy. *Nucleic acids research*. 2017, págs. 45(W1), W365–W373.

114. *Trends in intellectual property rights protection for medical cannabis and related products.* **Wyse, J., Luria, G.** 2021, J Cannabis Res 3.

115. **Superintendencia de Industria y Comercio.** *ABC de Propiedad Industrial*. Bogotá : s.n.

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

117. *Bioinfo aplicada a estudios de ecología y sistemática molecular de bacterias.* **UFLA, Lavras.** 2007.

118. **Contreras, Bruno.** Modelado comparativo de proteínas. *Computational & structural biology group*. 2012.

119. **Reyes-Puentes, J.** Obtención de parasporinas de *Bacillus thuringiensis* cepas CL9-1, CL9-3 y CL9-21 con actividad citotóxica para células de origen neoplásico. *Universidad Autónoma de Nuevo León*. 2016.

120. *SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes.* **Waterhouse, A., Bertoni, M., Bienert, S., Studer, G., Tauriello, G., Gumienny, R., Heer, F.** 2018, *Nucleic Acids Research*, Vol. 46, págs. W296-W303.

121. *Toward the estimation of the absolute quality of individual protein structure models.* **Pascal Benkert, Marco Biasini, Torsten Schwede.** 2011, *Bioinformatics*, Vol. 27, págs. 343-350.

122. *ReFOLD3: refinement of 3D protein models with gradual restraints based on predicted local quality and residue contacts.* **Recep Adiyaman, Liam J McGuffin.** 2021, *Nucleic Acids Research*, Vol. 49, págs. W589-W596.
123. **MacCallum, J. L., Pérez, A., Schnieders, M. J., Hua, L., Jacobson, M. P., & Dill, K. A.** Assessment of protein structure refinement in CASP9. *Proteins*. 79 Suppl 10, 2011, págs. 74-90.
124. **Feig, M.** Computational protein structure refinement: Almost there, yet still so far to go. *Wiley interdisciplinary reviews. Computational molecular science*. 7, 2017, Vol. 3, pág. e1307.
125. **Heo, L., Feig, M.** What makes it difficult to refine protein models further via molecular dynamics simulations? *Proteins*. 86 Suppl 1(Suppl 1), 2018, págs. 177-188.
126. **Medina, J.** *Purificación y caracterización de las Parasporinas (PS) presentes en Bacillus thuringiensis Cepas IB84 y GM18.* Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León. Nuevo León : s.n., 2017.
127. **Fountoulakis M, Tsangaris G, Oh JE, Maris A, Lubec G.** Protein profile of the HeLa cell line. *J Chromatogr A*. 4 de Jun de 2004, pág. 1038.
128. **Registre, M., Goetz, JG., St-Pierre, P., Pang, H., Lagacé, M., Bouvier, M., Le-PU, N.** The gene product of the gp78/AMFR ubiquitin E3 ligase cDNA is selectively recognized by the 3F3A antibody within a subdomain of the endoplasmic reticulum. *Biochem Biophys Res Commun*. 6 de Aug de 2004.
129. **Sha, Q., Zhu Y., Xiang, Y., Yu, J., Fan, X., Li, Y., Shen, Li.** Role of CxxC-finger protein 1 in establishing mouse oocyte epigenetic landscapes. *Nucleic Acids Research*. 2021, Vol. 49, 5, págs. 2569-2582.
130. **Sun, L., Wang, Y., Yuan, H., Burnett, J., Pan, J., Yang, Z., Ran, Y., Myers, I., & Sun, D.** CPA4 is a Novel Diagnostic and Prognostic Marker for Human Non-Small-Cell Lung Cancer. *Journal of Cancer*. 2016, Vol. 7, 10, págs. 1197–1204.
131. **Chang, H. S., Park, J. S., Lee, H. S., Lyu, J., Son, J. H., Choi, I. S., Shin, H. D., & Park, C. S.** Association analysis of ILVBL gene polymorphisms with aspirin-exacerbated respiratory disease in asthma. *BMC pulmonary medicine*. 17, 2017, Vol. 1, pág. 210.
132. **Dituri, F., Scialpi, R., Schmidt, T.A. et al.** Proteoglycan-4 is correlated with longer survival in HCC patients and enhances sorafenib and regorafenib effectiveness via CD44 in vitro. *Cell Death Dis*. 2020, Vol. 11, pág. 984.
133. **Yongji Tian, Benjamin E. Rich, Natalie Vena, Justin M. Craig, Laura E. MacConaill, Veena Rajaram, Stewart Goldman, Hala Taha, Madeha Mahmoud, Memet Ozek, Aydin Sav, Janina A. Longtine, Neal I. Lindeman, Levi A. Garraway,**

- Azra H. Ligon, Charles D. Stiles.** Detection of KIAA1549-BRAF Fusion Transcripts in Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Pediatric Low-Grade Gliomas. *The Journal of Molecular Diagnostics*. 6, 2011, Vol. 13, págs. 669-677.
134. **Reue, K., & Dwyer, J. R.** Lipin proteins and metabolic homeostasis. *Journal of lipid research*. 2009, págs. 109-114.
135. **Brohée, L., Demine, S., Willems, J., Arnould, T., Colige, A. C., & Deroanne, C. F.** Lipin-1 regulates cancer cell phenotype and is a potential target to potentiate rapamycin treatment. *Oncotarget*. 2015, Vol. 6, 13, págs. 11264–11280.
136. **Zhou, R., Shao, Z., Liu, J., Zhan, W., Gao, Q., Pan, Z., Wu, L., Xu, L., Ding, Y. and Zhao, L.** COPS5 and LASP1 synergistically interact to downregulate 14-3-3 σ expression and promote colorectal cancer progression via activating PI3K/AKT pathway. *Int. J. Cancer*. 2018, págs. 1853-1864.
137. **Lu R, Hu X, Zhou J, Sun J, Zhu AZ, Xu X, Zheng H, Gao X, Wang X, Jin H, Zhu P, Guo L.** COPS5 amplification and overexpression confers tamoxifen-resistance in ER α -positive breast cancer by degradation of NCoR. *Nat Commun*. 2016.
138. **Wang, F., Gatica, D., Ying, Z. X., Peterson, L. F., Kim, P., Bernard, D., Saiya-Cork, K., Wang, S., Kaminski, M. S., Chang, A. E., Phillips, T., Klionsky, D. J., & Malek, S. N.** Follicular lymphoma-associated mutations in vacuolar ATPase ATP6V1B2 activate autophagic flux and mTOR. *The Journal of clinical investigation*. 2019, Vol. 129, 4, págs. 1626–1640.
139. **Marshansky, V., Rubinstein. JL., Gruber, G.** Eukaryotic V-ATPase: novel structural findings and functional insights. *Biochim Biophys Acta*. 2014.
140. **Feng, S., Zhu, G., McConnell, M., Deng, L., Zhao, Q., Wu, M., et al.** Silencing of atp6v1c1 prevents breast cancer growth and bone metastasis. *Int J Biol Sci*. 2013.
141. **Xiaojuan, L., Hao, L., Caihong, Y., Liu, L., Sisi, D., Mi, L.** Comprehensive Analysis of ATP6V1s Family Members in Renal Clear Cell Carcinoma With Prognostic Values. *Frontiers in Oncology*. 30 de October de 2020, Vol. 10.
142. **Jaiswal, P.K., Koul, S., Palanisamy, N. et al.** Eukaryotic Translation Initiation Factor 4 Gamma 1 (EIF4G1): a target for cancer therapeutic intervention? *Cancer Cell*. 2019, pág. 224.
143. **Badura, M., Braunstein, S., Zavadil, J., Schneider, R.** DNA damage and eIF4G1 in breast cancer cells reprogram translation for survival and DNA repair mRNAs. *PNAS*. 109, 29 de October de 2012, Vol. 46, págs. 18767-18772.
144. **Lu, Y., Yu, S., Wang, G., Ma, Z., Fu, X., Cao, Y., Li, Q., & Xu, Z.** (2021). Elevation of EIF4G1 promotes non-small cell lung cancer progression by activating mTOR

signalling. . *Journal of cellular and molecular medicine*. 25, 2021, Vol. 6, págs. 2994–3005.

145. **Hincapie, D.** Estudio de las propensiones conformacionales del aminoácido L-Glutamato en regiones altamente estructuradas de proteínas resueltas por cristalografía de rayos X. *Pontificia Universidad Javeriana*. 2011.

146. **Peter Y. Chou, Gerald D. Fasman.** Structural and functional role of leucine residues in proteins. *Journal of Molecular Biology*. 1973., Vol. 74, 3, págs. 263-281.

147. **Zhang, L., y otros, y otros.** Leucine Supplementation: A Novel Strategy for Modulating Lipid Metabolism and Energy Homeostasis. *Nutrients*. 2020, Vol. 12, pág. 1299.

148. **Pegg, A. E.** Mammalian polyamine metabolism and function. . *IUBMB Life*. 2009, págs. 880–894.

149. **Son, S. M. et al.** Leucine signals to mTORC1 via its metabolite acetyl-coenzyme A. *Cell Metab*. 2019, Vol. 29, págs. 192–201.e197.

150. **Mayers, J. R. et al.** Elevation of circulating branched-chain amino acids is an early event in human pancreatic adenocarcinoma development. *Nat. Med*. 20, 2014, págs. 1193–1198.

151. **Sheen, J. H., Zoncu, R., Kim, D. & Sabatini, D. M.** Defective regulation of autophagy upon leucine deprivation reveals a targetable liability of human melanoma cells in vitro and in vivo. *Cancer Cell*. 325, 2011, págs. 613-628.

152. **Oda, K. et al.** L-type amino acid transporter 1 inhibitors inhibit tumor cell growth. *Cancer Sci*. 101, 2010, págs. 173–179.

153. **Ahearn, K.** Biochemistry and Molecular Biology. *The Great Courses, Teaching Company*. 2019.

154. **Webster, D., & Wildgoose, J.** Tyrosine supplementation for phenylketonuria. *The Cochrane database of systematic reviews*. 2013.

155. **Watanabe A., et al.** Serum amino acid levels in patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer*. 1984.

156. **Jiang, J., Batra, S., & Zhang, J.** Asparagine: A Metabolite to Be Targeted in Cancers. . *Metabolites*. 2021.

157. **Carreño-Venegas A, Chaparro-Giraldo A.** Diseño de casetes de expresión que confieran tolerancia a sequía y a glufosinato en maíz (*Zea mays*). *Acta biol. Colomb*. 2016, págs. 555-570.

158. **Huertas, A.** Sistemas vegetales para la expresión del ectodominio modificado y la proteína completa GP5 del virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino. *Centro de investigación y asistencia en tecnología y diseño del estado de Jalisco*. 2013.
159. **Hoil, D.** Diseño y construcción de vectores para la expresión de genes virales en cloroplastos. *Instituto Politécnico Nacional*. 2010.
160. *Genome Sequence of the Octopine-Type Agrobacterium tumefaciens Strain Ach5*. **Henkel, C. V., den Dulk-Ras, A., Zhang, X., & Hooykaas, P. J.** [ed.] 2. s.l. : 2, 2014, Genome announcements.
161. **Valderrama Fonseca, Ana Milena, Arango Isaza, Rafael y Afanador Kafuri, Lucia.** Transformación de plantas mediada por Agrobacterium: "Ingeniería genética natural aplicada". *Revista de la Facultad de Agronomía de Medellín*. 2005, págs. 2569-2585.
162. **Ferrín Suarez, Xaime.** Agrobacterium tumefaciens: descubrimiento, ciclo de vida, mecanismo de acción y aplicación en el ámbito de la biotecnología. *Universidad de Coruña*. 2020.
163. **Turkec, A, y otros, y otros.** Evaluation of DNA extraction methods in order to monitor genetically modified materials in soy foodstuffs and feeds commercialized in Turkey by multiplex real-time PCR. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2015, págs. 386-392.
164. **Bravo, A., Likitvivatanavong, S., Gill, S. S., & Soberón, M.** Bacillus thuringiensis: A story of a successful bioinsecticide. *Insect biochemistry and molecular biology*. 41, 2011, Vol. 7, págs. 423–431.
165. **Puspito, AN, Rao, AQ, Hafeez, MN, Iqbal, MS, Bajwa, KS, Ali, Q., Rashid, B., Abbas, MA, Latif, A., Shahid, AA, Nasir, IA y Husnain, T.** Puspito, A. N., Rao, A. Q., Hafeez, M. N., Iqbal, M. S., Bajwa, K. S., Ali, Q., Rashid, B., Abbas, M. A., Latif, A., Shahid, A. A., Nasir, I. A., & Husnain, T. (2015). Transformation and Evaluation of Cry1Ac+Cry2A and GTGene in Gossypium hirsutum. *Frontiers in plant science*. 2015.
166. **Qin, D., Liu, XY., Miceli, C. et al.** Soybean plants expressing the Bacillus thuringiensis cry8-like gene show resistance to Holotrichia parallela. *BMC Biotechnol.* 2019, pág. 66.
167. **Nemesio Villa-Ruano, Yesenia Pacheco-Hernández, Erika Beatriz.** Biotecnología de plantas medicinales: generando fármacos de un futuro tornado presente. *Ciencia y tecnología*. 2011, págs. 13-20.
168. **Torres, E., Vaquero, C., Nicholson, L., Sack, M., Stöger, E., Drossard, J., & Perrin, Y.** Rice cell culture as an alternative production system for functional diagnostic and therapeutic antibodies. *Transgenic research*. 8, 1999, Vol. 6, págs. 441-449.

169. **Afonso, L. C., Scharton, T. M., Vieira, L. Q., Wysocka, M., Trinchieri, G., & Scott, P.** The adjuvant effect of interleukin-12 in a vaccine against *Leishmania major*. *Science*. 1994, págs. 235-237.
170. **D.A. Goldstein, J.A. Thomas.** Biopharmaceuticals derived from genetically modified plants. *QJM: An International Journal of Medicine*. 11, November de 2004, Vol. 97, págs. 705-716.
171. *Unique activity associated with non-insecticidal Bacillus thuringiensis parasporal inclusions: in vitro cell-killing action on human cancer cells.* **Mizuki., Ohba, M., Akao, T., Yamashita, S., Saitoh, H.** 1999, *Journal of Applied Microbiology*, Vol. 86, págs. 477-486.
172. **Zhang, X., Candas, M., Griko, NB, Taussig, R., y Bulla, LA, Jr.** A mechanism of cell death involving an adenylyl cyclase/PKA signaling pathway is induced by the Cry1Ab toxin of *Bacillus thuringiensis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006, Vol. 103, 26, págs. 9897-9902.
173. **Universidad Nacional Autónoma de México.** UNAM. *Instituto de Biotecnología*. [En línea] 2019. [Citado el: 20 de 11 de 2019.] <http://www.ibt.unam.mx/>.