



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

CAMPUS TUXTEPEC

INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

**ESTUDIO DE LA VÍA DE APOPTOSIS INDUCIDA POR LA PARASPORINA A34-2
PRODUCIDA POR *Bacillus thuringiensis* EN LA LÍNEA CELULAR DE CÁNCER DE
MAMA MCF-7**

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:

ANGEL ANTONIO ORTELA GREGORIO

DIRECTOR

DRA. ANA KARIN NAVARRO MARTINEZ

CO-DIRECTOR

DRA. LUZ DEL CARMEN CAMACHO CASTILLO

SAN JUAN BAUTISTA TUXTEPEC, OAXACA

2024



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN CAMPUS TUXTEPEC

INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

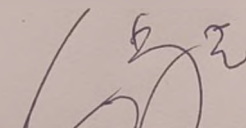
ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

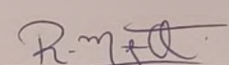
En la ciudad de San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, el día 08 de mayo de 2024 a las 16:15 h, los miembros de la comisión revisora de tesis designada por la Jefatura de Carrera de la Ingeniería en Biotecnología se reunieron en la sala de juntas del Instituto de Biotecnología de la Universidad del Papaloapan, con la finalidad de examinar la tesis titulada "**Estudio de la vía de apoptosis inducida por la parasporina A34-2 producida por *Bacillus thuringiensis* en la línea celular de cáncer de mama MCF-7**" presentada por el alumno **Angel Antonio Ortela Gregorio**, con número de matrícula 16090215, aspirante al título de **Licenciatura**.

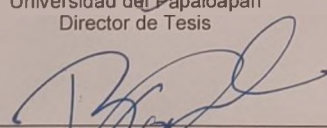
Después de intercambiar opiniones, los miembros de la comisión manifestaron que la tesis **satisface** los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes, otorgando su **aprobación** para que el aspirante pueda proceder con el proceso de titulación.

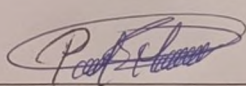
Tuxtepec, Oaxaca, a 08 de mayo de 2024.

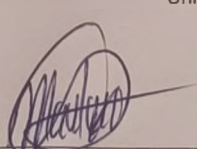
ATENTAMENTE
LA COMISIÓN REVISORA


Dra. Ana Karin Navarro Martínez
Profesor Investigador Titular "B"
Universidad del Papaloapan
Director de Tesis


Dra. Roxana Martínez Pascual
Profesor Investigador Titular "A"
Universidad del Papaloapan
Revisor de Tesis


Dr. Edgar Baldemar Sepúlveda García
Profesor Investigador Asociado "C"
Universidad del Papaloapan
Revisor de Tesis


Dr. Paul Mauricio Sánchez Ocampo
Profesor Investigador Titular "A"
Universidad del Papaloapan
Revisor de Tesis


Dra. Angélica Sofía Martínez Ramírez
Profesor Investigador Asociado "C"
Universidad del Papaloapan
Revisor de Tesis

Campus Loma Bonita
Av. Ferrocarril S/N, Col. Ciudad Universitaria, Loma
Bonita, Oaxaca C.P. 68400
Tel/Fax: 01 281 872 92 30

www.unpa.edu.mx

Campus Tuxtepec
Circuito Central N° 200, Col. Parque Industrial,
Tuxtepec, Oaxaca. C.P. 68301
Tel/Fax: 01 287 875 9240



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN
CAMPUS TUXTEPEC

INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

Tuxtepec, Oaxaca, a 08 de mayo de 2024
Oficio No. JCIB/002/02/2024

Lic. Yesenia Barrientos Arenal
Jefa de Servicios Escolares
Universidad del Papaloapan

Con base en el dictamen de la comisión revisora, se autoriza la impresión del trabajo de tesis del alumno **Angel Antonio Ortela Gregorio** con número de matrícula **16090215**, con título final **"Estudio de la vía de apoptosis inducida por la parasporina A34-2 producida por *Bacillus thuringiensis* en la línea celular de cáncer de mama MCF-7"** para ser presentado como trabajo de tesis para obtener el título de Licenciado en Ingeniería en Biotecnología, toda vez que cumple satisfactoriamente con la reglamentación establecida para tal fin.

El Jurado de Examen Profesional estará compuesto por los siguientes profesores:

Dra. Roxana Martínez Pascual (Presidente, Universidad del Papaloapan)
Dr. Paul Mauricio Sanchez Ocampo (Secretario, Universidad del Papaloapan)
Dra. Edgar Baldemar Sepúlveda García (Vocal, Universidad del Papaloapan)
Dra. Angélica Sofía Martínez Ramírez (Primer Suplente, Universidad del Papaloapan)
Dr. Miguel Ángel Peña Rico (Segundo Suplente, Universidad del Papaloapan)

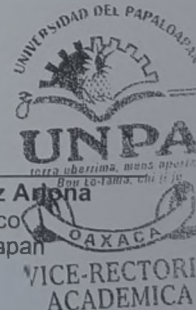
Sin más por el momento le envío un cordial saludo.

Atentamente
Terra uberrima, mens aperta
Bou Lo-tama, chí jí jú



Dra. Jacqueline Capataz Tatúr
Jefa de Carrera de Ingeniería en Biotecnología
Universidad del Papaloapan
CAMPUS TUXTEPEC

c.c.p. Dra. Ana Karin Navarro Martínez Directora de tesis, Para su conocimiento
c.c.p. Angel Antonio Ortela Gregorio, Alumno, Para su conocimiento
c.c.p. Archivo



Vo.Bo. M.C. Héctor López Arriaga
Vice Rector Académico
Universidad del Papaloapan

VICE-RECTORIA
ACADEMICA

Campus Loma Bonita
Av. Ferrocarril S/N, Col. Ciudad Universitaria, Loma
Bonita, Oaxaca C.P. 68400
Tel/Fax: 01 281 872 92 30

www.unpa.edu.mx

Campus Tuxtepec
Circuito Central N° 200, Col. Parque Industrial,
Tuxtepec, Oaxaca. C.P. 68301
Tel/Fax: 01 287 875 9240

HOJA DE ORIGINALIDAD

El presente trabajo nombrado estudio de la vía de apoptosis inducida por la parasporina A34-2 producida por *Bacillus thuringiensis* en la línea celular de cáncer de mama MCF-7 no ha sido aceptado o empleado para el otorgamiento de título o grado diferente o adicional al actual. La tesis es resultado de las investigaciones del autor, excepto donde se indican las fuentes de información consultadas. El autor otorga su consentimiento a la **Universidad del Papaloapan** para la reproducción del documento con el fin del intercambio bibliotecario siempre y cuando se indique la fuente.

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas que han contribuido en la realización de este trabajo de tesis.

Primero, deseo agradecer el apoyo incondicional a mis padres, la Sra. Elena gregorio Justo y al Sr. Rubén Ortela Alto, por su amor, paciencia y sacrificio para brindarme la oportunidad de perseguir mis metas académicas.

También quiero agradecer a mi directora de tesis, la Dra. Ana Karin Navarro Martínez, por su orientación, paciencia y por todos sus consejos a lo largo de este proceso. Su dedicación y experiencia fueron fundamentales para la culminación exitosa de este proyecto.

Además, quiero agradecer al Dr. Miguel Ángel Peña Rico, al Mtro. Alain Cruz Nolasco y a mis compañeros de trabajo, por las lecciones aprendidas, su ayuda y apoyo durante el trabajo. Su colaboración fue indispensable para obtener resultados significativos.

A mis amigos quienes me brindaron apoyo incondicional, comprensión y ánimo durante los momentos difíciles.

Asimismo, quiero agradecer a Sibel de Jesús Estrada Escobedo por haber llegado a mi vida, por su amor, apoyo y lecciones. Su presencia y aliento fue una fuente constante de inspiración y motivación para mí.

Al PROYECTO 321009 titulado DISCERNIENDO LA IMPORTANCIA DE LA INTERACCIÓN PARASPORINAS-MEMBRANA CELULAR PARA SU ACTIVIDAD CITOTÓXICA EN LA CÉLULA DE ORIGEN CANCEROSO financiado por CONAHCyT.

Finalmente, quiero agradecer a todo el personal de mi facultad, la Universidad del Papaloapan, por brindarme los ánimos y respeto para culminar mi estadía en mi casa de estudios.

A todos ustedes, gracias de corazón por su invaluable contribución y apoyo en este viaje.

CONTENIDO

ÍNDICE DE FIGURAS	1
ÍNDICE DE TABLAS	2
RESUMEN	4
1. INTRODUCCIÓN	5
1.1 <i>Bacillus thuringiensis</i>	5
1.1.1 Parasporinas	6
1.1.2. Mecanismo de acción	9
1.2 Cáncer	11
1.2.1 Cáncer de mama	12
1.2.2 Tratamientos contra cáncer de mamá	14
1.2.3 Parasporinas contra cáncer de mamá	15
1.3 Tipos de muerte celular	15
1.3.1 Autofagia	16
1.3.2 Necrosis	16
1.3.3 Apoptosis	18
1.4 Metodologías de pruebas genéticas y tipo de muerte celular	21
2. ANTECEDENTES	23
3. JUSTIFICACIÓN	25
4. HIPÓTESIS	26
5. OBJETIVOS	27
6. DIAGRAMA EXPERIMENTAL	28
7. MATERIALES Y MÉTODOS	29
7.1 Microorganismos	29
7.2 Producción de la parasporina	29
7.3 Purificación y cuantificación de la parasporina	29
7.4 Manejo de la línea celular de cáncer de mama MCF-7	31
7.5 Evaluación de la parasporina A34-2 en las líneas celulares	33
7.5.1 Ensayo biológico de la proteína A34-2 en células tumorales	33
7.5.2 Ensayo biológico de la proteína A34-2 en células no tumorales	33
7.6 Extracción del ARN total	35
7.7 Síntesis de cDNA	36
7.8 Determinación de la expresión de los genes por qRT-PCR	36

7.9 Análisis estadístico.....	37
8. RESULTADO Y DISCUSIÓN.....	38
8.1 Obtención de extractos proteicos y selección de inclusiones proteicas.....	38
8.2 Purificación de los extractos proteicos.....	39
8.3 Evaluación de actividad biológica de la proteína A34-2.....	39
8.3.1 Determinación citotóxica de la proteína A34-2 en la línea celular MCF-7	40
8.3.1.1 Evaluación morfológica de las células MCF-7	41
8.3.2 Determinación citotóxica de la proteína A34-2 en CMSP	1
8.3.3 Ensayo de hemólisis.....	2
8.4 Evaluación de la expresión de genes vinculados a la vía extrínseca en células MCF-7	3
9. CONCLUSIÓN	5
10. REFERENCIAS	6

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Imagen de microscopía electrónica de una cepa de <i>Bacillus thuringiensis</i>	5
Figura 2.- Dendrograma que ilustra la relación entre las parasporinas.....	8
Figura 3.- Mecanismo de acción sugerido para PS1.....	10
Figura 4.- Mecanismo de acción sugerido para PS2.....	10
Figura 5.- Anatomía de pecho femenino y masculino.....	13
Figura 6.- Representación simplificada de las vías de apoptosis.....	19
Figura 7.- Principales vías de señalización que conducen a la apoptosis de las células.....	21
Figura 8.- Línea celular MCF-7 utilizadas en los bioensayos.....	32
Figura 9.- Gel de SDS-PAGE con las distintas bandas obtenidas de la cepa A34.....	38
Figura 10.- Ensayo de viabilidad de las células MCF-7 tratadas con la parasporina A34-2.....	40
Figura 11.- Cambios morfológicos de células MCF-7.....	42
Figura 12.- Ensayo de viabilidad celular de las CMSP tratadas con la parasporina A34-2.....	43
Figura 13.- Ensayo de hemólisis tratadas con la parasporina A34-2.....	44
Figura 14.- Evaluación de la expresión de los genes en la línea celular MCF-7.....	45

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.- Clasificación y características de las parasporinas.....	7
Tabla 2. Características morfológicas diferenciales entre apoptosis y necrosis.....	17
Tabla 3.- Serie de lavados para la purificación de las parasporinas.....	30
Tabla 4.- Soluciones para el proceso de teñido y desteñido de los geles.....	30
Tabla 5.- Secuencias Forward y Reverse de los primers a utilizados.....	36

ABREVIATURAS Y SIGLAS

ATP	Adenosín Trifosfato o Trifosfato de Adenosina
CMSP	Células mononucleadas de sangre periférica
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
Fadd	Factor associated death domain
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
HEK293T	Células de riñón embrionario
HepG2	Células de cáncer hepático
HR+	Receptor Hormonal Positivo
LDH	Lactato deshidrogenasa
MCF-7	Michigan Cancer Foundation-7
MTT	3-(4,5) dimetiltiazolil -2,5 difeniltetrazólio
NIH	National Institutes of Health
OMS	Organización Mundial de la Salud
PBS	Buffer de Fosfatos Salinos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PS	Parasporina
qRT-PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa Cuantitativa en Tiempo Real
RE	Receptores de Estrógeno
RNA	Ácido ribonucleico
RP	Receptores de Progesterona
RPM	Rotaciones por minuto o revoluciones por minuto
SDS	Dodecil Sulfato de Sodio
SDS-PAGE	Dodecil Sulfato de Sodio-Gel de Electroforesis de Poliacrilamida
SFB	Suero Fetal Bovino
TNBC	Cáncer de mama triple negativo (por sus siglas en inglés Triple-negative breast cancer)
TNF	Factor de necrosis tumoral (por sus siglas en inglés Tumor necrosis factor)

RESUMEN

El cáncer es una enfermedad caracterizada por el crecimiento descontrolado y la propagación anormal de células en el cuerpo. Este proceso conduce a la formación de tumores y, en etapas avanzadas, a la metástasis, afectando diversos tejidos y órganos. De acuerdo a la Agencia Internacional para la Investigación de Cáncer, es una de las principales causas de muerte en el mundo, con casi 10 millones de fallecimientos registrados en 2020. El cáncer de mama es especialmente prevalente entre las mujeres y se espera que su incidencia siga aumentando. A pesar de los avances en prevención y tratamiento, el diagnóstico tardío y los tratamientos invasivos con efectos secundarios representan los principales desafíos. Sin embargo, investigaciones recientes sobre terapias antitumorales selectivas, como el uso de microorganismos como *Bacillus thuringiensis*, ofrecen esperanza para tratamientos más efectivos y menos invasivos en el futuro. Durante su proceso de esporulación, esta bacteria produce unas proteínas llamadas parasporinas, las cuales han despertado interés reciente debido a que exhiben un efecto citotóxico específico contra células cancerígenas, sin dañar a las células sanas.

El objetivo de este trabajo fue emplear una de las proteínas producida por la cepa A34 de *Bacillus thuringiensis* contra células de cáncer de mama MCF-7 con el fin de evaluar la expresión de genes vinculados a la ruta intrínseca de la apoptosis. Esto es debido a que las células cancerígenas en contacto con la proteína A34-2 muestran características morfológicas de muerte por apoptosis; así como también, verificar la toxicidad de la proteína en células no cancerosas.

Comprender los mecanismos de acción y los perfiles de seguridad de la parasporina A34-2, uno de los metabolitos producidos por *B. thuringiensis*, puede contribuir al desarrollo de tratamientos contra el cáncer más efectivos y menos agresivos.

1. INTRODUCCIÓN

Las numerosas especies del género *Bacillaceae* exhiben una amplia gama de habilidades fisiológicas que les permiten vivir en todos los entornos naturales. Su identificación se basa en criterios morfológicos y bioquímicos, por ejemplo, las especies de *Bacillus* son bacterias que poseen forma de bastón, son aeróbicas o anaeróbicas facultativas, formadoras de endosporas (que son resistentes al calor, el frío, la radiación, la desecación y los desinfectantes) y son Gram positivas, pero algunas especies pueden volverse Gram negativos mientras el cultivo bacteriano envejece. (Layton et al., 2011; Turnbull, 1996).

1.1 *Bacillus thuringiensis*

Bacillus thuringiensis es una bacteria Gram positiva (de 3 a 5 μm de largo y de 1 a 1.2 μm de ancho) que puede considerarse ubicuo por habitar en casi todos los ambientes, y se caracteriza por producir cristales parasporales durante su fase de esporulación (Figura 1). (Schnepf et al., 1998).

Esta bacteria fue aislada por primera vez en Japón por el biólogo japonés Shigetane Ishiwata (1901-1902); cuando estudiaba la causa de muerte en larvas de gusanos de seda, *Bombyx mori*. Al principio, Ishiwata la nombró como *Bacillus sotto*, por lo que la enfermedad de las larvas se conocía como enfermedad de Soto (Fiuza et al., 2017; Mizuki et al., 1999). Años más tarde, en 1911, en Alemania, el científico Ernst Berliner, aisló una cepa bacteriana en las larvas de una polilla muerta en la harina mediterránea, ubicada en un molino harinero en el estado alemán de Turingia, y lo nombró como *Bacillus thuringiensis* (Crickmore et al., 2014).

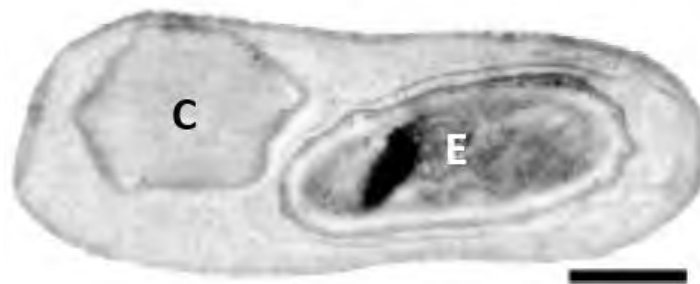


Figura 1. - Imagen de microscopía electrónica de transmisión de una cepa de *Bacillus thuringiensis* en estado de esporangio. C: cristal parasporal; E: espora. Barra, 0,5 μm (Modificada de Sauka & Benintende, 2008).

Las inclusiones parasporales que produce *B. thuringiensis* están formadas por uno o más cuerpos cristalinos de naturaleza proteica (Sauka & Benintende, 2008), constituidos por δ -endotoxinas y se clasifican en tres grupos:

- Proteínas Cry, estas proteínas presentan actividad antihelmíntica (Hu et al., 2010), codificada por los genes *cry* (Brasseur et al., 2015), son tóxicas para distintos invertebrados particularmente larvas e insectos. Debido a esto, estas proteínas han constituido la base del bioinsecticida de control biológico más vendido del mundo (Soberón et al., 2013).
- Proteínas Cyt, estas proteínas presentan una actividad hemolítica codificada por los genes *cyt* (Brasseur et al., 2015; Schnepf et al., 1998).
- Se han encontrado cepas de *B. thuringiensis* que muestran una nula actividad insecticida, pero sí presentan una actividad citotóxica al ser enfrentadas a líneas celulares de cáncer de diferentes tipos; estas proteínas han sido denominadas parasporinas (Velásquez Cardona et al., 2018).

1.1.1 Parasporinas

Las parasporinas (PS) se clasifican dentro del grupo de proteínas Cry, que son genealógicamente heterogéneas, y son sintetizadas por *B. thuringiensis*. Las PS tienen una fuerte actividad citotóxica en las células cancerosas humanas de diversos orígenes, lo anterior cuando son digeridas con proteasas (Ohba et al., 2009). Esto ha sido determinado mediante ensayos *in vitro* y por secuenciación aminoacídica (Mizuki et al., 2000; Ohba et al., 2009; Saitoh et al., 2006). Las PS se caracterizan por presentar baja o nula citotoxicidad hacia células normales, además de inducir una respuesta de apoptosis o necrosis en células cancerígenas (Velásquez Cardona et al., 2018). El mayor número de parasporinas, hasta el momento, proviene de cepas de *B. thuringiensis* aisladas del continente asiático como Japón, Vietnam, Malasia e India. Aunque también existen reportes de este tipo de cepas en el continente americano, como lo son las islas del Caribe, Canadá y México (Borin et al., 2021; Espino-Vázquez et al., 2012; Rezaei et al., 2023).

En la actualidad, se ha logrado identificar seis grupos o familias de PS clasificadas desde PS1 hasta PS6 por el comité de clasificación y nomenclatura de parasporinas, variando su peso molecular desde los ~34 hasta ~94 kDa (Brasseur et al., 2015), como se muestra en la Tabla 1. La forma en la que se clasifican las parasporinas está basada según el grado de homología que existe entre sus secuencias de aminoácidos, así como se muestra en el dendrograma de la Figura 2 (Okumura et al., 2010). Actualmente, se encuentran 29 secuencias parciales de PS reportadas en el GenBank, pero solo 19 cuentan con una nomenclatura oficial (Okumura et al., 2010).

Tabla 1.- Clasificación y características de las parasporinas

Nombre	Cry no.	Acc no.	Cepa fuente	Referencia
PS1Aa1	Cry31Aa1	AB031065	A1190	(Mizuki et al., 2000)
PS1Aa2	Cry31Aa2	AY081052	M15	(Jung et al., 2007)
PS1Aa3	Cry31Aa3	AB250922	B195	(Uemori et al., 2008)
PS1Aa4	Cry31Aa4	AB274826	Bt 79-25	(Yasutake et al., 2008)
PS1Aa5	Cry31Aa5	AB274827	Bt 92-10	(Yasutake et al., 2008)
PS1Aa6	Cry31Aa6	AB375062	CP78A, M019	(Nagamatsu et al., 2010)
PS1Ab1	Cry31Ab1	AB250923	B195	(Uemori et al., 2008)
PS1Ab2	Cry31Ab2	AB274825	Bt 31-5	(Yasutake et al., 2008)
PS1Ac1	Cry31Ac1	AB276125	Bt 87-29	(Yasutake et al., 2008)
PS1Ac2	Cry31Ac2	AB731600	B0462	(Kuroda et al., 2013)
PS1Ad1	Cry31Ad1	AB375062	CP78B, M019	(Nagamatsu et al., 2010)
PS2Aa1	Cry46Aa1	AB099515	A1547	(Ito et al., 2004)
PS2Aa2	Cry46Aa2	AB454419	A1470	(Okumura et al., 2013)
PS2Ab1	Cry46Ab1	AB186914	TK-E6	(Hayakawa et al., 2007)
PS3Aa1	Cry41Aa1	AB116649	A1462	(Yamashita et al., 2005)
PS3Ab1	Cry41Ab1	AB116651	A1462	(Yamashita et al., 2005)
PS4Aa1	Cry45Aa1	AB180980	A1470	(Okumura et al., 2004)
PS5Aa1	Cry64Aa1	AB555650	A1100	(Ekino et al., 2014)
PS6Aa1	Cry63Aa1	AB375063	CP84, M019	(Nagamatsu et al., 2010)

Fuente: Tomado y modificado del comité de clasificación y nomenclatura de parasporinas

(<http://parasporin.fitc.pref.fukuoka.jp>)

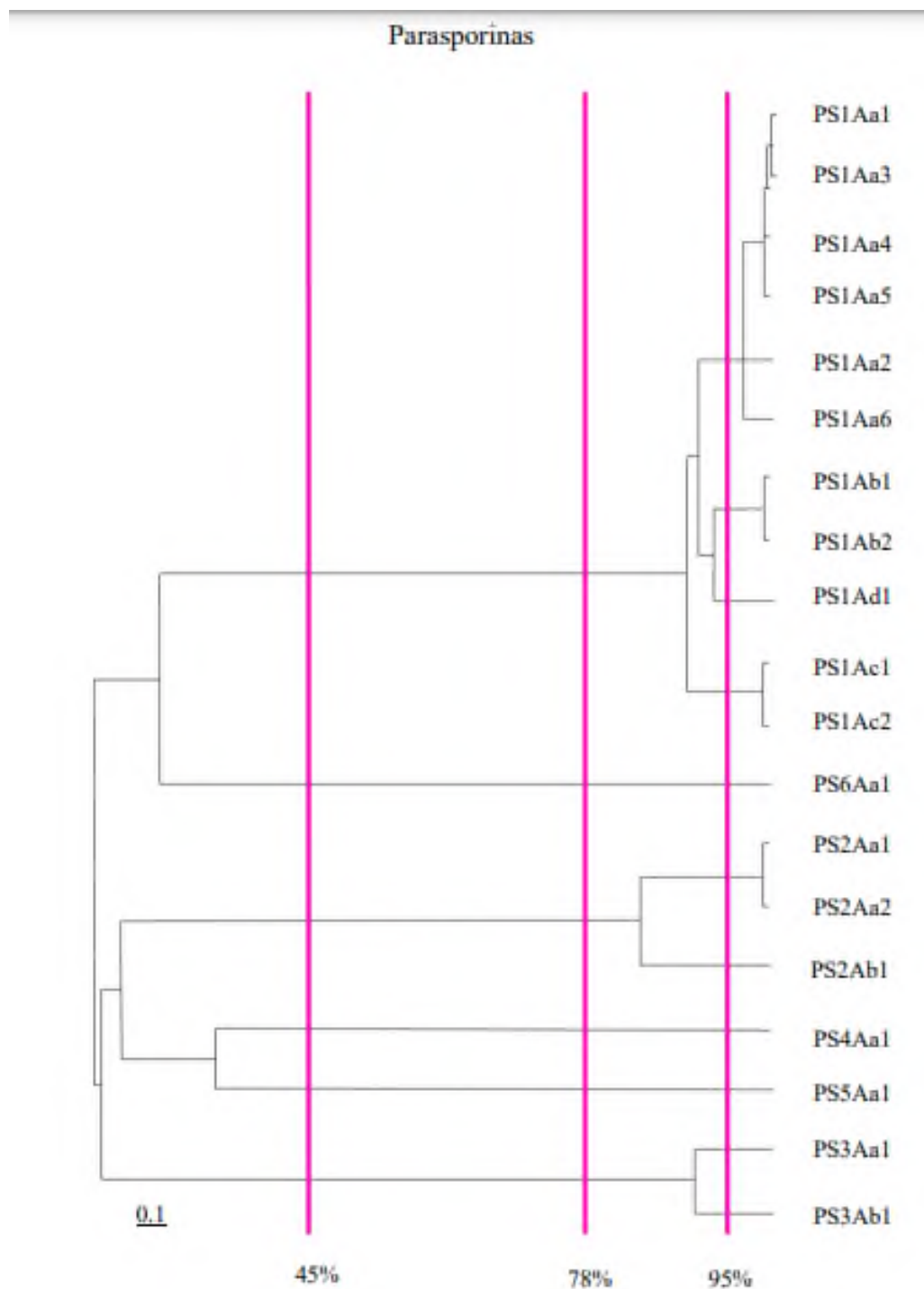


Figura 2. - Dendrograma que ilustra la relación entre las parasporinas pertenecientes a las seis familias, (PS1-PS6). Tomado del comité de clasificación y nomenclatura de parasporinas (<http://parasporin.fitc.pref.fukuoka.jp>).

Las parasporinas, son proteínas heterogéneas tanto en el espectro citocida como en su actividad (Inouye et al., 2008). Se pueden clasificar en dos grupos según su estructura tridimensional y el tipo de β -toxina formadora de poros (β -PFT) (Akiba & Okumura, 2017).

- Primero, el grupo de tres dominios (hojas β -plegadas, similares a un cilindro o barril). Estas proteínas son similares a las toxinas Cry de tres dominios con secuencias de cinco bloques altamente conservadas. En este grupo están las PS1, PS3 y PS6 (Akiba & Okumura, 2017).
- Segundo, las β -toxinas formadoras de poros (β -TFP), en las que se encuentran las PS2, PS4 y PS5 (Akiba & Okumura, 2017).

Por otro lado, los modos de acción de las parasporinas difieren entre las familias, así como su espectro citotóxico y su nivel de actividad (Ohba et al., 2009). Aunque estas parasporinas han cobrado un gran interés por su posible uso terapéutico debido a su efecto anticancerígeno, a su ubicuidad e inocuidad el mecanismo de acción aún se desconoce. Sin embargo, se sabe que su función varía de acuerdo al cáncer a tratar y al grupo de parasporinas con el que se trate (Espino-Vázquez et al., 2012).

1.1.2. Mecanismo de acción

A pesar de desconocer el mecanismo de acción específico de estas proteínas, se ha sugerido que requiere de una previa desnaturalización, para que posteriormente sean activadas con proteasas, lo que podría permitir la unión de la proteína a los receptores de glicoproteínas y así a la formación de poros en las células diana (Lee et al., 2001). Algunos mecanismos de acción propuestos son los siguientes:

- Para la familia PS1 (específicamente PS1Aa1), la proteína beclina-1 reconoce un receptor específico de la membrana celular cancerígena desencadenando el aumento de flujo de Ca^{+2} intracelular (figura 3), disminuyendo la síntesis de proteínas y ADN, lo cual involucra procesos de autofagia y apoptosis (Katayama et al., 2007). Lo distintivo de este receptor radica en que en las células normales se encuentra de forma intracelular y en las células cancerígenas de forma extracelular, como es el caso de las células HeLa (Zhong et al., 2009). Lo que explica la diferente actividad en células sanas y cancerosas.

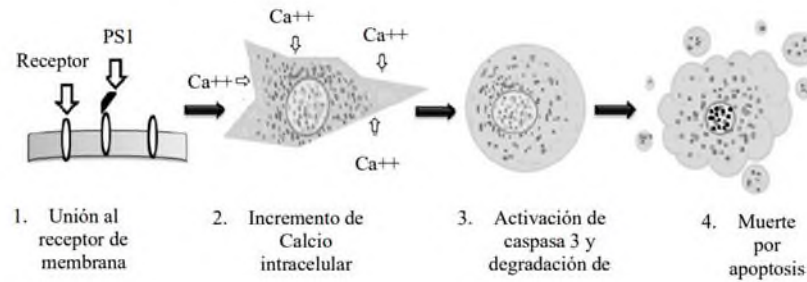


Figura 3. - Mecanismo de acción sugerido para PS1. (Modificado de Espino- Vázquez, 2017).

- Para la familia PS2 se propone que es formadora de poros ya que tiene similitud con la toxina Épsilon (ETX) y aerolisinas tipo β conocidas como Toxinas Formadoras de Poros (TFP; figura 4) (Xu et al., 2014). La PS2 es citotóxica contra líneas celulares HepG2 y MOLT-4, pero es poco probable que genere apoptosis (Ito et al., 2004). Se ha visto que estas toxinas se ubican en la periferia de las células cancerosas al igual que las cadherinas, las cuales son responsables de la adhesión célula-célula (Kitada et al., 2006).

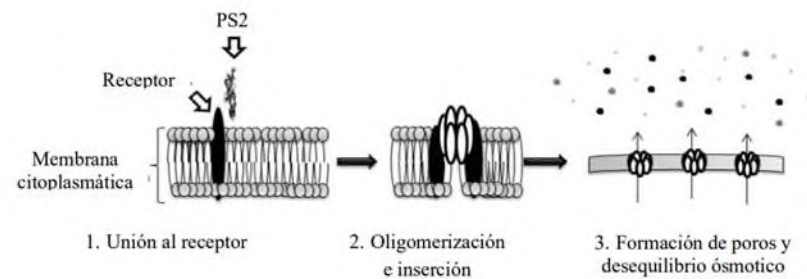


Figura 4. - Mecanismo de acción sugerido para PS2. (Modificado de Espino- Vázquez, 2017).

- La proteína PS3 es similar a la PS2, por lo que se propone que facilita la formación de poros lo que aumenta la permeabilidad de las células cancerígenas (Yamashita et al., 2005). Se sugiere una muerte celular por necrosis mediante la formación de poros en la membrana plasmática de células cancerosas. Lo anterior se comprobó tras la evaluación del daño en la membrana mediante la liberación de lactato deshidrogenasa (LDH) en células hepáticas HepG2 (Ohba et al., 2009).

- El mecanismo de acción de la PS4 es diferente a las PS antes mencionadas (Ohba et al., 2009). Se conoce que las PS4 provocan inflamación y lisis en células de cáncer, esto al unirse a la membrana plasmática y formar poros por oligomerización, permeabilizando la membrana celular. Esto se ha logrado determinar mediante la liberación de LDH y la internalización de dextranos de diferentes pesos moleculares, observándose en células MOLT-4. Además, se observó baja activación de las caspasas efectoras 3 y 7, lo que sugiere un posible mecanismo de muerte celular por necrosis (Okumura et al., 2011).
- La PS5 no es similar a otras proteínas Cry en cuanto a identidad, sin embargo, si lo es con aerolisinas β formadoras de poros (β -TFPs), las cuales generan canales en las membranas lipídicas de las células (Ekino et al., 2014).
- Por otro lado, la PS6 es citotóxica contra líneas celulares de cáncer de hígado y cervicouterino (Nagamatsu et al., 2010). Mientras que poco se sabe de su mecanismo de acción (Velasquez C. et al., 2018).

1.2 Cáncer

El cáncer es una enfermedad crónica-degenerativa, y se debe a mutaciones que pueden ser adquiridas con el tiempo o heredadas. Estas mutaciones pueden provocar la inactivación de genes de supresores de tumor y/o la activación de oncogenes (American Cancer Society, 2023). Dichas células se distinguen de células normales por las siguientes razones: proliferación descontrolada, pérdida de la capacidad de diferenciación, y se vuelven invasivas generando metástasis (Rang & Dale, 2014).

La incidencia del cáncer es mayor en adultos, en comparación con niños o jóvenes, este padecimiento no hace distinción de razas, nivel socioeconómico o sexo, sin embargo, tiende a afectar a hombres y mujeres en diferente medida (NIH, 2022).

La Organización Mundial de la Salud en 2021, reportó los principales tipos de cáncer que afectan a los humanos, siendo principalmente los tumores malignos de pulmón, próstata, colorrectal, estómago e hígado presente entre varones. Mientras que en las mujeres son los de mama, colorrectal, pulmón, cuello del útero y estómago (OMS, 2021). En 2019, por cada 100 mil mujeres de 20 años o más se reportaron 35.24 casos nuevos de cáncer de

mama a nivel nacional y una tasa de mortalidad de 17.19 defunciones por cada 100 mil mujeres de 20 años o más (INSP, 2020).

Si bien, no existe una causa directa que afirme el origen de esta enfermedad, la OMS (2021), a través del Centro Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer (IARC, por sus siglas en inglés), clasifica a los agentes cancerígenos en tres grandes grupos:

- Cancerígenos físicos: radiaciones ionizantes y ultravioleta.
- Cancerígenos químicos: tabaco, alcohol, asbestos, arsénico, aflatoxinas.
- Cancerígenos biológicos: infecciones causadas por ciertos virus, bacterias o parásitos.

1.2.1 Cáncer de mama

De acuerdo al National Institutes of Health (NIH) el cáncer de mama se desarrolla cuando las células dañadas del pecho comienzan a crecer descontroladamente llegando a formar tumores. Este tipo de cáncer no es exclusivo de las mujeres, sino que también los hombres pueden padecerlo, sin embargo, su incidencia es mucho menor en ellos (NIH, 2022).

El principal factor de riesgo para el cáncer de mama es el envejecimiento, pero existen otros factores, como los relacionados con la vida reproductiva de la mujer como son: pubertad precoz, primera gestación después de los 30 años, uso de anticonceptivos orales, menopausia tardía y terapias hormonales de remplazo (OMS, 2023). Además de antecedentes familiares de cáncer de mama, en los que se observan alteraciones en genes implicados con la regulación del metabolismo hormonal y a la reparación de ADN (Dimas E, 2016; Hernández, 2016).

De acuerdo a la American Society of Clinical Oncology, los tipos más comunes de cáncer de mama es el carcinoma ductal (comienza en los conductos donde se dirige la leche materna hacia el pezón) y el carcinoma lobulillar (se da en los lobulillos donde se produce la leche materna) (Figura 5) que se encuentra con más frecuencia en ambas mamas que otros tipos de este cáncer de mama (NIH, 2023).

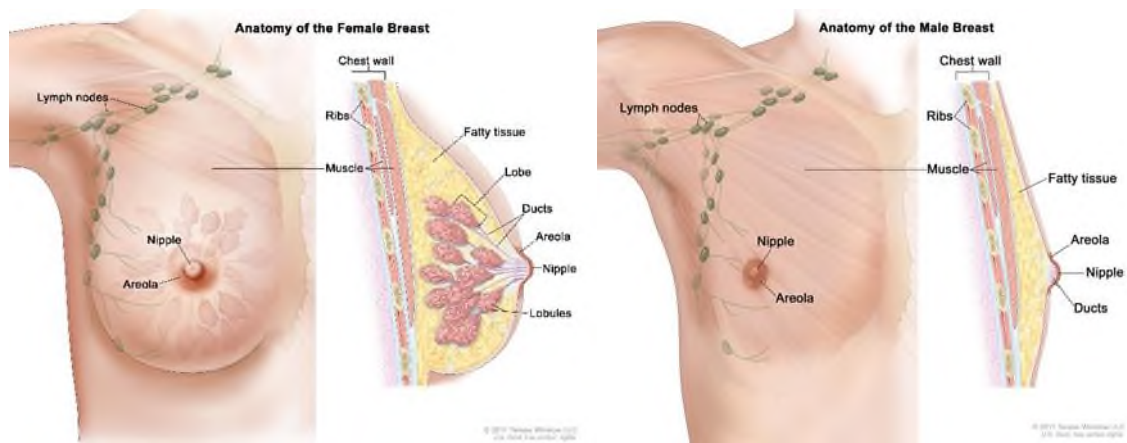


Figura 2. - Anatomía de glándula mamaria femenina (izquierda) y masculina (derecha). Tomado del Instituto Nacional del Cáncer (NIH, 2021)

El cáncer de mama se diferencia según las clasificaciones de tratamiento terapéutico con relación a sus receptores, y se hace en cuatro grupos principales (American Cancer Society, 2023):

- El grupo ER⁺, expresa receptores de estrógeno.
- El grupo PR⁺, expresa receptor de progesterona.
- El grupo HER2, expresa receptor del factor de crecimiento epidermal humano.

Estos a su vez se subclasifica en:

- A. Luminal A: receptor de estrógenos (ER⁺), receptor de progesterona (PR⁺) y sin receptor del factor de crecimiento epidermal humano (HER2⁻) (ER⁺ /PR⁺ /HER2⁻) Ki67 bajo
 - B. Luminal B: receptor de estrógenos, receptor de progesterona y receptor del factor de crecimiento epidermal humano (HER2⁺) (ER⁺ /PR⁺ /HER2⁺) o (ER⁺ /PR⁻ /HER2⁻ grado histológico 3) Ki67 alto.
 - C. HER2 sobreexpresado: sin receptor de estrógenos (ER⁻), sin receptor de progesterona (PR⁻) y con receptor del factor de crecimiento epidermal humano (ER⁻ /PR⁻ /HER2⁺), responden a terapias dirigidas anti-HER2.
- El grupo de tumores triple negativos (TNBC, por sus siglas en inglés) (ER⁻ /PR⁻ /HER2⁻), suele ser más agresivo y no existe un tratamiento estándar; sin embargo, se sugiere quimioterapia debido a las características biológicas únicas y a su elevada heterogeneidad.

Las variaciones en las características moleculares de un mismo tipo de cáncer demuestran la importancia de tomar medidas preventivas o de tratamiento teniendo en consideración las características únicas de cada individuo (American Cancer Society, 2023).

1.2.2 Tratamientos contra cáncer de mamá

Los tratamientos para cáncer de mama son cirugía, radioterapia, quimioterapia, tratamiento hormonal y biológico o una combinación de todos estos. Sin embargo, la elección del tratamiento varía según el avance de esta enfermedad (Guzmán-Aguillón, 2018). Dichos métodos ofrecen un alto porcentaje de éxito siempre y cuando se detecten en una fase temprana (American Cancer Society, 2023). No obstante, estos métodos no son selectivos por lo que terminan afectando la calidad de vida del paciente (OMS, 2023). Las quimioterapias se basan en una sola o más drogas que son utilizadas con el fin de contrarrestar el avance de cáncer de mama. En México las drogas más comunes para este caso son (secretaría de Salud, 2021):

- Antraciclinas: Epirrubicina, Doxorubicina liposomal pegilada.
- Taxanos: Paclitaxel, (Taxol) y el Docetaxel (Taxotere).
- Antimetabolitos: 5-fluorouracilo (5-FU) o Capecitabina, Gemcitabina.
- Otros fármacos: Ciclofosfamida (Cytosan), Mitoxantrona, Cisplatino, Fluorouracilo e Ixabepilona, Carboplatino (Paraplatin), Vinorelbina.

Este tratamiento hace que las células normales de la médula ósea, folículos pilosos (raíces del pelo), de la boca, del corazón, los riñones, la vejiga, los pulmones, sistema nervioso, tracto digestivo y órganos del sistema reproductor sean las más propensas a ser afectadas. Lo que provoca que la vida del paciente se vea afectada por estos nocivos efectos secundarios (NIH, 2023).

Con respecto a la terapia hormonal, se debe tomar en cuenta el periodo pre- o post menopáusico de la mujer. Considerando también, si ha recibido tratamientos hormonales previos (Gradishar et al., 2015).

De acuerdo a la American Cancer Society, los tratamientos hormonales en pacientes post y premenopáusicas son:

- Inhibidor de la aromatasa (IA) durante 5 años: Anastrozol, Letrozol y Exemestano.

- Tamoxifeno durante 2-3 años, seguido de IA hasta completar 5 años, o después de completar 5 años de IA.
- Tamoxifeno 5 años, seguido de IA 5 años.
- Tamoxifeno 5 años si hay contraindicación para IA, supresión de la función ovárica por 2 años (mujeres menores de 40 años). Si existe contraindicación se usa su análogo (LHRH+IA) 5 años.

1.2.3 Parasporinas contra cáncer de mamá

En el 2015, en investigaciones hechas por (Brasseur et al., 2015) demostraron que la parasporina-2Aa1, aislada de la cepa 4R2 de *Bacillus thuringiensis*, es específicamente citotóxica para diferentes tipos de cánceres (endometrio, colon, hígado, cuello uterino, mama y próstata). También, demostró que el mecanismo de acción de esta parasporina es por muerte celular programada, apoptosis, debido a que observaron la activación de las caspasas 3 y 9. Además, esta parasporina no mostró toxicidad alguna contra las células normales.

En el 2015, Sabiá Junior, reportó que dos proteínas de la cepa S1338 de *Bacillus thuringiensis* mostraron toxicidad contra células de cáncer de mama MCF-7, alterando su morfología y formando cuerpos apoptóticos después de 24 horas de tratamiento con la toxina activa, sugiriendo que el tipo de muerte celular es por apoptosis.

En el 2017, Cruz-Nolasco reportó cuatro PS (AX-1, AX-2, A34-1 y A34-2) provenientes de las cepas de *B. thuringiensis* aisladas de la región de la Cuenca del Papaloapan e identificadas por nuestro grupo de trabajo de la Universidad del Papaloapan. Dichas parasporinas presentaron actividad anti proliferativa contra líneas celulares de cáncer de mama MCF-7 y MDA-MB 231.

1.3 Tipos de muerte celular

La muerte celular es poco comprendida, a pesar de ser un evento importante en el desarrollo celular, la renovación de los tejidos y el mantenimiento de la homeostasis del organismo. Además, la existencia de errores en los mecanismos de muerte genera diversas patologías que generan un mal funcionamiento celular como son el cáncer, desórdenes

neurodegenerativos, enfermedades autoinmunes, etc. (Cruz-Martín-del-Campo et al., 2020).

En un principio las clasificaciones de muerte celular se realizaron con base en los cambios morfológicos, sin embargo, en el 2018 la NCCD (Nomenclature Committee on Cell Death por sus siglas en inglés) las clasificó con base en los procesos moleculares involucrados, en muerte celular programada o no programada.

1.3.1 Autofagia

La autofagia es un mecanismo lento pero fundamental en la adaptación al estrés, la supervivencia y la homeostasis celular. Este tipo de muerte conlleva una degradación intracelular de diversos desechos (toxinas, moléculas, patógenos y organelos dañados) invaginados en vesículas de doble membrana tras su fusión con los lisosomas (Maciel-Herrerías & Cabrera-Benítez, 2016). En este proceso de reciclado, los desechos (aminoácidos y moléculas pequeñas) son devueltos al citoplasma donde serán usados como sustratos, dando inicio a la síntesis de proteínas nuevas, biomoléculas o la producción de energía. Lo anterior constituye una fuente alternativa de energía en situaciones de estrés (Costas & Rubio, 2017; Maciel-Herrerías & Cabrera-Benítez, 2016). Sin embargo, bajo condiciones altamente estresantes (hipoxia o falta de nutrientes), el proceso puede dispararse de forma alarmante, generando una depleción de moléculas y organelos esenciales que culminan en una muerte celular autofágica (Costas & Rubio, 2017; Maciel-Herrerías & Cabrera-Benítez, 2016). Aunque no está del todo claro, se sugiere que existe una relación entre la autofagia y la apoptosis. Esto debido a la similitud de la autofagia con la vía mitocondrial de la apoptosis, dado por la expresión de diversos genes (DRAM1, ISG20L1, DAPK-1, BAX y PUMA). Dichos genes se encuentran regulados por el gen p53, por lo que también se considera un mecanismo molecular importante que retarda o promueve la apoptosis de las células tumorales (Palacios Alaiz et al., 2011).

1.3.2 Necrosis

La necrosis es una forma de muerte celular que resulta de un proceso pasivo, accidental o no programado. Este tipo de muerte ocurre cuando factores externos superan las

condiciones fisiológicas de un tejido y someten a la célula a un estrés (isquemia, temperaturas extremas, traumatismos mecánicos, etc.) excesivo e incontrolable, lo que altera definitivamente su función (Agudelo & López, 2010; Cruz-Martín-del-Campo et al., 2020b). La diferencia de este proceso que la hace resaltar de entre los otros (ver tabla 2) es que no solo afecta a una célula en particular, sino afecta a varias células contiguas dentro de un área tisular (Agudelo & López, 2010; Pérez Machado & Lie Concepción, 2006).

En la necrosis la membrana celular no se destruye lo que impide el escape al espacio extracelular de su contenido resultando un proceso "silencioso" sin inflamación (Palacios Alaiz et al., 2011). Desde el punto de vista morfológico, dentro de la célula inicia un proceso de desnaturalización de proteínas y de la digestión enzimática autolítica o heterolítica (Agudelo & López, 2010). A nivel nuclear la cromatina se condensa agrupada en varios sectores formando cuerpos apoptóticos. La membrana celular se recoge sobre las eminencias globuliformes que forman los elementos deteriorados del citoplasma y núcleo. Finalmente, fagocitos captan la célula en su totalidad impidiendo que se produzca alarma en el resto del tejido (Agudelo & López, 2010).

Tabla 2. Características morfológicas diferenciales entre apoptosis y necrosis.

Características	Apoptosis	Necrosis
Tamaño celular	Disminuido	Incrementado
Desprendimiento celular	Temprano, en células individuales	Tardío, en grupos celulares
Permeabilidad de la membrana citoplasmática	Normal	Alterada
“Burbujeo” de membrana	Precoz	Ausente
Morfología mitocondrial	Normal	Hinchada
Cromatina celular	Condensada y fragmentada	Sin condensación
Formación de “cuerpos apoptóticos”	Condensada y fragmentada	Sin condensación
Final celular	Fagocitosis	Lisis

Apariencia en secciones tisulares	Células individuales y afectación asincrónica	Grupos celulares y afectación sincrónica
Repercusión en tejidos circundantes	Escasa	Importante, con fenómenos inflamatorios asociados

Fuente: Agudelo & López (2010)

1.3.3 Apoptosis

La apoptosis es el mecanismo de muerte más común, así como también la más estudiada, y es conocida como muerte celular programada. Este tipo de muerte juega un papel crucial para la homeostasis morfogénica de todo individuo (Cruz-Martín-del-Campo et al., 2020b). Lo anterior debido a que está implicada en la estructuración de los tejidos durante la embriogénesis y el desarrollo del sistema inmunológico lo que permite eliminar células invadidas por patógenos, células inmunitarias malignas y autoagresivas, etc. (Castillo Ferrer et al., 2021; Kashyap et al., 2021).

La existencia de defectos durante la apoptosis conlleva a la aparición de distintas enfermedades como es el caso del cáncer, enfermedades neurodegenerativas, enfermedades autoinmunes, entre otras (Cruz-Martín-del-Campo et al., 2020b).

Este tipo de muerte se caracteriza por una serie de cambios morfológicos y bioquímicos, así como con la activación de diversas caspasas (Zamora S et al., 2005). Las caspasas son mediadores moleculares clave de la apoptosis que se pueden activar a través de dos vías distintas pero interconectadas: la extrínseca y la intrínseca (figura 6) (Castillo Ferrer et al., 2021). En la apoptosis se observa una fragmentación del ADN cromosómico, condensación de la cromatina, acidificación del citoplasma y ruptura del núcleo (Cruz-Martín-del-Campo et al., 2020).

En este tipo de muerte la integridad de la membrana plasmática se mantiene intacta, hasta el final de la apoptosis donde la célula se encoge y se rompen en pequeños fragmentos conocidos como cuerpos apoptóticos. La función de dichos cuerpos es contener el material celular y evitar que éstos actúen como desencadenante de la muerte de otras

células (Castillo Ferrer et al., 2021; Cruz-Martín-del-Campo et al., 2020b; García & Vecino, 2003). Posteriormente, estos cuerpos se eliminan mediante fagocitosis, la cual, a diferencia de la necrosis no genera una respuesta inflamatoria por parte del individuo (Castillo Ferrer et al., 2021; Cruz-Martín-del-Campo et al., 2020b; Elmore, 2007).

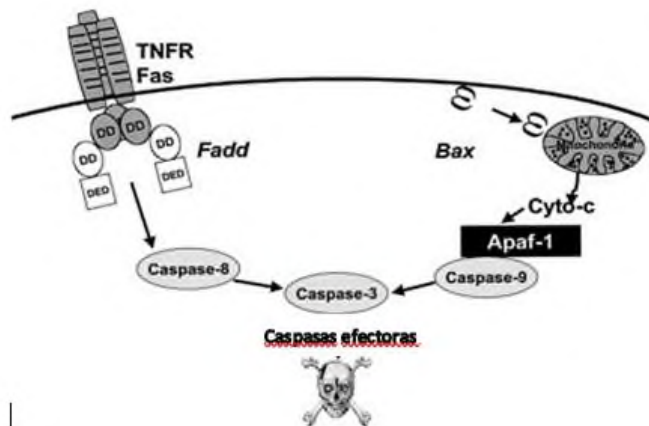


Figura 3. - Representación simplificada de las vías para la activación de apoptosis mediada por caspasas. La vía extrínseca (lado izquierdo) puede ser inducida por miembros de la familia TNF (TNFR y Fas). Estas proteínas reclutan proteínas adaptadoras a sus DD (dominios de muerte), como Fadd, que luego se une a procaspasas que contienen DED (dominios efectoros de muerte) y que activa a la caspasa-8. La vía intrínseca (lado derecho) se ve inducida por diversos estímulos que conllevan a la formación de un complejo llamado (citocromo c, Apaf-1, caspasa-9). La activación de una u otra vía culminan en la activación de la caspasa efectora (caspasa-3). Otras caspasas (no mostradas) también pueden participar en estas vías (modificado de (Reed, 2000).

La vía extrínseca (Figura 7), también conocida como vía de receptores de muerte (Ke et al., 2022), se caracteriza por la presencia de polipéptidos transmembranales, que funcionan como receptores. Los cuales pertenecen a la familia de factor de necrosis tumoral (TNF), y a los dominios asociados a muerte (FADD/MORT₁ y Fas/Apo1 /CD95) (Castillo Ferrer et al., 2021). Estos inician la señalización de la apoptosis al activar a los zimógenos (proteínas precursoras o forma inactiva de las caspasas) de la caspasa-8, también conocidos como procaspasa-8 (Ashkenazi & Dixit, 1998; Castillo Ferrer et al., 2021). Una vez activa, la caspasa-8 realiza una cascada de caspasas que culmina con la muerte celular (García & Vecino, 2003).

Además, la caspasa-8 puede activar a la proteína Bid (miembro pro-apoptótico de la familia Bcl-2) que se encuentra en el citosol. Esta activación le permite a Bid translocarse a la mitocondria, donde altera la membrana y libera el citocromo c al citosol e induce la

apoptosis por la vía intrínseca (Carneiro & El-Deiry, 2020; García & Vecino, 2003; Reed, 2000).

La vía intrínseca (Figura 7) involucra la participación de las mitocondrias, por lo que también se conoce como vía mitocondrial (Ke et al., 2022). Esta vía se activa por estrés u otras señales que de forma general permeabilizan la membrana externa mitocondrial (MOMP). Lo anterior provoca la salida de citocromo c, el cual, en condiciones normales de supervivencia celular, se localiza en el espacio intermembranal de la mitocondria (García & Vecino, 2003). Una vez fuera de la mitocondria, el citocromo c se une al factor activador de la proteasa apoptótica 1 (Apaf-1), posteriormente este complejo se une y activa al zimógeno de caspasa-9. Esta unión se conoce como apoptosoma, el cual genera una cascada de activación de caspasas que culmina con la muerte celular llevada a cabo por las caspasas efectoras 3 y 7 (García & Vecino, 2003; Shakeri et al., 2021).

Además de las caspasas, la vía intrínseca está regulada por proteínas de la familia Bcl-2 que son clave para la supervivencia de una célula (NIH,2023). Dentro de esta ruta, se encuentran genes que codifican a proteínas de la familia Bcl-2 que se encuentran regulados por el gen p53 que promueven o retardan el proceso de muerte celular por apoptosis. Estas proteínas se clasifican en dos grupos, las pro-apoptóticas (Bax, Bak, Bok, Bad, Bid, Bik, Bim, BMF, HRK, Noxa, y PUMA) y las anti-apoptóticas o pro-supervivencia (Bcl-2, Bcl-xl, BclW, Mcl-1, y BFL-1/A1). Las pro-apoptóticas, como Bax y Bak, se someten a una homodimerización y oligomerización en la membrana mitocondrial externa, lo que conduce a la liberación de citocromo c al citoplasma (Carneiro & El-Deiry, 2020; Kashyap et al., 2021; Palacios Alaiz et al., 2011). Las anti-apoptóticas, como Bcl-2 y Bcl-xl, se encuentran presentes en la membrana externa mitocondrial suprimiendo el proceso de la apoptosis al bloquear o inhibir la unión de las proteínas pro-apoptóticas a la membrana externa mitocondrial (Carneiro & El-Deiry, 2020). Este bloqueo impide su permeabilización y, por ende, la liberación de citocromo c. Otras proteínas también cumplen la función de impedir la formación del apoptosoma, al interaccionar con Apaf-1, como es el caso de Bcl-xl (Carneiro & El-Deiry, 2020; Kashyap et al., 2021).

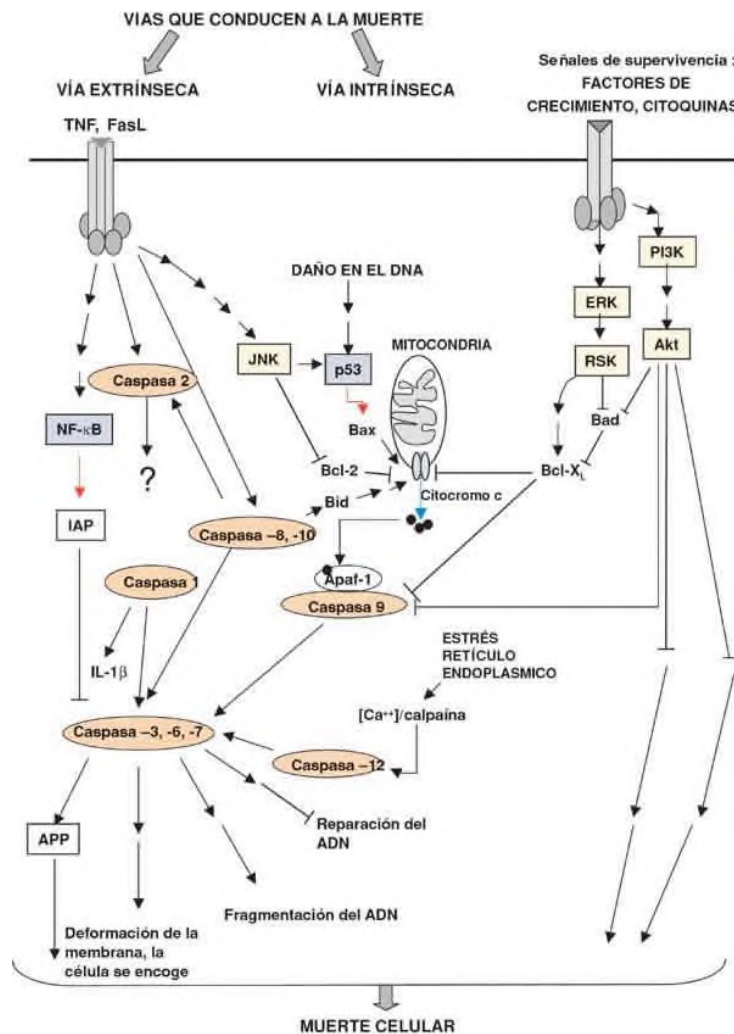


Figura 4. - Principales vías (intrínseca y extrínseca) de señalización que conducen a la apoptosis de las células. Flechas sencillas muestran acciones directas, flechas dobles muestran un efecto en varios pasos. Flechas acabadas en punta: efecto activador, terminadas con una línea: efecto inhibitorio. La flecha azul indica translocación y la roja estimulación de la transcripción (García & Vecino, 2003).

1.4 Metodologías de pruebas genéticas y tipo de muerte celular

Dada la relevancia e interés en las pruebas genéticas en los últimos años, estas han aumentado considerablemente, por lo que también han aumentado las metodologías para obtener resultados más certeros (Genetic Alliance, 2009).

El tipo de prueba genética depende de la anomalía que se esté evaluando. Existen tres tipos de estas pruebas: las citogenéticas para detectar anomalías en la estructura de los cromosomas; las bioquímicas para el funcionamiento de las proteínas; y las moleculares para la secuencia del ADN (Genetic Alliance, 2009). Una prueba molecular se basa en el análisis directo del ADN y se realiza cuando se conoce la secuencia del gen de interés,

siendo la más conocida la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) (Genetic Alliance, 2009). Esta nos permite realizar una prueba de ADN en cualquier muestra de tejido, incluso con muestras muy pequeñas. Además, ofrece la posibilidad de llevarla a cabo con fines cualitativos (PCR convencional) o cuantitativos (qRT-PCR) (Genetic Alliance, 2009). La diferencia entre ambas PCR es que en la cualitativa se determina si hay o no expresión del gen de interés, mientras que la cuantitativa determina cuánto hay de cada gen estudiado (Vinuela, 2009).

Además del análisis de expresión génica por PCR, existen otras metodologías para detectar y evaluar al ADN. Una de estas metodologías es la fragmentación del ADN nuclear, lo que es un indicador de apoptosis (Paparella et al., 2017; Saucedo-de la Lata et al., 2017). La fragmentación de DNA se determina mediante la electroforesis en agarosa, que es la más accesible; por citometría de flujo, que permite medir simultáneamente dos tipos de muerte celular, necrosis y apoptosis; por la técnica de TUNEL (marcaje de extremos de corte dUTP mediado por desoxinucleotidil transferasa terminal) y por ISEL (marcaje de extremos *in situ*, por sus siglas en inglés) (Ning et al., 2002; Cummings & Schnellmann, 2021).

2. ANTECEDENTES

Dentro del vasto espectro de organismos microbianos, *B. thuringiensis* surge como un agente fascinante, no solo por su capacidad para controlar plagas agrícolas, sino también por la producción de parasporinas y su aplicación terapéutica.

Desde el descubrimiento de las parasporinas se han explorado estas proteínas en el campo oncológico, en donde las investigaciones han despertado tanto interrogantes como las expectativas de muchos investigadores como lo han sido:

- Mizuki et al. (2000), mostraron que la parasporina (Cry31Aa1) obtenida de la cepa *B. thuringiensis* 84-HS-1-11, al ser aplicadas en células T leucémicas humanas (MOLT-4) y células cancerosas del cuello uterino humano (HeLa) presentan una fuerte actividad citotóxica en estas líneas celulares, pero no contra las células T normales.
- Akiba et al., (2009), demostraron que la parasporina-2 de la cepa A1547 de *B. thuringiensis* tiene una fuerte actividad citotóxica contra las células MOLT-4, HepG2 y CACO-2, Jurkat y HL-60; pero no contra las células normales de cada línea.
- En el 2014, Cruz-Nolasco realizó la búsqueda, aislamiento y purificación de diversas cepas (AC, AX, A13, A24, A34 y A35) de *B. thuringiensis* dentro de los suelos de la región del Papaloapan. Más tarde, en el 2017 Cruz-Nolasco demostró que las cepas AX-2 y A34-2 fueron las que mostraron mayor actividad antiproliferativa contra la línea celular MCF-7.
- En el 2020, Castrejón-Arroyo realizó la evaluación del efecto antiproliferativo mediante metabolismo oxidativo de las parasporinas procedentes de las cepas A13-2, A13-5 y A24-6 de *B. thuringiensis* sobre la línea celular MCF-7. Mediante el metabolismo oxidativo demostraron que A13-2 presenta una mayor actividad de las especies reactivas de oxígeno (EROs), por ende, causando daño a nivel del ADN y la liberación de la doble cadena de ADN en líneas MCF-7. Además, demostró que dichas parasporinas no generan muerte por estrés oxidativo, ni daño genotóxico sobre las células mononucleadas de sangre periférica (CMSP). Lo anterior comprueba la ventaja de las PS de ser selectivas y presentar seguridad farmacológica para su utilización.

Por otro lado, diversos autores han publicado sus metodologías para medir la expresión de genes involucrados en la vía intrínseca y extrínseca de la apoptosis:

- Valdés-Cañedo (2003), evaluó la expresión de genes Bcl-2, en el epitelio tubular renal de rata en respuesta a isquemia-reperfusión por medio de RT-PCR. Los primers o cebadores que usó fueron específicos para Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-xS, Bax y para GAPDH (utilizada como referencia basal).
- Alimba et al., (2022), realizaron una evaluación de los lixiviados del suelo de Nigeria e India y como estos inducen daños en el ADN y alteraciones en genes asociados con la apoptosis en células Jurkat (linfocitos T), utilizando diversos primers como CASP2, AIFM2, BID, BAD, CASP6, p53, FADD, API5 y Beta actina.
- Azizi et al., (2021), realizaron nanoestructuras de polímeros de oro como nanoportadores de fármacos en la terapia contra cáncer de mama, para ello emplearon diversos primers que codifican genes con el propósito de usarlos en RT-qPCR, como lo fueron caspasas 3, 6, 7, 8, 9, 10, y 12, Bax, Bcl-2 y GAPDH.
- Kim et al., (2008), realizaron la medición de la expresión de los genes Bcl-2 y p53 en la línea celular MCF-7. Los primers que utilizaron para la RT-PCR fueron específicos para amplificar Bcl-2, p53 y GAPDH.
- Chubicka et al., (2018), demostraron que la parasporina KAU-41 al estar en contacto con células HeLa aumentan la transcripción de los genes de caspasa 3 y 9 utilizando la técnica de RT-qPCR.
- Okumura et al., (2011), demostraron que las células MOLT-4 tratadas con la parasporina-4 presentan síntesis de las caspasas efectoras 3 y 7.
- Brasseur et al., (2015), demostraron la síntesis de las caspasas 3 y 7 en las células PC-3, HepG2, HIESC y MCF-7 tratadas con la parasporina-2.

Aunque hay avances en la investigación de las parasporinas, su aplicación médica sigue en la etapa inicial. Por eso, este estudio busca entender cómo las parasporinas afectan la expresión de genes asociados a la apoptosis, especialmente en la línea celular MCF-7.

3. JUSTIFICACIÓN

En el mundo, el cáncer es una enfermedad que presenta altos índices de mortalidad, existiendo más de 100 tipos, de los cuales el cáncer de mama ocupa uno de los primeros lugares tanto en nuestro país como en el mundo. A pesar de que esta enfermedad se trata en diversas etapas, ya sea por cirugía, quimioterapia, radioterapia, etc., su porcentaje de éxito disminuye cuando más avanzada se encuentre la enfermedad. Mas aún, los tratamientos al no ser selectivos, generan desagradables efectos secundarios, como el daño en el ADN de las células normales, lo que ocasiona que estas adquieran la capacidad de generar células cancerosas y afectar así, aún más el sistema inmunológico, lo que disminuye drásticamente la calidad de vida de los pacientes afectados.

Debido a esto, es crucial buscar nuevos métodos que resuelvan esta problemática, afortunadamente la biotecnología ofrece una alternativa a través de diversos microorganismos, como es el caso de *B. thuringiensis*, la cual ha demostrado poseer una actividad anticancerígena. Esto se debe, a la producción de cristales proteicos durante su etapa de esporulación, los cuales son llamados parasporinas.

La región del Papaloapan es considerada una gran bóveda de recursos que poseen un gran potencial biotecnológico. El equipo de trabajo ha logrado aislar e identificar distintas cepas de *B. thuringiensis* dentro de la región. Algunas proteínas de estas cepas han sido probadas contra distintas líneas celulares de cáncer de mama, presentando actividad citotóxica selectiva contra las células cancerígenas, lo cual representa una nueva alternativa en el campo terapéutico contra el cáncer. En ellas se encontró que la proteína A34-2 es una parasporina que reduce el porcentaje de viabilidad de las células MCF-7 de cáncer de mama, pero se desconoce el tipo de muerte que genera. Por esta razón, en el presente proyecto se plantea estudiar el tipo de muerte que genera la parasporina A34-2 como primer paso para entender el mecanismo de acción de dichas proteínas dentro de las células cancerígenas.

4. HIPÓTESIS

La parasporina A34-2 producida por *Bacillus thuringiensis* inducirá la apoptosis por la vía intrínseca en la línea celular de cáncer de mama MCF-7.

5. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

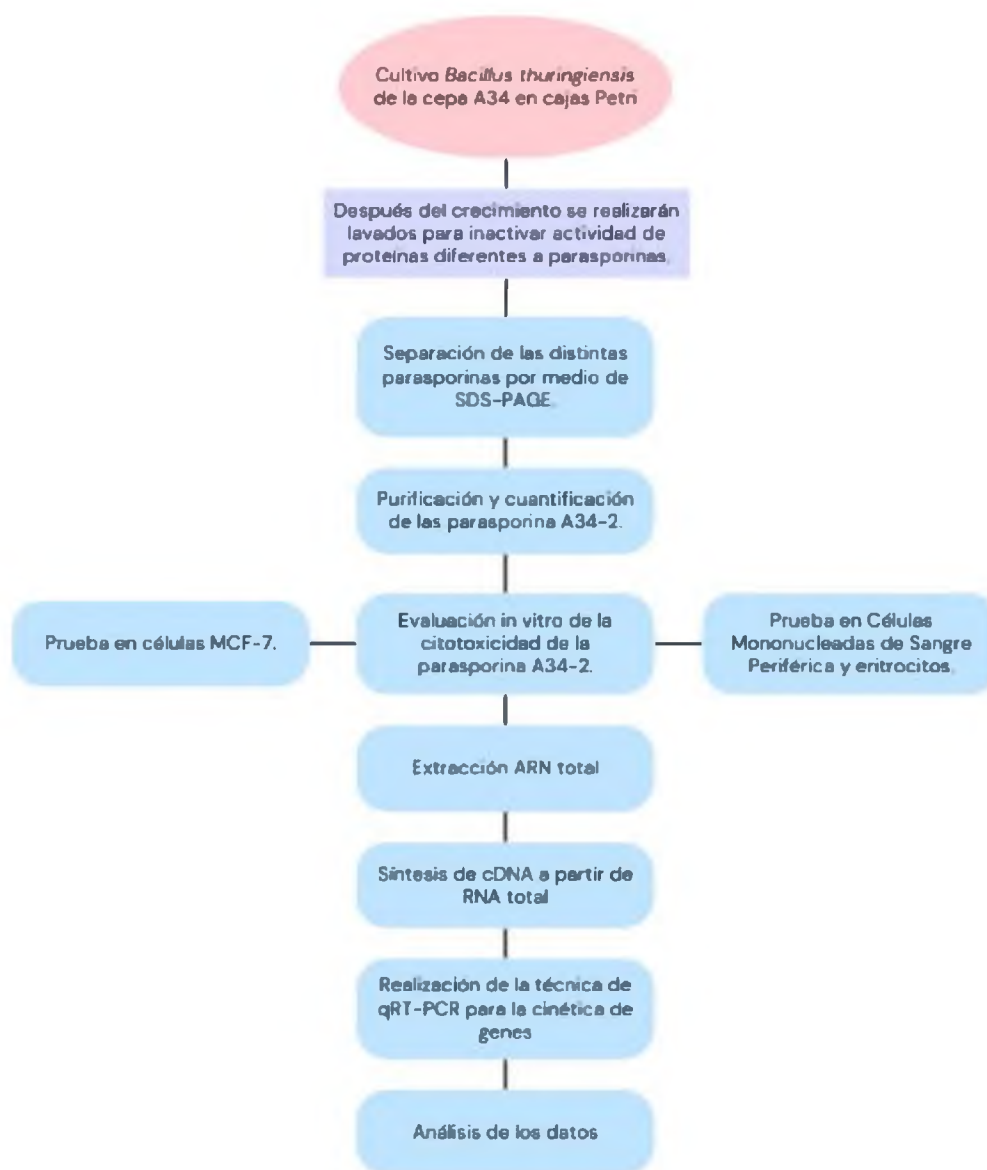
Determinar el tipo de vía de la apoptosis que se activa con el tratamiento de la parasporina A34-2 sobre células de cáncer de mama MCF-7

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Verificar el efecto citotóxico y hemolítico sobre células sanas de la parasporina A34-2.
- Estandarizar las condiciones de la qPCR para evaluar la expresión de las caspasas 3, 6, y 9, Bcl-2 y p53 en células MCF-7.
- Determinar la expresión de las caspasas 3, 6, y 9, Bcl-2 y p53, en células MCF-7, tratadas y no tratadas con las parasporinas A34-2.

6. DIAGRAMA EXPERIMENTAL

DIAGRAMA EXPERIMENTAL



7. MATERIALES Y MÉTODOS

Nuestro trabajo se desarrolló dentro de los laboratorios de biorreactores y de cultivo de células animales dentro de la Universidad del Papaloapan Campus Tuxtepec (UNPA). La parasporina (PS) A34-2 fue probada en células de cáncer de mama (MCF-7).

7.1 Microorganismos

Se utilizó la cepa *Bacillus thuringiensis* A34 de la colección de cepas aisladas previamente por el grupo de trabajo. La cepa está conservada en discos de esporas de papel filtro con dimensiones aproximadas de 6 mm.

7.2 Producción de la parasporina

Se utilizó agar nutritivo para el cultivo bacteriano, para su preparación se siguieron las indicaciones del proveedor MCD LAB (23 g/L) y se ajustó el pH a 7.4 con una solución de NaOH a 1 M. Previo a la inoculación con la cepa A34 de *Bacillus thuringiensis*, el medio se esterilizó a 15 psi y 121 °C por 15 min. Posteriormente, para dar inicio a la fermentación, se frotó un disco de papel filtro con esporas en cajas Petri con agar nutritivo para esparcir las esporas sobre el área y las cajas se incubaron a 30 °C.

El periodo óptimo de cultivo se determinó con base en el porcentaje de esporulación, realizando frotis cada 24 h. Los frotis fueron teñidos con la tinción de Gram y se observaron en el microscopio de contraste de fase a 100X (DIGITAL motic, modelo leica DM3000). Cuando la esporulación alcanzó el 90 % se dio por finalizada la fermentación. Se estableció 5 días en cultivo sólido de agar nutritivo.

7.3 Purificación y cuantificación de la parasporina

Para la recuperación de las proteínas del agar nutritivo se vertió agua destilada estéril sobre el agar y se raspó la superficie con un asa bacteriológica estéril, con el propósito de resuspender en el agua el crecimiento resultado de la fermentación.

Posteriormente, se recuperó la solución de esporas de las cajas y se lavaron por centrifugación con una solución isotónica de NaCl al 0.85 % (p/v) y con agua acidificada a un pH de 2 en una centrífuga ThermoFisher Scientific Heraeus Megafuge 16R. Entre cada fase de lavado se realizó un enjuague con agua destilada como se indica en la tabla 3. Por último, se resuspendió la pastilla en ~5 mL de agua destilada y se conservó en refrigeración a 5°C hasta su desnaturalización.

Tabla 3.- Serie de lavados para la purificación de las parasporinas.

Orden	Solución	Condiciones
1	Agua destilada	Se aforó a 5 mL y se centrifugó a 5500 rpm por 20 min a 5 °C.
2	Solución isotónica	
3	Solución isotónica	
4	Agua destilada	
5	Solución acidificada	
6	Solución acidificada	
7	Agua destilada	

La desnaturalización de las proteínas se realizó en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS), con el método descrito por Laemmli en 1970. Posteriormente se separaron las proteínas con la técnica de SDS-PAGE en geles al 10%, y se corrió en buffer de Tris-Glicina a 100 V por alrededor de 1.5 h en una cámara de electroforesis modelo Mini-PROTEAN Tetra Vertical Electrophoresis Cell de Bio-Rad. Se añadieron 15 µL de muestra por pozo y 3 µL de marcador de peso molecular (NZYColour Protein Maker II). Terminado el proceso de electroforesis, realizamos el proceso de tñido y desteñido de geles como se establece en la tabla 4. Entre cada fase se enjuagó con agua destilada por al menos 5 min y entre cada fase se mantuvo en agitación constante.

Tabla 4.- Soluciones para el proceso de tñido y desteñido de los geles.

Solución	Tiempo de agitación (min)
Ácido Tricloro acético (12.5% P/V)	30
Metanol/ Ác. Acético/ Agua/ Azul de Coomassie G250 (40%, 7%, 53%,1% P/V)	60
Etanol (50%)	30
Etanol/Ác. Acético/Agua (30%,10%, 60%)	30
Metanol/Ác. Acético/Agua (25%,10%, 65%)	120

Una vez concluido todo este proceso, se seleccionó la banda de interés (55 kDa), se procedió a cortarlas en los bordes y se conservaron en agua destilada estéril. Posteriormente, se extrajo la proteína de la matriz polimérica por medio de la técnica de electroelución.

La electroelución se corrió en buffer de Tris-Glicina a 10 A por alrededor de 4 h en un elutor modelo Model 422 electro-eluter de Bio-Rad. Pasado ese tiempo, la muestra eluída se sometió a purificación por diálisis con una membrana Spectra/Por Membrane MWCO: 6000-8000 Da en buffer de PBS por 24 h, cambiándolo cada 2 h con buffer nuevo y frío. Este paso de purificación se realiza con el propósito de retirar la mayor cantidad del SDS de las muestras eluídas debido a que dicha sustancia es tóxica para las células.

Para la cuantificación de la proteína se preparó una serie de estándares con albúmina de suero bovino (BSA) a distintas concentraciones desde 0 a 20 $\mu\text{g/mL}$. La muestra dializada de la parasporina A34-2 se diluyó 1:10, 1:20 y 1:100. La cuantificación de la proteína dializada se realizó en una placa de 96 pozos con el método de Bradford (1976). Para lo cual se depositaron 150 μL /pozo de cada una de las distintas concentraciones de BSA, así como de cada una de las diluciones de A34-2 por separado y se agregaron 150 μL de reactivo de Bradford en cada pozo. Se incubó por 15 min en oscuridad y a temperatura ambiente. Posteriormente, se cuantificó en un lector de microplacas Mark Microplate Reader, Bio-Rad® a una longitud de onda de 595 nm.

7.4 Manejo de la línea celular de cáncer de mama MCF-7

La línea celular MCF-7 se caracteriza por su capacidad de proliferación y adherencia, además son células de naturaleza poligonal que se encuentran en estrecho contacto entre sí y tienen la capacidad de formar colonias. Las células MCF-7 fueron aisladas de un derrame pleural de una paciente caucásica de 69 años con adenocarcinoma metastásico de mama en 1973 por la Fundación del Cáncer en Michigan, figura 8. Estas células expresan el oncogén WNT7B, además, tiene receptores de estrógenos y progesterona por lo que responden a terapias hormonales (www.atcc.org).

ATCC Number: **HTB-22**
Designation: **MCF-7**

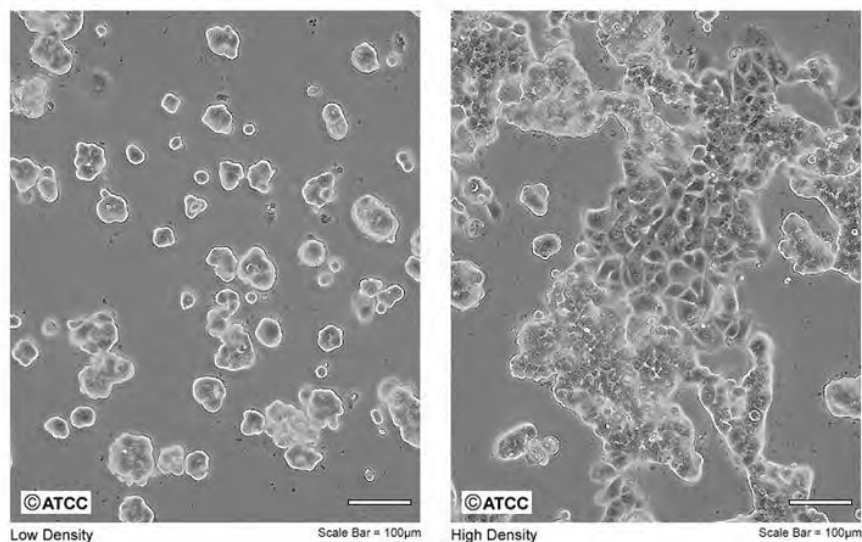


Figura 5. - Línea celular MCF-7 utilizadas en los bioensayos de actividad antiproliferativa y hemólisis. Imágenes tomadas de www.atcc.org.

La línea celular MCF-7 se descongeló para su expansión. Para lo cual, el vial que contenía a las células en medio con crioprotector fue centrifugado a 1200 rpm por 10 min a temperatura ambiente. Concluida la centrifugación, el medio de crioprotector fue eliminado por decantación para posteriormente resuspenderlas en 5 mL de medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, por sus siglas en inglés) suplementado (10 % suero fetal bovino, 1 % de antibiótico penicilina/ estreptomycin, P/S). Posteriormente, se centrifugó a 1300 rpm por 3 minutos y se retiró el sobrenadante por decantación. El pellet obtenido se resuspendió en 3 mL de medio RPMI suplementado y se agregó a una caja de cultivo celular con 5 mL del medio suplementado, se incubó a 37 °C, 95 % de humedad y 5 % CO₂. Se monitoreó el cultivo en un microscopio trinocular invertido AE31E, MOTIC a 4X por 24 h para evaluar la adherencia, proliferación, morfología celular, y también para corroborar que el cultivo estuviese libre de contaminación y/o muerte celular para asegurar el éxito de los subcultivos posteriores.

Para los subcultivos, primero se les retiró el medio con las células muertas y se realizaron dos lavados con 3 mL de PBS por cada uno. Se removió el PBS de la caja de cultivo y se agregó 1 mL de tripsina para disgregar y resuspender a las células, se dejó incubar por 1 o 2 minutos a 37 °C al 5% CO₂.

Pasado este tiempo se verificó al microscopio que la tripsina haya cumplido su función (despegar a las células de la caja de cultivo y evitar que las células formen aglomerados), después se detuvo la actividad de la tripsina con 3 mL de medio de cultivo suplementado con SFB y se transfirió a un tubo Falcon de 15 mL. Posteriormente, se centrifugó a 1200 rpm por 5 minutos a 20 °C, se eliminó el sobrenadante y el pellet obtenido se resuspendió en 1 mL de medio suplementado.

El conteo de células viables se realizó en cámara de Neubauer con una dilución 1:20 (50 µL de células y 950 µL de medio) para calcular el volumen y número de células para los bioensayos.

7.5 Evaluación de la parasporina A34-2 en las líneas celulares

7.5.1 Ensayo biológico de la proteína A34-2 en células tumorales

Para la evaluación citotóxica de las parasporinas libres contra la línea celular cancerígena se utilizó el método MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) (Mosmann, 1983), el cuál evalúa la viabilidad celular. Para realizarlo, primero se cultivaron 90 µL de 2×10^4 de células/pozo en medio RPMI y se incubó en una atmósfera de 5 % de CO₂ por 24 h a 37 °C en una incubadora marca BIOBASE, modelo BJPX-C80. Después de la incubación, se agregaron a cada pozo distintas concentraciones de las proteínas purificadas en 10 µL (para tener una concentración final de 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 y 21 µg en los 100 µL de volumen final del pozo) y se incubó por 24 h a 37 °C al 5 % de CO₂. Pasado este tiempo, se añadieron 10 µL de MTT (concentración final de 5 mg/mL) a cada pozo y se incubaron nuevamente al 5 % de CO₂ por 4 h a 37 °C. Al término de esta incubación, se retiró el sobrenadante y se agregaron 100 µL DMSO (dimetilsulfóxido). Se tomó una lectura de absorción a 595 nm en un lector de placas iMark™ Microplate Absorbance Reader. Se realizó una regresión lineal de absorbancia contra concentración celular para obtener la curva estándar que se utilizó para calcular LC₅₀ de la parasporina A34-2. Se utilizó doxorrubicina y células MCF-7 sin tratamiento como control positivo y control negativo, respectivamente.

7.5.2 Ensayo biológico de la proteína A34-2 en células no tumorales

Para garantizar la no citotoxicidad de las parasporinas en células de origen no canceroso, se realizaron dos ensayos, uno en células mononucleadas de sangre periférica (CMSP) y otro en eritrocitos para, además, determinar la actividad hemolítica. Las células se obtuvieron de voluntarios sanos, con previo conocimiento y consentimiento de las pruebas a realizar dentro del laboratorio de cultivo de células animales del centro de investigaciones científicas (CIC) de la Universidad del Papaloapan.

Para la extracción de las CMSP, se tomó muestra de un donante mediante punción venosa utilizando tubos con heparina (Tubos BD Vacutainer®). Para la separación de los componentes celulares de la sangre se utilizó el protocolo modificado de (Pongsavee, 2009). En un tubo Falcon de 15 mL se agregaron 5 mL de Lymphosep y 5 mL de sangre por las paredes del tubo cuidando no mezclar los dos componentes y se centrifugó a 1500 rpm por 30 minutos. Se apreciaron las diferentes fases y se recuperaron las células mononucleares por medio de una pipeta Pasteur. Se agregaron 10 mL de PBS 1X para el lavado y se centrifugó a 700 rpm por 10 minutos. Se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en medio RPMI suplementado (FBS 10 % y P/S 1 %). Se realizó el conteo celular en cámara de Neubauer en una dilución 1:20 para realizar los cálculos de volumen necesario para una concentración de 5×10^4 células por cada pozo.

Para el cultivo celular de las CMSP se utilizó una microplaca de 96 pozos en el que se sembraron 5×10^4 células en un volumen final de 100 μ L por cada pozo y por triplicado. Se aplicó la LC_{50} de la proteína A34-2 (15.04 μ g/mL), como control negativo se utilizaron solo células con medio suplementado y dos como control positivo, doxorubicina 4 μ M (2.17 g/L) y SDS al 2 % (20 g/L). Después de aplicar los respectivos tratamientos, se dejó incubando por 24 horas a 37 °C y 5 % de CO_2 . Posteriormente, a cada pozo se le agregaron 10 μ L de MTT a 5 mg/mL disuelto en PBS y se incubó por 4 h a 37 °C y 5 % de CO_2 . Pasado este tiempo se solubilizaron los cristales de formazán con 100 μ L de DMSO y se leyó la absorbancia en un lector de microplacas Mark Microplate Reader, Bio-Rad® a una longitud de onda de 595 nm.

La extracción de eritrocitos se realizó de igual forma a la extracción de monocitos (CMPS). Se utilizó el protocolo modificado de Evans et al., (2013) para extraer 5 mL de sangre.

Se centrifugó a 1700 rpm durante 5 minutos en tubo Falcon marcando los niveles de eritrocitos (rojo, capa inferior) y plasma (amarillento, capa superior). Para el lavado, se aspiró y desecho el plasma en el contenedor de residuos biológico infecciosos. Posteriormente se sustituyó el volumen de plasma retirado con NaCl a 150 mM, se mezcló por inversión y se centrifugó a 1700 rpm por 5 minutos. Repetimos los lavados dos veces más, se aspiró el sobrenadante y se reemplazó por PBS pH 7.4, se invirtió el tubo para mezclar y se centrifugó a 1700 rpm por 5 minutos. Por último, se desechó el sobrenadante y se agregó 12 mL de PBS por cada 3 mL de eritrocitos en suspensión. Se realizó el cálculo para agregar 15 µg/mL de la proteína A34-2 para un volumen final de 200 µL (eritrocitos más parasporina) en tubos eppendorf. Como control negativo se utilizaron eritrocitos más PBS y como control positivo se usó SDS al 2 %. Después de aplicar los respectivos tratamientos, se dejó incubando por 1 h a 37 °C y 5 % de CO₂. Pasado el tiempo, se centrifugaron los tubos eppendorf a 1700 rpm por 5 minutos y cuidando de no romper el sedimento celular se tomaron 100 µL del sobrenadante de cada tubo para agregar en una microplaca y medir la absorbancia a 590 nm. Los cálculos de % de hemólisis se realizaron con la siguiente formula. % de hemólisis = (absorbancia de la muestra con proteínas/ absorbancia de la muestra con SDS al 2%).

7.6 Extracción del ARN total

Para la extracción ARN total se utilizó el reactivo NZYol de acuerdo a las especificaciones del proveedor Nzytech (MB18501). Para la lisis celular, a cada muestra se le agregaron 300 µL de NZyol, se homogenizó y se dejó reposar por 5 min a temperatura ambiente. A la mezcla se le añadieron 200 µL de cloroformo frío y se dejó incubando por 15 min a 25 °C. Inmediatamente se centrifugó a 12000 rpm por 15 min a 4 °C para lograr la separación por fases. Se recuperó la fase acuosa (fase traslúcida) y se le agregaron por goteo 500 µL de isopropanol grado molecular frío, se mezcló suavemente y se incubó a 0 °C durante 10 min en una nevera con hielo. A continuación, se centrifugó nuevamente a 12000 rpm por 15 min a 4 °C. Consecutivamente, se eliminó el sobrenadante, a la pastilla resultante se le hicieron dos lavados con 500 µL de etanol grado molecular al 70 % (centrifugando a 12000 rpm, 15 min a 4°C). La pastilla de RNA obtenida se resuspendió con 30 µL de agua libre de

RNAsas. La integridad del material genético se verificó mediante geles de agarosa al 2 %. El ARN se almacenó a -70 °C hasta su uso posterior.

7.7 Síntesis de cDNA

La retrotranscripción del ARN total a cDNA se llevó de acuerdo con las especificaciones del kit NZY Reverse Transcriptase. Se tomaron 7 µL de la suspensión de RNA total y se añadieron los demás reactivos (hexameros aleatorios, dNTP's, buffer de reacción, inhibidor de la ribonucleasa, retrotranscriptasa y agua) como lo indicó el proveedor. Cada muestra se incubó primero a 25 °C durante 10 min, seguido de 50 °C por 45 min. Para finalizar, se inactivó la acción de la retrotranscriptasa incrementando la temperatura a 85 °C durante 5 min. Las muestras se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

7.8 Determinación de la expresión de los genes por qRT-PCR

Para la medición de los niveles de expresión de genes asociados con los mecanismos de muerte por apoptosis, empleamos la técnica de qRT-PCR, se utilizaron primers de cada uno de los genes a evaluar (caspasa 3, 6, 9, Bcl-2 y p53), así como del gen constitutivo GAPDH (Tabla 5). Se utilizaron células sin tratamiento con PS y células tratadas con doxorrubicina como control negativo y positivo respectivamente. Los perfiles de expresión se evaluaron usando SyBR-Green y el método reportado por Kim et al., (2008).

Tabla 5.- Secuencias Forward y Reverse de los primers a utilizados

Primer	Secuencia Forward	Secuencia Reverse	Referencia
p53	5' GAGGTTGGCTCTGACTGTACC 3'	5' TCCGTCCCAGTAGATTACCAC 3'	(Assmann et al., 2018)
Bcl-2	5'GAGGATTGTGGCCTTCTTTGAGT 3'	5' AGTCATCCACAGGGCGATGT 3'	(Assmann et al., 2018)
CASP3	5' GTCGACATGGAGAAC ACTGAAAACTCAGTGGATT 3'	5' GTCGACCTCGAGACCACC AACCAACCATTCTTTAGTG 3'	(Kurokawa et al., 1999)
CASP6	5' CAGGCATGTCGAGGTGATAAA 3'	5' GCATCCACTTCAGTCTGGTT 3'	(Habashy et al., 2018)
CASP9	5' ATTTGGTGATGTCGGTGCTC 3'	5' TCACGGCAGAAGTTCACATTG 3'	(Sharifi & Moridnia, 2017)
GAPDH	5' AATCCCATCACCATCTTCCA 3'	5' TGGACTCCACGACGTACTCA 3'	(Kuang et al., 2018)

7.9 Análisis estadístico

Los datos se analizaron utilizando un ANOVA (Análisis de varianza) de una vía con la versión del software Graphpad Prism 8.0. Se aplicó la prueba de Dunnet para comparar cada tratamiento con el control negativo, con una significancia estadística de $p < 0.05$.

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1 Obtención de extractos proteicos y selección de inclusiones proteicas

La proteína A34-2 de ~55 KDa (reportada previamente por Cruz-Nolasco en el 2017), se seleccionó para llevar a cabo las pruebas en las células de cáncer de mama, porque demostró tener efecto sobre la línea celular cancerígena de mama, MCF-7. Para ello, se realizó una separación por tamaños de las proteínas cristalinas de los extractos proteicos de la cepa A34 de *B. thuringiensis* que fueron solubilizadas y separadas por electroforesis en geles de SDS-PAGE al 10% acrilamida/bis-acrilamida, como se observa en la figura 9.

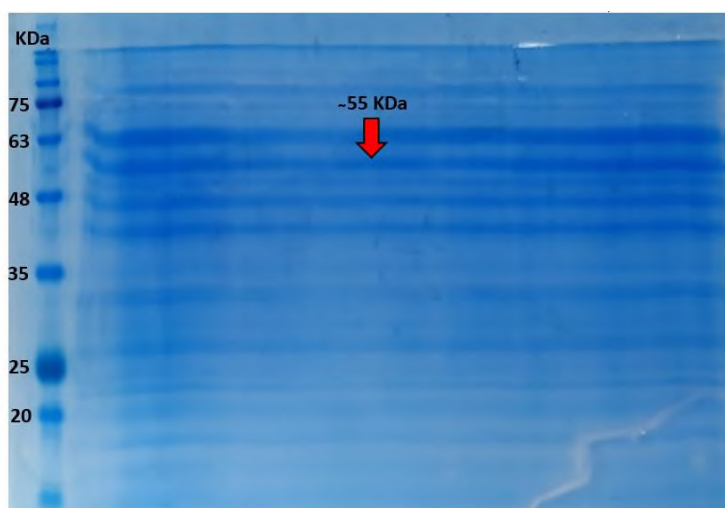


Figura 9.- Gel de SDS-PAGE al 10 % con las distintas bandas obtenidas de la cepa A34. En el carril uno, se muestra el peso molecular y en el segundo, la muestra de proteínas. La flecha roja indica la proteína (A34-2) a utilizar para los procesos posteriores.

La cepa A34 expresa bandas proteicas de distintos pesos moleculares que se encuentran dentro del rango reportado por otros autores. Cruz-Nolasco (2017), reportó distintas bandas proteicas (27 a 75 KDa) para la cepa A34 de en geles de acrilamida al 7%. Castrejón-Arroyo (2020) reportó otras proteínas (desde 20 a 50 KDa) para la cepa A13 y A24 en geles al 12%. Las cepas 84-HS-1-11 y A1190 de Mizuki et al., (2000), produjo bandas desde los 15 a 81 KDa. Poornima et al., (2010), obtuvieron proteínas Cry de diversos pesos moleculares (desde 20 a 180 KDa) para las cepas LDC-391, LDC415 y LDC-426 en geles de acrilamida al 12%.

Chubicka et al., (2018), reportaron que la cepa KAU 41 produjo una única banda de 31 kDa, la cual se apreció en geles de 15% de acrilamida. Sin embargo, Akiba & Okumura, (2017), definieron el peso molecular aproximado de las parasporinas activas, definiéndolas entre 15 y 58 kDa. Las diferencias entre las bandas de proteínas se deben a la cepa utilizada, a las condiciones de cultivo, al porcentaje de acrilamida y en ocasiones al marcador de peso molecular usado.

8.2 Purificación de los extractos proteicos

La cuantificación de la parasporina A34-2 se realizó después de una diálisis con buffer Tris-Gly y se apoyó en el método de Bradford, obteniendo una concentración proteica de 124 µg/mL. En comparación, en el 2017, Cruz-Nolasco, después de purificar con diálisis a la parasporina A34-2, cuantificó una concentración de 340 µg/mL con el equipo NanoDrop 2000. Ambos experimentos se realizaron con la cepa A34 cultivadas en agar nutritivo y purificada por diálisis en buffer Tris-Gly. Sin embargo, los valores diferentes de ambas cuantificaciones pueden deberse a las diferentes metodologías empleadas, la calibración de los equipos o a la cantidad de células bacterianas del cultivo que partieron. Teixeira Corrêa et al., (2012), cultivaron a la cepa S-1989 en medio LB, se separaron los extractos proteicos en geles al 12%, se purificó por diálisis usando discos de membrana y se cuantificó en el NanoDrop 3300, obteniendo una concentración de 147 µg/mL. En otro trabajo, de cultivos purificados por diálisis en buffer Tris-HCl, de la cepa Bt-LDC-501 realizados por Grace et al., (2020), obtuvieron concentraciones parasporales desde 150 hasta 410 µg/mL. De acuerdo a los autores la diferencia de concentraciones se debió a las distintas formulaciones del medio de cultivo utilizadas. Melo & Kitada (2020) reportaron que la cepa A14d2 cultivada en agar nutritivo y cuantificada con el método de ácido bicineónico (BCA), se obtuvo una concentración de proteínas parasporales de 520 µg/mL.

8.3 Evaluación de actividad biológica de la proteína A34-2

Las condiciones para que una proteína parasporal pueda considerarse parasporina, están: ser producida por *Bacillus thuringiensis*, que no produzca hemólisis y que sea citotóxica selectiva

contra células cancerígenas (Mizuki et al., 2000), por lo que se evaluó la actividad de la proteína A34-2 sobre monocitos, células eritrocíticas y células MCF-7.

8.3.1 Determinación citotóxica de la proteína A34-2 en la línea celular MCF-7

Los resultados de la actividad citotóxica de la inclusión proteica A34-2, determinado con el método MTT en la línea MCF-7, se muestran en la figura 10. Los resultados muestran una viabilidad celular superior al control negativo cuando la concentración de la proteína A34-2 es menor a 9.052 $\mu\text{g/mL}$. Lo anterior, sugiere que, en concentraciones menores, la PS no tienen efecto en las células cancerígenas, por lo que continúan proliferando. Estos resultados son similares a los obtenidos por Castrejón-Arroyo (2020), que observó que concentraciones menores a 10 $\mu\text{g/mL}$ no presentan un efecto disminuyendo la viabilidad celular tras 48 horas de incubación. Sin embargo, se observó que la PS aislada por nosotros a concentraciones mayores a esta cifra muestran una disminución gradual de la viabilidad celular. Utilizando el programa Graphpad Prism se obtuvo una LC_{50} de 15.04 $\mu\text{g/mL}$, lo cual indica un efecto citotóxico en la línea MCF-7 tras 24h de incubación.

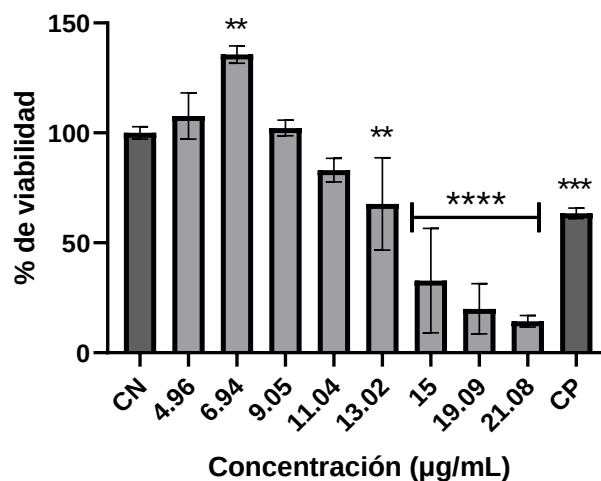


Figura 10.- Ensayo de viabilidad celular por MTT de las células MCF-7 tratadas con la parasporina A34-2 a 24 h de incubación. Resultados expresados en porcentaje respecto al control negativo (100% de viabilidad celular). CN: células sin tratamiento; CP: células tratadas con doxorrubicina 4 μM (2.17 g/L). Los datos se muestran como valores medios y desviaciones estándar (media $\pm$ SD) de las muestras por triplicado. Se realizó el análisis estadístico por ANOVA de una vía, seguido por una prueba post hoc de Dunnet. Valores de $p < \alpha$ (0.05) se consideran estadísticamente significativos. Siendo ** ($p < 0.01$), *** ($p < 0.001$) y **** ($p < 0.0001$).

Desde el 2005, Katayama et al., demostraron que la mayoría de las parasporinas poseen actividad citotóxica contra diversas líneas celulares de mamíferos, como es el caso de la Parasporina-1. Esta parasporina tiene una LC_{50} que varía desde 0.12 hasta 3 $\mu\text{g/mL}$ dependiendo de la línea celular cancerígena tratada con 1 h de incubación. Teixeira Corrêa et al. (2012) observaron que la proteína Cry11A (de la cepa S-1989) demostró tener una LC_{50} de 20 $\mu\text{g/mL}$ tras 24 h de incubación con las células MCF-7. La parasporina A14d2, posee una LC_{50} de 14.83 $\mu\text{g/mL}$ en la línea MCF-7 tras 24 horas de incubación (Melo & Kitada, 2020). Las parasporinas A13-2 y A13-5 demostraron tener una LC_{87} de 6 $\mu\text{g/mL}$ y LC_{80} de 8 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, en la línea MCF-7 tras 48 h de incubación (Borin et al., 2021). Por lo que la LC_{50} de la parasporina A34-2 se encuentra dentro de los valores reportados.

8.3.1.1 Evaluación morfológica de las células MCF-7

Los cultivos de las células MCF-7 tratadas con la LC_{50} (15.04 $\mu\text{g/mL}$) de la proteína A34-2 se monitorearon a diferentes tiempos (0, 9 y 24 h). El cultivo del control negativo presentó un crecimiento normal dentro de las primeras horas de incubación (Figura 11A y Figura 11B), sin embargo, para las 24 h de incubación, las células ya habían proliferado lo suficiente para formar una bicapa (Figura 11C). Las células MCF-7 tratadas con la proteína A34-2 presentaron cambios morfológicos (células ovaladas y oscuras) dentro de las primeras 9 h (Figura 11D y Figura 11E), y a las 24 h cerca del 50 % de las células estaban adheridas a la caja de cultivo, el resto se encontró en suspensión y con una morfología más redonda y oscura, características de cuerpos apoptóticos (Figura 11F). En cultivo del control positivo detuvo la proliferación celular cerca del 50 % dentro de las primeras 9 h (Figura 11G y Figura 11H), y a las 24 h se observó una gran cantidad de células en suspensión (Figura 11I).

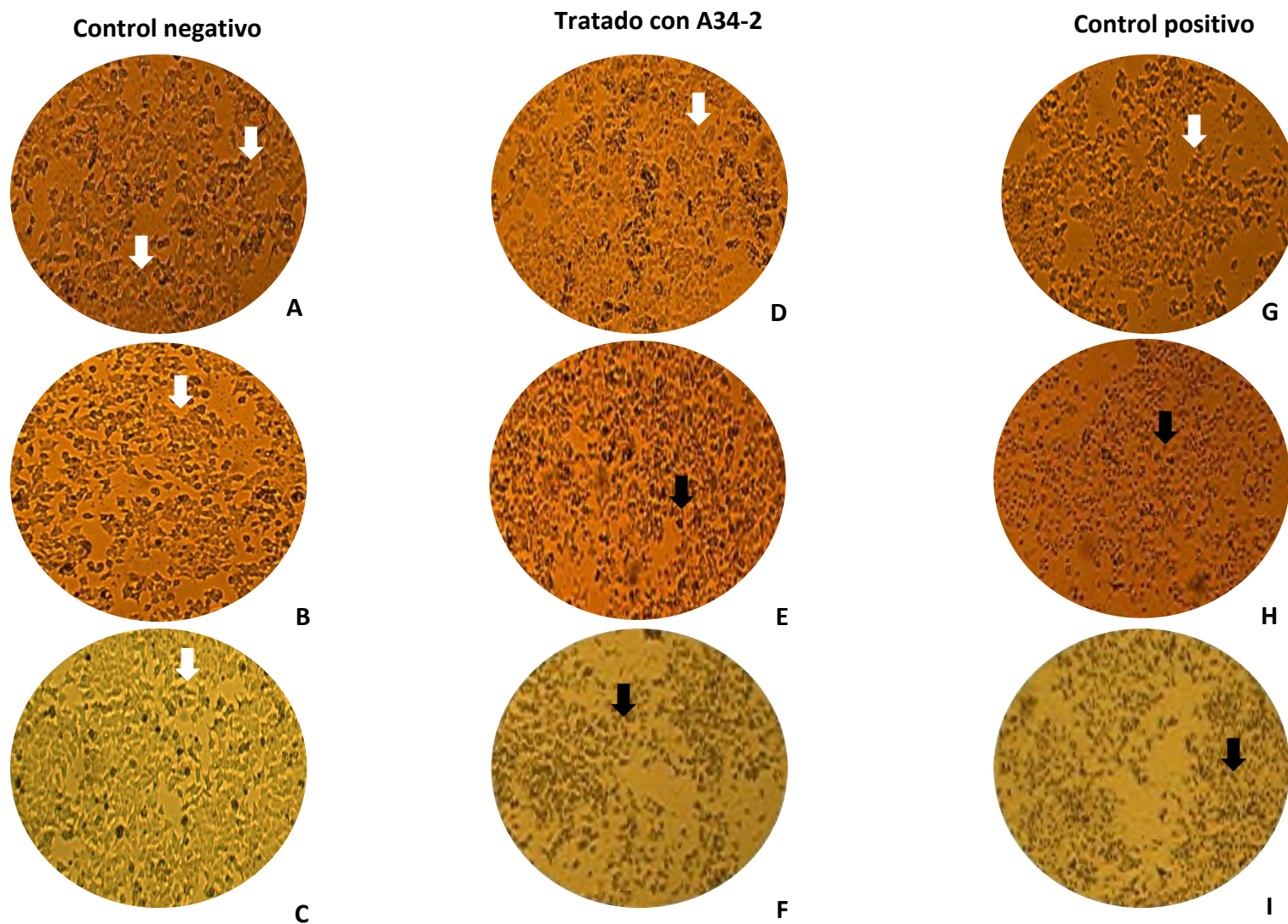


Figura 11.- Cambios morfológicos de células MCF-7, sin tratamiento (control negativo; A, B, C), con la proteína A34-2 (D, E, F) y con doxorubicina (control positivo; G, H, I); a las 0 horas de tratamiento (A, D, G), 9 horas de tratamiento (B, E, H) y a las 24 horas de tratamiento (C, F, I). Flecha negra, células muertas; flechas blancas, células vivas. Las células se observaron con el objetivo de 4X.

8.3.2 Determinación citotóxica de la proteína A34-2 en CMSP

Las CMSP se incubaron con la LC_{50} de la inclusión proteica A34-2 (15.04 $\mu\text{g/mL}$). Se realizó el ensayo MTT a las 24 h de tratamiento como se mencionó anteriormente, se usaron SDS al 2 % y doxorubicina 4 μM (2.17 g/L) como controles positivo y negativo respectivamente. La proteína A34-2 no mostró un efecto significativo de reducción de la viabilidad de las células CMSP, figura 12.

En comparación, en otros estudios realizados con las parasporinas A13-2, A13-5 obtenidos por Castrejón-Arroyo (2020) y Borin et al., (2021) tampoco observaron muerte celular de las CMSP tratadas con las PS. Por el contrario, los autores observaron un aumento de la proliferación celular tras 24 y 48 h de incubación, sugiriendo que posiblemente las PS generan una respuesta que estimula la proliferación celular. Katayama et al., (2005), reportaron que diversas células normales (células T normales de sangre periférica; UtSMC, células del musculo uterino normal; HC, células hepáticas; MRC-5, Fibroblasto pulmonar primario, normal) tratadas con la parasporina-1 a diversas concentraciones (hasta 10 $\mu\text{g/mL}$), con 1 h de incubación, no mostraron un efecto citotóxico significativo.

Okumura et al., (2008), reportaron que la parasporina-4 fue débilmente citotóxica a concentraciones $>2 \mu\text{g/mL}$ al estar en contacto con células T, UtSMC, HC y MRC-5, tras 20 h de incubación. Por lo que nuestros resultados sobre la viabilidad de las células CMSP tratadas con A34-2 están dentro de lo reportado.

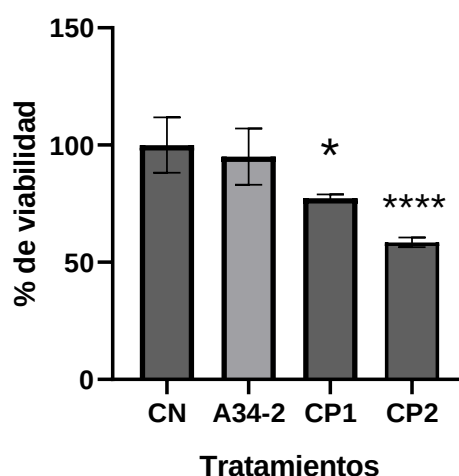


Figura 12.- Ensayo de viabilidad celular por MTT de las CMSP tratadas con la parasporina A34-2 a 24h de incubación. Resultados expresados en porcentaje respecto al control negativo (100% de viabilidad celular).

Los datos se muestran como valores medios y desviaciones estándar (media $\pm$ SD) de las muestras por triplicado. CN: Control negativo, células sin tratamiento; CP1: Control positivo, doxorrubicina 4 μ M (2.17 g/L); CP2: Control positivo, SDS 2% (p/v). Se realizó el análisis estadístico por ANOVA de una vía, seguido por una prueba post hoc de Dunnet. Valores de $p < \alpha$ (0.05) se consideran estadísticamente significativos. Siendo * ($p < 0.05$) y **** ($p < 0.0001$).

8.3.3 Ensayo de hemólisis

Para este ensayo los eritrocitos extraídos de sangre periférica se incubaron con la proteína A34-2 al valor obtenido de LC_{50} en las células MCF-7 (15.04 μ g/mL), como control positivo se utilizó SDS 2% y el control negativo se utilizó PBS 1X.

En este ensayo se observó que el efecto de hemólisis ocasionado por la proteína A34-2 sobre los eritrocitos de pacientes sanos fue cercano al 27.9% al ser tratadas a una concentración de 15.04 μ g/mL (Figura 13).

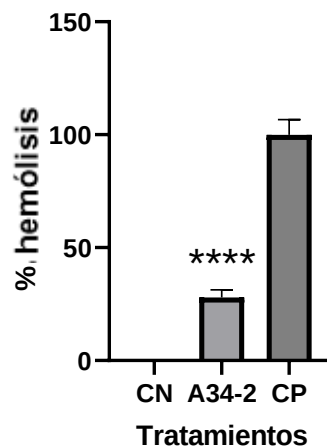


Figura 13.- Ensayo de hemólisis tratadas con la parasporina A34-2 a 24h de incubación. Resultados expresados en porcentaje respecto al control positivo (100% de hemólisis). Los datos se muestran como valores medios y desviaciones estándar (media $\pm$ SD) de las muestras por triplicado. CN: Control negativo, células sin tratamiento; CP: Control positivo, SDS 2% (p/v). Se realizó el análisis estadístico por ANOVA de una vía, seguido por una prueba post hoc de Dunnet. Valores de $p < \alpha$ (0.05) se consideran estadísticamente significativos. Siendo **** ($p < 0.0001$).

Las parasporinas estudiadas por otros autores, como la parasporina-1 (Aberkane et al., 2020); la A13-2 y A13-5 (Borin et al., 2021); la KAU-41 (Chubicka et al., 2018), no presentaron una actividad hemolítica significativa al estar en contacto con eritrocitos

humanos. Por otro lado, en el 2010, Poornima et al., observaron que las proteínas parasporales LDC-426 y LDC-415, exhibieron actividades hemolíticas leves contra eritrocitos humanos. Sin embargo, también apreciaron que la proteína LDC-391 presenta actividad hemolítica moderada pero no presentó dicha actividad al ser digerida con proteinasa k.

8.4 Evaluación de la expresión de genes vinculados a la vía extrínseca en células MCF-7

En la figura 14 se muestran los niveles de expresión de los genes después de la incubación de las células MCF-7 con la parasporina A34-2 por 24 h. Los genes de caspasa-3, caspasa-9 y Bcl-2 incrementaron 2, 1.8 y 8 veces, respectivamente. Mientras que caspasa-6 mostró una disminución en la expresión de 5 veces y el gen p53 no presentó un cambio significativo en sus niveles de expresión con respecto al control negativo. Lo anterior sugiere que la parasporina A34-2 induce la muerte por la vía apoptótica intrínseca.

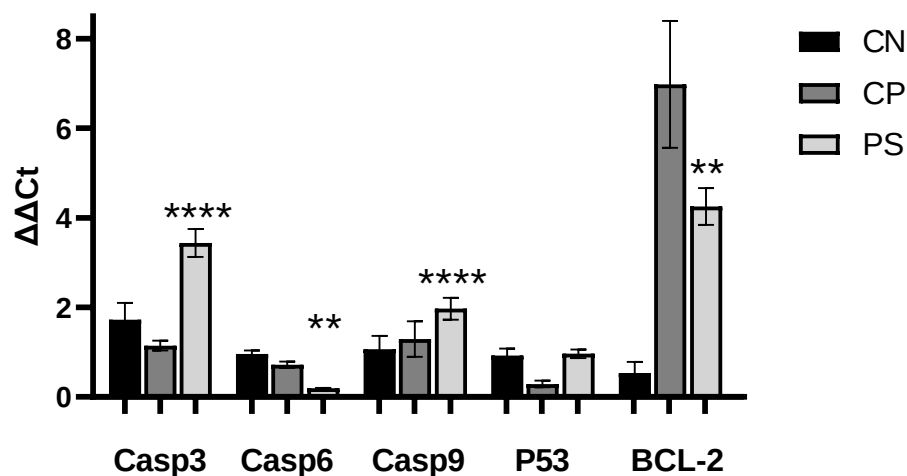


Figura 14.- Evaluación de la expresión de los genes de la vía intrínseca de la apoptosis en la línea celular MCF-7 tratadas con la parasporina A34-2 a 24h de incubación. Resultados expresados en números de veces con respecto a su control negativo. Los datos se muestran como valores medios y desviaciones estándar (media $\pm$ SD) de las muestras por triplicado. Se realizó el análisis estadístico por ANOVA de una vía, seguido por una prueba post hoc de Dunnet. Valores de $p < \alpha$ (0.05) se consideran estadísticamente significativos. Siendo ** ($p < 0.01$) y **** ($p < 0.0001$).

Debido a la casi nula información de estudios donde se evalúe la expresión de genes transcritos relacionado a la vía extrínseca en células MCF-7 tratadas con parasporinas no es posible contrastar nuestros resultados. Sin embargo, las células MOLT-4 tratadas con la parasporina-4 presentan una activación de las caspasas efectoras 3 y/o 7 al medirla con el kit CaspaseGLO 3/7 (Okumura et al., 2011).

También la parasporina-2 se probó con células PC-3, HepG2, HIESC y MCF-7 demostrando una expresión de las proteínas de la caspasa 3 y 7, sin embargo, la línea celular cancerosa MCF-7 tiene deficiencia de caspasa-3 y, considerando esta deficiencia, solo se pudo medir caspasa-7 mediante el kit Caspase-Glo 3/7 (Brasseur et al., 2015). La parasporina KAU-41 demostró que al estar en contacto con células HeLa sobre expresa la transcripción de los genes de caspasa 3 y 9 en 7.4 y 14.9 veces, respectivamente. Los autores sugirieron una activación de la vía intrínseca descartando la extrínseca por una baja expresión de la caspasa 8 de 0.37 veces (Chubicka et al., 2018), en este trabajo utilizaron también la técnica de RT-qPCR.

9. CONCLUSIÓN

En este trabajo, el aislamiento y purificación de la proteína A34-2 de ~55 kDa producida por la cepa A34 de *Bacillus thuringiensis*, mostró tener efecto citotóxico al emplearse como tratamiento en células MCF-7 con una LC_{50} de 15.04 $\mu\text{g/mL}$. Además, la parasporina demostró poseer un efecto preferentemente sobre células cancerígenas, al no presentar un efecto significativo sobre células mononucleares de sangre periférica (CMSP) y un porcentaje de viabilidad en eritrocitos cercano al 72 %.

El impacto morfológico observado en las células MCF-7 tratadas con la proteína A34-2 varió desde una apariencia típica y normal hasta una morfología distintiva asociada con la apoptosis. Es decir, que la parasporina indujo la formación de células redondeadas y oscuras en suspensión, junto con una disminución en el crecimiento celular. Estos resultados sugieren que la acción citotóxica inducida por la parasporina A34-2 en las células MCF-7 está relacionada con la muerte celular por apoptosis.

Por otro lado, la sobreexpresión de los genes de Caspasa 3 y 9, así como el gen Bcl-2 en células MCF-7 tras 24 horas de tratamiento con la proteína A34-2 podrían confirmar muerte apoptótica e indicar la activación de la vía intrínseca. Sin embargo, es necesario realizar más estudios a tiempos de tratamiento más cortos que nos permita realizar una cinética de expresión para poder determinar con mayor precisión los tiempos en los que se expresan los genes que aquí evaluamos, y por ende obtener un panorama más amplio sobre el cómo y cuándo afecta la proteína A34-2 en las células cancerígenas MCF-7.

10. REFERENCIAS

- Aberkane, L., Nacer-Khodja, A., Djenane, Z., Djouadi, L. N., Ouafek, A., Bouslama, L., Grib, H., Mameri, N., Nateche, F., & Djefal, A. (2020). In Vitro Cytotoxicity of Parasporins from Native Algerian *Bacillus thuringiensis* Strains Against Laryngeal and Alveolar Cancers. *Current Microbiology*, 77(3). <https://doi.org/10.1007/s00284-019-01841-2>
- Agudelo, M. E. R., & López, M. R. (2010). La necrosis, un mecanismo regulado de muerte celular. In *Iatreia* (Vol. 23, Issue 2).
- Akiba, T., Abe, Y., Kitada, S., Kusaka, Y., Ito, A., Ichimatsu, T., Katayama, H., Akao, T., Higuchi, K., Mizuki, E., Ohba, M., Kanai, R., & Harata, K. (2009). Crystal Structure of the Parasporin-2 *Bacillus thuringiensis* Toxin That Recognizes Cancer Cells. *Journal of Molecular Biology*, 386(1). <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.12.002>
- Akiba, T., & Okumura, S. (2017). Parasporins 1 and 2: Their structure and activity. In *Journal of Invertebrate Pathology* (Vol. 142). <https://doi.org/10.1016/j.jip.2016.10.005>
- Alimba, C. G., Rudrashetti, A. P., Sivanesan, S., & Krishnamurthi, K. (2022). Landfill soil leachates from Nigeria and India induced DNA damage and alterations in genes associated with apoptosis in Jurkat cell. *Environmental Science and Pollution Research*, 29(4). <https://doi.org/10.1007/s11356-021-15985-x>
- Ashkenazi, A., & Dixit, V. M. (1998). Death receptors: Signaling and modulation. In *Science* (Vol. 281, Issue 5381). <https://doi.org/10.1126/science.281.5381.1305>
- Assmann, C. E., Cadoná, F. C., Bonadiman, B. da S. R., Dornelles, E. B., Trevisan, G., & Cruz, I. B. M. da. (2018). Tea tree oil presents in vitro antitumor activity on breast cancer cells without cytotoxic effects on fibroblasts and on peripheral blood mononuclear cells. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 103. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.04.096>
- Azizi, M., Pakravan, A., Valizadeh, H., Rahbarghazi, R., Dianat-Moghadam, H., Bani, F., ... & Mehrmohammadi, M. (2021). Smart Gold-Polymer Nanostructures As Promising Drug Nanocarriers For Dual-Imaging Modality And Synergistic Chemo-Photothermal Therapy in Breast Cancer Cells.
- Borin, D. B., Castrejón-Arroyo, K., Cruz-Nolasco, A., Peña-Rico, M., Rorato, M. S., Santos, R. C. V., de Baco, L. S., Pérez-Picaso, L., Camacho, L., & Navarro-Mtz, A. K. (2021). Parasporin a13-2 of *bacillus thuringiensis* isolates from the papaloapan region (Mexico) induce a cytotoxic effect by late apoptosis against breast cancer cells. *Toxins*, 13(7). <https://doi.org/10.3390/toxins13070476>
- Brasseur, K., Auger, P., Asselin, E., Parent, S., Côté, J. C., & Sirois, M. (2015). Parasporin-2 from a new *bacillus thuringiensis* 4r2 strain induces caspases activation and apoptosis in human cancer cells. *PLoS ONE*, 10(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135106>
- Carneiro, B. A., & El-Deiry, W. S. (2020). Targeting apoptosis in cancer therapy. In *Nature Reviews Clinical Oncology* (Vol. 17, Issue 7). <https://doi.org/10.1038/s41571-020-0341-y>
- Castillo Ferrer, C., Berthenet, K., & Ichim, G. (2021). Apoptosis – Fueling the oncogenic fire. In *FEBS Journal* (Vol. 288, Issue 15). <https://doi.org/10.1111/febs.15624>
- Chubicka, T., Giriya, D., Deepa, K., Salini, S., Meera, N., Raghavamenon, A. C., Divya, M. K., & Babu, T. D. (2018). A parasporin from *Bacillus thuringiensis* native to Peninsular India induces apoptosis in cancer cells through intrinsic pathway. *Journal of Biosciences*, 43(2). <https://doi.org/10.1007/s12038-018-9759-0>

- Costas, M., & Rubio, M. (2017). AUTOFAGIA, UNA ESTRATEGIA DE SUPERVIVENCIA CELULAR. *Medicina*, 4.
- Crickmore, N., Baum, J., Bravo, A., Lereclus, D., Narva, K., Sampson, K., Schnepf, E., Sun, M., & Zeigler, D. R. (2014). *Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature. [Http://www.Btnomenclature.Info/](http://www.btnomenclature.info/).
- Cruz-Martín-del-Campo, S. L., González-Espinosa, C., Ruiz-Quiñonez, A. K., & Carranza-Aguilar, C. J. (2020a). Tipos de muerte celular y sus implicaciones clínicas. *El Residente*, 15(3). <https://doi.org/10.35366/95960>
- Cruz-Martín-del-Campo, S. L., González-Espinosa, C., Ruiz-Quiñonez, A. K., & Carranza-Aguilar, C. J. (2020b). Tipos de muerte celular y sus implicaciones clínicas. *El Residente*, 15(3). <https://doi.org/10.35366/95960>
- Cummings, B. S., & Schnellmann, R. G. (2021). Measurement of Cell Death in Mammalian Cells. *Current Protocols*, 1(8). <https://doi.org/10.1002/cpz1.210>
- Díez, J. C., & Herráez, Á. (2017). Iniciación al diagnóstico genético: una aproximación a la medicina molecular. *Revista de Investigación y Educación En Ciencias de La Salud (RIECS)*, 2(1). <https://doi.org/10.37536/riecs.2017.2.1.23>
- Dimas E. (2016). Biología del cáncer de mama. *Revista Venezolana de Oncología*, 28.
- Ekino, K., Okumura, S., Ishikawa, T., Kitada, S., Saitoh, H., Akao, T., Oka, T., Nomura, Y., Ohba, M., Shin, T., & Mizuki, E. (2014). Cloning and characterization of a unique cytotoxic protein parasporin-5 produced by *Bacillus thuringiensis* a1100 strain. *Toxins*, 6(6). <https://doi.org/10.3390/toxins6061882>
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. In *Toxicologic Pathology* (Vol. 35, Issue 4). <https://doi.org/10.1080/01926230701320337>
- Espino-Vázquez, A., Gómez-Treviño, A., Galán-Wong, L., & Pereyra-Alfárez, B. (2012). Isolation of *Bacillus thuringiensis* strains with cytotoxic activity against MOLT-4, a leukemia cell line. In *Microbes in Applied Research: Current Advances and Challenges, Malaga, Spain, 14 - 16 September 2011*. https://doi.org/10.1142/9789814405041_0029
- Espino Vázquez, A. N. (2014). *Caracterización biológica de parasporinas en cepas nativas de Bacillus thuringiensis* (Doctoral dissertation, Universidad Autónoma de Nuevo León)
- Evans, B. C., Nelson, C. E., Yu, S. S., Beavers, K. R., Kim, A. J., Li, H., Nelson, H. M., Giorgio, T. D., & Duvall, C. L. (2013). Ex vivo red blood cell hemolysis assay for the evaluation of pH-responsive endosomolytic agents for cytosolic delivery of biomacromolecular drugs. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, 73. <https://doi.org/10.3791/50166-v>
- Fiuza, L. M., Polanczyk, R. A., & Crickmore, N. (2017). *Bacillus thuringiensis* and *Lysinibacillus sphaericus*: Characterization and use in the field of biocontrol. In *Bacillus Thuringiensis and Lysinibacillus Sphaericus: Characterization and use in the Field of Biocontrol*. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-56678-8>
- García, M., & Vecino, E. (2003). Vías de señalización intracelular que conducen a la apoptosis de las células de la retina. *Archivos de La Sociedad Española de Oftalmología*, 78(7). <https://doi.org/10.4321/s0365-66912003000700004>
- Genetic Alliance. (2009). Cómo entender la genética: Una guía para pacientes y profesionales médicos en la región de Nueva York y el Atlántico Medio. *Como Entender La Genética*.
- Grace, J. J., Ramani, G., & Shenbagarathai, R. (2020). Enhancement of Purified Human Colon Cancer-Specific Parasporal Toxin from *Bacillus thuringiensis*-LDC-501. *Current Microbiology*, 77(1). <https://doi.org/10.1007/s00284-019-01800-x>

- Gradishar, W. J., Anderson, B. O., Balassanian, R., Blair, S. L., Burstein, H. J., Cyr, A., Elias, A. D., Farrar, W. B., Forero, A., Giordano, S. H., Goetz, M., Goldstein, L. J., Hudis, C. A., Isakoff, S. J., Marcom, P. K., Mayer, I. A., McCormick, B., Moran, M., Patel, S. A., ... Kumar, R. (2015). Breast Cancer, Version 1.2016. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*, 13(12). <https://doi.org/10.6004/jnccn.2015.0176>
- Guzmán Aguillón, O. L. (2018). *Estudio de la muerte celular inducida por el Immunepotent CRP® en líneas celulares de cáncer de mama y su efecto en combinación con ciclofosfamida o epirubicina* (Doctoral dissertation, Universidad Autónoma de Nuevo León)
- Habashy, W. S., Milfort, M. C., Rekaya, R., & Aggrey, S. E. (2018). Expression of genes that encode cellular oxidant/antioxidant systems are affected by heat stress. *Molecular Biology Reports*, 45(3). <https://doi.org/10.1007/s11033-018-4173-0>
- Hayakawa, T., Kanagawa, R., Kotani, Y., Kimura, M., Yamagiwa, M., Yamane, Y., Takebe, S., & Sakai, H. (2007). Parasporin-2Ab, a newly isolated cytotoxic crystal protein from *Bacillus thuringiensis*. *Current Microbiology*, 55(4). <https://doi.org/10.1007/s00284-006-0351-8>
- Hernández, D. E. (2016). BIOLOGÍA DEL CÁNCER DE MAMA. *Revista Venezolana de Oncología*, 28.
- Hu, Y., Georgiou, S. B., Kelleher, A. J., & Aroian, R. V. (2010). *Bacillus thuringiensis* Cry5B protein is highly efficacious as a single-dose therapy against an intestinal roundworm infection in mice. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 4(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000614>
- Inouye, K., Okumura, S., & Mizuki, E. (2008). Parasporin-4, a novel cancer cell-killing protein produced by *Bacillus thuringiensis*. In *Food Science and Biotechnology* (Vol. 17, Issue 2).
- Ito, A., Sasaguri, Y., Kitada, S., Kusaka, Y., Kuwano, K., Masutomi, K., Mizuki, E., Akao, T., & Ohba, M. (2004). A *Bacillus thuringiensis* crystal protein with selective cytotoxic action to human cells. *Journal of Biological Chemistry*, 279(20). <https://doi.org/10.1074/jbc.M401881200>
- Jung, Y. C., Mizuki, E., Akao, T., & Côté, J. C. (2007). Isolation and characterization of a novel *Bacillus thuringiensis* strain expressing a novel crystal protein with cytotoxic activity against human cancer cells. *Journal of Applied Microbiology*, 103(1). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.03260.x>
- Kashyap, D., Garg, V. K., & Goel, N. (2021). Intrinsic and extrinsic pathways of apoptosis: Role in cancer development and prognosis. In *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology* (Vol. 125). <https://doi.org/10.1016/bs.apcsb.2021.01.003>
- Katayama, H., Kusaka, Y., Yokota, H., Akao, T., Kojima, M., Nakamura, O., Mekada, E., & Mizuki, E. (2007). Parasporin-1, a novel cytotoxic protein from *Bacillus thuringiensis*, induces Ca²⁺ influx and a sustained elevation of the cytoplasmic Ca²⁺ concentration in toxin-sensitive cells. *Journal of Biological Chemistry*, 282(10). <https://doi.org/10.1074/jbc.M611382200>
- Katayama, H., Yokota, H., Akao, T., Nakamura, O., Ohba, M., Mekada, E., & Mizuki, E. (2005). Parasporin-1, a novel cytotoxic protein to human cells from non-insecticidal parasporal inclusions of *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Biochemistry*, 137(1). <https://doi.org/10.1093/jb/mvi003>
- Ke, F. S., Holloway, S., Uren, R. T., Wong, A. W., Little, M. H., Kluck, R. M., Voss, A. K., & Strasser, A. (2022). The BCL-2 family member BID plays a role during embryonic development in addition to its BH3-only protein function by acting in parallel to BAX, BAK and BOK. *The EMBO Journal*, 41(15). <https://doi.org/10.15252/embj.2021110300>
- Kim, H., Chung, H., Kim, H. J., Lee, J. Y., Oh, M. Y., Kim, Y., & Kong, G. (2008). Id-1 regulates Bcl-2 and Bax expression through p53 and NF-κB in MCF-7 breast cancer cells. *Breast Cancer Research and Treatment*, 112(2). <https://doi.org/10.1007/s10549-007-9871-6>

- Kitada, S., Abe, Y., Shimada, H., Kusaka, Y., Matsuo, Y., Katayama, H., Okumura, S., Akao, T., Mizuki, E., Kuge, O., Sasaguri, Y., Ohba, M., & Ito, A. (2006). Cytocidal actions of parasporin-2, an anti-tumor crystal toxin from *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Biological Chemistry*, 281(36). <https://doi.org/10.1074/jbc.M602589200>
- Kuang, J., Yan, X., Genders, A. J., Granata, C., & Bishop, D. J. (2018). An overview of technical considerations when using quantitative real-time PCR analysis of gene expression in human exercise research. *PLoS ONE*, 13(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196438>
- Kuroda, S., Begum, A., Saga, M., Hirao, A., Mizuki, E., Sakai, H., & Hayakawa, T. (2013). Parasporin 1Ac2, a novel cytotoxic crystal protein isolated from *Bacillus thuringiensis* B0462 strain. *Current Microbiology*, 66(5). <https://doi.org/10.1007/s00284-013-0301-1>
- Kurokawa, H., Nishio, K., Fukumoto, H., Tomonari, A., Suzuki, T., & Saijo, N. (1999). Alteration of caspase-3 (CPP32/Yama/apopain) in wild-type MCF-7, breast cancer cells. *Oncology Reports*, 6(1). <https://doi.org/10.3892/or.6.1.33>
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259). <https://doi.org/10.1038/227680a0>
- Layton, C., Maldonado, E., Monroy, L., Corrales Ramírez MSC, L. C., & Sánchez Leal MSC, L. C. (2011). *Bacillus* spp.; perspectiva de su efecto biocontrolador mediante antibiosis en cultivos afectados por fitopatógenos. *Nova*, 9(16). <https://doi.org/10.22490/24629448.501>
- Lee, D. W., Katayama, H., Akao, T., Maeda, M., Tanaka, R., Yamashita, S., Saitoh, H., Mizuki, E., & Ohba, M. (2001). A 28 kDa protein of the *Bacillus thuringiensis* serovar shandongiensis isolate 89-T-34-22 induces a human leukemic cell-specific cytotoxicity. *Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1547(1). [https://doi.org/10.1016/S0167-4838\(01\)00169-8](https://doi.org/10.1016/S0167-4838(01)00169-8)
- Lu, D., Liang, J., Fan, Y., Gu, Z., & Zhang, X. (2010). In Vivo Evaluation of a pH-Sensitive Pullulan–Doxorubicin Conjugate. *Advanced Engineering Materials*, 12(9). <https://doi.org/10.1002/adem.200980085>
- Pérez Machado, J., & Lie Concepción, A. (2012). Apoptosis, mecanismo de acción. *Medimay*, 18(2), 138-153. Recuperado de <https://revcmhabana.sld.cu/index.php/rcmh/article/view/572>
- Maciel-Herrerías, M., & Cabrera-Benítez, S. (2016). El papel de la autofagia en enfermedades pulmonares. *NCT Neumología y Cirugía de Tórax*, 75(3). <https://doi.org/10.35366/67952>
- Melo, A. L. A., & Kitada, S. (2020). Selection of the *Bacillus thuringiensis* Berliner strain to produce a parasporin with cytotoxic activity against MCF-7 breast cancer cells. *Breast Disease*, 39(1). <https://doi.org/10.3233/BD-190405>
- Mizuki, E., Ichimatsu, T., Hwang, S. H., Park, Y. S., Saitoh, H., Higuchi, K., & Ohba, M. (1999). Ubiquity of *Bacillus thuringiensis* on phylloplanes of arboreous and herbaceous plants in Japan. *Journal of Applied Microbiology*, 86(6). <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1999.00778.x>
- Mizuki, E., Park, Y. S., Saitoh, H., Yamashita, S., Akao, T., Higuchi, K., & Ohba, M. (2000). Parasporin, a human leukemic cell-recognizing parasporal protein of *Bacillus thuringiensis*. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 7(4). <https://doi.org/10.1128/CDLI.7.4.625-634.2000>
- Nagamatsu, Y., Okamura, S., Saitou, H., Akao, T., & Mizuki, E. (2010). Three cry toxins in two types from *Bacillus thuringiensis* strain M019 preferentially kill human hepatocyte cancer and uterus cervix cancer cells. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 74(3). <https://doi.org/10.1271/bbb.90615>

- Ning, S. Bin, Wang, L., & Song, Y. C. (2002). Identification of programmed cell death in situ in individual plant cells in vivo using a chromosome preparation technique. *Journal of Experimental Botany*, 53(369). <https://doi.org/10.1093/jexbot/53.369.651>
- Nolasco, I. A. C. (2017). Síntesis de nanoliposomas que contienen parasporinas de *Bacillus thuringiensis* con actividad antiproliferativa.
- Ohba, M., Mizuki, E., & Uemori, A. (2009). Parasporin, a new anticancer protein group from *Bacillus thuringiensis*. *Anticancer Research*, 29(1).
- Okumura, S., Akao, T., Higuchi, K., Saitoh, H., Mizuki, E., Ohba, M., & Inouye, K. (2004). *Bacillus thuringiensis* serovar shandongensis strain 89-T-34-22 produces multiple cytotoxic proteins with similar molecular masses against human cancer cells. *Letters in Applied Microbiology*, 39(1). <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2004.01544.x>
- Okumura, S., Ishikawa, T., Saitoh, H., Akao, T., & Mizuki, E. (2013). Identification of a second cytotoxic protein produced by *Bacillus thuringiensis* A1470. *Biotechnology Letters*, 35(11). <https://doi.org/10.1007/s10529-013-1275-6>
- Okumura, S., Saitoh, H., Ishikawa, T., Inouye, K., & Mizuki, E. (2011). Mode of action of parasporin-4, a cytotoxic protein from *Bacillus thuringiensis*. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1808(6). <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2010.11.003>
- Okumura, S., Saitoh, H., Ishikawa, T., Mizuki, E., & Inouye, K. (2008). Identification and characterization of a novel cytotoxic protein, parasporin-4, produced by *Bacillus thuringiensis* A1470 strain. In *Biotechnology Annual Review* (Vol. 14). [https://doi.org/10.1016/S1387-2656\(08\)00009-4](https://doi.org/10.1016/S1387-2656(08)00009-4)
- Palacios Alaiz, E., Miró, M., & Boticario Boticario, C. (2011). Muerte celular y cáncer: las vías de la apoptosis y de la autofagia como dianas en la terapia del cáncer. *Anales de La Real Academia de Doctores*, 15(2).
- Paparella, C. V., Pavesi, A., Provenzal, O., Ombrella, A. M., Luciano, M., Rodriguez, A., & Bouvet, B. R. (2017). Infertilidad masculina : consumo de tabaco y su relación con fragmentación del ADN y apoptosis espermática temprana. *Rev. Inv.Disc.*, 23(1).
- Pongsavee, M. (2009). Effect of borax on immune cell proliferation and sister chromatid exchange in human chromosomes. *Journal of Occupational Medicine and Toxicology*, 4(1). <https://doi.org/10.1186/1745-6673-4-27>
- Poornima, K., Selvanayagam, P., & Shenbagarathai, R. (2010). Identification of native *Bacillus thuringiensis* strain from South India having specific cytotoxic activity against cancer cells. *Journal of Applied Microbiology*, 109(1). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2010.04697.x>
- Rang, H., & Dale, M. (2014). Rang y Dale Farmacología. In *Elsevier* (Issue 1).
- Reed, J. C. (2000). Warner-Lambert/Parke Davis award lecture: Mechanisms of apoptosis. In *American Journal of Pathology* (Vol. 157, Issue 5). [https://doi.org/10.1016/s0002-9440\(10\)64779-7](https://doi.org/10.1016/s0002-9440(10)64779-7)
- Rezaei, R., Moazamian, E., & Montazeri-Najafabady, N. (2023). Parasporin-4, a novel apoptosis inducer of breast cancer cells produced by *Bacillus thuringiensis*. *Molecular Biology Reports*, 50(5). <https://doi.org/10.1007/s11033-023-08378-5>
- Sabiá Júnior, E. F. (2015). Detecção e caracterização de proteínas parasporinas em *Bacillus thuringiensis*.
- Saitoh, H., Okumura, S., Ishikawa, T., Akao, T., Mizuki, E., & Ohba, M. (2006). Investigation of a novel *Bacillus thuringiensis* gene encoding a parasporal protein, parasporin-4, that preferentially kills human leukemic T cells. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 70(12). <https://doi.org/10.1271/bbb.60352>

- Saucedo-de la Llata, E., López-Reyes, J. J., Moraga-Sánchez, M. R., Romeu-Sarrió, A., & Carmona-Ruiz, I. O. (2017). Fragmentación del ADN espermático: Situación actual. In *Ginecología y Obstetricia de Mexico* (Vol. 85, Issue 3).
- Sauka, D. H., & Benintende, G. B. (2008). *Bacillus thuringiensis*: Generalidades. Un acercamiento a su empleo en el biocontrol de insectos lepidópteros que son plagas agrícolas. In *Revista Argentina de Microbiología* (Vol. 40, Issue 2).
- Schnepf, E., Crickmore, N., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Feitelson, J., Zeigler, D. R., & Dean, D. H. (1998). *Bacillus thuringiensis* and Its Pesticidal Crystal Proteins . *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(3). <https://doi.org/10.1128/mmbr.62.3.775-806.1998>
- Shakeri, R., Kheirollahi, A., & Davoodi, J. (2021). Contribution of Apaf-1 to the pathogenesis of cancer and neurodegenerative diseases. In *Biochimie* (Vol. 190). <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2021.07.004>
- Sharifi, M., & Moridnia, A. (2017). Apoptosis-inducing and antiproliferative effect by inhibition of miR-182-5p through the regulation of CASP9 expression in human breast cancer. *Cancer Gene Therapy*, 24(2). <https://doi.org/10.1038/cgt.2016.79>
- Soberón, M., López-Díaz, J. A., & Bravo, A. (2013). Cyt toxins produced by *Bacillus thuringiensis*: A protein fold conserved in several pathogenic microorganisms. In *Peptides* (Vol. 41). <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2012.05.023>
- Teixeira Corrêa, R. F., Ardisson-Araújo, D. M. P., Monnerat, R. G., & Ribeiro, B. M. (2012). Cytotoxicity Analysis of Three *Bacillus thuringiensis* Subsp. israelensis δ -Endotoxins towards Insect and Mammalian Cells. *PLoS ONE*, 7(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046121>
- Turnbull, P. C. B. (1996). *Bacillus*. In: Medical Microbiology. In *Beneficial Microbes in Agro-Ecology: Bacteria and Fungi*.
- Uemori, A., Ohgushi, A., Yasutake, K., Maeda, M., Mizuki, E., & Ohba, M. (2008). Parasporin-1Ab, a novel *Bacillus thuringiensis* cytotoxin preferentially active on human cancer cells in vitro. *Anticancer Research*, 28(1 A).
- Valdés Cañedo, F. (2003). Expresión de genes bcl-2, reguladores de apoptosis, en epitelio tubular renal de rata en respuesta a isquemia-reperfusión memoria para optar al grado de doctor.
- Velasquez C., L.-F., Rojas T., D. S., & Cerón S., J. A. (2018). Proteínas de *Bacillus thuringiensis* con actividad citotóxica: Parasporinas TT - Proteins of *Bacillus thuringiensis* with cytotoxic activity: Parasporins. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 20(2).
- Velásquez Cardona, L. F., Rojas Torres, D. S., & Cerón Salamanca, J. (2018). TOXINAS DE *Bacillus thuringiensis* CON ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA: PARASPORINAS. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 20(2). <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v20n2.73668>
- Vinueza, C. (2009). PCR en Tiempo Real : la nueva era de la información genética celular (Real Time PCR : the new age of cellular genetic information). *Redvet*, 10(2).
- Xu, C., Wang, B. C., Yu, Z., & Sun, M. (2014). Structural insights into *Bacillus thuringiensis* Cry, Cyt and parasporin toxins. In *Toxins* (Vol. 6, Issue 9). <https://doi.org/10.3390/toxins6092732>
- Yamashita, S., Katayama, H., Saitoh, H., Akao, T., Park, Y. S., Mizuki, E., Ohba, M., & Ito, A. (2005). Typical three-domain cry proteins of *Bacillus thuringiensis* strain A1462 exhibit cytotoxic activity on limited human cancer cells. *Journal of Biochemistry*, 138(6). <https://doi.org/10.1093/jb/mvi177>
- Yasutake, K., Uemori, A., Binh, N. D., Mizuki, E., & Ohba, M. (2008). Identification of parasporin genes in Vietnamese isolates of *Bacillus thuringiensis*. *Zeitschrift Fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences*, 63(1–2). <https://doi.org/10.1515/znc-2008-1-225>

- Zamora S, J. D., Otárola A, I. C., & Brenes G, O. (2005). LA APOPTOSIS Y SU RELACIÓN CON DIVERSOS NUTRIENTES. *Revista Chilena de Nutrición*, 32(3). <https://doi.org/10.4067/s0717-75182005000300002>
- Zhong, Y., Wang, Q. J., Li, X., Yan, Y., Backer, J. M., Chait, B. T., Heintz, N., & Yue, Z. (2009). Distinct regulation of autophagic activity by Atg14L and Rubicon associated with Beclin 1-phosphatidylinositol-3-kinase complex. *Nature Cell Biology*, 11(4). <https://doi.org/10.1038/ncb1854>