

Caracterización fenotípica de *B. cereus* FS1, sobreexpresante de la proteína YieF de *E. coli*, en su interacción con profármacos nitroaromáticos

Phenotypic characterization of *B. cereus* FS1, overexpressing the *E. coli* YieF protein, in its interaction with nitroaromatic prodrugs

Jocelyn Hernández Orduña¹, Paola Orozco Fernández¹, Fernando Santos Escobar¹, J Félix Gutiérrez Corona¹

¹Departamento de Biología, División de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad de Guanajuato, Noria Alta S/N, Guanajuato, Gto. México, C.P. 36050.

felixg@ugto.mx¹

Resumen

El cromo (VI) es un contaminante ambiental de alta prioridad, debido a sus características como son su alta solubilidad, movilidad y capacidad de integrarse a las células, convirtiéndose en una amenaza significativa para el medio ambiente y la salud humana. Por otro lado, el cromo (III) es menos tóxico, es insoluble y de fácil remoción. Es por esto que se han buscado alternativas para la reducción biológica de cromo (VI) a cromo (III). Las cromato reductasas bacterianas han despertado un interés en este campo, especialmente las de clase II, las cuales durante el proceso de reducción liberan una menor cantidad de ROS, minimizando el daño celular. La enzima YieF de *Escherichia coli* es una cromato reductasa de clase II, la cual presenta la capacidad de reducir profármacos nitroaromáticos. En este trabajo se evaluó la tolerancia de dos cepas sobreexpresantes de la proteína YieF en *B. cereus* FS1 (Y2 y Y7) expuestas a cromo, así como la capacidad para reducir cromo (VI) y la activación de los profármacos nitroaromáticos Mitomicina C y Metronidazol. Los resultados mostraron que, en comparación a la cepa control Y0 (que es la cepa *B. cereus* FS1 transformada con el vector vacío), ambas cepas sobreexpresantes, Y2 y Y7, presentan mayor tolerancia a Cr(VI) y mayor capacidad de reducirlo, tanto en cultivo como en extractos libres de células. En los ensayos de activación de profármacos, solamente se observó la activación de metronidazol mediante el uso de una cepa reportera de *E. coli* (recA-Gfp), que se activa por daño genotóxico derivado de la activación del profármaco. Estos resultados abren interesantes perspectivas de trabajo futuro.

Palabras clave: Cromo (VI), reducción, cromato reductasa, mitomicina C, metronidazol.

Introducción

El cromo hexavalente Cr(VI), en su forma de cromato o dicromato, es un contaminante ambiental que ha generado alta preocupación, debido a su alta toxicidad y a su amplio uso industrial en procesos como el curtido de pieles y cueros, la fabricación de pigmentos, el tratamiento de metales y el teñido de textiles, entre otros procesos (Sandana y col., 2015). Su alta solubilidad en agua, movilidad y capacidad de ingresar a células procariotas y eucariotas, a través del sistema de transporte de sulfato, lo convierten en una amenaza significativa para el ambiente y la salud humana (Ackerley y col., 2004). A nivel intracelular, la reducción incompleta de Cr(VI) genera especies reactivas de oxígeno (ROS) responsables de un daño celular severo (Ackerley y col., 2004). Por el contrario, su forma trivalente Cr(III) es menos tóxica, insoluble y puede ser removida eficazmente del ambiente mediante precipitación (Sandana y col., 2015). Por ello, la reducción biológica de Cr(VI) a Cr(III) se ha propuesto como una alternativa ecológica a los métodos físico-químicos tradicionales de remediación, los cuales suelen ser costosos, energéticamente intensivos y generadores de residuos secundarios (Kalsoom y col., 2025).

En este contexto, las cromato reductasas bacterianas han despertado gran interés, especialmente aquellas clasificadas como enzimas de clase II, que reducen Cr(VI) directamente a Cr(III) con una baja generación de ROS (Shahpiri y col., 2021). La enzima YieF de *Escherichia coli* es una cromato reductasa de clase II que, además de mostrar una alta eficiencia en la reducción de Cr(VI), genera niveles intracelulares mínimos de estrés oxidativo intracelular (Shahpiri y col., 2021). Esta enzima ha sido mejorada mediante evolución dirigida,

logrando incrementar su capacidad reductora hasta 200 veces respecto a la proteína nativa (Barak y col., 2006).

Estudios recientes han demostrado que YieF también posee la capacidad de reducir profármacos nitroaromáticos, incluidos profármacos anticancerígenos como la mitomicina-C, así como el antiparasitario metronidazol, cuya activación en células tumorales permite una acción quimioterapéutica específica y efectiva (Barak y col., 2006, Sharrock y col., 2021). Estos profármacos son inactivos en su forma original, pero al ser reducidos intracelularmente generan especies citotóxicas capaces de inducir daño en el DNA, incluso en células en estado no proliferativo, lo cual representa una ventaja significativa frente a tratamientos convencionales (Kalsoom y col., 2025).

El metronidazol es un profármaco antimicrobiano caracterizado por su bajo potencial de "efecto espectador", lo que implica que sus metabolitos activos tienden a quedar retenidos dentro de la célula una vez reducidos. Esta particularidad lo hace idóneo para estudios de ablación celular precisa y para ser utilizado como un "interruptor de apagado" en terapias génicas, permitiendo la eliminación controlada de células vectoras (Sharrock y col., 2021). Por su parte, la mitomicina-C es un profármaco reductivo no tóxico en su forma nativa que, al ser reducido, genera una especie altamente tóxica que mata las células mediante la creación de aductos de DNA (Barak y col., 2006). Su ventaja radica en su capacidad para dirigirse tanto a células tumorales en crecimiento como a las que no se replican activamente, lo cual es crucial, dado que en los tumores humanos solo una fracción de las células se encuentra en replicación constante (Barak y col., 2006).

La actividad de YieF ha sido estudiada principalmente en bacterias Gram-negativas como *E. coli*, mientras que especies Gram-positivas como *Bacillus cereus* carecen naturalmente de esta proteína. En el grupo de trabajo se han aislado cepas bacterianas de residuos industriales que contienen Cr(VI), como la cepa Am13 de *B. cereus* (Chávez-Eliás, 2015). Recientemente, en nuestro grupo, se han realizado estudios para sobreexpresar la proteína YieF de *E. coli* en *B. cereus* FS1, una cepa derivada de la cepa ambiental AM13 que esta deletada en el regulador transcripcional PlcR, por lo cual es una cepa inocua que no produce toxinas importantes, pero que mantiene tolerancia a Cr(VI) y buena capacidad para reducirlo, así como buena efectividad para la remoción de colorantes azoicos (Uribe Juárez, 2023). Otros estudios fueron enfocados en sintetizar y obtener el marco de lectura abierto (ORF) del gen *yieF* de *E. coli* con la modificación descrita por Barak y col., (2006) que incrementa la capacidad de reducción de Cr(VI), mediante el uso de codones de *B. cereus* y clonación de la secuencia en el vector de expresión pBCF. Además, río arriba del ORF del gen *yieF*, se incluyó la secuencia de un promotor inducible por estrés salino, un inductor de bajo costo (Santos-Escobar y col., 2024; datos no publicados). Resultados preliminares con varias sobreexpresantes de *B. cereus* AM13 que contienen el vector pBCY, mostraron que, en comparación con la transformante que contiene el vector vacío (pBCF, denominada Y0), las sobreexpresantes denominadas Y2 y Y7, presentaron mayor capacidad de reducción de Cr(VI) tras la inducción con NaCl al 2.5 % por 3 h (Merino-Montiel y col., 2025; datos no publicados).

Debido al potencial biotecnológico de YieF tanto para aplicaciones ambientales como terapéuticas, en el presente trabajo se propone la caracterización fenotípica de una cepa de *B. cereus* FS1 genéticamente modificada para sobreexpresar la proteína YieF, con el fin de evaluar su eficacia tanto en la reducción de Cr(VI) como en la activación de profármacos nitroaromáticos de interés clínico.

Materiales y métodos

Cepas bacterianas

Se utilizó la cepa *Bacillus cereus* FS1, derivada de AM13 que esta deletada en el regulador transcripcional PlcR, por lo cual es una cepa inocua que no produce toxinas importantes; esta cepa es similar a la cepa parental *B. cereus* AM13 en la tolerancia a Cr(VI) y en la capacidad de reducirlo, así como en la capacidad de remover colorantes azoicos. La cepa Y0 es una derivada de la cepa FS1 por transformación con el vector vacío pBCF, en tanto que las cepas Y2 y Y7 fueron obtenidas como derivadas de la cepa FS1 por transformación con el vector pBCY (contiene el gen *yieF* adaptado al uso de codones de *B. cereus*). Como cepa reportera para detectar daño genotóxico, se utilizó *Escherichia coli* MG1655 que contiene la fusión

transcripcional *PrecA::gfpmut2* en el vector pUA66 denominada ECR11 (Zaslaver y col., 2006). El mantenimiento de los cultivos y crecimiento para los diferentes experimentos, fue realizado en medio Luria-Bertani (LB; NaCl 5 g L⁻¹, extracto de levadura 5 g L⁻¹ y peptona biotriptasa 10 g L⁻¹) suplementado con tetraciclina 15 µg mL⁻¹.

Ensayos de inducción (NaCl)

Con el fin de determinar la concentración óptima de NaCl para la inducción del gen *yieF* en las cepas Y2 y Y7 de *B. cereus* FS1, se llevaron a cabo ensayos de reducción de Cr(VI). A partir de un preinóculo crecido toda la noche, de cada cepa, se inocularon matraces con medio LB líquido (30 mL) suplementado con tetraciclina hasta llegar a una densidad óptica (D.O.) a 600 nm de 0.5 (fase exponencial de crecimiento). Posteriormente, cada cultivo fue dividido en cuatro partes iguales (5 mL) y fueron inducidos con NaCl al 0%, 1.5%, 2.5% y 3.5%, se dejaron incubando por 3 horas adicionales a 37°C/200 rpm. Después de la inducción, fue agregado el Cr(VI) (15 ppm) y se incubó por 30 minutos adicionales a 37°C/200 rpm. Finalmente, fue determinado el crecimiento a una D.O.₆₀₀ y la capacidad de reducción de Cr(VI) por el método de la difenilcarbocida (Sandana y col., 2015).

Tolerancia a cromo hexavalente

Para determinar el fenotipo de tolerancia a cromo hexavalente fueron realizadas cinéticas de crecimiento. Cultivos de las cepas Y0, Y2 y Y7 de *B. cereus* FS1 fueron crecidos en medio LB líquido y suplementados con tetraciclina hasta obtener el cultivo en fase exponencial (D.O.₅₉₅ de 0.5) bajo las condiciones de incubación antes mencionadas. A este tiempo, cada cultivo fue dividido en partes iguales (20 mL), a un matraz se le añadió la concentración óptima de NaCl estéril y al otro H₂O MQ estéril y fueron incubados a 37°C/200 rpm por 3 h adicionales. Posteriormente, cada cultivo fue ajustado a una D.O.₅₉₅ de 0.2 y una alícuota de 180 µL fue adicionada a una placa Elisa de 96 pocillos y esta fue aforada con 20 µL de la concentración de cromo hexavalente (0, 15, 30, 50, 70 y 90 ppm). La microplaca fue incubada en un lector de Elisa MULTISCAN FC (marca Thermo Scientific) bajo las siguientes condiciones: temperatura de 37°C, agitación orbital media, toma de muestras cada 20 min por 12 h.

Ensayo de actividad cromato reductasa

A partir de un preinoculo crecido toda la noche de las cepas Y0, Y2 y Y7, se inocularon matraces con medio LB líquido (50mL) adicionado con tetraciclina y se incubaron a 37°C hasta llegar a una densidad óptica de 0.2 a 600nm. A este tiempo, se agregó el inductor, NaCl al 1.5% y los matraces fueron incubados por 3 h adicionales a 37°C/200 rpm. Una vez inducidos, se centrifugaron las células a 5,000 g por 5 min a 4°C y se decantó el sobrenadante, se realizaron 2 lavados y se resuspendió la pastilla celular con 5 mL de buffer de fosfato al 0.2M pH 7.2 a 4°C. A continuación, se realizó la lisis agregando a la suspensión celular, 0.6 g de perlas de vidrio (estériles), 0.3 mL de inhibidor de proteasas (s8820) al 1X, 0.005 mL de lisozima y 0.01mL de mutanolizina. Toda la mezcla se dejó incubando por 1 hora 30 minutos a 37°C. Posteriormente se dejó reposar 15 minutos a -20°C y fue agitado por vórtex a máxima velocidad por 5 minutos y luego se incubó a -20°C, este paso se repitió por 7 veces. Posteriormente se centrifugó a 16000 x g por 20 minutos a -4°C y fue separado el sobrenadante (extracto crudo) de los restos celulares.

Para determinar la actividad de la enzima cromato reductasa se utilizó el método según Sandana y col., (2015). Para el ensayo se utilizó una mezcla que contenía 0.2 mL de una solución de Cr VI 0.2 mM; 0.2 mL de Buffer de fosfato 0.2 M a pH 7.2; 0.2 mL de NADH 0.2 mM y 0.4 mL del extracto crudo. Se incubó por 30 minutos a 37°C y se añadieron 0.5 mL de ácido tricloroacético (TCA) al 20% para detener la reacción. Posteriormente se añadieron 2 mL de difenilcarbocida al 0.5%, obteniéndose un color rosado característico. Para determinar la reducción de Cr se midió la absorbancia a 540nm y se utilizó una curva estándar para cuantificar el Cr(VI). Así mismo, se preparó un control que contenía NADH y Cr(VI) para determinar la reducción abiótica.

Activación de profármacos

A partir del extracto crudo obtenido previamente, fue realizada la siguiente mezcla de activación de los profármacos de interés, Mitomicina C (Barak y col., 2006) y Metronidazol (Sharrock y col., 2021): 5 μ M del profármaco, 0.2 mL de Buffer de fosfato 0.2 M a pH 7.2; 0.2 mL de NADH 0.2 mM y 0.4 mL del extracto crudo. La mezcla de reacción fue incubada en un Termomixer (Eppendorf) por 60 minutos a 37°C/600 rpm y se añadieron 0.5 mL de TCA al 20% para parar la reacción.

Para verificar la activación de los profármacos, fue utilizada una cepa reportera de *E. coli* EcR11 conteniendo la fusión transcripcional PrecA-Gfpmut2::KnR (Zaslaver y col., 2006), la cual, es ampliamente utilizada para la detección de agentes genotóxicos (Matejczyk & Rosochacki, 2014). A partir de un preinoculo crecido toda la noche de la cepa EcR11, se inoculó un matraz con medio LB líquido (20mL) suplementado con kanamicina [$40 \mu\text{g mL}^{-1}$] y se incubó a 37°C/200 rpm hasta alcanzar una densidad óptica a 600nm de 0.5. Posteriormente se hicieron alícuotas 0.8 mL del cultivo de *E. coli* en tubos Eppendorf y se les agregaron 0.2 mL de los profármacos activados por los extractos sin o con la proteína YieF, por cada uno de los profármacos y cada una de las muestras, para obtener una concentración final de 2 μ M. Así mismo, se incluyeron los controles, positivos (Mitomicina C y Metronidazol, ambos a una concentración final de 2 μ M) y negativo, adicionando agua (H_2O) desionizada estéril. Los tubos se incubaron por 1 hora a 37 °C / 600 rpm en un Termomixer (Eppendorf) y muestras de cada tubo se observaron por microscopia de epifluorescencia.

Resultados y Discusión

Caracterización de cepas de *B. cereus* FS1 portando el vector pBCF (Y0) y la construcción pBCY para sobreexpresar yieF (Y2 y Y7) en respuesta a NaCl.

Las transformantes de *B. cereus* FS1, Y2 y Y7, sobreexpresantes de la proteína yieF, mostraron un notable efecto inhibitorio en su crecimiento al tratamiento con NaCl, el cual fue dependiente de la concentración, observando una mayor sensibilidad a la concentración salina de 3.5 % en conjunto con la cepa control, Y0, cuyo efecto inhibitorio fue mayor (Figura 1). Con base a estos resultados, decidimos utilizar la concentración de NaCl de 1.5% debido a un efecto mínimo de toxicidad, con el fin de analizar la capacidad de reducción y de tolerancia a Cr(VI). Este resultado sugiere que a una baja concentración de NaCl se podría inducir adecuadamente la expresión del gen yieF, sin generar un estrés salino excesivo que pudiera afectar la producción de la proteína y la viabilidad celular (Naamala y col., 2023).

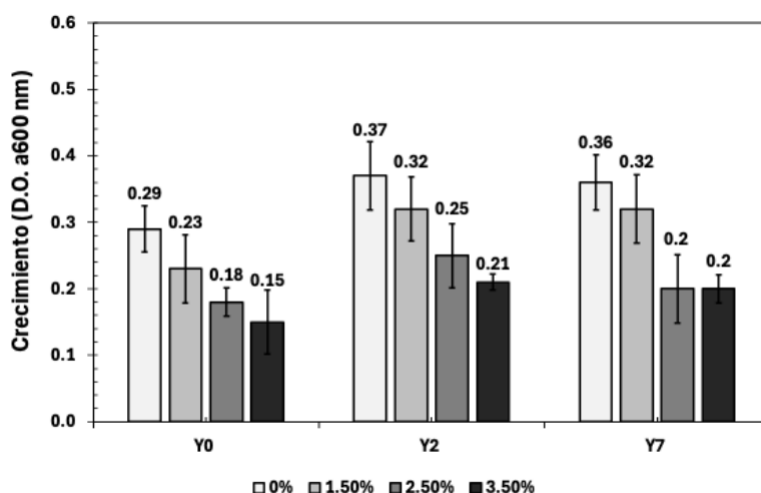


Figura 1. Efecto del NaCl en el crecimiento de las transformantes de *B. cereus* FS1 Y0, Y2 y Y7. Las transformantes fueron crecidas en medio LB suplementado con tetraciclina hasta llegar a la fase de crecimiento exponencial (D.O. a 600 nm de 0.5); el cultivo fue dividido en partes iguales, fue tratado con diferentes concentraciones de NaCl (expresadas en %) y fue incubado por 3 h adicionales a 37°C/200 rpm. Los resultados fueron graficados como el promedio de tres experimentos independientes hechos por triplicado $\pm$ DE.

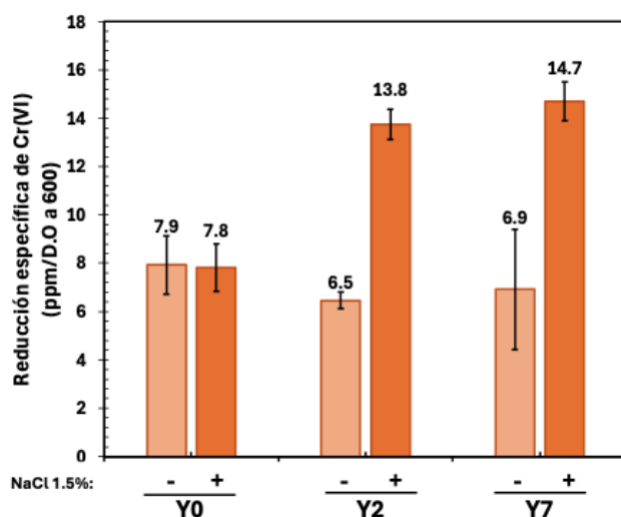


Figura 2. Efecto de la expresión heteróloga de *yieF* en *Bacillus cereus* FS1 sobre la capacidad de reducción de Cr(VI). Las transformantes de *B. cereus* Y0, Y2 y Y7 fueron crecidas en medio LB-Tc^R hasta llegar a la fase de crecimiento exponencial y cada cultivo fue tratado o no con el inductor (NaCl al 1.5%) por 3 h. Posteriormente, fue adicionada la concentración de Cr(VI), 35 ppm, y los cultivos fueron incubados por 3 h. La capacidad de reducción fue medida utilizando el método de la difenilcarbazida de acuerdo con lo descrito en Materiales y métodos. Los resultados fueron graficados como el promedio de tres experimentos independientes hechos por triplicado $\pm$ DE.

Efecto de la sobreexpresión de *yieF* en la capacidad de reducción y tolerancia de *B. cereus* FS1 a los efectos tóxicos de Cr(VI).

Con base a los resultados del efecto del NaCl sobre el crecimiento de las cepas de *B. cereus* Y0, Y2 y Y7, fueron obtenidos cultivos en fase exponencial e inducidos o no con 1.5 % de NaCl y expuestos a 15 ppm de Cr(VI), para determinar la capacidad de reducción del oxianión. Los resultados de los ensayos de reducción de Cr(VI), mostraron que las cepas de *B. cereus* Y2 y Y7, que portan la construcción que sobreexpresa al gen *yieF*, presentaron aproximadamente 2 veces más capacidad reductora de Cr(VI), en comparación con las cepas sin inducción y que la cepa control Y0 (Figura 2). A continuación, se estudió el efecto del Cr(VI) en el crecimiento de las cepas transformantes, mediante la realización de cinéticas de crecimiento en respuesta a diferentes concentraciones de Cr(VI) (0, 30 y 50 ppm). En las figuras 3A y 3D, se muestra que las cepas de *B. cereus*, Y2 y Y7, presentan un crecimiento similar tanto en ausencia como en presencia del inductor (NaCl); sin embargo, la cepa Y0 utilizada como control del experimento, mostró un menor crecimiento en comparación con las cepas sobreexpresantes Y2 y Y7, bajo las mismas condiciones.

En presencia de Cr(VI) sin el inductor, las cepas de *B. cereus* Y2 y Y7, presentan mayor tolerancia al oxianión que Y0 (Fig. 3B y 3C). Sin embargo, en presencia de NaCl, la cepa transformante Y0 presenta un aumento importante de tolerancia a Cr(VI), alcanzando un crecimiento similar al de las sobreexpresantes Y2 y Y7 (Fig. 3E y 3F). En conjunto, estos resultados indican que la producción de la proteína YieF por las cepas transformantes Y2 y Y7 mejora la capacidad de reducción de Cr(VI). Se ha descrito que en *E. coli* la proteína YieF tiene la capacidad de reducir el Cr(VI) a Cr(III) intracelularmente (Ackerley y col., 2004), por lo que puede interpretarse que dicha proteína promueve la tolerancia al estrés generado por el oxianión en las sobreexpresantes Y2 y Y7, con el consecuente aumento en capacidad de reducción extracelular de Cr(VI).

Estos resultados sugieren que la sobreexpresión de *yieF* reduce los efectos tóxicos ocasionados por el Cr(VI), lo que le confiere a *B. cereus* FS1 la capacidad de tolerar mayores concentraciones de este metal. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Liu y col., 2015, quienes observaron que la expresión heteróloga de *yieF*, en células humanas HepG2, incrementó la tolerancia y protección frente a los efectos nocivos del ion cromato. El mecanismo mediante el cual YieF protege a *B. cereus* de los daños celulares causados por el Cr(VI) se encuentra actualmente en investigación en nuestro laboratorio.

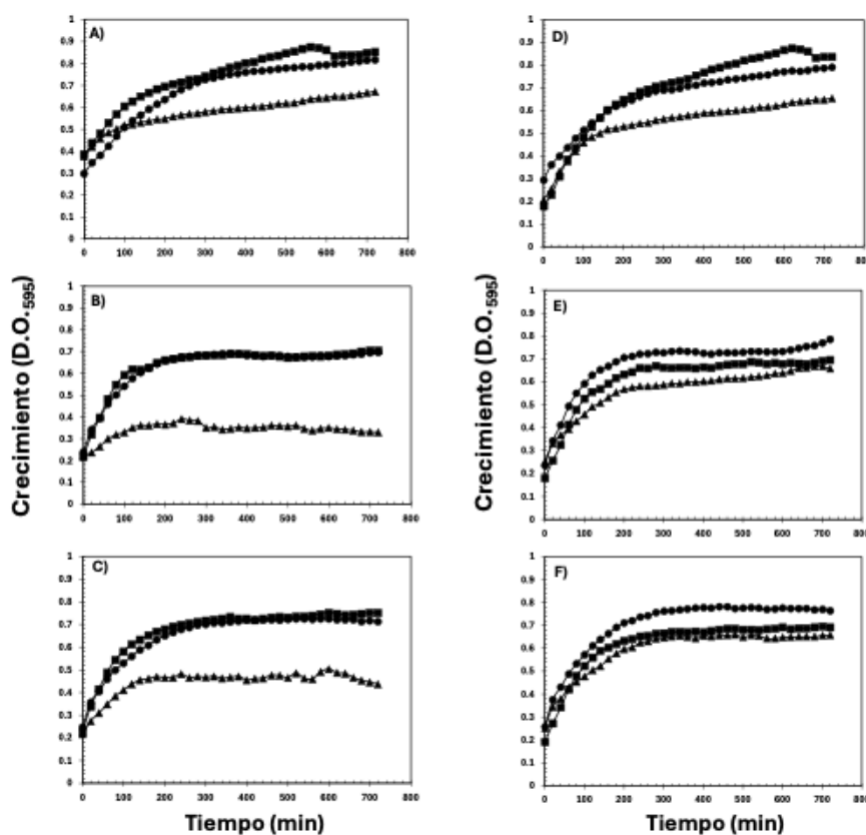


Figura 3. Efecto de la expresión heteróloga de *yieF* en *Bacillus cereus* FS1 crecido en presencia de Cr(VI). Cinética de crecimiento de *B. cereus* Y0 (▲), Y2 (●) y Y7 (■), inducidas (D-F) o no (A-C) con NaCl al 1.5 % y después tratadas con 0 (A y D), 30 (B y E) y 50 (C y F) ppm de Cr(VI). Los resultados fueron graficados como el promedio de tres experimentos independientes hechos por triplicado.

Por otro lado, estos resultados sugieren que la posible expresión heteróloga del gen *yieF*, no solo confiere una mayor tolerancia al estrés generado por el Cr(VI), sino que también aumenta la capacidad de reducción del metal. Un hallazgo importante fue el aumento en la tolerancia a cromo en la transformante de *B. cereus* Y0 que porta el vector vacío (pBCF) a la concentración salina evaluada como inductor. Este fenómeno podría estar relacionado con la respuesta celular potenciada frente al estrés osmótico, favoreciendo la respuesta al efecto tóxico del cromo (Shahpiri et al., 2021), sin un aumento en la capacidad de reducción (ver Fig. 2).

Debido a que la actividad de la proteína YieF es citosólica (Ackerley y col., 2004), decidimos medir la actividad de cromato reductasa en extractos crudos obtenidos mediante la lisis celular de las cepas sobreexpresantes de *B. cereus* Y2 y Y7, previamente tratadas con NaCl al 1.5 % utilizando el protocolo para la lisis celular descrito en la sección de Materiales y Métodos. Los resultados descritos en la Figura 4 muestran que las cepas sobreexpresantes de *B. cereus* Y2 y Y7 presentan una capacidad de reducción de Cr(VI) 1.6 y 1.3 veces mayor, respectivamente, en comparación con la transformante Y0. Estos resultados validan la eficacia de YieF como una cromato reductasa activa en un organismo Gram-positivo, lo que constituye un hallazgo relevante, ya que hasta ahora la mayoría de los estudios se habían centrado su atención en bacterias Gram-negativas como *E. coli* y *Pseudomonas aeruginosa* (Ackerley y col., 2004). Además, este resultado en conjunto con el fenotipo de tolerancia y capacidad de reducción de las sobreexpresantes Y2 y Y7, refuerzan la conclusión de que la proteína YieF se encuentra presente, es funcional y activa bajo las condiciones analizadas en este estudio.

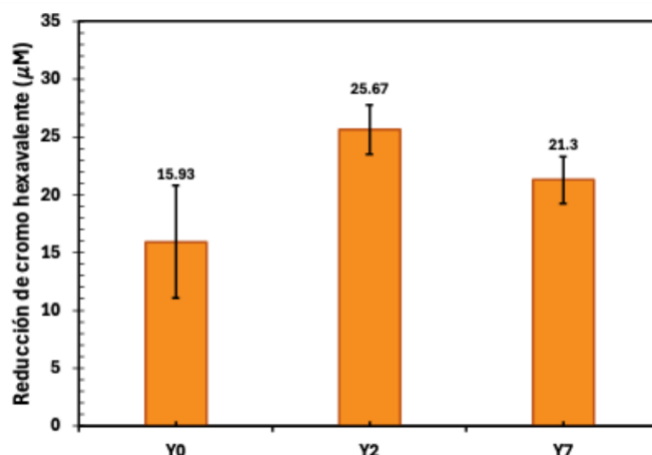


Figura 4. Actividad de cromato reductasa derivada del extracto crudo obtenido de la lisis celular de las transformantes de *B. cereus* FS1, Y0, Y2 y Y7. Utilizando células en fase exponencial y la concentración de NaCl al 1.5 como inductor, fue obtenido el extracto crudo a partir de la lisis combinando las condiciones enzimática/mecánica descrita en Materiales y métodos. La concentración de Cr(VI) evaluada en este experimento fue 40 μM. Los resultados fueron graficados como el promedio de tres experimentos independientes hechos por triplicado.

Con base en los resultados mostrados en la Figura 4, se eligió la sobreexpresante de *B. cereus* Y2 para analizar la activación de los profármacos, otra actividad importante que contiene la proteína YieF (Barak y col., 2006). La activación de profármacos fue evaluada mediante el uso de la cepa reportera *E. coli* MG1655 que contiene la fusión transcripcional PrecA-Gfp que se activa mediante daño genotóxico (Zaslaver y col., 2006, Matejczyk & Rosochacki, 2014). Para la activación, se adicionaron metronidazol y mitomicina-C a una concentración final de 5 μM, previamente activados por el extracto crudo de Y2 que fue inducido con NaCl al 1.5%. La adición de metronidazol o Mitomicina C activados (concentración final de 2 μM) a las células de *E. coli* EcR11, solamente resultó en una clara señal de fluorescencia cuando se utilizó el metronidazol activado (Fig. 5G-I) en comparación a los controles: metronidazol (Fig. 5 A-C) y metronidazol no activado, derivado de la cepa de *B. cereus* Y0 (Fig. 5D-F). En este caso fue posible observar la señal de fluorescencia de la proteína Gfp en las células de *E. coli* EcR11, resultado de la activación efectiva del profármaco. Este resultado comprueba la capacidad de la enzima YieF, expresada en Y2, para reducir compuestos nitroaromáticos con fines terapéuticos, como ha sido demostrado previamente por Barak et al. (2006) en el contexto de quimioterapia reductiva. Además, estos resultados indican que, en ausencia de YieF, el extracto carece de la capacidad de reducir el profármaco a su forma activa. La ausencia de señal fluorescente en este control negativo confirma que la actividad reductora específica observada en Y2 se atribuye directamente a la expresión de *yieF*, y no a componentes inespecíficos del extracto celular o a efectos de la inducción salina por sí sola.

Por otro lado, la adición de mitomicina-C activada con el extracto crudo de Y2 inducido con 1.5% de NaCl no mostró fluorescencia a la concentración evaluada, 2 μM, ni en el extracto crudo derivado de Y0. Solamente se observó fluorescencia en el control positivo, en presencia de mitomicina C (2 μM; datos no mostrados). Esta ausencia de activación puede deberse a un error durante la manipulación en la mezcla de reacción para la activación del profármaco; en particular, quizá al parar la reacción con el TCA, este pudo haber precipitado la mitomicina C activa, ya sea en su forma activa o no, y de esta manera, no estaría disponible para generar daño genotóxico en la cepa reportera de *E. coli*.

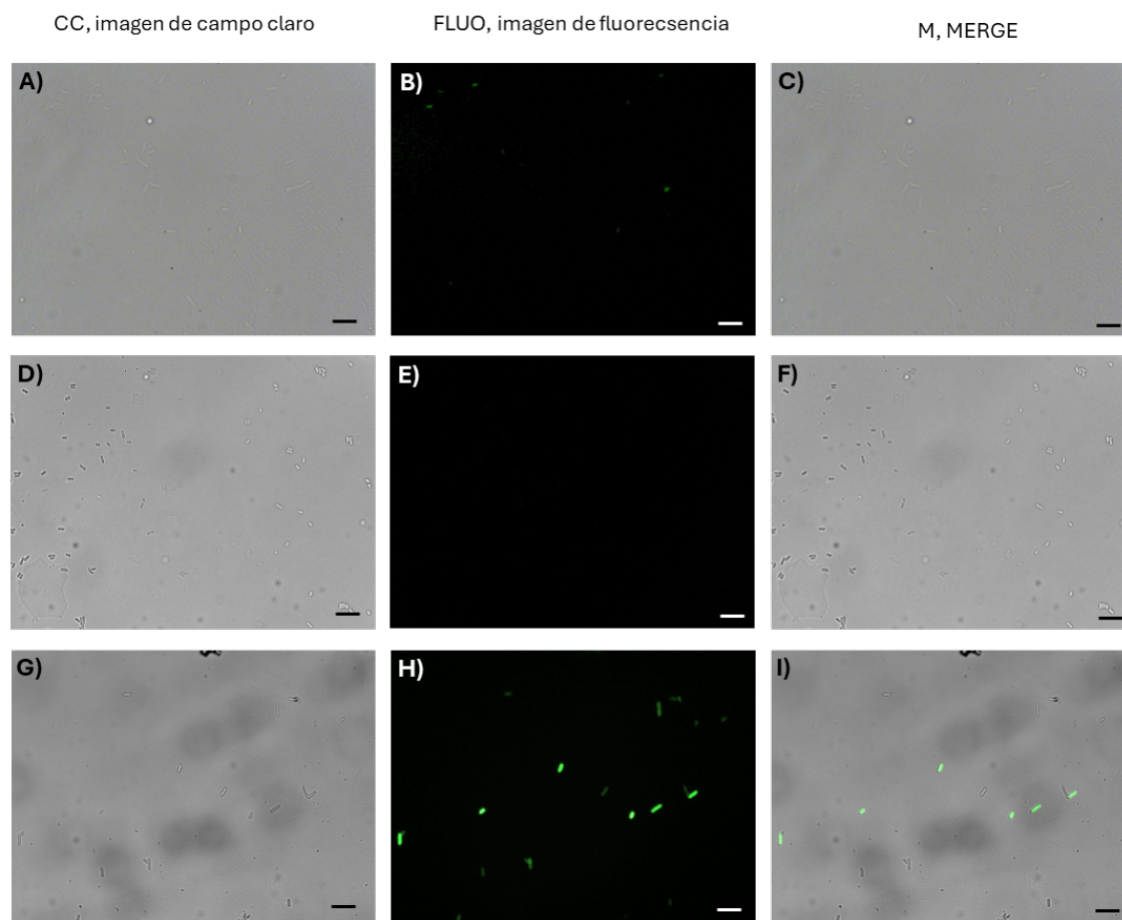


Figura 5. Ensayo de activación del profármaco Metronidazol utilizando la cepa reportera de *E. coli* PrecA-Gfp::Kn^R. Se observó la activación de los profármacos a partir del extracto crudo de la cepa Y2 mediante microscopía de fluorescencia a 63X utilizando un pad de agarosa. **A)** Micrografía de CC como control negativo, metronidazol 2 uM, profármaco no activo. **B)** Micrografía FLUO del control negativo, mezcla de reacción del extracto crudo de la cepa de *B. cereus* Y0 con metronidazol, profármaco no activo. **C)** Combinación de las micrografías de CC y FLUO. Micrografías de CC, FLUO y MERGE de células de *E. coli* EcR11 con metronidazol no activado derivado del extracto crudo de la lisis celular de la cepa de *B. cereus* Y0 (**D-F**) y Y2 (**G-I**) en presencia de NaCl al 1.5%. Imágenes representativas de tres experimentos independientes.

Conclusiones

Las cepas recombinantes de *B. cereus* FS1 Y2 y Y7, que sobreexpresan la proteína YieF de *E. coli*, demostraron una mayor capacidad para reducir Cr(VI). Esta característica puede estar atribuida a la presencia de un vector autorreplicativo que expresa de manera inducible con NaCl el gen *yieF*. La cepa Y2 mostró una mayor eficiencia reductora al ser inducida con NaCl al 1.5%, en comparación con Y7 y con el control negativo Y0. Dado que YieF es una proteína de localización citosólica, los resultados de la mayor actividad de cromato reductasa en los extractos crudos de las cepas Y2 y Y7 indicaron que la sobreproducción de la referida proteína podría ser la responsable.

En conjunto, los resultados obtenidos demuestran que la expresión heteróloga de *yieF* en *B. cereus* es funcional y representa una estrategia prometedora tanto para la biorremediación de Cr(VI) como para la activación de profármacos, como se evidenció en la activación de metronidazol, con potencial aplicación en el área biomédica.

Referencias

Ackerley, D. F., Gonzalez, C. F., Park, C. H., Blake II, R., Keyhan, M., Martin, A. (2004). *Chromate-Reducing Properties of Soluble Flavoproteins from Pseudomonas putida and Escherichia coli*. Applied and Environmental Microbiology, 70, 2

Barak, Y., Stephen, H. T., Ackerley, D. F., Lynch, S. V., Contag, C. H., Martin, A. (2006). *New enzyme for reductive cancer chemotherapy, YieF, and its improvement by directed evolution*. Mol Cancer Ther, 5, 97-103

Chávez Elías Amelia Fabiola (2015). *Caracterización de cepas bacterianas nativas de residuos industriales con alto contenido de metales*. Tesis de licenciatura, Q.F.B. Universidad de Guanajuato

Kalsoom, K., Ud Din, S., Ceylan, E., Hasan, F., Khan, S., Badshan, M., Canakci, S., Osman Belduz, A., Ali Shan, A. (2025). *Cloning and expression of chromate reductase from Bacillus paramycoides S48 for chromium remediation*. Scientific Reports, 15:18796

Liu, X., Wu, G., Zhang, Y., Wu, D., Li, X., & Liu, P. (2015). Chromate reductase YieF from Escherichia coli enhances hexavalent chromium resistance of human HepG2 cells. International Journal of Molecular Sciences, 16(6), 11892-11902.

Matejczyk, M., & Rosochacki, S. (2014). *Potential applications of sos-gfp biosensor to in vitro rapid screening of cytotoxic and genotoxic effect of anticancer and antidiabetic pharmacist residues in surface water*. Journal Of Ecological Engineering, 16, 116-121.

Naamala, J., Subramanian, S., Msimbira, L. A., & Smith, D. L. (2023). Effect of NaCl stress on exoproteome profiles of Bacillus amyloliquefaciens EB2003A and Lactobacillus helveticus EL2006H. Frontiers in Microbiology, 14, 1206152.

Sandana Mala, J. G., Sujatha, D., Rose, C. (2015). *Inducible chromate reductase exhibiting extracellular activity in Bacillus methylotrophicus for chromium biorremediation*. Microbiological Research, 170, 235-241

Shahpiri, A., Majnoun, Z., Kazemi-Nasab, A., Zarei, M. (2021). *Enhancement of chromate bioaccumulation by engineered Escherichia coli cells coexpressing chromate reductase (YieF) and a rice matellothionein isoform (OsMT1)*. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 96, 1285-1291

Sharrock, A. V., McManaway, S. P., Rich, M. H., Mumm, J. S., Hermans, I. F., Tercel, M., Pruijn, F. B., Ackerley, D. F. (2021). *Engineering the Escherichia coli Nitroreductase NfsA to Create a Flexible Enzyme-Prodrug Activation System*. Drug Metabolism and Transport, 12,

Uribe Juárez, Diana Eréndira de Jesús (2023). *Caracterización de una cepa de Bacillus cereus deficiente en el regulador transcripcional PlcR respecto de su interacción con cromo y colorantes azoicos*. Tesis de Maestría. Posgrado en Ciencias (Biología), DCNE, Universidad de Guanajuato

Zaslaver, A., Bren, A., Ronen, M., Itzkovitz, S., Kikoin, I., Shavit, S., Liebermeister, W., Surette, M. G., & Alon, U. (2006). *A comprehensive library of fluorescent transcriptional reporters for Escherichia coli*. Nature Methods, 3(8), 623-628.