



Universidad del Papaloapan

Campus Tuxtepec

Evaluación del efecto citotóxico en la línea celular MCF-7 utilizando una nueva Parasporina aislada de la cepa AC5 y una PS4 de la cepa IB84 ambas de *Bacillus thuringiensis*.

TESIS

para obtener el título de:

Ingeniera en Biotecnología

Presenta:

Karelia Quijano Santiago

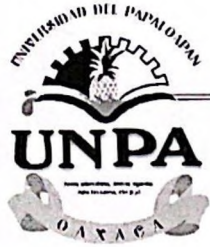
Director:

Miguel Ángel Peña Rico

Co-director:

Dra. Luz del Carmen Camacho Castillo

San Juan Bautista Tuxtepec Oaxaca, Enero 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 07 de septiembre de 2023 a las 16:15 hr, 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 "Evaluación del efecto citotóxico en la línea celular MCF-7 utilizando una nueva parasporina aislada de la cepa AC5 y una PS4 de la cepa IB84 ambas de *Bacillus thuringensis*" presentada por la alumna Karelia Quijano Santiago, con número de matrícula 14090578, 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 la aspirante pueda proceder con el proceso de titulación.

Tuxtepec, Oaxaca, a 07 de septiembre de 2023.

ATENTAMENTE
LA COMISIÓN REVISORA

Dr. Miguel Ángel Peña Rico
Profesor Investigador Titular "A"
Universidad del Papaloapan
Director de Tesis

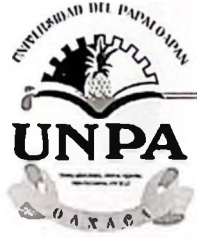
Dr. Edgar García López
Universidad del Papaloapan
Revisor de Tesis

Dr. Adolfo López Torres
Profesor Investigador Titular "A"
Universidad del Papaloapan
Revisor de Tesis

Dr. Paul Mauricio Sánchez Ocampo
Universidad del Papaloapan
Revisor de Tesis

Dr. Enrique Villalobos Amador
Profesor Investigador Titular "A"
Universidad del Papaloapan
Revisor de Tesis

Dra. Karla Viridiana Castro Cerritos
Profesor Investigador Asociado "B"
Universidad del Papaloapan
Revisor de Tesis



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN
CAMPUS TUXTEPEC

INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

Tuxtepec, Oaxaca, a 07 de septiembre de 2018
Oficio No. JCIB/001/09/2023

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

Con base en el dictamen de la comisión revisora, se autoriza la impresión del trabajo de tesis de la alumna **Karelia Quijano Santiago** con título definitivo "**Evaluación del efecto citotóxico en la línea celular MCF-7 utilizando una nueva parasporina aislada de la cepa AC5 y una PS4 de la cepa IB84 ambas de *Bacillus thuringiensis***". Para ser presentado como trabajo de tesis para obtener el título de Licenciada 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:

Dr. Enrique Villalobos Amador (Presidente, Universidad del Papaloapan)
Dr. Adolfo López Torres (Vocal, Universidad del Papaloapan)
Dr. Paul Mauricio Sánchez Ocampo (Secretario, Universidad del Papaloapan)
Dra. Karla Viridiana Castro Cerritos (Primer Suplente, Universidad del Papaloapan)
Dr. Edgar García López (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*



Jaqueline Capataz Tafur
Dra. Jacqueline Capataz Tafur
Jefa de Carrera de Ingeniería en
Biotecnología
Universidad del Papaloapan

Vo.Bo Dra. Tania Zuñiga Marroquín
Encargada del Despacho de Vice-Rectoría
Académica
Universidad del Papaloapan
VICE-RECTORIA
ACADEMICA



c.c.p Dr. Miguel Ángel Peña Rico. Director de tesis, para su conocimiento
c.c.p. Karelia Quijano Santiago. Alumna, para su conocimiento
c.c.p. Archivo

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 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.

Dedicatoria

Dedico esta tesis con todo mi corazón:

A mi madre Edoné Santiago, de quien siempre obtuve su apoyo incondicional, gracias por creer en mí, a ti debo la persona que soy, mis principios, mis valores, mi perseverancia y mi empeño.

A mi padre Ángel L. Quijano, quien me instruyó a ser una persona fuerte y luchar por un mejor futuro, gracias por enseñarme el camino de la superación.

A mis hermanas por el cariño brindado día a día durante mi vida universitaria, gracias por hacer de mi vida un lugar seguro y divertido.

A mi abuela Irma por su orientación y que no importa si es tarde o temprano, se pueden hacer todo lo que uno se proponga, gracias por confiar en mi talento.

A mi tío Iván por revelarme la vida desde otra perspectiva, y que existen otros caminos por recorrer, gracias a eso busco lo mejor para mí.

Agradezco a mi asesor de tesis el Dr. Miguel Ángel Peña y compañeros de laboratorio, por haber permitido desarrollarme en el campo de la investigación y brindarme todo el conocimiento científico durante el desarrollo de la tesis.

A todos ustedes, infinitas gracias.

INDICE

1. INTRODUCCIÓN	13
2. MARCO TEÓRICO.....	15
2.1. <i>B. thuringiensis</i>	15
2.1.1. Generalidades.....	15
2.1.2. Actividad tóxica	16
2.1.3. Parasporinas	17
2.2. Muerte celular	22
2.2.1. Apoptosis	22
2.2.2. Necrosis	23
2.3. Análisis de Imagen	24
2.3.1. ImageJ.....	24
3. JUSTIFICACIÓN.....	26
4. HIPÓTESIS	27
5. OBJETIVOS.....	27
5.1. Objetivos específicos	27
1. Aislar el cristal parasporal a partir de cultivos de la cepa AC5 de <i>B. thuringiensis</i>	27
2. Identificar una inclusión proteica con posible actividad anticancerígena.	27
3. Determinar la actividad anticancerígena en la línea celular MCF-7 de cáncer de mama...	27
4. Analizar los cambios morfológicos de las células MCF-7 a diferentes tiempos de exposición y de concentración de las inclusiones proteicas.	27
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	28
6.1. Material Biológico	28
6.2. Producción del cristal parasporal de la cepa AC5 de <i>B. thuringiensis</i>	28

6.3.	Selección de las Inclusiones proteicas	29
6.4.	Purificación y cuantificación	30
6.5.	Bioensayos Dosis Respuesta	30
6.5.1.	Línea celular	30
6.5.2.	Cultivo de células	31
6.5.3.	Curva dosis respuesta: determinación de la actividad citotóxica	32
6.5.4.	Ensayo de viabilidad celular (MTT)	32
6.6.	Adquisición de micrografías y análisis de imagen	33
6.7.	Pruebas de seguridad farmacológica	33
6.7.1.	Prueba de hemólisis	33
6.7.2.	Ensayo de toxicidad en células mononucleares de sangre periférica	34
6.8.	Análisis estadísticos	35
7.	RESULTADOS	36
7.1.	Determinación del número de esporas	36
7.2.	Obtención de extractos proteicos	36
7.3.	Purificación de los extractos proteicos	38
7.4.	Determinación de la actividad citotóxica mediante un ensayo de curso temporal dosis-respuesta en MCF-7	39
7.4.1.	Tiempo de exposición 24 h	39
7.4.2.	Tiempo de exposición 48 h	43
7.4.3.	Tiempo de exposición 72 h	46
7.5.	Pruebas de seguridad farmacológica	51
7.5.1.	Ensayo de Hemólisis	51
7.5.2.	Ensayo en CMSP	52
8.	DISCUSIÓN	53

9. CONCLUSIÓN	56
8. PERSPECTIVAS	57
9. REFERENCIAS	58
10. ANEXO	65

ABREVIATURAS

°C: Grados centígrados	min: Minuto
AC5: Cepa de <i>Bacillus thuringiensis</i>	mL: Mililitro
ADN: Acido Desoxirribonucleico	P/S: Penicilina-Streptomina
<i>B. thuringiensis:</i> <i>Bacillus thuringiensis</i>	PBS: Solución Amortiguadora de Fosfato
BSA: Albumina de Suero Bovino	PS: Parasporina
D.E: Desviación estándar	rpm: Revoluciones por minuto
DMEM: Dulbecco's Minimum Essential Medium (por sus siglas en inglés).	SDS: Dodecil sulfato de sodio
DMSO: Dimetilsulfóxido	SDS-PAGE: Dodecil Sulfato de Sodio- Electroforesis en Gel de Poliacrilamida
h: Horas	SFB: Suero Fetal Bovino
IB84: Cepa <i>Bacillus thuringiensis</i>	µg: Microgramo
IC₅₀: Median Inhibitory Concentration	µL: Microlitro
kDa: Kilodaltons	MTT: (bromuro de 3-(3,4 -dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio)
MCF-7: Michigan Cancer Foundation-7	
mg: Miligramos	

INDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1: Morfologías de los cristales producidos por diferentes cepas de B. thuringiensis.</i>	<i>16</i>
<i>Figura 2: Espectro tóxico de las endotoxinas (Cry y Cyt).....</i>	<i>17</i>
<i>Figura 3: Diferencias estructurales entre los dos tipos de PS.....</i>	<i>20</i>
<i>Figura 4: Morfología de la línea celular MCF-7 a baja y alta densidad</i>	<i>31</i>
<i>Figura 5: Micrografías de la tinción de esporas.....</i>	<i>36</i>
<i>Figura 6: Perfil de separación electroforética (SDS-PAGE al 12%)......</i>	<i>38</i>
<i>Figura 7: Ensayo de MTT a 24 h de incubación la inclusión proteica de B. thuringiensis AC5 y B. thuringiensis IB84 en la línea MCF-7.....</i>	<i>40</i>
<i>Figura 8: Micrografías representativas tomadas a las 24 h tratadas con la PS-4 de IB84.....</i>	<i>42</i>
<i>Figura 9: Área de celular MCF-7 a 24 h de exposición con concentraciones de IB84..</i>	<i>43</i>
<i>Figura 10: Ensayo de MTT a 48 h de incubación la inclusión proteica de B. thuringiensis AC5 y B. thuringiensis IB84 en la línea MCF-7.....</i>	<i>44</i>
<i>Figura 11: Micrografías representativas a las 48 h tratadas con la PS4 de IB84..</i>	<i>45</i>
<i>Figura 12: Área de las células MCF-7 a 48 h de exposición con concentraciones de IB84.....</i>	<i>46</i>
<i>Figura 13: Ensayo de MTT a 72 h de incubación con concentraciones de B. thuringiensis IB84 y B. thuringiensis AC5 en la línea celular MCF-7.....</i>	<i>47</i>
<i>Figura 14: Micrografías representativas a las 72 h tratadas con la inclusión proteica AC5.....</i>	<i>48</i>
<i>Figura 15: Área de células MCF-7 a 72 h de exposición con concentraciones de AC5. Los datos se presentan en gráfico con distribución de puntos y media.</i>	<i>48</i>
<i>Figura 16: Micrografías representativas a las 72 h tratadas con la PS-4 de IB84..</i>	<i>49</i>
<i>Figura 17: Área de células MCF-7 a 72 h de exposición con concentraciones de B. thuringiensis IB84.....</i>	<i>50</i>
<i>Figura 18: Ensayo de hemólisis para inclusión proteica aislada de la cepa AC5.</i>	<i>51</i>
<i>Figura 19: Ensayos de citotoxicidad de inclusión proteica AC5 en células Mononucleares de sangre periférica.</i>	<i>52</i>
<i>Figura 20: Espectro citotóxico de las principales parasporinas (Espino V, 2014).</i>	<i>54</i>

INDICE DE TABLAS

<i>Tabla 1: Taxonomía de B. thuringiensis</i>	15
<i>Tabla 2: Lista de publicaciones relacionadas con PS de B.thuringiensis</i>	18
<i>Tabla 3: Cepas de B. thuringiensis aisladas de suelos en la Cuenca del Papaloapan</i>	28
<i>Tabla 4: Concentración de las proteínas purificadas por diálisis y en columna, cuantificados en NanoDrop</i>	38
<i>Tabla 5: Valores IC₅₀ de B. thuringiensis AC5 y B. thuringiensis IB84 sobre MCF-7 a las 12, 24, 48 y 72 h.</i>	50

RESUMEN

Las parasporinas (PS) han emergido como una nueva clase de proteínas potenciales contra el cáncer. Este grupo de proteínas son sintetizadas por *B. thuringiensis* y tienen la capacidad de matar de forma específica a células de origen cancerosos sin causar daño a las células que no tienen este origen. Las PS tienen actividad citotóxica contra más de un tipo de cáncer y dicha actividad puede variar dependiendo de la cepa de la que fue aislada. Este trabajo se centró en encontrar una inclusión proteica en la cepa AC5 de *B. thuringiensis* con actividad citotóxica sobre la línea celular de cáncer de mama MCF-7, así como, probar si la PS4 producida por la cepa IB84 *B. thuringiensis* presentaba actividad citotóxica en las células MCF-7. Los resultados indicaron que la banda elegida de 26 kDa de la cepa AC5 de *B. thuringiensis* tuvo actividad citotóxica sobre la línea celular MCF-7 a partir de las 72 h de tratamiento, reduciendo la viabilidad celular hasta un 39% con respecto al grupo control y un valor aproximado de IC₅₀ de 35.57 mg/mL, mientras que la PS4 de 26 kDa de la cepa IB84 mostró una significativa actividad citotóxica sobre las células MCF-7 reduciendo la viabilidad celular hasta el 80% a partir de las 48 h, con un valor de IC₅₀ de 5.069 mg/mL. El análisis por microscopía óptica de ambas proteínas mostró cambios morfológicos celulares importantes destacando la presencia de células redondas con tamaños diversos, así como el incremento en el volumen de la célula y del núcleo, condensación de la cromatina y derrame de componentes citosólicos. Ambos casos muestran una relación proporcional a la reducción del tamaño con respecto al aumento de la concentración. Estas características observadas tienen gran similitud a las encontradas con el tratamiento con Doxorrubicina, un compuesto utilizado en el tratamiento contra el cáncer el cual se sabe conduce a la muerte celular por apoptosis. Los resultados de la prueba de hemólisis y el ensayo de citotoxicidad en CMSP, demostraron que la inclusión proteica de AC5 es una parasporina.

En conclusión **1)** la cepa AC5 de *B. thuringiensis* produce una PS de 26 kDa, **2)** la cual conduce a cambios morfológicos asociados con la muerte celular conocida como apoptosis. Sin embargo, **3)** su actividad citotóxica es relativamente baja cuando se le compara con la PS4 de 26 kDa producida por cepa IB84 de *B. thuringiensis*. **4)** La PS de AC5 es farmacológicamente segura y cumple con los criterios de una PS **5)** La PS4 de IB84 mostró una fuerte actividad citotóxica sobre las células MCF-7, **6)** conduciendo a cambios morfológicos asociados con la apoptosis. Como perspectivas a futuro, es conveniente respaldar con estudios que confirmen el mecanismo de muerte asociado.

ABSTRACT

Parasporins (PS) have emerged as a new class of potential anticancer proteins. This group of proteins are synthesized by *B. thuringiensis* and have the ability to specifically kill cells of cancerous origin without causing damage to cells that do not have this origin. PS have cytotoxic activity against more than one type of cancer and this activity could vary depending on the strain from which it was isolated. This work focused on finding a protein inclusion in the AC5 strain of *B. thuringiensis* with cytotoxic activity on the MCF-7 breast cancer cell line, as well as testing whether PS4 produced by *B. thuringiensis* strain IB84 had cytotoxic activity against more than one type of cancer. The results indicated the chosen 26 kDa band of *B. thuringiensis* strain AC5 had cytotoxic activity on the MCF-7 cell line from 72 hours of treatment, reducing cell viability by 39% with respect to the control group with an IC_{50} value of 35.57 g/mL, while 26 kDa PS4 from strain IB84 showed high cytotoxic activity on MCF-7 cells, reducing cell viability to 80% after 48h, with an IC_{50} value of 5.069 g/mL.

Optical microscopy analysis of both proteins showed important cellular morphological changes, highlighting the presence of round cells with different sizes, as well as the increase in the volume of the cell and nucleus, chromatin condensation and spillage of cytosolic components. Both cases show a proportional relationship to the reduction in size with respect to the increase in concentration. These observed characteristics have great similarity to those found with the treatment with Doxorubicin, a compound used in the treatment against cancer which is known to lead to cell death by apoptosis. The results of the hemolysis tests and a cytotoxicity assay in PBMC, affirm that the isolated protein inclusion of AC5 is a parasporin.

In conclusion **1)** *B. thuringiensis* strain AC5 produces a 26 kDa parasporin, **2)** which leads to morphological changes associated with cell death known as apoptosis. However, **3)** its cytotoxic activity is lower when compared to the 26 kDa PS4 produced by *B. thuringiensis* strain IB84. **4)** AC5 PS is pharmacologically safe and meets the criteria for a PS **5)** PS4 produced by IB84 showed strong cytotoxic activity on MCF-7 cells, **6)** leading to morphological changes associated with apoptosis. As prospects, it is convenient to support it with studies that confirm the mechanism of death.

1. INTRODUCCIÓN

El cáncer es una de las principales causas de muerte en todo el mundo, y en el año 2020 representó aproximadamente 10 millones de muertes. La Organización mundial de la salud lo define como un grupo de enfermedades que pueden afectar cualquier parte del cuerpo, otros términos utilizados para describir la enfermedad son tumores malignos y neoplasias. Surge de la transformación de células normales en células tumorales a través de múltiples etapas, una de las características notorias es la rápida creación de células anormales que crecen más allá de sus límites habituales y que pueden invadir partes adyacentes del cuerpo, como tejidos y órganos. Los 5 tipos de cáncer más común son el de mama, pulmón, colon y recto, y próstata (OMS, 2022).

En México en el año 2017, el cáncer de mama se ubicó como la principal causa de egreso hospitalario por tumores malignos en la población mayor de 20 años. A nivel nacional, la tasa de mortalidad por cáncer de mama es de 17.19 defunciones por cada 100 mil mujeres de 20 años o más. Entre las mujeres que fallecen por cáncer de mama, 1% son jóvenes de 15 a 29 años, 13% tienen entre 30 a 44 años y más de la tercera parte (38%), está entre los 45 a 59 años; la mayoría fallece después de los 59 años (48 %) (INEGI, 2020).

Actualmente existen distintos tratamientos para combatir esta enfermedad como la cirugía, quimioterapia y terapias hormonales, que dependen de varios factores como el tipo de cáncer, gravedad y origen, así como del estado de salud del paciente. A pesar del impacto que han tenido estos tratamientos, siguen siendo inespecíficos y dañan tanto células cancerosas como a las células normales, ocasionando efectos secundarios no deseados en pacientes, que conlleva a que calidad de vida del enfermo se deteriore y a que muchos de estos pacientes terminen abandonando el tratamiento. Así en el incremento en el número de personas diagnosticadas con cáncer aunado a la poca efectividad de los tratamientos para combatir esta enfermedad ha obligado a la búsqueda nuevas alternativas terapéuticas más selectivas y eficientes, que le permitan al paciente tener una mejor calidad de vida.

En este contexto, este proyecto de investigación enfoca su interés en la importancia de contribuir a la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas aprovechando el conocimiento que se tiene de *Bacillus thuringiensis* (*B. thuringiensis*) una bacteria capaz de sintetizar cristales proteicos

selectivos contra diversos tipos celulares de origen canceroso y que no dañan células normales, y así mejorar la calidad de vida de los pacientes.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. *B. thuringiensis*

2.1.1. Generalidades

B. thuringiensis fue descubierta por primera vez en 1901 por el biólogo japonés Shigetane Ishiwatari en el gusano de seda *Bombyx mori* y lo llamó *Bacillus sotto*, sin embargo, una década más tarde fue redescubierta y aislada de la polilla *Ephestia kuehniella* por Berliner nombrándola *B. thuringiensis*, en honor al lugar donde fue descubierta Thuringia, Alemania (Mendoza Almanza, *et al.*, 2020; Medina López, 2017)

B. thuringiensis es un bacilo anaerobio Gram positivo, su tamaño va de 2 a 5 μm de largo por 1 μm de ancho y su morfología es de bacilo flagelado. Forma parte del grupo de *Bacillus cereus*, que incluye a *Bacillus anthracis*; *B. thuringiensis* se encuentra estrechamente relacionado con las características fenotípicas y genotípicas de *Bacillus cereus*, sin embargo, el Bergey's Manual of Determinative Bacteriology reconoce su individualidad basándose en dos características: la presencia de una inclusión parasporal y sus propiedades insecticidas, además *B. thuringiensis* se clasifica en 84 serovares mediante serología del antígeno flagelar H (Cruz Nolasco, 2017; Bravo, *et al.*, 2007; Sauka, 2017).

Tabla 1: Taxonomía de *B. thuringiensis* (Sauka, *et al* 2008).

Familia	<i>Bacillaceae</i>
Género	<i>Bacillus</i>
Especie	<i>thuringiensis</i>
Grupo	<i>Bacillus cereus</i> (<i>B. anthracis</i> , <i>B. cereus</i> , <i>B. mycoides</i> , <i>B. pseudomycoides</i> , <i>B. thuringiensis</i> , y <i>B. weihenstephanensis</i>)
Nombre binomial	<i>Bacillus thuringiensis</i> , Berliner 1915

B. thuringiensis al ser una bacteria formadora de endosporas le confiere una gran resistencia a diversos ecosistemas tanto terrestres como acuáticos, incluso en ambientes bajo condiciones extremas, esta bacteria ha sido aislada de diversos ambientes en todo el mundo entre ellos suelos, insectos muertos, grano almacenado, hojas caducifolias y coníferas, sin embargo, el ambiente en el que mejor se desarrollan es el suelo, ya que la mayoría de las especies de *Bacillus* son saprófitas (Medina López, 2017; Villarreal Delgado, *et al.*, 2017).

2.1.2. Actividad tóxica

B. thuringiensis es una bacteria capaz de sintetizar distintas moléculas con actividad citotóxica que afectan tanto a organismos procariontas como a células eucariotas (Espino V, 2014). El ciclo de vida de *B. thuringiensis* consta principalmente de dos fases: **1)** la fase vegetativa, donde las bacterias se reproducen por bipartición mediante un ambiente favorable de nutrientes, temperatura, pH, etc., es decir, condiciones óptimas, y **2)** Fase de esporulación, cuando las bacterias pasan a un estado de latencia y es, en esta fase, cuando la bacteria produce cuerpos de inclusión en posición parasporal con formas cúbicas, bipiramidales, esféricas, ovaladas e irregulares, los cuales están conformados por δ -endotoxinas, Cry o Cyt. (Figura 1) (Mendoza Almanza, *et al.*, 2020; Izquierdo Rubio, 2011).

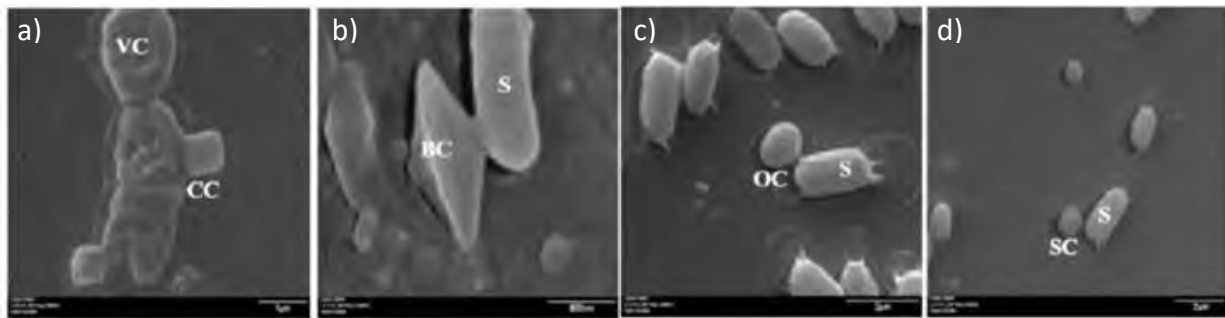


Figura 1: Morfologías de los cristales producidos por diferentes cepas de *B. thuringiensis*. Las imágenes son tomadas por microscopía electrónica de barrido a diferentes órdenes de magnitud. De izquierda a derecha: **a)** 20,000x, **b)** 15.000x, **c)** 15.000x, **d)** 50.000x. VC: célula vegetativa; CC: cristal cúbico; S: esporas; BC: cristal bipiramidal; OC: cristal ovoide; SC: cristal esférico. Imagen tomada de (Mendoza Almanza, *et al.*, 2020).

Estas δ -endotoxinas también son conocidas como proteínas cristal insecticida (ICP). Las proteínas Cry y Cyt han sido ampliamente utilizadas en el área de control biológico ya que son selectivamente tóxicos para larvas de insectos y nematodos, cuando son ingeridos por los insectos estos cristales se solubilizan en el intestino medio y las toxinas se activan proteolíticamente por proteasas, uniéndose a receptores específicos ubicados en la membrana celular, llevando a cabo la formación de poros y ocasionando la muerte de insectos. Estas proteínas han resultado inocuas para plantas, peces, pájaros, incluso para el mismo hombre (Sauka, 2017; Palma, *et al.*, 2014)

La δ -endotoxina Cry es tóxica para una gran cantidad de insectos, su espectro de toxicidad abarca dos o tres órdenes, la proteína Cyt presenta una homología similar pero limitada a las toxinas Cry, es tóxica para larvas de dípteros y, para células de mamíferos y dípteros *in vitro*, y es reconocida

por su actividad hemolítica, ambas son proteínas de inclusión parasporal de *B. thuringiensis* (Figura 2) (Xu, *et al.*, 2014).

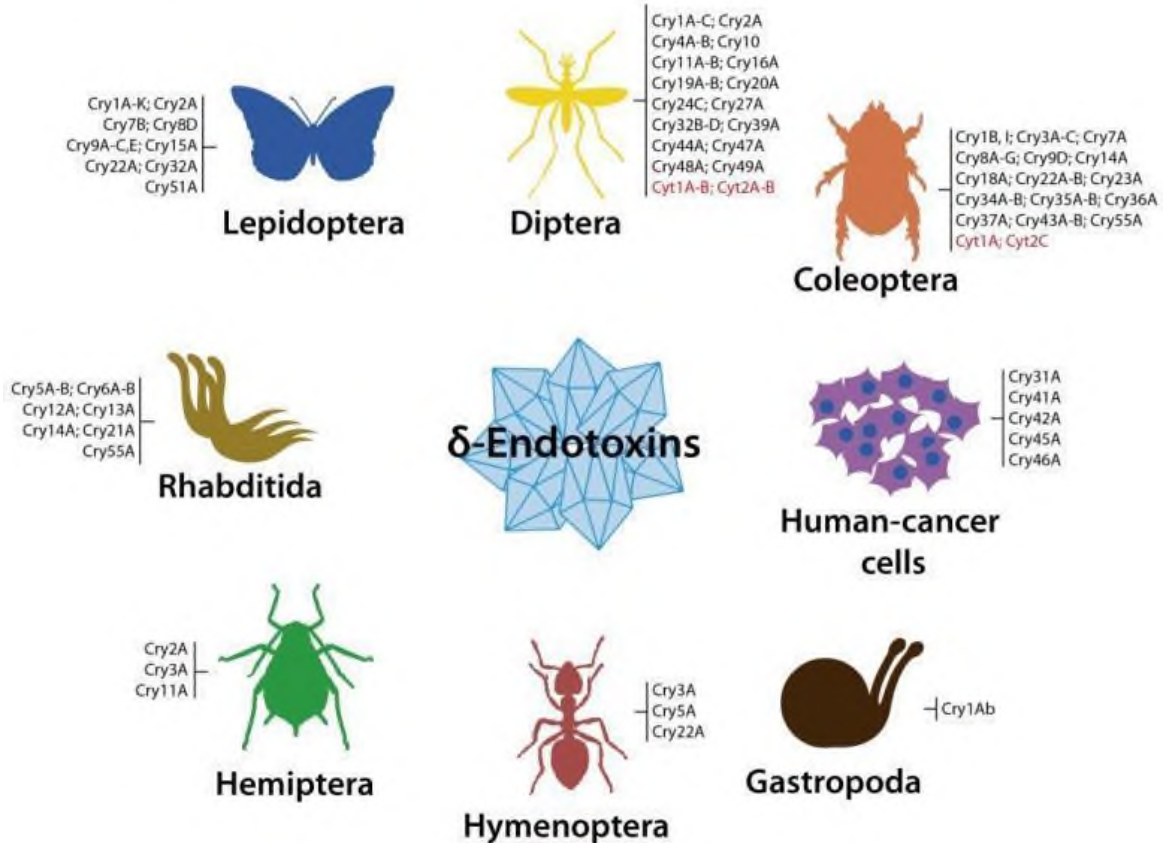


Figura 2: Espectro tóxico de las endotoxinas (Cry y Cyt). Cry1A-C (separado por guión) indica un grupo de toxinas Cry1A, Cry1B y Cry1C. Cry1B, I (separado por dos puntos) indica diferentes toxinas Cry1B y Cry1I. Los punto y coma separan grupos o toxinas individuales. Las toxinas Cyt están en rojo. Imagen tomada de Palma, *et al.*, 2014.

B. thuringiensis también produce otras toxinas importantes como parasporinas (PS), Capa-S (proteínas de la capa superficial), Vip (proteína insecticida vegetativa) y Sip (proteína insecticida secreta) (Mendoza Almanza, *et al.*, 2020; Palma, *et al.*, 2014).

2.1.2. Parasporinas

Las PS son proteínas descubiertas en el año 1996 tras una amplia investigación sobre las toxinas de *B. thuringiensis* que no tenían actividad insecticida conocida y que representaban un porcentaje importante, planteándose la pregunta de si estas proteínas tenían alguna actividad no reconocida, para el año 1999 Mizuki y colaboradores, encontraron que estas proteínas tenían cierta preferencia citotóxica contra células cancerosas humanas, y las clasificó como proteínas

parasporales bacterianas, que no son hemolíticas pero sí citotóxicas contra células humanas de cáncer, surgiendo así el término PS (Lenina, *et al.*, 2014; Krishnan, *et al.*, 2010; Mizuki *et al.*, 1999).

Inicialmente, cuando las PS fueron descubiertas, se reconocieron como proteínas Cry con propiedades no insecticidas y no hemolíticas, sin embargo, a través del tiempo, su estudio llevó a considerarlas nuevas proteínas dados los hallazgos sobre sus efectos tóxicos sobre células de origen canceroso, por lo cual en mayo del 2006 se surge un Comité de Clasificación y Nomenclatura de Parasporina (<http://parasporin.fitc.pref.fukuoka.jp/>). Ahora se sabe que las PS no poseen actividad hemolítica, pero pueden tener o no actividad insecticida, con actividad preferencial contra células cancerosas humanas y no sobre las células humanas no cancerosas, lo que llevó a llamar a estas proteínas como PS definiéndolas, así como “*B. thuringiensis* y proteínas parasporales bacterianas relacionadas que no son hemolíticas pero capaces de matar preferentemente las células cancerosas” (Mendoza Almanza, *et al.*, 2020; Xu, *et al.*, 2014).

En todo el mundo se han identificado alrededor de 19 PS en 6 familias distintas, de la PS1 a la PS6, en países como Japón, Vietnam, India, Canadá, y las Islas Caribe, presentando diferentes espectros citotóxicos, pesos moleculares y estructura (Tabla 2), estas proteínas se encuentran referenciadas en al menos 47 publicaciones y artículos conocidos hasta el 2015 (<http://parasporin.fitc.pref.fukuoka.jp/>) (Lenina, *et al.*, 2014; Akiba & Okumura, 2016; Velásquez C. *et al.*, 2018)

Tabla 2: Lista de publicaciones relacionadas con PS de *B. thuringiensis* (<http://parasporin.fitc.pref.fukuoka.jp/>)

Nombre	Cry No.	Acc No.	Autores	Año	Fuente Cepa	Referencia*
PS1Aa1	Cry31Aa1	AB031065	Mizuki <i>et al.</i>	2000	A1190	4) Mizuki <i>et al.</i> , 2000
PS1Aa2	Cry31Aa2	AY081052	Jung & Côté	2002	M15	23) Jung <i>et al.</i> , 2007
PS1Aa3	Cry31Aa3	AB250922	Uemori <i>et al.</i>	2006	B195	27) Uemori <i>et al.</i> , 2008
PS1Aa4	Cry31Aa4	AB274826	Yasutake <i>et al.</i>	2006	<i>B. thuringiensis</i> 79-25	26) Yasutake <i>et al.</i> , 2008
PS1Aa5	Cry31Aa5	AB274827	Yasutake <i>et al.</i>	2006	<i>B. thuringiensis</i> 92-10	26) Yasutake <i>et al.</i> , 2008
PS1Aa6	Cry31Aa6	AB375062	Nagamatsu <i>et al.</i>	2010	CP78A, M019	35) Nagamatsu <i>et al.</i> , 2010
PS1Ab1	Cry31Ab1	AB250923	Uemori <i>et al.</i>	2006	B195	27) Uemori <i>et al.</i> , 2008
PS1Ab2	Cry31Ab2	AB274825	Yasutake <i>et al.</i>	2006	<i>B. thuringiensis</i> 31-5	26) Yasutake <i>et al.</i> , 2008
PS1Ac1	Cry31Ac1	AB276125	Yasutake <i>et al.</i>	2006	<i>B. thuringiensis</i> 87-29	26) Yasutake <i>et al.</i> , 2008
PS1Ac2	Cry31Ac2	AB731600	Kuroda <i>et al.</i>	2012	B0462	in preparation
PS1Ad1	Cry31Ad1	AB375062	Nagamatsu <i>et al.</i>	2010	CP78B, M019	35) Nagamatsu <i>et al.</i> , 2010

PS2Aa1	Cry46Aa1	AB099515	Ito & Kitada	2004	A1547	9) Itoh <i>et al.</i> , 2004
PS2Aa2	Cry46Aa2	AB454419	Ishikawa <i>et al.</i>	2008	A1470	in preparation
PS2Ab1	Cry46Ab1	AB186914	Yamagiwa <i>et al.</i>	2004	TK-E6	25) Hayakawa <i>et al.</i> , 2007

PS3Aa1	Cry41Aa1	AB116649	Yamashita <i>et al.</i>	2005	A1462	13) Yamashita <i>et al.</i> , 2005
PS3Ab1	Cry41Ab1	AB116651	Yamashita <i>et al.</i>	2005	A1462	13) Yamashita <i>et al.</i> , 2005

PS4Aa1	Cry45Aa1	AB180980	Okumura & Saitoh	2004	A1470	10) Okumura <i>et al.</i> , 2004

PS5Aa1	Cry64Aa1	AB555650	Ekino & Shin	2009	A1100	in preparation

PS6Aa1	Cry63Aa1	AB375063	Nagamatsu <i>et al.</i>	2010	CP84, M019	35) Nagamatsu <i>et al.</i> , 2010

Las PS necesitan ser hidrolizadas por proteasas en puntos específicos para su activación, en este caso por un pH muy alcalino o muy ácido, y dirigido por una serín proteasa, como la Proteínasa K o Tripsina; muestran alta citotoxicidad hacia células humanas de origen canceroso, pero baja o nula hacia células sanas; y poseen bajos porcentajes de identidad con proteínas Cry insecticidas (Espino V, 2014; Mourad A. M, 2019; Velásquez C, *et al.*, 2018)

Se han identificado dos tipos de PS de acuerdo a su estructura (Figura 3): **1)** Tipo toxina Cry, aquella que contienen tres dominios con 5 bloques altamente conservados, se expresan en forma nativa de aproximadamente 80 kDa y se procesan en forma activa de aproximadamente 60 a 70 kDa, se encuentra las PS1, PS3, y PS6, y **2)** Tipo formadora de poro (Beta-PFT) las cuales corresponden a toxinas Cry con similitud a MTX (toxinas de *L. sphaericus*), ambas tienen una secuencia limitada con un grupo B-PFT representada por *Aeromonas hydrophila* aerolisina, en forma nativa se encuentra entre 31-37 kDa y en forma activa de 27-30 kDa, se encuentran las proteínas PS2, PS4 y PS5 (Akiba & Okumura, 2016; Ekino, *et al.*, 2014).

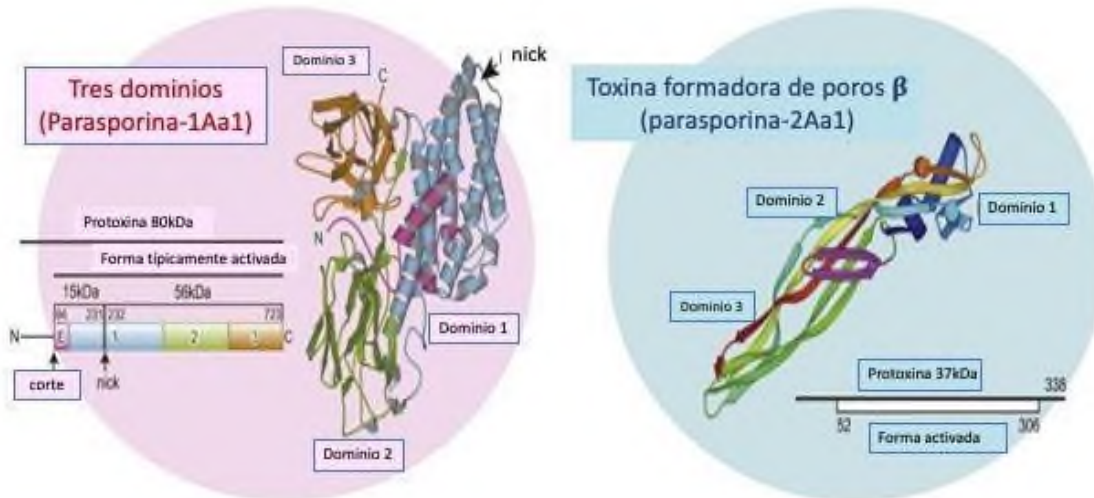


Figura 3: Diferencias estructurales entre los dos tipos de PS, del lado izquierdo las proteínas de tipo 3-dominios (PS1Aa1) y lado derecho las PS tipo formadora de poro (PS2Aa1). Imagen tomada y modificada de Akiba & Okumura, 2016.

PS1 (PS1Aa1) fue la primer PS descubierta y hasta ahora la más estudiada, produce una protoxina de 81 kDa y en su forma activa genera dos polipéptidos uno de un peso molecular de 15 kDa y 56 kDa, esta proteína ha demostrado un amplio espectro citotóxico en líneas celulares cancerígenas como MOLT-4 (leucemia de células T), HepG2 (células de cáncer de hígado), Jurkat (leucemia), Sawano (células de cáncer endometrial), de entre las cuales se destacan HeLa (cáncer de cérvix, LD₅₀ 0.12 µg/mL), HL-60 (cáncer de leucemia promielocíticas, LD₅₀ 0.32 µg/mL) ambas respectivamente sensibles a esta proteína, mientras que no se ha detectado toxicidad en células humanas sanas, como las células musculares lisas del útero, hepatocitos y células T de sangre periférica (Velásquez C, *et al.*, 2018; Mendoza Almanza, *et al.*, 2020). La PS1 no induce despolarización ni aumento en la permeabilidad membranal (formación de poros), induce la entrada de Ca²⁺ activando probablemente la vía de señalización apoptótica (Akiba & Okumura, 2016; Ekino, *et al.*, 2014).

Las PS2 generalmente se encuentran como protoxinas en tamaños de 37 kDa, y en forma activa de 30 kDa, ejerciendo efecto citotóxico en líneas celulares cancerígenas como HepG2, Jurkat, CACO-2 (células de cáncer de colon), MOLT-4 y HL-60, el valor de LD₅₀ para estas células es alrededor de 20 ng/mL y provoca menor toxicidad hacia células HeLa y hepatocitos normales. En algunos estudios el tipo de muerte ejercida por estas proteínas ocasiona apoptosis en su mayoría (Brasseur, *et al.*, 2015; Velásquez C, *et al.*, 2018), sin embargo, en otros casos no existe la certeza

de que sea apoptosis, ya que genera cambios morfológicos notables como hinchazón, ampollas, y lisis, así como el desmontaje de microtúbulos, el enredo de los filamentos de actina y fragmentación de mitocondrias y retículas endoplasmáticas; estos cambios están acompañados por la localización de la proteína en la membrana plasmática y un rápido aumento de la permeabilidad de la membrana. La PS2Aa1 es la única PS de estructura conocida por difracción de rayos X, (Akiba & Okumura, 2016).

La PS3 (PS3Aa1 y PS3Ba1) fue la primera toxina notificada con arquitectura única de 3 dominios y es la única proteína con dominio de ricina. Se ha sugerido que esta proteína tenga un modo de acción similar a las proteínas Cry de tres dominios, se sabe que estas proteínas generan muerte necrótica, por la formación de poros en la membrana plasmática, demostrado por la liberación de lactato deshidrogenasa (LDH) en líneas celulares como HL-60 y HepG2 (Velásquez C, *et al.*, 2018; Xu, *et al.*, 2014)

La PS4 tiene similitud con las PS2, sin embargo, solo 1 de 3 ha sido caracterizada, PS4Aa1, se presenta en protoxina de 30 kDa, y como toxina en 27 kDa, cuando la PS4 es solubilizada en pH ácido aumenta su citotoxicidad, hasta ahora se sabe que provoca inflamación y lisis celular después de 24 h de exposición, su mecanismo de acción genera liberación de LDH, permeabilización de la membrana en células MOLT-4 y baja activación de caspasas, sugiriendo necrosis (Velásquez C, *et al.*, 2018). Exhibe una fuerte citotoxicidad en células tumorales MOLT-4, CaCo-2, HL-60, U937, HepG2, Sawano, DE-4 (leucemia), TS (cáncer uterino), TCS (cáncer cervical) y especialmente sobre CACO-2 (Mendoza Almanza, *et al.*, 2020)

Las PS5 (PS5Aa1) es el único miembro de la familia, como protoxina se encuentra en un tamaño de 33.8 kDa, y en forma activa en un tamaño de 29.8 kDa, es altamente tóxico para la línea celular MOLT-4, Jurkat, HL-60, HepG2, HeLa, Sawano, TCS, CaCo-2 y K562, sin embargo, también muestra una actividad potente contra las células de tejido sano como UtSMC (útero normal) y MRC-5 (pulmón normal), aun no se han estudiado el mecanismo de acción de esta PS. (Velásquez C, *et al.*, 2018; Mendoza Almanza, *et al.*, 2020; Ekino, *et al.*, 2014)

La PS6 es una de las PS de reciente descubrimiento, está estrechamente relacionada con PS1 y PS3, compartiendo una secuencia de 5 aminoácidos, como protoxina tiene un tamaño de 84 kDa, y como toxina consta de dos partes una equivalente a un tamaño de 59 kDa y 14 kDa. Es

selectivamente tóxico en células cancerígenas HepG2 y HeLa, sin embargo, el mecanismo de acción por el cual matan las células es desconocido, presenta el 56.4% de homología con la toxina Cry2 lo que sugiere un mecanismo similar (Xu, *et al.*, 2014; Velásquez C, *et al.*, 2018; Ekino, *et al.*, 2014).

2.2. Muerte celular

La muerte celular es una parte fundamental del proceso de ciclo de vida celular y la regulación homeostática de un organismo multicelular. La muerte celular puede ser esporádica, ya sea por factores internos y/o externos, o programada a través de rutas bioquímicas diferentes y puede estar clasificada de acuerdo con criterios morfológicos como necrosis, apoptosis o autofagia (Baynes & Dominiczak, 2019).

2.2.1. Apoptosis

A menudo el proceso de apoptosis es considerado como una muerte celular programada, que depende de varios mecanismos de energía y características morfológicas distintas, que implica la eliminación genética de determinadas células, sin embargo, en trabajos recientes se han reportado otras formas distintas de muerte celular programada (Baynes & Dominiczak, 2019)

Existe una amplia variedad de estímulos y condiciones que pueden desencadenar en apoptosis, tanto físicas como biológicas, sin embargo, no todas las células morirán en respuesta al mismo estímulo, en algunos casos el tipo y/o grado de estímulo determina si una célula muere por apoptosis o necrosis, incluso estos procesos pueden ocurrir secuencial o simultáneamente. Para la apoptosis, un proceso de energía a menudo conlleva a la activación de una cascada de señalización en donde participan un grupo de proteínas denominadas caspasas, cuya etapa final es la desaparición de la célula (Elmore, 2007). En etapas avanzadas de la apoptosis, la célula exhibe cambios morfológicos caracterizados por condensación nuclear y citoplasmática y fragmentación celular en cuerpos apoptóticos unidos a la membrana. Estos cambios morfológicos pueden observarse mediante microscopía óptica y se correlacionan inicialmente con grandes fragmentos de ADN cromosómico y, posteriormente, muy pequeños (Wyllie *et al.*, 1981). De hecho, otras características morfológicas de la apoptosis ocurren en ausencia de fragmentación de ADN detectable o una disminución en el contenido de ADN (Cohen *et al.*, 1992).

La microscopía ha identificado diversos cambios morfológicos durante la apoptosis, como la contracción celular (el encogimiento de la célula) y picnosis, que involucra que la célula adquiera una morfología redonda, retracción de los pseudópodos, reducción del volumen nuclear y celular, condensación y fragmentación de la cromatina, abultamientos de la membrana plasmática, formación de cuerpos apoptóticos e invaginación por parte de los fagocitos residentes in vivo (Baynes & Dominiczak, 2019; Elmore, 2007). La fragmentación internucleosomal del ADN genómico ha sido el sello bioquímico de la apoptosis durante muchos años (Wyllie, 1987). El proceso de muerte celular se ejecuta de forma organizada reflejando la presencia de vías moleculares bien conservadas. A inicios de este siglo, se implicó a la proteólisis selectiva de sustratos celulares vitales como el mecanismo molecular clave de los cambios apoptóticos (Saraste and Pulkki, 2000). Derivado de esta observación, se han hecho estudios en extractos citosólicos de células a las que se les ha sincronizado la inducción de la apoptosis, demostraron que este mecanismo de muerte puede dividirse en dos fases, la bioquímica y morfológica, respectivamente. En la primera, los estímulos proapoptóticos desencadenan la activación de toda una maquinaria molecular central de la apoptosis, fase de inicio. En la segunda fase, llamada efectora, la maquinaria ejecutora molecular se activa por completo, induciendo cambios apoptóticos en los núcleos. Solo después de esto, en la tercera fase de degradación, se hacen evidentes las características de la apoptosis. Estos incluyen cambios morfológicos y fragmentación del ADN (Lazebnik *et al.*, 1993; Solary *et al.*, 1993).

2.2.2. Necrosis

Por mucho tiempo se conocía a la necrosis como un tipo de muerte alternativa a la apoptosis, sin embargo, recientes estudios indican que varios estímulos pueden causar apoptosis y necrosis en la misma población celular (Ya Proskuryakov, *et al.*, 2003), además la necrosis puede controlarse o iniciarse mediante una vía de señalización específicas en las que intervienen principalmente RIP serina/treonina cinasas. Este tipo de necrosis se denomina necroptosis y se ha observado en células tumorales, en células proliferativas que han sufrido daños del ADN y en células infectadas por virus (vaccinia) (Baynes & Dominiczak, 2019)

Pareciera que la apoptosis y necrosis fuese un proceso continuo, pero las consecuencias de ambos son completamente distintas para todo un organismo, pues el proceso final de necrosis consiste en el derrame celular de los componentes citosólicos al espacio extracelular por el rompimiento

de la membrana provocando una respuesta inflamatoria. Otras características que podemos observar en una muerte por necrosis es el aumento del volumen celular y tumefacción de los orgánulos (Ya Proskuryakov, *et al.*, 2003; Baynes & Dominiczak, 2019).

2.3. Análisis de Imagen

Una de las técnicas utilizadas para estudiar a las PS han sido técnicas microscópicas las cuales son ampliamente utilizadas como método primario para estudiar el desarrollo y las funciones celulares, además permiten analizar una gran cantidad de datos a partir de imágenes, por ejemplo, las células que se encuentran en apoptosis avanzada muestran cambios caracterizados por una condensación nuclear y citoplásmica, y fragmentación celular en cuerpos apoptóticos unidos a la membrana, estos cambios son observados por microscopía óptica y se relacionan normalmente con una disminución en el cambio de tamaño de ADN cromosómico (Bavis kar, 2011; Helmy & Abdel Azim, 2012).

La investigación biológica moderna se ha forzado en transformar el uso del microscopio, aumentando capacidades técnicas de procesamiento de imágenes. Esta transformación va desde los análisis cualitativos hasta los cuantitativos (Eliceiri, 2016). El análisis de imagen es una herramienta útil para evaluar de forma preliminar los cambios morfológicos celulares, el objetivo es acelerar mediante los procesos computacionales, el trabajo rutinario y al mismo tiempo, obtener resultados cuantitativos (Scidelin, *et al.*, 2015). Un ejemplo de su gran uso está en la determinación de la tasa de apoptosis celular, que es un parámetro significativo en muchos experimentos. La cinética de muerte celular puede medirse contando el número de células y/o el área ocupada en cada placa de cultivo analizando imágenes tomadas en diferentes momentos de su evolución (Malpica *et al.*, 2003); ya que como se sabe en etapas avanzadas de la apoptosis, las células muestran cambios morfológicos caracterizados por la condensación nuclear y citoplasmática, y la fragmentación de los cuerpos apoptóticos unidos a la membrana, estas alteraciones pueden observarse mediante microscopía óptica (Carpenter *et al.*, 2006).

2.3.1. ImageJ

ImageJ es un programa flexible y gratuito, basado en Java, desarrollado por científicos de la Institutos Nacionales de Salud (NIH, por sus siglas en inglés) y descargable en sistemas operativos como Windows, Mac OS, Mac OS X y Linux (Helmy & Abdel Azim, 2012; Bavis kar, 2011). ImageJ ha resultado ser eficiente en trabajos de investigación, ya que puede medir resultados sutiles,

pero altamente significativos, como la disminución del tamaño celular o área, sobre todo si este programa se utiliza en combinación con colorantes adecuadas para teñir las partes celulares de las que se deseen obtener más (Abdul Rahman, *et al.*, 2013)

ImageJ mide la distancia en píxeles, y los transforma en la unidad definida por el usuario, tiene funciones estándares como manipulación de contraste, nitidez, brillo, suavizado, detección de bordes y filtrado medio, las aplicaciones en estudios biológicos permiten comparar y cuantificar componentes celulares y subcelulares, estimar concentraciones de ADN y proteínas, y analizar procesos como la quimiotaxis y migración celular (Bavis kar, 2011).

El factor de área nuclear (NAF) es un indicador temprano para la identificación de cambios morfológicos de apoptosis y puede ser cuantificado con ImageJ, con la excepción de que el núcleo celular permanezca intacto y no exista fragmentación del ADN. Un conteo de núcleos podría ser una buena opción, sin embargo, puede producir variación debido a la incapacidad de precisión cuando existe interposición de núcleos, ya que ImageJ tiene la desventaja de no contar con una herramienta para separar células aglomeradas (Helmy & Abdel Azim, 2012)

En un estudio realizado por Helmy & Abdel Azim en el 2012, obtuvieron valores como el área de superficie, perímetro (longitud exterior) y la circularidad automáticamente en ImageJ para después calcular el valor de NAF mediante el producto de la zona nuclear y la circularidad, en ImageJ el valor de circularidad equivalente a 1 indica un círculo perfecto, mientras que los valores cercanos a 0 indican un polígono irregular alargado. El valor de circularidad para partículas muy pequeñas puede dar lugar a valores no válidos y se recomienda más estudios antes de utilizarlo como uso rutinario, sin embargo, nos da un acercamiento a los posibles cambios morfológicos que pudieran presentarse en la célula.

En la presente tesis, se utiliza la herramienta ImageJ para calcular el perímetro y el área celular de las células MCF-7 post tratamiento con la proteína la cepa AC5 de *B. thuringiensis*. Se decidió evaluar el área celular y los cambios morfológicos, para después contrastarlo con los valores de las células control y dar un acercamiento del tipo de muerte celular ejercido por estas PS.

3. JUSTIFICACIÓN

La necesidad de encontrar nuevas alternativas de tratamientos más eficaces y específicos contra el cáncer ha conducido al hallazgo de un sin número de moléculas con actividad antineoplásica. Una de ellas son las proteínas producidas por *B. thuringiensis* con actividad citotóxica selectiva contra células de origen canceroso llamadas PS y que han sido ampliamente estudiadas con posibles mecanismos de acción a través de la interacción con la membrana celular cancerosa que es mediada por receptores específicos reconocidos por la PS, esta interacción conduce a un daño a nivel de membrana que lleva a encender el mecanismo de muerte conocido como apoptosis. Dada la importancia y necesidad de buscar tratamientos seguros y eficaces contra el cáncer, el grupo de investigación se dio a la tarea de aislar cepas de *B. thuringiensis* y de ellas hacer una búsqueda de proteínas con actividad citotóxica contra diferentes tipos de cáncer, así como, determinar cuál es mecanismo de muerte asociado con dicha actividad, haciendo uso de diferentes metodologías que nos permitan determinar de forma sencilla dicho mecanismo. Por lo que, este trabajo tiene como objetivo principal encontrar una proteína con actividad anticancerígena en la cepa AC5 de *B. thuringiensis* y evaluar mediante un análisis de imagen los cambios morfológicos en la célula sufridos después del tratamiento con la inclusión proteicas de las cepas de AC5 y la PS4 de IB84.

4. HIPÓTESIS

La cepa AC5 de *B. thuringiensis* contiene una inclusión proteica con actividad citotóxica sobre las células MCF-7 de cáncer de mama, así mismo la PS4 de la cepa IB84 tiene un efecto citotóxico en esa misma línea celular.

5. OBJETIVOS

Encontrar una inclusión proteica con actividad citotóxica en la cepa AC5 de *B. thuringiensis* sobre la línea celular MCF-7, así como demostrar que la PS4 de la cepa IB4 tendrá actividad antiproliferativa sobre la línea MCF-7.

5.1. Objetivos específicos

1. Aislar el cristal parasporal a partir de cultivos de la cepa AC5 de *B. thuringiensis*.
2. Identificar una inclusión proteica con posible actividad anticancerígena.
3. Determinar la actividad anticancerígena en la línea celular MCF-7 de cáncer de mama.
4. Analizar los cambios morfológicos de las células MCF-7 a diferentes tiempos de exposición y de concentración de las inclusiones proteicas.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Material Biológico

La Universidad del Papaloapan campus Tuxtepec cuenta con una colección de cepas bacterianas de *B. thuringiensis* aisladas de la Región del Papaloapan tanto de suelos cultivados como no cultivados. Las cepas de *B. thuringiensis* están almacenados en forma de esporas, estas esporas están contenidas en discos de papel filtro para un mejor manejo. En la Tabla 3 se muestra el nombre de las cepas y el tipo de suelo de cultivo de procedencia (Cruz Nolasco, 2017).

Tabla 3: Cepas de *B. thuringiensis* aisladas de suelos en la Cuenca del Papaloapan (Cruz Nolasco, 2014).

Cepa de <i>B. thuringiensis</i>	Tipo de suelo	Cepa de <i>B. thuringiensis</i>	Tipo de suelo
AC-1	No cultivado	AX	Caña
AC-2	No cultivado	A-5	Caña
AC-3	Plátano	A-9	Plátano
AC-5	Café	A-13	Caña
AC-6	Plátano	A-24	Caña
AC-7	Café	A-34	Caña
AC-8	Plátano	A-35	Caña

Los antecedentes filogenéticos conocidos de estas cepas, indican que AX, HD1, AC5, A10, A5 y A24, provienen de cepa A34 como ancestro en común; quien mostró una relación filogenética con cualquiera de las variedades del grupo de *B. thuringiensis serovar tolworthi* (Martínez Hernández, 2019). La cepa IB84 fue donada de la colección de cepas de *B. thuringiensis* del Laboratorio de Dr. Benito Pereyra Alférez del Instituto de Biotecnología Facultad de Ciencias Biológicas-UANL.

6.2. Producción del cristal parasporal de la cepa AC5 de *B. thuringiensis*

Para obtener el cristal parasporal de la cepa AC5 de *B. thuringiensis*, la cepa se cultivó bajo las siguientes condiciones: 300 mL de caldo nutritivo con agitación a 180 rpm, temperatura 30°C durante 7 días hasta alcanzar al menos el 90% de las esporas libres. Se realizó el mismo procedimiento para *B. thuringiensis* IB84.

Al finalizar la fermentación, se realizó la tinción de Schaeffer y Fulton para verificar la presencia de esporas. Posteriormente, el cultivo líquido se recuperó en tubos cónicos de 50 mL, se centrifugó a 5500 rpm por 15 min a 4°C, y se desechó el sobrenadante al término del proceso. El paquete celular resultante, el cual contenía los cristales proteicos insolubles, se resuspendió en 5 mL de agua destilada y se centrifugó a las mismas condiciones. En seguida, se realizaron lavados

para desactivar las proteasas que produce *B. thuringiensis*. Primeramente, se hicieron 3 lavados con una Ácido Clorhídrico pH=1.8, un lavado con agua destilada, 3 lavados con solución isotónica (NaCl 0.85% p/v), y finalmente un lavado con agua destilada. En cada lavado se realizó una centrifugación (5500 rpm, 15 min y 4°C), al concluir cada centrifugación la pastilla formada se resuspendió con 5 mL de la solución correspondiente empleando un vórtex. Finalmente, la pastilla se disgregó en 5 mL de agua destilada (Cruz Nolasco, 2014).

6.3. Selección de las Inclusiones proteicas

Las muestras lavadas se solubilizaron según el método de Laemmli. Consecutivamente se realizó una separación electroforética de proteínas usando geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) al 12%. La electroforesis se llevó a cabo empleando la solución amortiguadora Tris-glicina 1X a 100 volts durante 120 min (Yábar Varas, 2003; Castrejón Arroyo, 2019). Se utilizó albúmina sérica bovina (BSA, 63kDa) como proteína de referencia, un marcador de peso molecular para geles del 4 al 20% (PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder) y la cepa de referencia de *B. thuringiensis var.kurstaki* HD-73 que produce una sola proteína de 133 kDa (Cry1Ac) (Castrejón Arroyo, 2019).

A partir del perfil electroforético resultante de los cristales de cepa AC5 *B. thuringiensis*, se seleccionaron las inclusiones proteicas alrededor de 30 kDa, debido a dos razones, 1) el marcaje muy perceptible de la banda; debido a que en este rango de pesos se presentaban dos bandas muy marcadas y unidas, se decidió cortar ambas y considerarlas como una sola inclusión proteica y, 2) se sabe que bandas proteicas de *B. thuringiensis* con tamaños de entre 25 a 70 KDa han mostrado actividad antiproliferativa sobre líneas celulares de origen canceroso por ejemplo, en 2004 encontraron que una banda proteica de la cepa A1547 de *B. thuringiensis* de 30 kDa tuvo actividad citotóxica contra diferentes células de cáncer humano principalmente contra células T leucémicas humanas, MOLT-4 (Ito et al., 2004), en 2010 un aislado de Malasia denominado Bt18 produjo una proteína parasporal citotóxica de 68 kDa preferencial para las células T leucémicas humanas (CEM-SS) (Krishnan, et al., 2010); y, en 2010 Yasunori y colaboradores, encontraron proteínas de 70 y 73 kDa con actividad citocida preferentemente hacia células de cáncer de hepatocito humano (HepG2) y células de cáncer de cuello uterino (HeLa), que causaban inflamación celular y formación de vacuolas en el citoplasma.

6.4. Purificación y cuantificación

Las proteínas de las bandas recortadas se recuperaron mediante electroelución a 10 mA por 3.5 h en agitación 120rpm. Las muestras eluidas y que contenían SDS, fueron dializadas para eliminar la mayor cantidad posible de este detergente. Para ello, se empleó una membrana de diálisis (Sigma-Aldrich MWCO: 12000), la cual fue sellada y sumergida en PBS 1X durante 24h en agitación, la solución amortiguadora fue reemplazado por limpio cada 4 h para mantener una temperatura máxima de 25°C.

Para la cuantificación de la proteína se realizó una curva de calibración utilizando reactivo de Bradford, con las concentraciones de 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.12 y 0 µg/mL de BSA. Al término de la reacción las muestras fueron leídas a 595 nm (lector de microplacas iMark™ BIO-RAD). Como segundo método para cuantificación de proteínas se utilizó el NanoDrop (2000/2000c, Protein A280).

6.5. Bioensayos Dosis Respuesta

6.5.1. Línea celular

Para evaluar la actividad anticancerígena de la inclusión proteica aislada de la cepa AC5 de *B. thuringiensis*, se utilizó la línea celular MCF-7 de cáncer de mama, la cual fue donada por la Dra. Luz del Carmen Camacho Castillo del Instituto Nacional de Pediatría de la Ciudad de México.

Las características generales fueron recabadas en ATCC (American Type Culture Collection, www.atcc.org) (Figura 4). La línea celular MCF-7 proveniente del organismo *Homo sapiens*, es una célula de tipo y morfología epitelial, obtenida de la glándula mamaria de una mujer de etnicidad caucásica de 69 años. El medio base para esta línea celular es el DMEM (10% SFB, 1% penicilina/streptomicina) (Dulbecco's Minimum Essential Medium, por sus siglas en inglés).

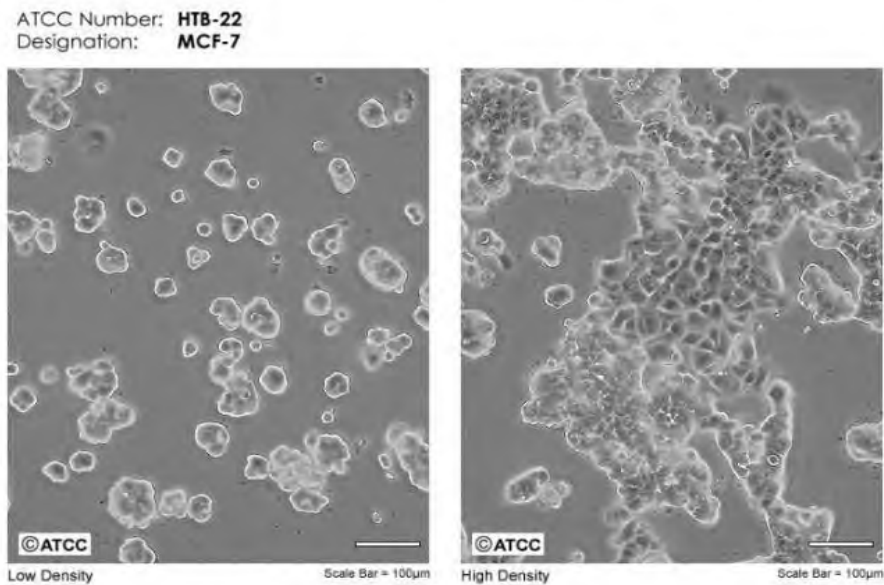


Figura 4: Morfología de la línea celular MCF-7 a baja y alta densidad (www.atcc.org).

6.5.2. Cultivo de células

La línea celular MCF-7 se descongeló a temperatura ambiente y rápidamente se colocó en 5 mL medio DMEM suplementado con 10% de SFB y 1% de p/s. Para eliminar el DMSO que contiene el medio de crioconservación, las células se centrifugaron a 1200 rpm a 24°C durante 10 min, se desechó el sobrenadante y el paquete celular resultante se resuspendió en 2 mL de DMEM suplementado los cuales fueron llevados a un volumen final de 9 mL en un frasco de cultivo de 25 mm, para enseguida incubar a 37°C, 5% CO₂ y 95% de humedad, el crecimiento celular fue verificado mediante microscopía usando un microscopio invertido trinocular de contraste de fases.

Para los ensayos de citotoxicidad, al frasco de cultivo que contenía las células MCF-7 se le retiró el medio DMEM y se lavaron las células con 5 mL de PBS, enseguida se agregó 1 mL de tripsina y se incubó por 2 min a las condiciones de cultivo; transcurrido el tiempo se verificó que las células estuvieran levantadas. Posteriormente, se añadieron 2 mL de medio DMEM suplementado para neutralizar la acción de la tripsina. Posteriormente, las células se colocaron en un tubo cónico de 15 mL y se centrifugó a 1200 durante 10 min. Inmediatamente después, el paquete celular se resuspendió en 1 mL de DMEM suplementado y se disgregó el paquete celular. De esta suspensión celular, se preparó una dilución 1:20 para calcular el número de células presentes en

la suspensión, para ello, se tomaron 11 μL y se colocaron en la cámara de Neubauer para el conteo. El número de células se calculó utilizando la siguiente fórmula:

Número de células

$$= \text{promedio de los 4 cuadrantes de la celda} * \text{factor de dilución} * 10,000$$

Para cada ensayo se sembraron 20,000 células/pozo, en placas de 96 pozos. Las células se incubaron por 24 h a 37°C y 5% CO₂ para permitirles adherirse a la placa.

6.5.3. Curva dosis respuesta: determinación de la actividad citotóxica

Para evaluar la actividad citotóxica de las proteínas, se diseñó una curva dosis respuesta con las siguientes concentraciones 0.625, 1.25, 2.5, 5, 10 y 20 $\mu\text{g/mL}$, como control negativo se colocó DMEM suplementado y se le consideró como la concentración 0. Además, se usó como control positivo doxorubicina (inductor de apoptosis) y peróxido de hidrógeno (inductor de necrosis). Se realizaron 3 experimentos independientes cada uno por triplicado.

6.5.4. Ensayo de viabilidad celular (MTT)

El método del MTT se basa en la reducción metabólica del bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) por la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa en un compuesto de color azul (formazán, cristales insolubles en agua), permitiendo determinar la funcionabilidad mitocondrial de las células tratadas. Este método ha sido muy utilizado para medir supervivencia y proliferación celular. La cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán producido. Este método fue desarrollado por Mosmann en 1983, como un método colorimétrico para medir la viabilidad celular.

Pasado las horas de tratamiento de ambas las proteínas, las placas se sacaron de la incubadora y en cada uno de los pozos que contenían un volumen de 200 μL , se colocó 10 μL de MTT (5 mg/mL), previamente preparado y disuelto en PBS. Se dejó incubar a 37°C por 4 h. Al término del tiempo incubado se retiró todo el medio y los cristales producidos fueron disueltos con 100 μL de isopropanol y DMSO en una concentración 1:1, se determinó la absorbancia a 595 nm en un lector de microplacas (Modulus microplate- ELISA). Estos valores se utilizaron para realizar una curva dosis-respuesta y determinar el valor de IC₅₀.

El IC₅₀ es la concentración de un compuesto que es necesaria para inhibir la actividad biológica en un 50% en comparación con un control sin tratamiento. Por lo tanto, cuanto menor sea IC₅₀,

mayor será la eficacia del compuesto para inhibir la actividad biológica, esta se puede obtener aplicando la siguiente fórmula

$$IC_{50} = (C1 + C2)/2$$

Donde C1 y C2 son las concentraciones del compuesto en las que se produce el efecto biológico del 25% y el 75%, respectivamente.

6.6. Adquisición de micrografías y análisis de imagen

Las micrografías fueron tomadas en un Microscopio Invertido Trinocular de contraste de fases de la Marca MOTIC, modelo: AE31E, utilizando el programa Motic Images Plus 3.0. Para la obtención del área total de las células se empleó el software acceso libre *ImageJ* (ANEXO A).

6.7. Pruebas de seguridad farmacológica

Para evaluar la seguridad farmacológica de la inclusión proteica de 26 kDa producida por la cepa AC5 de *B. thuringiensis*, se realizó un ensayo de hemólisis y un ensayo de toxicidad en cultivo primario de células mononucleares de sangre periférica (CMSP).

6.7.1. Prueba de hemólisis

Esta prueba evalúa la actividad hemolítica de la inclusión proteica sobre eritrocitos humanos como parte de uno de los criterios establecidos por el Comité de Clasificación y Nomenclatura de Parasporinas (<http://parasporin.fitc.pref.fukuoka.jp/>) así como evaluar la capacidad citotóxica sobre células no cancerosas.

Para ello, se extrajeron 5 mL de sangre de un donante humano sano, en un tubo Vacutainer® recubierto con K2-EDTA (anticoagulante), el cual evitará la coagulación de muestra sanguínea. Posteriormente, se centrifugó a 500 *xg* durante 5 min, concluida la centrifugación, con un plumón de tinta indeleble se marcaron los niveles de hematocrito (rojo, fase inferior) y plasma (líquido de color amarillento, parte superior) en el tubo. Se aspiró el plasma y se desechó en un recipiente que contenía hipoclorito de sodio (1:10). El volumen de plasma se sustituyó por una solución de NaCl 150 mM y se mezcló el contenido celular con dicha solución mediante inversión suavemente. La mezcla se centrifugó a 500 *xg* durante 5 min. Estos dos últimos pasos se repitieron una vez más. Se aspiró el sobrenadante y se reemplazó con PBS a pH 7.4. Nuevamente se mezcló invirtiendo suavemente el tubo, se centrifugó a 500 *xg* durante 5 min y se descartó el

sobrenadante por aspersion, se agregaron 12 mL de PBS a 3 mL de suspension de eritrocitos y se mezcló.

Se prepararon diluciones seriadas para lograr la concentracion deseada en un volumen de 200 μ L, se aadiaron 190 μ L de sangre roja diluida + 10 μ L de la inclusion proteica, en un microtubo de 1.5 mL. Cada dilucion se evaluó por triplicado, como control positivo se utilizaron 10 μ L de Tritón X-100 al 20 % y para los pocillos marcados como control negativo se les agregaron 10 μ L de PBS. Se incubaron los tubos a 37 °C durante una hora y se centrifugaron las placas durante 5 min a 500 xg para sedimentar los eritrocitos intactos.

Nota: al retirar la placa de la centrifuga y transportarla al siguiente paso, manéjese con cuidado y asegúrese de no romper el sedimento celular.

Posteriormente se transfirieron 100 μ L de sobrenadante de cada pocillo a una placa transparente de 96 pocillos de fondo plano y se midió la absorbancia de los sobrenadantes con un lector de placas a 541 nm.

6.7.2. Ensayo de toxicidad en células mononucleares de sangre periférica

Las células mononucleadas de sangre periférica (CMSP) fueron aisladas de sangre de un donante sano, siguiendo los principios expresados en la Declaración de Helsinki. La extracción de células mononucleadas de sangre periférica se realizó en dos pasos:

1. Recolección de la muestra: se tomaron 15 mL sangre periférica de un donador sano, mediante punción venosa utilizando tubos con K2-EDTA tipo Vacutainer®.
2. Separación de células: En tubos cónicos de 15 mL se colocaron 7 mL Histopaque-1077 y se agregaron lentamente por las paredes del tubo 7 mL de sangre periférica. Todos los tubos se centrifugaron durante 30 min a 1000 rpm. Las CMSP se pasaron a un tubo cónico nuevo y se centrifugó durante 15 min a 1800 rpm, la pastilla resultante se resuspendió en medio RPMI suplementado con 10 % suero fetal bovino y antibiótico penicilina/estreptomicina al 1 %. Posteriormente, las CMSP se contaron usando una cámara de Neubauer y se sembraron 2.5×10^5 células/mL. Las células fueron mantenidas a una atmósfera de 5 %, CO₂ y humedad saturada (95 %) a 37 °C.

Ensayo de MTT

Para determinar la citotoxicidad de las proteínas elegidas sobre las CMSP se hará mediante un ensayo de MTT, permitiendo determinar la funcionalidad mitocondrial de las células tratadas (Mosmann, 1983).

Para esto las CMSP fueron expuestas a concentraciones de 0.625, 1.25, 2.5, 5, 10 y 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de la proteína de 26 kDa de la cepa de AC5 de *B. thuringiensis* durante 24 h. Transcurrido el tiempo de incubación, se añadieron 5 mg/mL de MTT y se incubó por 4 h a las condiciones de cultivo. Finalmente, se retiró el medio y se agregaron 100 μL de isopropanol, para disolver los cristales de formazán formados. Se tomaron las lecturas de absorción a 595 nm y se realizó una gráfica de absorbancia contra concentración celular para determinar la IC_{50} . Se realizarán por lo menos tres ensayos independientes para validar el efecto.

6.8. Análisis estadísticos

El análisis estadístico se realizó mediante el software Graphpad Prism versión 5.0, donde los datos correspondientes al porcentaje de viabilidad celular de cada grupo de estudio, se analizó utilizando un ANOVA (Análisis de Varianza) de una sola vía. Adicional, se aplicó la prueba de Tukeys para comparar cada tratamiento con respecto al control. Asimismo, la significancia estadística se estableció para una $p < 0.05$.

7. RESULTADOS

7.1. Determinación del número de esporas

B. thuringiensis en su fase de esporulación además de producir una endospora, simultáneamente genera un cristal proteico (Whiteley and Schnepf, 1986). Por lo que, aprovechando esta estrategia fisiológica de *B. thuringiensis*, se determinó de forma indirecta la presencia de cristales proteicos en el cultivo, mediante la detección de esporas en el medio. Para visualizar las esporas se empleó la tinción de Schaeffer y Fulton (Senthilkumar *et al.*, 2021). La Figura 5 muestra la presencia de una gran cantidad de esporas teñidas en azul, un indicativo de la formación de los cristales proteicos, los cuales solo se producen durante la fase de esporulación. Se sabe que estas proteínas se acumulan en grandes cantidades tanto como una inclusión proteica y recubriendo las esporas (Whiteley and Schnepf, 1986).

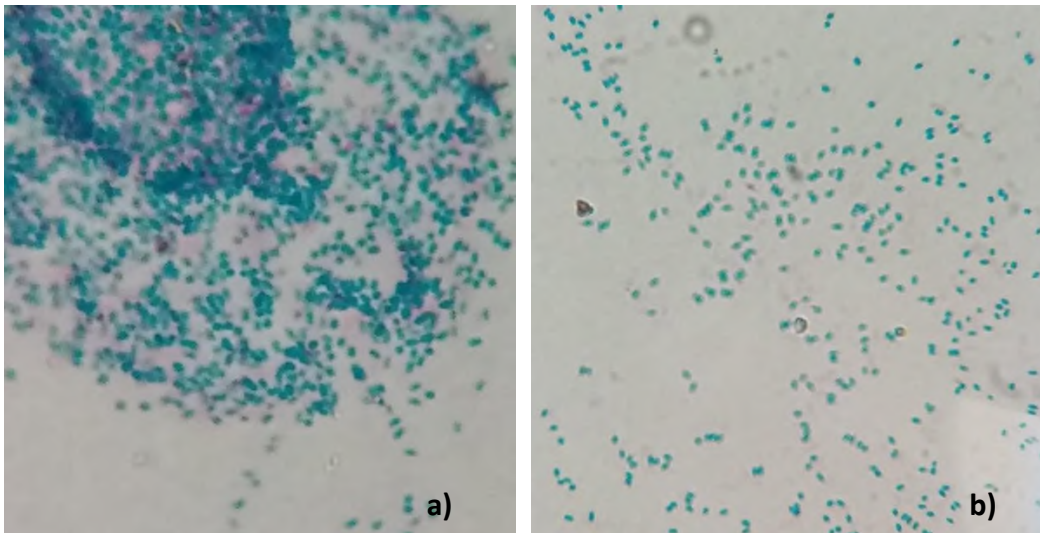


Figura 5: Micrografías de la tinción de esporas. En **a)** esporas de la cepa AC5 de *B. thuringiensis* y en **b)** esporas de la cepa IB84 de *B. thuringiensis*. Imágenes tomadas a 100X de un microscopio invertido después de 7 días de crecimiento.

7.2. Obtención de extractos proteicos

Previo a las pruebas citotóxicas, las inclusiones proteicas fueron purificadas a partir de bandas recuperadas de geles SDS-PAGE al 12%. En la Figura 6 se presenta un gel representativo de 12% de concentración acrilamida/bis-acrilamida, en el que se observa el perfil de separación de bandas de los cristales proteicos de las cepas AC5 e IB84 de *B. thuringiensis* y las bandas seleccionadas fueron aisladas de cada cepa. En el caso de la cepa AC5 se eligieron dos bandas con un peso molecular de entre 25 y 28 kDa que por su cercanía en peso se decidió aislar ambas y

considerarlas como una sola proteína de 26 kDa. Para el caso de la cepa de IB84 la banda corta fue aquella que tuvo un peso de 26 kDa, que en trabajos previos ya se ha demostrado que reduce la viabilidad de la línea celular MOLT-4 de leucemia en un 40% mediante la activación de la apoptosis (Velásquez C, *et al.*, 2018; Medina López, 2017). El objetivo de analizar la citotóxicidad de IB84 fue evaluar si esta proteína tenía mayor actividad antiproliferativa sobre la línea celular de cáncer de mama, ya que una de las premisas de las parasporina es que éstas pueden tener actividad citotóxica contra diferentes líneas celulares cancerígenas.

En la Figura 6 se presenta un gel de acrilamida/bis-acrilamida, en los carriles del 1 al 4 se observa el perfil de bandeo de proteínas de la cepa IB84 *B. thuringiensis*, en la que se destacan por su intensidad la correspondiente a 26 kDa aproximadamente. Mientras que en los carriles del 5 al 9 se muestran los perfiles electroforéticos de las inclusiones proteicas de la cepa AC5 de *B. thuringiensis*.

Por otro lado, el perfil de bandeo no solo evalúa la presencia de bandas con un tamaño que permite intuir la presencia de una PS, sino también se ha utilizado a groso modo para distinguir una cepa de otra, ejemplo de ello, las cepas LBT 63 y LBT 87 de *B. thuringiensis* muestran un perfil electroforético proteico similar al subsp. *israelensis* (Carreras Solís, *et al.*, 2009; Niedmann Lolas *et al.*, 2006)

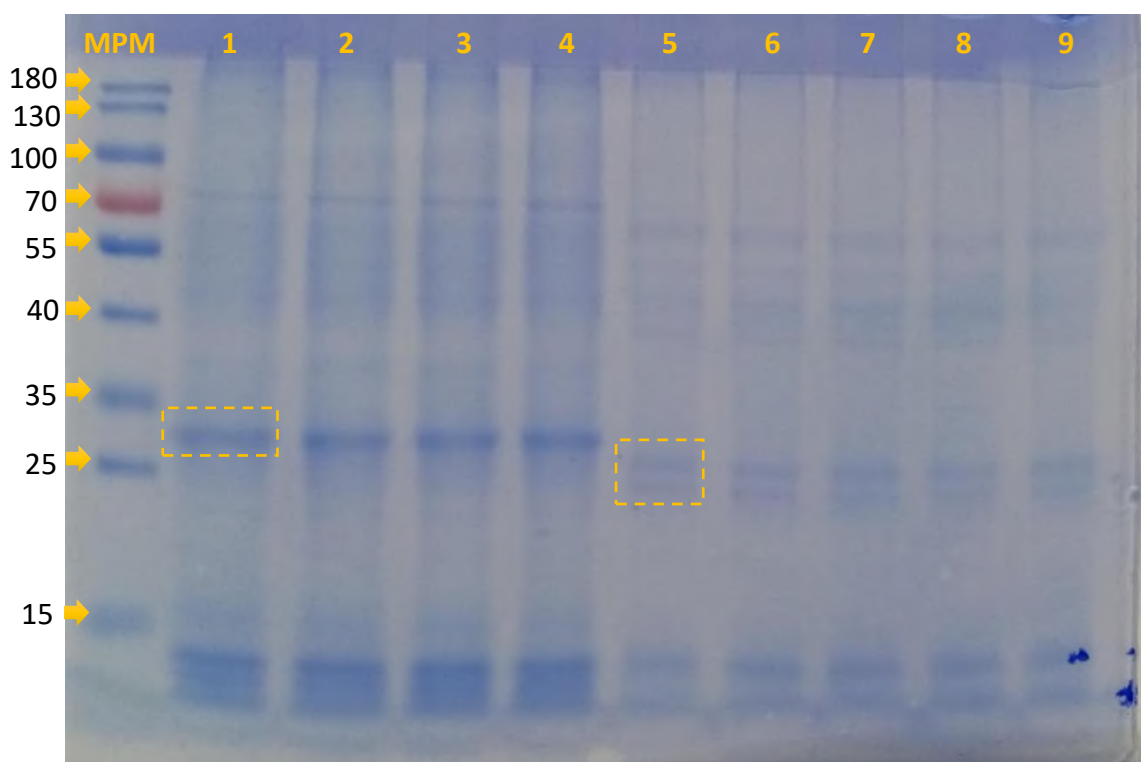


Figura 6: Perfil de separación electroforética (SDS-PAGE al 12%). MPM: Marcador de peso molecular. En los carriles del 1 al 4 corresponden a la cepa de *B. thuringiensis* IB84. Del carril 5 al 9 corresponden a la cepa de *B. thuringiensis* AC5. En el rectángulo punteado se muestran las bandas de proteínas seleccionadas para la purificación.

7.3. Purificación de los extractos proteicos

Para eliminar impurezas que pudieran interferir en la prueba de viabilidad celular, se empleó la diálisis utilizando solución amortiguadora de fosfatos (PBS, por sus siglas en inglés) como solución de intercambio. En la tabla 4 se indican las concentraciones de las proteínas obtenidas de *B. thuringiensis*.

Tabla 4: Concentración de las proteínas purificadas por diálisis, cuantificados en NanoDrop (2000/2000c, Protein A280).

Inclusión proteica	Cepa	Peso molecular (~kDa)	Concentración (mg/mL)
			Diálisis
AC5	AC5	26	4.8 ± 0.17
PS IB84	IB84	26	2.7 ± 0.29

En este sentido, se sabe que la diferencia de la concentración de proteína varía entre cada cepa, debido a que no todas estas expresan la misma cantidad de proteína en el ciclo de vida del bacilo (Cruz, Nolasco, 2017). Por ejemplo, en 2014 Ekino y colaboradores purificaron una proteína de 29.8 kDa con actividad citocida contra las células T leucémicas humanas (MOLT-4) con una

concentración efectiva al 50 % (EC50) de aproximadamente 0,075 µg/mL. Algunos autores han empleado técnicas de cromatografía para la purificación de las proteínas producidas por *B. thuringiensis*. En 2019, se extrajeron purificaron y analizaron por cromatografía una PS1 a partir de la cepa BDzG de *B. thuringiensis* correspondiente a una proteína de 81 kDa y varios péptidos de diferentes pesos moleculares (18-58 kDa) se observó actividad citocida frente a células epiteliales humanas de tipo 2 (HEp2) con una IC50 igual a 2,33 µg/ml, mientras que se ha demostrado una citotoxicidad moderada frente a células epiteliales basales alveolares humanas adenocarcinómicas (A549) con IC50 igual a 18.54 µg/ml (Djefa, 2020). Treviño en 2016 obtuvo péptidos con actividad citotóxica derivados de *B. thuringiensis*, empleando cromatografía de intercambio aniónico, en dicho trabajo se aislaron de la cepa IB79 proteínas con pesos aproximados de 10, 15 y 25 kDa, con una concentración de 330 µg/mL cuantificado por el método de Bradford (Suarez Treviño, 2017). Estos procesos cromatográficos podrían ser una buena opción, que podría garantizar proteínas purificadas de buena calidad y eliminar en su totalidad cualquier interferente.

7.4. Determinación de la actividad citotóxica mediante un ensayo de curso temporal dosis-respuesta en MCF-7

7.4.1. Tiempo de exposición 24 h.

Para evaluar la actividad antiproliferativa de las inclusiones proteicas de las cepas AC5 de *B. thuringiensis* y la PS de IB84 en la línea celular de cáncer de mama MCF-7, se empleó el método de MTT. Para ello, se realizó un ensayo dosis-respuesta con los extractos proteicos aislado de cada cepa. La curva propuesta tuvo las siguientes concentraciones: 0.625, 1.25, 2.5, 5, 10 y 20 µg/mL, para ambos extractos, estas concentraciones se plantearon con base a los antecedentes de otras proteínas analizadas en las que se detectó actividad citotóxica en la línea celular MCF-7, los resultados observados después de 24 h de exposición a las distintas concentraciones de la inclusión proteica de la cepa AC5 (Figura 7), indicaron nulo efecto citotóxico sobre la línea celular MCF-7. Asimismo, tampoco se detectaron cambios morfológicos con respecto al grupo CN (control negativo) después del análisis de las micrografías tomadas.

Por otro lado, la PS de IB84 de *B. thuringiensis* bajo las mismas concentraciones y tiempo de exposición que AC5, se observaron efectos citotóxicos a 20 µg/mL, disminuyendo el porcentaje de viabilidad celular en un 50.87% a las 24 h post tratamiento sobre la línea celular MCF-7.

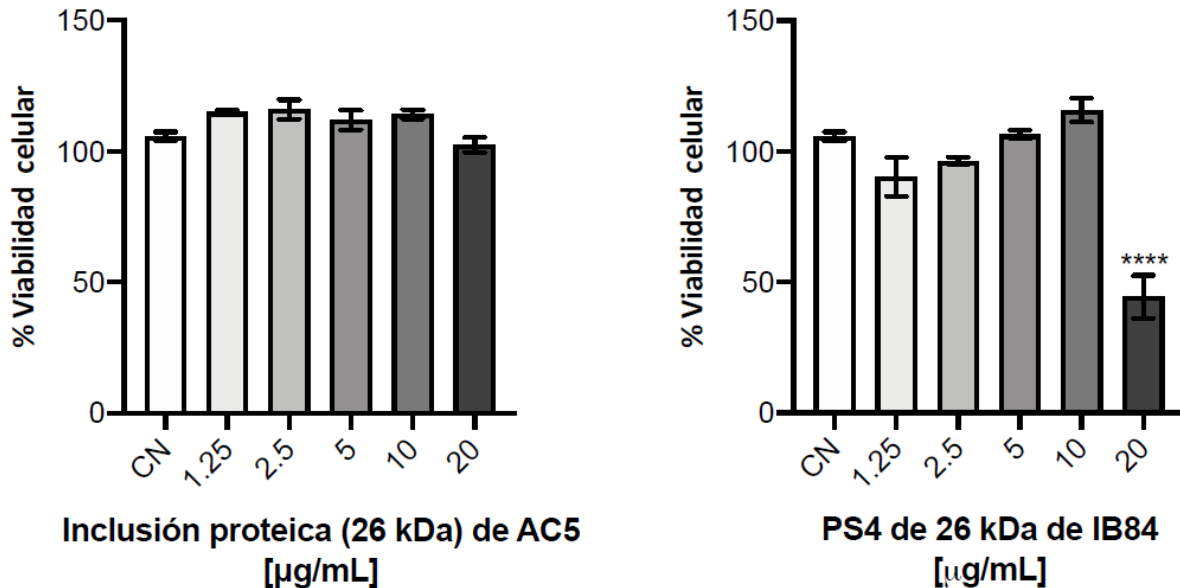


Figura 7: Ensayo de MTT a 24 h de incubación la inclusión proteica de *B. thuringiensis* AC5 y *B. thuringiensis* IB84 en la línea MCF-7. Izquierda: inclusión proteica de la cepa AC5 *B. thuringiensis*. Derecha: PS4 de la cepa IB84 de *B. thuringiensis*. Los datos son expresados como media \pm desviación estándar. Se realizó una ANOVA de una vía y una prueba de Tukey's para estimar la significancia estadística. Los valores de $P < 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos, siendo **** $P < 0.0001$ vs CN.

Se hicieron la captura de micrografías de ambos tratamientos y el análisis de los cambios morfológicos asociados al tratamiento con las inclusiones proteicas usando un programa (*ImageJ*), específicamente se evaluó el área total de las células. Sin embargo, para AC5 no se detectaron cambios en el área celular a las 24 h de post tratamiento en ninguna concentración empleada. Es importante considerar que la actividad citotóxica de las PS depende de diversos factores dentro de los que se destaca su preferencia por el tipo de cáncer y el origen del mismo. Por ejemplo, Kuroda *et al.* (2013), encontraron una PS altamente citotóxica para las células HeLa, pero sin actividad sobre las células MOLT-4 (Kuroda *et al.*, 2013). Así mismo, la concentración a la que estas proteínas son o tienen actividad citotóxica dependerá de la cepa y de la fuente de origen de la bacteria (Nolasco, 2017). En el caso de *B. thuringiensis* AC5, existen las posibles explicaciones por las que no se vio actividad citotóxica son: **1)** una baja concentración de la proteína, ó **2)** que la proteína no posea actividad contra este tipo celular (línea celular de cáncer de mama).

En el caso de la PS de IB84, las micrografías (Figura 8), se perciben cambios importantes a partir de la concentración de 1.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, haciéndose más evidentes a 5 y 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Destacando la pérdida de contacto célula-célula, es decir comenzaron a desagruparse, separándose en pequeños grupos de celulares, un evento anormal en este tipo de células adherentes, así mismo, la población disminuyó significativamente y se perciben irregularidades a nivel de membrana. En la concentración 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ se observaron núcleos grandes y el ADN condensado, además de la presencia formas redondas con características de cuerpos apoptóticos, la célula notoriamente ha perdido su morfología original y las irregularidades en la membrana son aún más evidentes. En la concentración 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$, las células están totalmente fragmentadas, lográndose ver únicamente restos celulares dispersos, similar a los observados en la necrosis inducida con peróxido de oxígeno. Los cambios morfológicos en células son una señal de daño generalizado tanto interna como a nivel de la membrana de la célula. Por ejemplo, se sabe que durante la apoptosis una serie de cascadas de señalizaciones desencadenan la activación de proteínas de muerte celular que llevan a cambios internos en la célula (Tibbetts *et al.*, 2003). Todos estos procesos requieren varias horas desde el inicio de la muerte celular hasta que finalmente hay fragmentación celular, que depende del tipo de célula, el estímulo y la vía apoptótica que se active (Ziegler and Groscurth, 2004). Desde el punto de vista morfológico, el núcleo es el organelo que más cambios sufre durante cualquier proceso que comprometa a la célula, cuando esto sucede el núcleo manda señales químicas y físicas que activan procesos de muerte, un ejemplo es la apoptosis. Durante este proceso, en el núcleo se llevan a cabo alteraciones como la condensación de cromatina y la fragmentación nuclear. En las etapas finales de la apoptosis, el núcleo se condensa aún más y finalmente se rompe dentro de la célula, cuya membrana aún se mantiene intacta (Majno and Joris, 1995). Similar a lo que observamos a 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ post tratamiento con la PS de IB84 de *B. thuringiensis* (Figura 8), lo que hace suponer que el mecanismo de muerte inducido por la inclusión de *B. thuringiensis* IB84 en las células MCF-7 es la apoptosis, contrariamente a lo reportado en la línea celular MOLT-4 en la que se menciona que la muerte es debida al proceso conocido como necrosis (Velásquez C, *et al.*, 2018). A nivel de la membrana y el citoplasma durante la apoptosis, las células se encogen y, finalmente, se forman estructuras tipo ampollas que se separan dando lugar a los cuerpos apoptóticos.

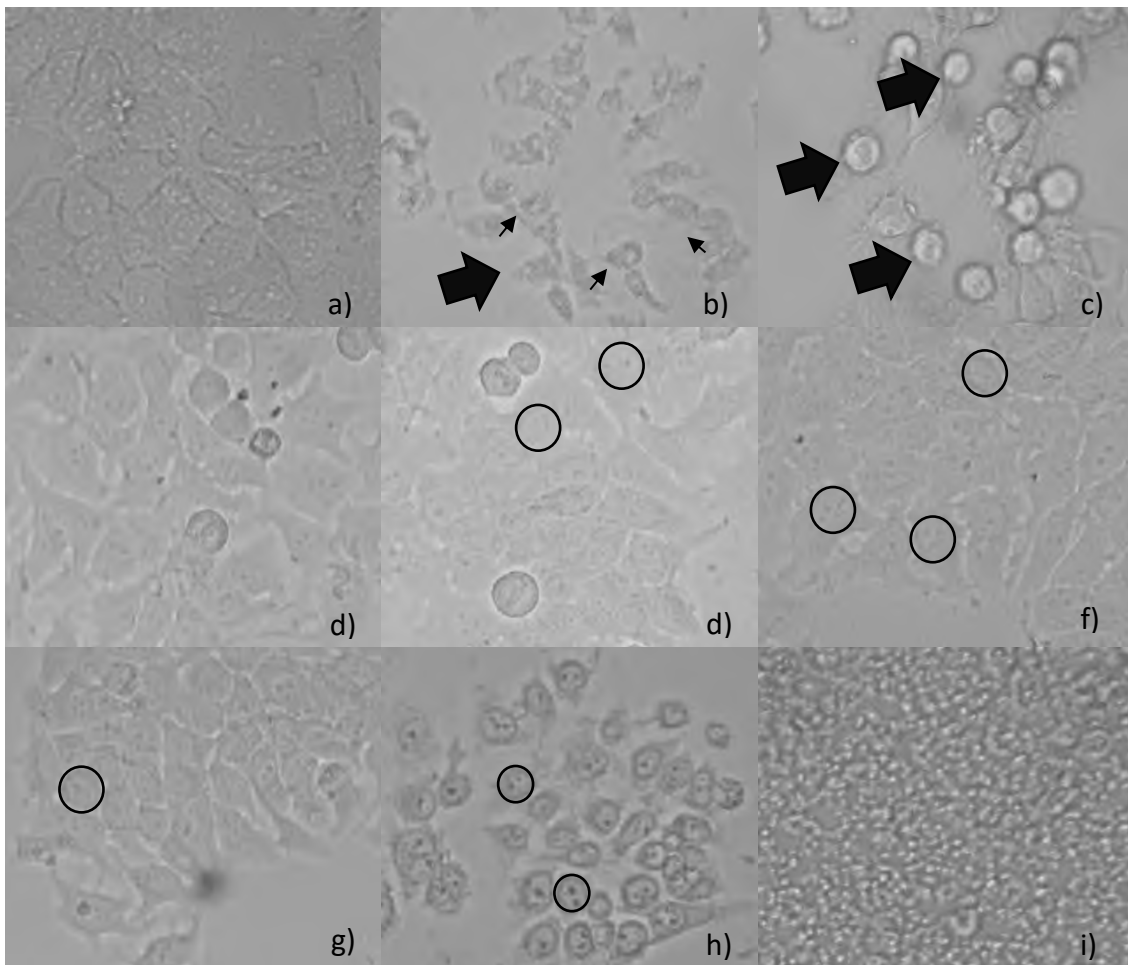


Figura 8: Micrografías representativas tomadas a las 24 h tratadas con la PS-4 de IB84, que muestran los cambios morfológicos de las células MCF-7. Imágenes tomadas a 100X de un microscopio invertido. a) Control negativo (C-), b) Peróxido (5%), c) Doxorubicina (0.20Mm), d) 0.625, e) 1.25, f) 2.5, g) 5, h) 10, i) 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectivamente. Los círculos señalan los núcleos que abarcan casi toda el área de la célula. Las flechas gruesas señalan cuerpos apoptóticos, las puntas de flecha delgadas indican células necróticas.

Los valores de área (Figura 9), muestra un ligero cambio que estadísticamente no fue significativo en el área celular con respecto al grupo CN. Por el contrario, a la concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ el área celular disminuye significativamente de 1000 a 400 μm^2 (2.5 veces más pequeña), mientras que con 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ los fragmentos celulares formados tuvieron un área promedio de 59.3 μm^2 , cambios que como se mencionó anteriormente son característicos de procesos apoptóticos. En conjunto, los resultados a 24 h para la proteína IB84 *B. thuringiensis* señalan que esta induce muerte por apoptosis en la línea celular MCF-7. Sin embargo, esta conjetura debe ser comprobada con pruebas como Anexina/IP o determinación de caspasas.

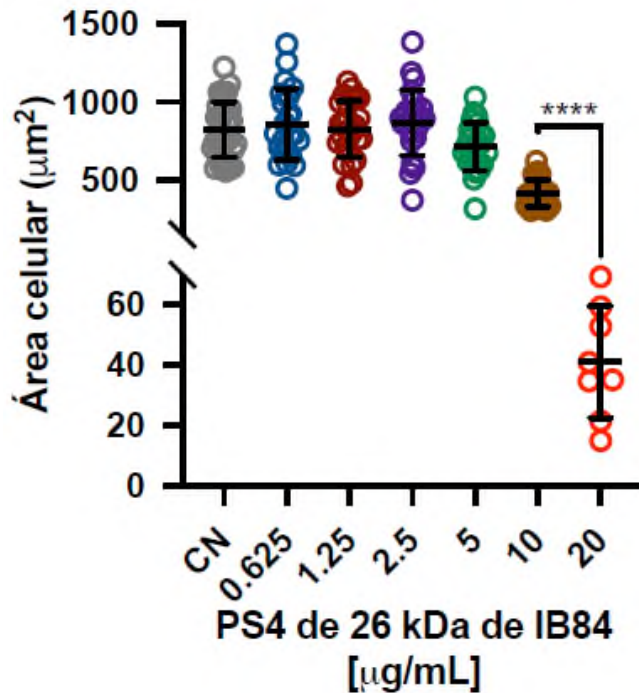


Figura 9: Área de celular MCF-7 a 24 h de exposición con concentraciones de IB84. Los datos se presentan en gráfico con distribución de puntos y media. Se realizó una ANOVA de una vía y prueba de Tukey's para estimar la significancia estadística. Los valores de $P < 0.05$ se consideraron significativos, siendo $****P < 0.0001$.

7.4.2. Tiempo de exposición 48 h

Similar a lo detectado a las 24 h de exposición, a las 48 h la proteína AC5 tampoco tuvo efecto citotóxico sobre la línea celular MCF-7 a ninguna de las concentraciones estudiadas (Figura 10), ni cambios morfológicos perceptibles, el análisis de las áreas celulares totales confirmó que no hubo cambios estadísticamente significativos. Por el contrario, con la PS IB84 los porcentajes de muerte celular fueron estadísticamente significativos en las concentraciones 10 y 20 µg/mL, con 74.24% y 70.41% respectivamente en comparación con el control, incrementándose en casi un 20 % más la muerte celular con respecto a las 24 h.

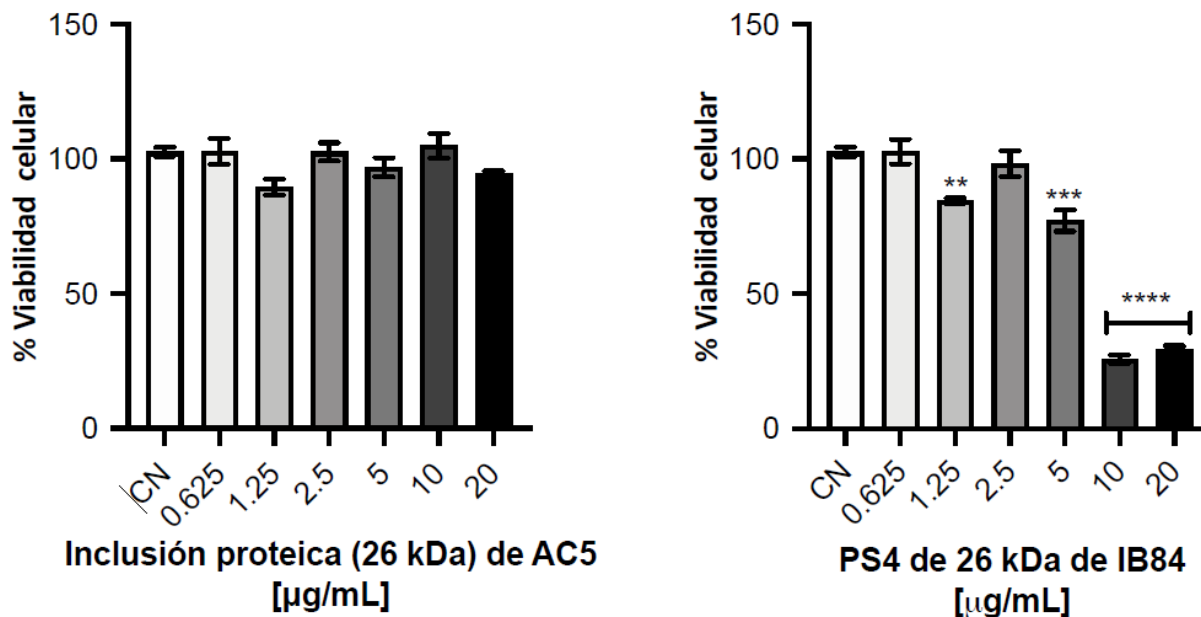


Figura 10: Ensayo de MTT a 48 h de incubación la inclusión proteica de *B. thuringiensis* AC5 y *B. thuringiensis* IB84 en la línea MCF-7. Izquierda: inclusión proteica de la cepa AC5 *B. thuringiensis*. Derecha: PS4 de la cepa IB84 de *B. thuringiensis*. Los datos son expresados como media \pm desviación estándar. Se realizó una ANOVA de una vía y una prueba de Tukey's para estimar la significancia estadística. Los valores de $P < 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos, siendo **** $P < 0.0001$ vs CN.

Se analizaron las micrografías tomadas a las células MCF-7 (Figura 11), tratadas con la PS IB84 y se compararon con el CN. Las imágenes indicaron que a partir de la concentración 5 µg/mL, empiezan a distinguirse algunos cuerpos redondos oscuros, el contenido celular disminuyó, así como cambios en la morfología, específicamente, la pérdida forma estrellada de las células MCF-7. A la concentración 10 µg/mL prácticamente todas las células han perdido la morfología estrellada, el núcleo se ha perdido y en el interior de la célula se pueden ver pequeñas vesículas, además de la membrana celular dañada. A 20 µg/mL las células están totalmente fragmentadas, pudiéndose observar solo unos cuantos cuerpos apoptóticos. Todas las características señaladas, tanto a 24 como 48h, dan indicios de que la cepa IB84 de *B. thuringiensis* activa mecanismos de muerte celular por apoptosis. Como se señaló previamente, además del “desmantelamiento” celular en cuerpos apoptóticos, existen otras características morfológicamente distintivas se presentan, entre ellas **i**) la alteración y reorganización del citoesqueleto y proteínas contráctiles; y **ii**) “encogimiento” celular. La disminución del volumen apoptótico que conduce al encogimiento celular es generalmente un evento temprano en el curso de la apoptosis (Doonan and Cotter, 2008; Mills *et al.*, 1999).

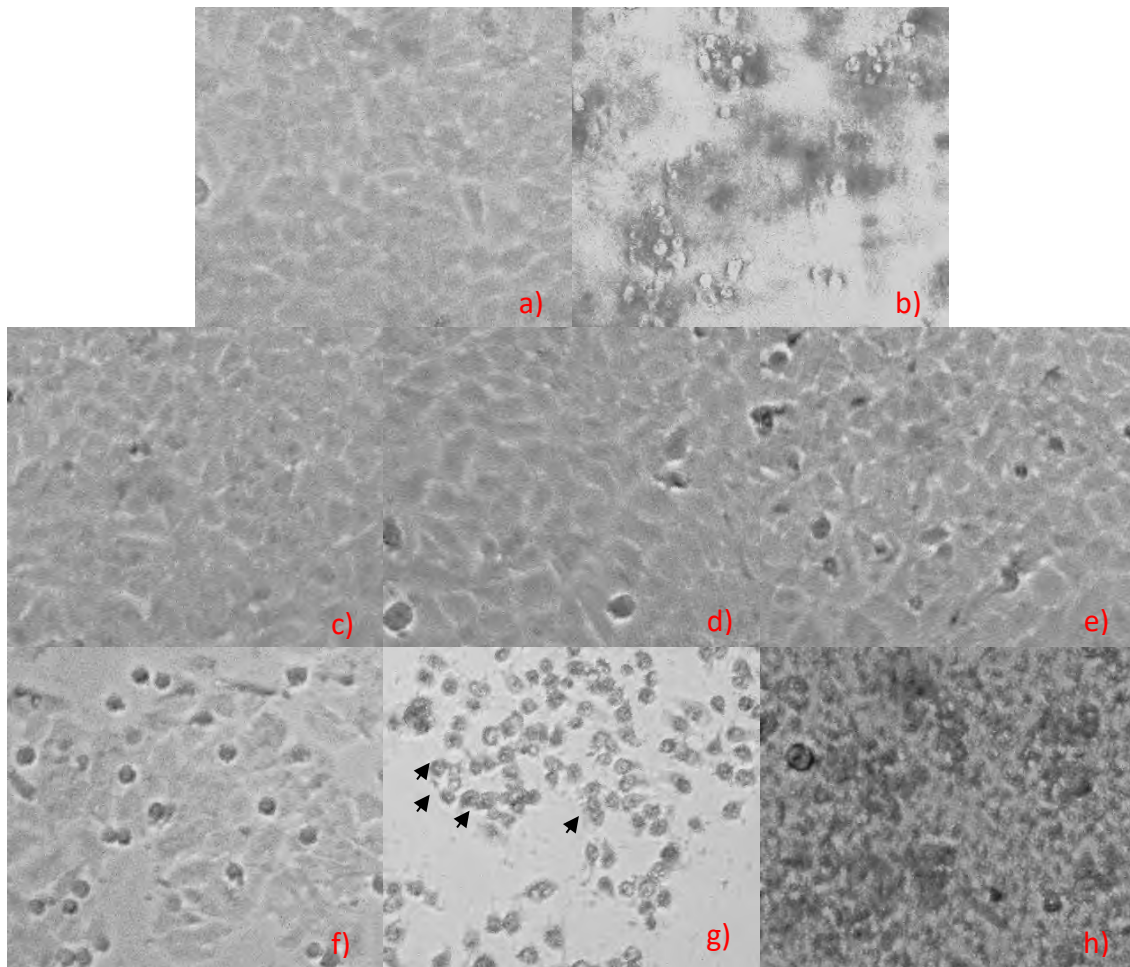


Figura 11: Micrografías representativas a las 48 h tratadas con la PS4 de IB84, que muestran los cambios morfológicos de las células MCF-7. Imágenes tomadas a 10X de un microscopio invertido. a) CN, b) Doxorubicina (0.20 Mm), c) 0.625, d) 0.125, e) 2.5, f) 5, g) 10, h) 20 µg/mL respectivamente. Las puntas de las flechas señalan células estrechas y membrana celular dañada.

El análisis de área celular para la PS de IB84 de *B. thuringiensis* (Figura 12), indicó que a las concentraciones 0.625, 1.25 y 2.5 µg/mL, las células no tuvieron cambios significativos en sus dimensiones celulares con respecto a CN. En contraste, a las concentraciones 5, 10 y 20 µg/mL las áreas celulares tienen diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.0001$) con respecto al CN, incluso a la concentración de 20 µg/mL las áreas tiende a ser cero. Además, se puede apreciar que el daño celular es proporcional a la concentración de la inclusión proteica, similar a lo encontrado a las 24 h.

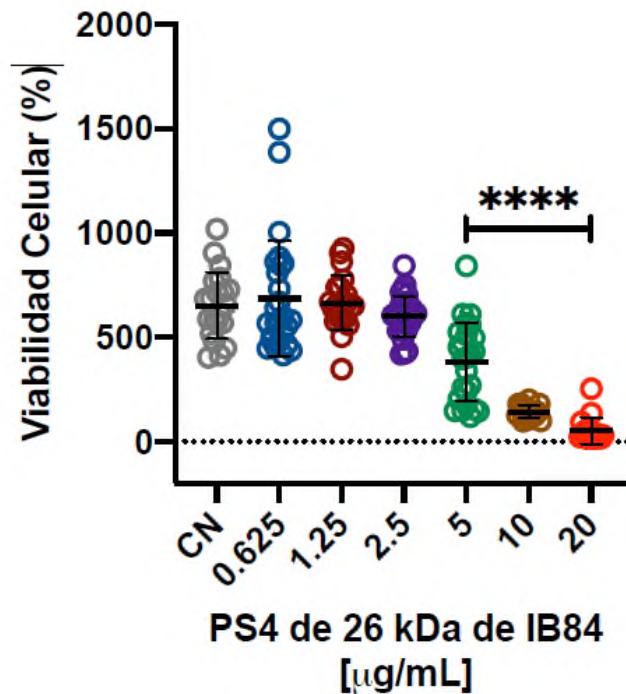


Figura 12: Área de las células MCF-7 a 48 h de exposición con concentraciones de IB84. Los datos se presentan en gráfico con distribución de puntos y media. Se realizó un análisis de ANOVA de una vía con prueba de Tukey's. Los valores de $P < 0.05$ se consideran significativos, siendo $****P < 0.0001$.

7.4.3. Tiempo de exposición 72 h

En cuanto a los ensayos de citotoxicidad a las 72 h, para la inclusión proteica AC5 esta presentó un efecto citotóxico sobre MCF-7 estadísticamente significativo en las concentraciones de 5, 10 y 20 $\mu\text{g/mL}$, (ver figura 13), aunque sin alcanzar el 50% de muerte celular. Los resultados podrían indicar dos posibles eventos: 1) que la actividad citotóxica de la inclusión proteica AC5 es dependiente del tiempo de exposición y 2) que la cantidad de proteína no es suficiente, por lo que para futuros estudios se sugiere incrementar la concentración de la proteína AC5. Es importante considerar que uno de los mecanismos propuestos para la actividad de las PS es a través de unión a receptores de membrana y la generación de poros, causando permeabilidad de la membrana y daño a las células (Medina López, 2017). Estos hallazgos nos permiten concluir que la inclusión proteica es estable por lo menos hasta las 72 h que duraron los ensayos. En este contexto, y a pesar de que en trabajos previos del grupo han reportado que las inclusiones proteicas con actividad citotóxica requieren concentraciones bajas (Cruz- Nolasco, 2017), que contrasta con lo realizado en este trabajo, también hay que recordar que no todas las PS tienen la misma potencia citotóxica y muchas de estas proteínas no son activas contra el mismo tipo de

cáncer y que cada una tiene su propio mecanismo de inducción de muerte (Kitada *et al.*, 2007; Krishnan, 2013). En cuanto a la proteína IB84, se encontró que, en los tiempos de 24 h y 48 h, esta presentó diferencias significativas en cuanto a la viabilidad celular se refieren, siendo las concentraciones de 5, 10 y 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ las tuvieron mayor actividad citotóxica (Figura 13). De igual forma, cabe destacar que la estabilidad en términos de efecto citotóxico se mantuvo hasta las 72 h. No obstante, se esperaba que hubiera mayor muerte celular con respecto a 24 y 48 h.

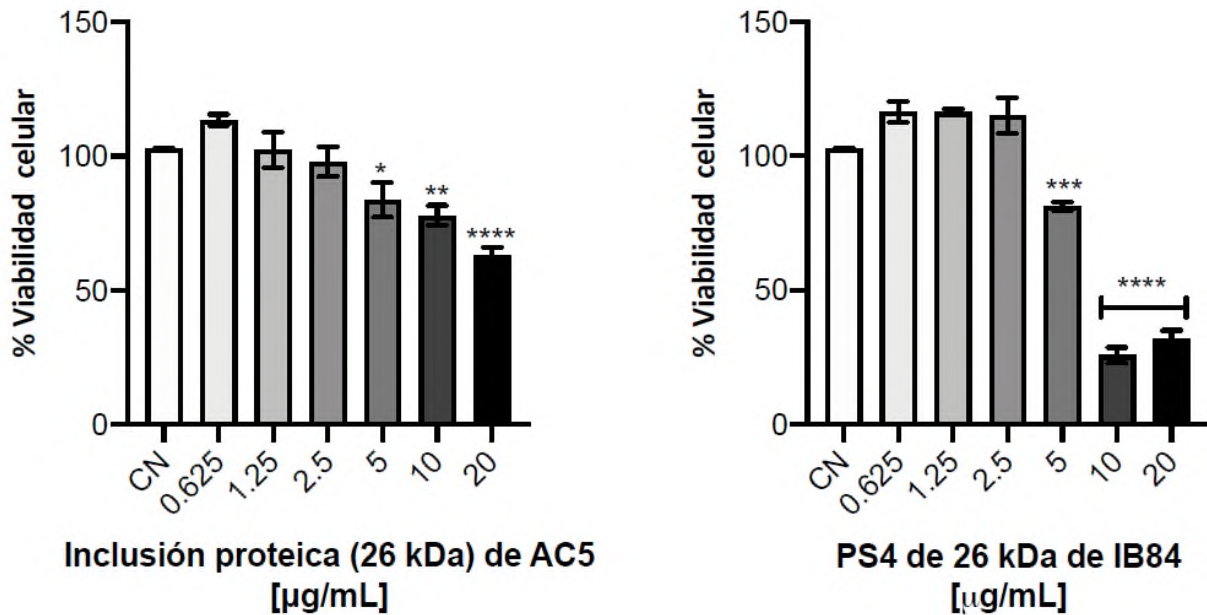


Figura 13: Ensayo de MTT a 72 h de incubación con concentraciones de *B. thuringiensis* IB84 y *B. thuringiensis* AC5 en la línea celular MCF-7. Los datos se expresan como media \pm y desviación estándar. Se realizó un ANOVA de una vía y una prueba de Tukey's para estimar la significancia estadística. Los valores de $P < 0.05$ se consideran significativos, siendo * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ y **** $P < 0.0001$ vs CN respectivamente.

En términos morfológicos la inclusión proteica AC5 (Figura 14), no se destacan cambios importantes, solo a la concentración de 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$, en donde la célula ya presenta un núcleo prominente, no obstante, el tamaño del área celular no presenta cambios estadísticamente significativos (Figura 15).

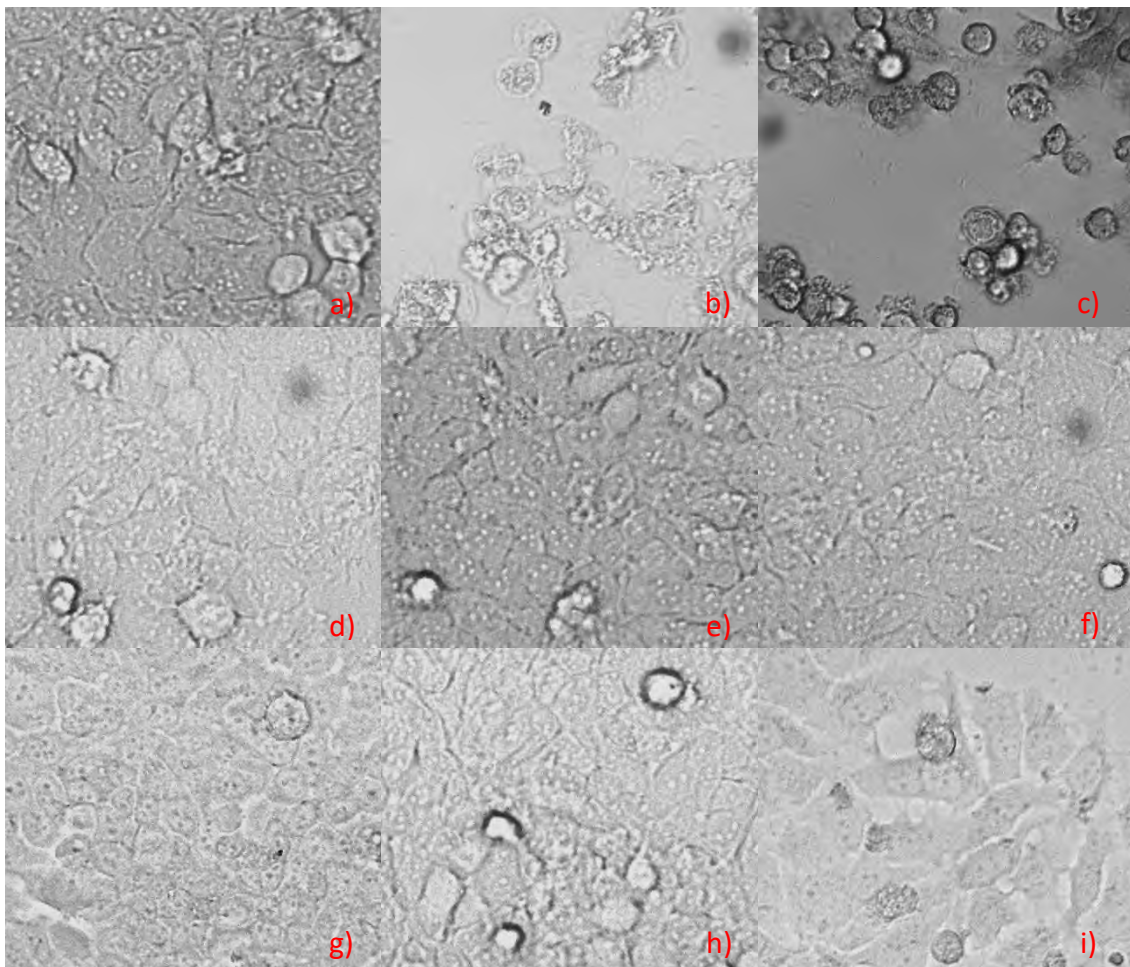


Figura 14: Micrografías representativas a las 72 h tratadas con la inclusión proteica AC5, que muestran los cambios morfológicos de las células MCF-7. Imágenes tomadas a 100X de un microscopio invertido. a) Control negativo (C-), b) Peróxido (5%), c) D Doxorubicina (0.20 mM), d) 0.625, e) 0.125, f) 2.5, g) 5, h) 10, i) 20 µg/mL respectivamente.

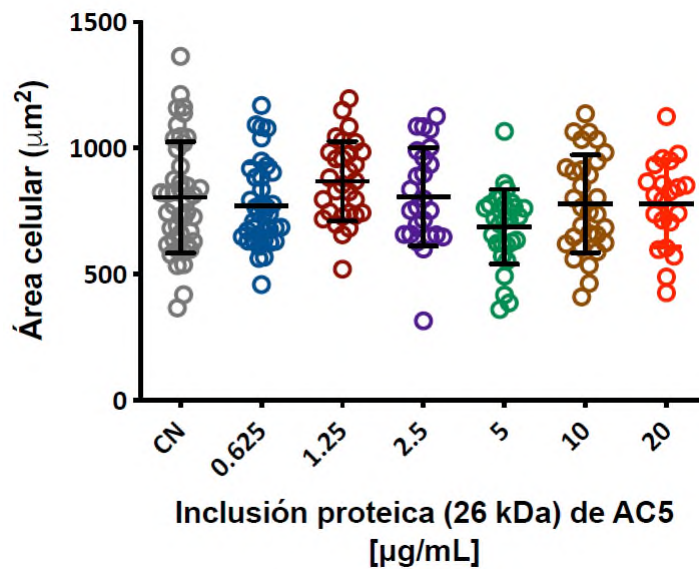


Figura 15: Área de células MCF-7 a 72 h de exposición con concentraciones de AC5. Los datos se presentan en gráfico con distribución de puntos y media. Se realizó una ANOVA de una vía y prueba de Tukey's para estimar la significancia estadística. Los valores de $P < 0.05$ se consideraron significativos, siendo $****P < 0.0001$

Por el contrario, IB84 (Figura 16), ya se perciben cambios morfológicos significativos a partir de la concentración 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, como la formación de cuerpos redondos, condensación de núcleos, disminución en cantidad celular, pérdida de la agrupación celular. Así mismo la célula empieza a tomar forma tipo fibroblasto (células alargadas). A 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ las células ya se tornaron redondas y con un núcleo que ocupa casi en su totalidad el cuerpo de la célula y en su interior se percibe claramente el ADN altamente condensado, esto un sello característico de cambios al interior de la célula, particularmente del citoesqueleto. Mientras que a 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ la célula ya está totalmente fragmentada.

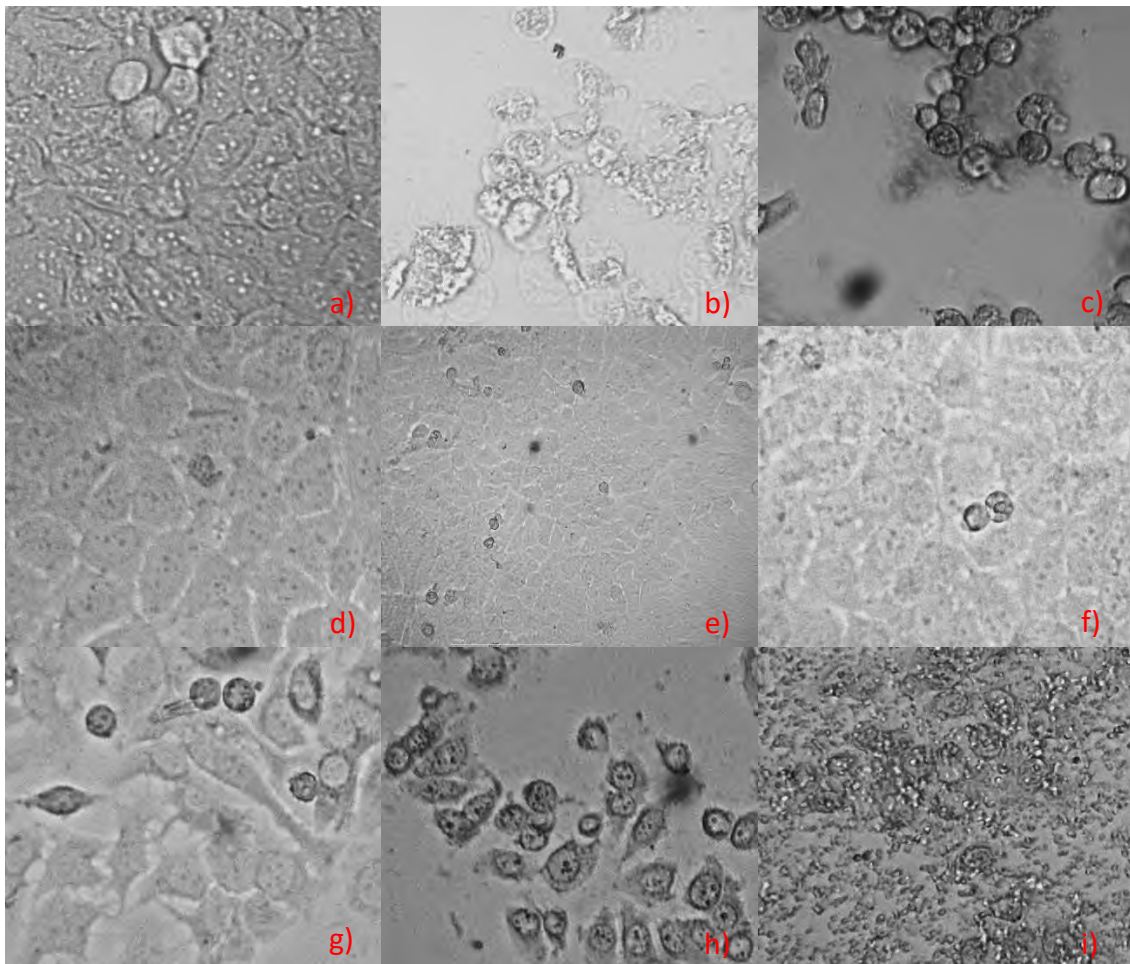


Figura 16: Micrografías representativas a las 72 h tratadas con la PS-4 de IB84, que muestran los cambios morfológicos de las células MCF-7. Imágenes tomadas a 20X de un microscopio invertido. a) Control negativo (C-), b) Peróxido (5%), c) Doxorubicina (0.20Mm), d) 0.625, e) 0.125, f) 2.5, g) 5, h) 10 e, i) 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectivamente.

Los valores del área celular total (Figura 17) muestra un aumento en el área celular en las concentraciones menores y a partir de la concentración 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ una significativa disminución, tendiendo a valores muy cercanos a 0 en la concentración 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$, similar a los descrito a las 24, 48 h.

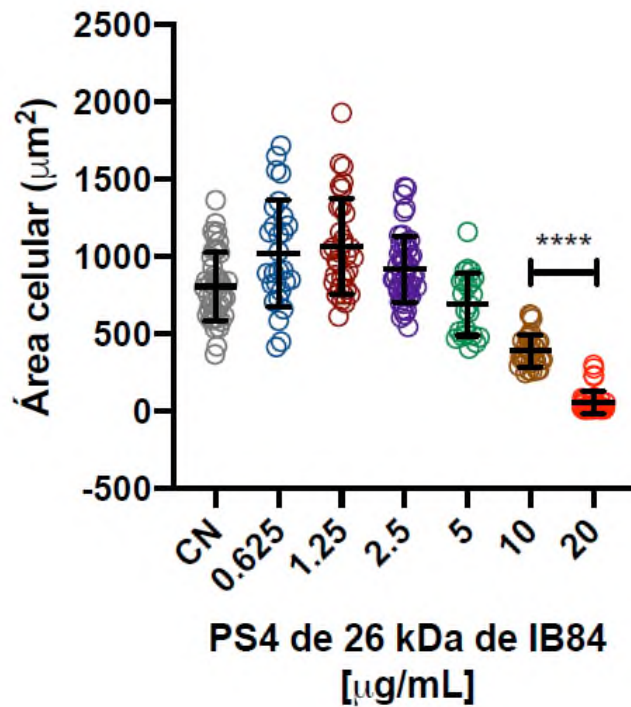


Figura 17: Área de células MCF-7 a 72 h de exposición con concentraciones de *B. thuringiensis* IB84, los datos se presentan en gráfico con distribución de puntos y media. Se realizó un análisis de ANOVA de una vía con prueba de Tukey's. Los valores de $P < 0.05$ se consideran significativos, siendo **** $P < 0.0001$ vs. CN

Se calculó el valor de IC_{50} para cada condición de trabajo (Tabla 5).

Tabla 5: Valores IC_{50} de *B. thuringiensis* AC5 y *B. thuringiensis* IB84 sobre MCF-7 a las 12, 24, 48 y 72 h.

Proteína	Tiempos	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
<i>B. thuringiensis</i> AC5	12 h	~28.5
	24 h	~23.93
	48 h	~No convergente
	72 h	~35.57
<i>B. thuringiensis</i> IB84	12 h	~5.071
	24 h	~6.542
	48 h	~5.395
	72 h	~5.069

Los resultados muestran que los valores de IC_{50} de la inclusión proteica IB84, son similares en todos los tiempos de exposición. Por el contrario, para la proteína de AC5 de *B. thuringiensis*, los valores de citotoxicidad no permiten determinar la IC_{50} , y que solo hasta las 72 h se logra detectar un efecto antiproliferativo sin que este alcance el 50% de muerte en las células MCF-7. Se sugiere que otra alternativa es evaluar la citotoxicidad en otro tipo de células cancerosas.

7.5. Pruebas de seguridad farmacológica

Los estudios de seguridad farmacológica permiten predecir la probabilidad de que el compuesto químico o biomolécula sea peligroso cuando se administra dentro del intervalo terapéutico a poblaciones humanas, un primer acercamiento de dicho estudio es haciendo uso de células “sanas” o aisladas de un tejido sano. El propósito de los estudios de seguridad farmacológica es evitar el uso de fármacos peligrosos (Pugsley, 2008).

7.5.1. Ensayo de Hemólisis

Para evaluar la seguridad farmacológica se realizó el ensayo hemólisis, además esta prueba nos permite determinar una de las condiciones que debe cumplir una inclusión proteica para poder ser llamada parasporina. Los resultados de hemólisis (Figura 18) tras la exposición a la proteína AC5 demostró que no produce lisis de glóbulos rojos, por lo que dicha proteína podría ser considerada como PS.

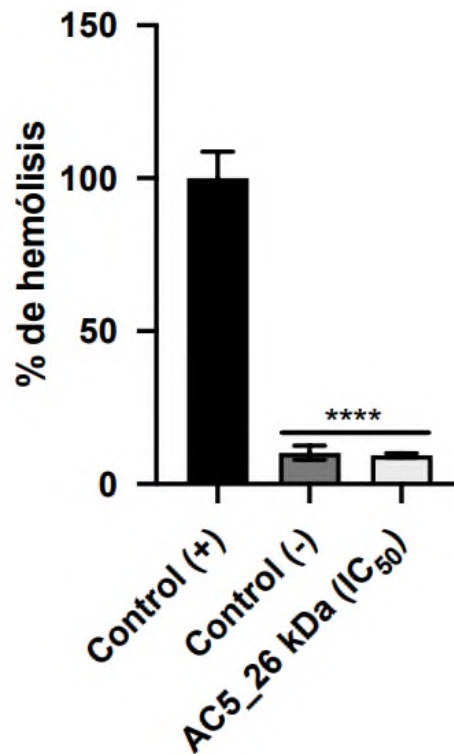


Figura 18: Ensayo de hemólisis para inclusión proteica aislada de la cepa AC5. Se realizó un análisis de ANOVA de una vía con prueba de Tukey's. Los valores de $P < 0.05$ se consideran significativos, siendo **** $P < 0.0001$ vs. Control (+).

7.5.2. Ensayo en CMSP

Otro de los parámetros determinantes en seguridad farmacológica es su evaluación en células de origen no canceroso. Además, este análisis nos permite evaluar otro de los criterios que debe cumplir una PS, la inocuidad sobre células de tipo no canceroso. Los resultados mostraron que esta proteína no presenta efecto citotóxico en CMSP.

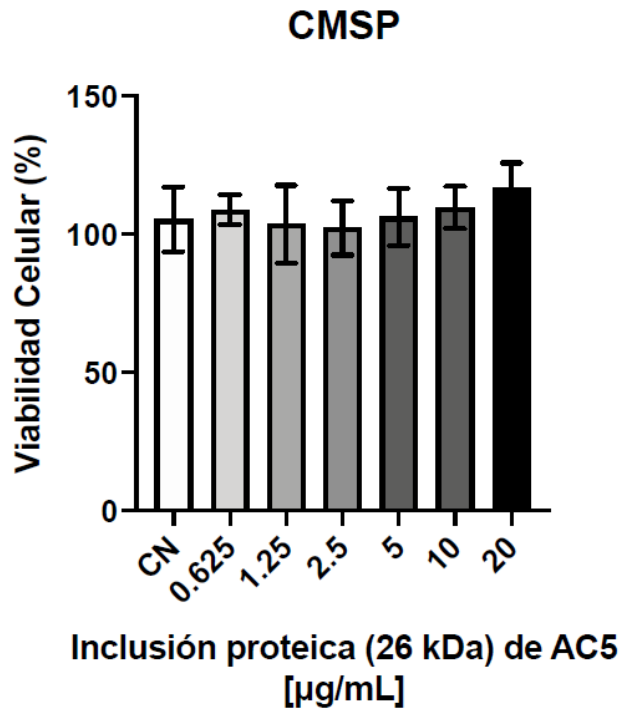


Figura 19: Ensayos de citotoxicidad de inclusión proteica AC5 en células Mononucleares de sangre periférica. Se realizó un ANOVA de una vía y una prueba de Tukey's.

Con los resultados obtenidos de citotoxicidad en MCF-7 a las 72h, el ensayo de hemólisis y el de citotoxicidad en CMSP, podemos afirmar que la inclusión proteica obtenida de *B. thuringiensis* AC5, se trata de una parasporina, pero que no es altamente citotóxica contra células MCF-7, por lo cual se sugiere probar en otro tipo de línea celular.

8. DISCUSIÓN

Las PS son un grupo de proteínas Cry genéticamente relacionadas y sintetizadas en *B. thuringiensis*. Una característica comúnmente asociada con las proteínas PS es la fuerte actividad citotóxica preferencial para las células cancerosas humanas de diferentes orígenes, las proteínas muestran actividades citotóxicas solo cuando se digieren con proteasas. Estas proteínas se clasifican en 6 familias: PS1, PS2, PS3, PS4, PS5 y PS6 (Mendoza Almanza, *et al.*, 2020). En este contexto, los resultados muestran que la cepa AC5 de *B. thuringiensis* presentó una actividad citotóxica contra MCF-7 después de las 72 h de tratamiento con un porcentaje de muerte celular del 39% a la concentración de 20 µg/mL, teniendo un valor aproximado de IC₅₀ de 35.57 µg/mL. Por otro lado, los análisis del área celular demostraron que la proteína conduce a cambios morfológicos importantes asociados con la apoptosis, dentro de lo más destacado está la condensación de núcleo, pérdida de la interacción célula-célula y, en menor proporción, la pérdida de su forma tipo fibroblasto, fenómeno que fue similar al tratamiento con Doxorubicina (Figura 14).

Borin *et al.* (2021) y Chubicka *et al.* (2017) describen cambios morfológicos similares a los detectados en este trabajo, y mediante ensayos específicos demuestran que sus PS inducen la apoptosis. Si bien la PS de la cepa AC5 mostró citotoxicidad sobre las células de cáncer de mama MCF-7, esta es moderada, por lo que se sugieren ampliar pruebas en más líneas celulares. De hecho, un ejemplo claro y demostrado en este trabajo es la actividad de la PS de la cepa IB84, la cual previamente se había encontrado una moderada actividad sobre las células MOLT-4 (Espino V, 2014) sin embargo, en este trabajo se encontró su fuerte actividad antiproliferativa sobre las células MCF-7, esto podría deberse a la sobre expresión de diversas moléculas en las células cancerosas, entre ellos algunos receptores de membrana con alta probabilidad de ser células objetivo para el tratamiento del cáncer de las PS. En este contexto, recientemente se encontró que células de cáncer de colon sobre expresan el receptor de aminopeptidasa y que este posee sitios de unión para PS2 (Suárez-Barrera, *et al.* 2022). También sugiere que la PS2 puede llevar al daño celular atacando las balsas lipídicas, adquiriendo una conformación hidrófoba por oligomerización, lo que inducirá la formación de poros, esta proteína muestra una ligera dependencia del colesterol, es decir, estas PS2 tiene como requisito la unión a GPI, que se encuentran principalmente en el colesterol y esfingolípidos (Anon, 2008. Cáncer, 2009).

Otro ejemplo de la complejidad de los mecanismos de acción de las PS, es lo que se han reportado con las PS1 que son selectivamente citotóxicas contra MOLT-4 y MCF-7 gracias a proteínas G acopladas a receptores ubicados de membrana de estas células y, por tanto, atribuyéndole una función importante al Ca²⁺ intracelular, que como se sabe induce la vía mitocondrial de la apoptosis (Medina López, 2017), pero moderado efecto citotóxico hacia células Sawano (células de cáncer endometrial) y HepG2; y nula actividad contra células T de tejidos normales y MCR-5. Dicha actividad selectiva sugiere el reconocimiento de un receptor específico entre el fragmento tóxico PS1 y las células blanco (Velásquez C, *et al.*, 2018). Además, no se debe descartar la variable afinidad de las PS a sus diferencias estructurales, dentro de la diversidad de factores relacionados con la actividad de las PS esta variabilidad en las concentraciones que muestran la citotoxicidad.

En la Figura 20 se muestran la diversidad de IC₅₀ reportadas en diversos estudios por diferentes grupos de investigación.

Línea celular	Descripción	PS1Aa1		PS2Aa1		PS3Aa1		PS4Aa1		PS6Aa1		PS Malasia	
		CE ₅₀	EC	CE ₅₀	EC	CE ₅₀	EC	CE ₅₀	EC	CE ₅₀	EC	CE ₅₀	EC
Células normales de humano													
Linfocitos T	Células T	>10.0	-	0.148	+++	>10.0	-	>2.0	-	Nd		>32.0	-
HC	Células hepáticas	>10.0	-	>10.0	-	>10.0	-	>2.0	-	>10.0	-	Nd	
UtSMC	Células de útero	>10.0	-	9.28	-	>10.0	-	>2.0	-	Nd		Nd	
MRC-5	Células de pulmón	>10.0	-	7.15	-	>10.0	-	>2.0	-	Nd		Nd	
Células de cáncer humano													
MOLT-4	Leucemia	2.2	+	0.044	++++	>10.0	-	0.47	++	Nd		Nd	
Jurkat	Leucemia	>10.0	-	0.015	++++	>10.0	-	>2.0	-	Nd		Nd	
HL-60	Leucemia	0.32	++	0.066	++++	1.32	+	0.73	+	Nd		Nd	
CEM-SS	Leucemia	Nd		Nd		Nd		Nd		Nd		0.122	+++
U-937-DE4	Linfoma	Nd		Nd		Nd		0.98	+	Nd		Nd	
K562	Leucemia	Nd		Nd		Nd		>2.0	-	Nd		Nd	
HepG2	Cáncer hepático	3.0	-	0.023	++++	2.8	+	1.9	+	2.3	+	Nd	
HeLa	Cáncer cervical	0.12	+++	>10.0	-	>10.0	-	>2.0	-	7.2	-	>0.5	++
Sawano	Cáncer endometrial	>10.0	-	0.041	++++	>10.0	-	0.25	++	nd		Nd	
TCS	Cáncer cervical	Nd		>10.0	-	>10.0	-	0.72	+	nd		Nd	
A549	Cáncer pulmonar	>10.0	-	>10.0	-	>10.0	-	>2.0	-	nd		Nd	
CACO-2	Cáncer de colon	>10.0	-	4.86	-	>10.0	-	0.12	+++	>10	-	Nd	

CE₅₀, Concentración efectiva media (µg ml⁻¹); EC, Efecto citotóxico basado en las CE₅₀ (Mizuki *et al.*, 2000), en donde: +++++, extremadamente tóxico; +++, altamente tóxico; ++, moderadamente tóxico; +, poco tóxico; -, no tóxico. Nd: no determinado.

Figura 20: Espectro citotóxico de las principales parasporinas (Espino V, 2014).

Por lo que se refiere a PS IB84 de *B. thuringiensis* los resultados demuestran claramente cambios muy evidentes en la morfología de las células MCF-7, que se asemejan los observados con el tratamiento con Doxorubicina, lo que hace suponer que el mecanismo de muerte inducido en el

modelo celular empleado es la apoptosis. Algo que se debe destacar es que previamente se reportó que esta PS conduce a necrosis en las células MOLT-4, demostrando su actividad citotóxica con un valor de IC₅₀ de 6.058 µg/mL reportando además a esta PS como un tipo similar a las PS-2 y PS-4, (Espino V, 2014; Medina López, 2017)

La PS-2 y PS-4 corresponden a una proteína tipo formadora de poro (Beta-PFT), el mecanismo de muerte celular de las PS2 en las diferentes líneas celulares utilizada informa que en su mayoría es apoptosis, sin embargo, otros trabajos mencionan que esta proteína ha generado hinchazón, ampollas y lisis celular ocasionando permeabilidad en la membrana, marcas características del tipo de muerte llamado necrosis (Brasseur, *et al.*, 2015; Akiba & Okumura, 2016; Ekino, *et al.*, 2014). De la misma forma, se sabe que las PS4 activan la necrosis celular, ocasionando lisis celular en un tiempo de exposición mayor a las 24 h en células MOLT-4, CaCo-2, hI-60, U937, HepG2, Sawano, DE-4, TS, TCS, y especialmente en CACO-2 (Mendoza Almanza, *et al.*, 2020; Shiro Okumura, 2011).

El propósito de los estudios de seguridad farmacológica es evitar el uso de fármacos peligrosos, dentro de las competencias de la farmacología de seguridad incluye la predicción del riesgo de eventos letales raros, la proyección de los datos en el cálculo del margen de seguridad y el control de la seguridad clínica. En base a ello, los resultados de la evaluación de seguridad farmacológica empleando la proteína de AC5, han demostrado que corresponde a un tipo de parasporina al ser una proteína no Hemolítica y con nula citotoxicidad en células de células normales (CMSP), sin embargo, no es altamente toxica contra las células probadas MCF-7.

Finalmente se destaca la importancia de hacer una evaluación exhaustiva de la PS en estudio, empleando varias líneas celulares de origen canceroso. La complejidad en la respuesta o actividad que posee hace imperativo una evaluación más detallada. En este sentido, el esfuerzo por utilizar una técnica de análisis de imagen y las ventajas que ésta nos brinda al evaluar los cambios morfológicos celulares ocurridos durante los diferentes tratamientos, es conveniente respaldar los estudios con otras pruebas, tales como, expresión génica (qPCR) de caspasas o Anexina V/ IP por citometría de flujo.

9. CONCLUSIÓN

En conjunto los resultados permiten concluir lo siguiente:

Con respecto a la inclusión proteica de 26 kDa aislada de la cepa **AC5 de *B. thuringiensis*** se puede concluir que:

1. Los ensayos de citotoxicidad demostraron que reducen significativamente la viabilidad de las células MCF-7.
2. Requieren 72 h de exposición para mostrar actividad citotóxica sobre la línea celular MCF-7.
3. De manera preliminar, los análisis morfológicos indican que el mecanismo de muerte inducido por la inclusión es la apoptosis.
4. Las pruebas de bioseguridad demuestran que la inclusión no produce hemólisis ni daño a células de origen no canceroso.
5. En conjunto las pruebas de citotoxicidad en la línea celular MCF-7, la hemólisis y citotoxicidad en CMSP demostraron que la inclusión proteica AC5 es una parasporina.

Con respecto a la PS de 26 kDa de la cepa **IB84 de *B. thuringiensis*** se concluye que:

1. Los ensayos de citotoxicidad demostraron una significativa actividad de muerte celular en células MCF-7, aun mayor a lo reportado en MOLT-4.
2. Los análisis morfológicos preliminarmente indican que el mecanismo de muerte inducido en MCF-7 es la apoptosis.

8. PERSPECTIVAS

Como perspectivas para dar seguimiento a este proyecto se propone lo siguiente:

1. Para validar los resultados obtenidos mediante el análisis morfológico, es necesario realizar métodos más específicos y concluyentes del mecanismo de muerte inducido por las PS analizadas en este trabajo. Entre las pruebas que se proponen están A) determinación de la expresión de genes apoptóticos y de necrosis y B) realizar por citometría de flujo el análisis Anexina V/IP.
2. Evaluar en otras líneas celulares la actividad citotóxica de las PS de 26 kDa aisladas y probadas en este trabajo.
3. Caracterizar la proteína de 26 kDa de la cepa AC5 mediante un análisis de secuencia y modelaje de proteínas y, definir el tipo de parasporina que representa.

9. REFERENCIAS

- Abdul Rahman, S. N. S., Abdul Wahab, N. & Abd Malek, S. N., 2013. In Vitro Morphological Assessment of Apoptosis, Induced by Antiproliferative Constituents from the Rhizomes of *Curcuma zedoaria*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, p. 14.
- Akiba, T. & Okumura, S., 2016. Parasporins 1 and 2: their structure and activity. *Journal of Invertebrate Pathology*, 1(1).
- Anon., 2008. Raft-targeting and oligomerization of Parasporin-2, a bacillus thuringiensis crystal protein with anti-tumour activity. *Yuichi Abe, Hiroyasu Shimada, Sakae Kitada*, 2(143), pp. 265-75. 4
- Ates, G., Vanhaecke, T., Rogiers, V., and Rodrigues, R.M. (2017). Assaying cellular viability using the neutral red uptake assay. In *Cell Viability Assays*, (Springer), pp. 19–26.
- Bavis kar, S. N., 2011. A Quick & Automated Method for. *The american biology teacher*, pp. 554-556.
- Baynes, J. W. & Dominiczak, M. H., 2019. *Bioquímica médica*. 5 ed. s.l.:Elsevier.
- Borin, D. B., Castrejón-Arroyo, K., Cruz-Nolasco, A., Peña-Rico, M. A., Rorato, M. S., Santos, R. C., ... & Navarro-Mtz, A. K. (2021). Parasporin A13-2 of *Bacillus thuringiensis* isolate from Papaloapan region, induce a cytotoxic effect by late apoptosis against breast cancer cells.
- Brasseur, K. y otros, 2015. Parasporin-2 from a New *Bacillus thuringiensis* 4R2 Strain Induces Caspases Activation and Apoptosis in Human Cancer Cells. *PLoS One*.
- Bravo, A., S.Gill, S. & Soberón, M., 2007. *Mode of action of Bacillus thuringiensis Cry and Cyt toxins and their potential for insect control*. [En línea] Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/m/pubmed/17198720>
- Cáncer, I. I. d. I. c. e., 2009. *Parasporin, a new anticancer protein group from Bacillus thuringiensis*, s.l.: Anticancer Research.
- Carpenter, A.E., Jones, T.R., Lamprecht, M.R., Clarke, C., Kang, I.H., Friman, O., Guertin, D.A., Chang, J.H., Lindquist, R.A., and Moffat, J. (2006). CellProfiler: image analysis software for identifying and quantifying cell phenotypes. *Genome Biol.* 7, 1–11.

Carreras Solís, B., y Rodríguez Batista, D. (2009). Evaluación de cepas de *Bacillus thuringiensis* para el control de *Drosophila melanogaster* Maengi. *Fitosanidad* 13, 83–88.

Castrejón Arroyo, K., 2019. Evaluación de la seguridad farmacológica y efecto antiproliferativo de parasporinas libres, de *Bacillus thuringiensis*, sobre células de cáncer de mama, mediante metabolismo oxidativo. *Tesis de maestría*, pp. 8-53.

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

Cohen, G.M., Sun, X.M., Snowden, R.T., Dinsdale, D., and Skilleter, D.N. (1992). Key morphological features of apoptosis may occur in the absence of internucleosomal DNA fragmentation. *Biochem. J.* 286, 331–334.

Committee of Parasporin Classification and Nomenclature (The committee was founded on 2006) (<http://parasporin.fitc.pref.fukuoka.jp/>).

Crowley, L.C., Marfell, B.J., Christensen, M.E., and Waterhouse, N.J. (2016). Measuring cell death by trypan blue uptake and light microscopy. *Cold Spring Harb. Protoc.* 2016, pdb-prot087155.

Cruz Nolasco, A., 2014. Aislamiento e identificación de cepas de *Bacillus thuringiensis* productoras de proteína Cry. *Tesis de licenciatura*, pp. 8-70.

Cruz Nolasco, A., 2017. Síntesis de Nanoliposomas que contienen parasporinas de *Bacillus thuringiensis* con actividad antiproliferativa. *Tesis de Maestría*.

Djefa, L. A. A. N. Z. D. L. N. D. A. O. O. H. G. H. G. F. N., 2020. In Vitro Cytotoxicity of Parasporins from Native Algerian *Bacillus*. *Current Microbiology*, Issue 77, pp. 405-414.

Doonan, F., and Cotter, T.G. (2008). Morphological assessment of apoptosis. *Methods* 44, 200–204.

Ekino, K eisuke. Shiro Okumura, Tomoyuki Ishikaw, Sakae Kitada, Hiroyuki Saitoh, Tetsuyuki Akao, Takuji Oka, Yoshiyuki Nomura, Michio Ohba, Takashi Shin and Eiichi Mizuki, 2014.

Cloning and Characterization of a Unique Cytotoxic Protein Parasporin-5 Produced by *Bacillus thuringiensis* A1100 Strain. *Toxins*, p. 1882–1895.

Eliceiri, E. T. A. C. T. R. M. C. H. S. W. M. Y. K. W., 2016. Quantitating the cell: turning images into numbers with ImageJ. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology*, 6(2), p. 260.

Elmore, S., 2007. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology*, Issue 35, pp. 495-516.

Escobar M, L., Rivera, A. & Aristizábal G, F. A., 2010. Estudio comparativo de los métodos de Resazurina y MTT en estudios de citotoxicidad en líneas celulares tumorales humanas. *VITAE*, pp. 67-74.

Espino V, Astrid N, 2014. *Caracterización Biológica de Parasporinas en cepas Nativas de Bacillus thuringiensis*. Universidad Autónoma de Nuevo León: Tesis de Doctorado.

Helmy, I. M. & Abdel Azim, A. M., 2012. Efficacy of ImageJ in the assessment of apoptosis. *Diagnostic pathology*, 7(1-15).

INEGI. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (2020). Comunicado de prensa núm. 462/20. Estadísticas a propósito del día mundial de la lucha contra el cáncer de mama (19 de octubre del 2020) chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2020/Cancermama20.pdf#:~:text=El%20c%C3%A1ncer%20de%20mama%20es%20una%20de%20las,nuevos%20%28Grajales%2C%20Cazares%2C%20D%C3%ADaz%20y%20de%20Alba%2C%202014%29.

Ito, A., Sasaguri, Y., Kitada, S., Kusaka, Y., Kuwano, K., Masutomi, K., Mizuki, E., Akao, T., y Ohba, M. (2004). A *Bacillus thuringiensis* crystal protein with selective cytotoxic action to human cells. *J. Biol. Chem.* 279, 21282–21286.

Izquierdo Rubio, L., 2011. Actividad de las toxinas de *Bacillus thuringiensis* para el control de *Tuta absoluta*. *Tesis Maestría*.

Kitada, S., Abe, Y., Ito, A., Kuge, O., Akao, T., Mizuki, E., and Ohba, M. (2007). Molecular identification and cytotoxic action of parasporin, a protein group of novel crystal toxins

targeting human cancer cells. In Proceedings of the 6th Pacific Rim Conference on the Biotechnology of *Bacillus thuringiensis* and Its Environmental Impact, Victoria, BC, Canada, 30 October-3 November, 2005, (National Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC)), pp. 23–27.

Krishnan, K., Er An Ker, J., Mohammed, S. M. & Devi Nadarajah, V., 2010. Identification of Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) as a binding protein for a 68-kDa *Bacillus thuringiensis* parasporal protein cytotoxic against leukaemic cells. *Journal of Biomedical Science*, p. 86.

Krishnan, V. (2013). Investigation of parasporins, the cytotoxic proteins from the bacterium *Bacillus thuringiensis*.

Kuroda, S., Begum, A., Saga, M., Hirao, A., Mizuki, E., Sakai, H., and Hayakawa, T. (2013). Parasporin 1Ac2, a novel cytotoxic crystal protein isolated from *Bacillus thuringiensis* B0462 strain. *Curr. Microbiol.* 66, 475–480.

Lazebnik, Y.A., Cole, S., Cooke, C.A., Nelson, W.G., y Earnshaw, W.C. (1993). Nuclear events of apoptosis in vitro in cell-free mitotic extracts: a model system for analysis of the active phase of apoptosis. *J. Cell Biol.* 123, 7–22.

Lenina, N. K. y otros, 2014. Characterization of parasporin gene harboring Indian isolates of *Bacillus thuringiensis*. *3Biotech*, pp. 545-551.

Majno, G., and Joris, I. (1995). Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am. J. Pathol.* 146, 3.

Malpica, N., Santos, A., Tejedor, A., Torres, A., Castilla, M., Garcia-Barreno, P., and Desco, M. (2003). Automatic quantification of viability in epithelial cell cultures by texture analysis. *J. Microsc.* 209, 34–40.

Martínez Hernández, L. O., 2019. Identificación molecular de serovares de *Bacillus thuringiensis* de cepas aisladas de la Cuenca del Papaloapan, Oaxaca, México. pp. 1-50.

Medina López, J.O., 2017. Purificación y caracterización de las parasporinas (PS) presentes en *Bacillus thuringiensis* Cepas IB84 y GM18.

Meerlo, J. Van, Kaspers, G.J.L., and Cloos, J. (2011). Cell sensitivity assays: the MTT assay. In *Cancer Cell Culture*, (Springer), pp. 237–245.

Mendoza Almanza, G., Esparza-Ibarra, E. L., Ayala-Luján, J. L., Mercado-Reyes, M., Godina-González, S., Hernández-Barrales, M., & Olmos-Soto, J. (2020). The Cytocidal Spectrum of *Bacillus thuringiensis* Toxins: From Insects to Human Cancer Cells. *Toxins*, p. 12(5), 301.

Mills, J.C., Stone, N.L., and Pittman, R.N. (1999). Extranuclear apoptosis: the role of the cytoplasm in the execution phase. *J. Cell Biol.* 146, 703–708.

Mizuki, E., Ohba, M., Akao, T., Yamashita, S., Saitoh, H., y Park, Y.S. (1999). Unique activity associated with non-insecticidal *Bacillus thuringiensis* parasporal inclusions: in vitro cell-killing action on human cancer cells. *J. Appl. Microbiol.* 86, 477–486.

Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(1–2), 55–63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)

Mourad A. M. Aboul-Soud, M. Z. A.-A. ., A. K. ., Y. A. A.-S. ., A. E. A. ., T. A. E.-K., 2019. Specific Cytotoxic Effects of Parasporal Crystal Proteins Isolated from Native Saudi Arabian *Bacillus thuringiensis* Strains against Cervical Cancer Cells. *molecules* , p. 506.

Niedmann Lolas, L., and Meza-Basso, L. (2006). Evaluación de cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* como una alternativa de manejo integrado de la polilla del tomate (*Tuta absoluta* Meyrick; Lepidoptera: Gelechiidae) en Chile. *Agric. Técnica* 66, 235–246.

OMS. Organización Mundial de la Salud (2022). Cáncer. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>.

Palma, L. y otros, 2014. *Bacillus thuringiensis* Toxins: An Overview of Their Biocidal Activity. *Toxins*, pp. 3296-3325.

Pugsley, M. K. A. S. & C. M. J., 2008. Principles of safety pharmacology.. *British journal of pharmacology* , Volumen 154(7),, pp. 1382-1399.

Saraste, A., and Pulkki, K. (2000). Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovasc. Res.* 45, 528–537.

Sauka, Diego H., 2017. *Bacillus thuringiensis*: ¿nuevas aplicaciones para un viejo conocido?. *Revista Argentina de Microbiología*, abril-junio, 49(2), pp. 123-124.

Sauka, Diego H; Graciela B. Benintende, 2008. *Bacillus thuringiensis*: generalidades. Un acercamiento a su empleo en el biocontrol de insectos. *Revista Argentina de Microbiología*, pp. 124-140.

Scidelin, O., Rueden, C. T., Hiner, M. C. & Eliceir, K. W., 2015. The ImageJ Ecosystem: An Open Platform for Biomedical Image Analysis. *Molecular Reproduction & Development*, Volumen 82, pp. 518-529.

Senthilkumar, M., Amaresan, N., and Sankaranarayanan, A. (2021). Spore Staining and Biochemical Characterization of Bacillus. In *Plant-Microbe Interactions*, (Springer), pp. 225–229.

Shiro Okumura, H. S. T. I. K. I. E. M., 2011. Mode of action of parasporin-4, a cytotoxic protein from *Bacillus thuringiensis*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Biomembranes*, 1808(6), pp. 1476-1482.

Solary, E., Bertrand, R., Kohn, K.W., and Pommier, Y. (1993). Differential induction of apoptosis in undifferentiated and differentiated HL-60 cells by DNA topoisomerase I and II inhibitors.

Souissi, W., Kaloki, A., Etherington, S., Domanska, B., West, M. J., & Crickmore, N. (2019). Differential proteolytic activation of the *Bacillus thuringiensis* Cry41Aa parasporin modulates its anticancer effect. *Biochemical Journal*, 476(24), 3805-3816.).

Suárez-Barrera, M. O., Visser, L., Pinzón-Reyes, E. H., Rondón Villarreal, P., Alarcón-Aldana, J. S., & Rueda-Forero, N. J. (2022). Site-Directed Mutants of Parasporin PS2Aa1 with Enhanced Cytotoxic Activity in Colorectal Cancer Cell Lines. *Molecules*, 27(21), 7262.

Suarez Treviño, V.M. (2017). Obtención de péptidos con actividad citotóxica derivados de las parasporinas de *Bacillus thuringiensis*. *Rev. Ciencias Farm. y Biomed.* (ISSN 2448-8380) 32.

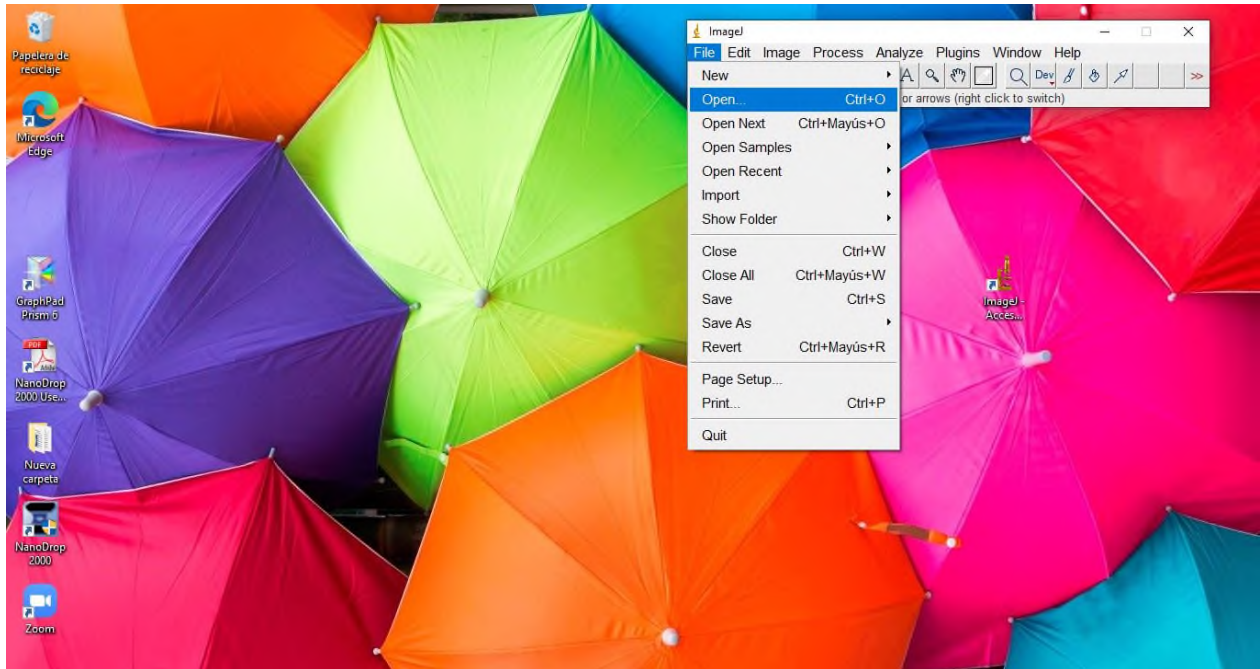
Tibbetts, M.D., Zheng, L., and Lenardo, M.J. (2003). The death effector domain protein family: regulators of cellular homeostasis. *Nat. Immunol.* 4, 404–409.

- Velásquez C, Luisa F., Rojas T, D. S. & Cerón S, J. A., 2018. Proteínas de *Bacillus thuringiensis* con actividad citotóxica: Parasporinas. *Revista colombiana de Biotecnología*. Vol.XX(2).
- Vermes, I., Haanen, C., and Reutelingsperger, C. (2000). Flow cytometry of apoptotic cell death. *J. Immunol. Methods* 243, 167–190.
- Villarreal Delgado, M. F. y otros, 2017. El género *Bacillus* como agente de control biológico y sus implicaciones en la bioseguridad agrícola. *Revista mexicana de fitopatología*.
- Whiteley, H.R., and Schnepf, H.E. (1986). The molecular biology of parasporal crystal body formation in *Bacillus thuringiensis*. *Annu. Rev. Microbiol.* 40, 549–576.
- Wyllie, A.H. (1980). Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* 284, 555–556.
- Wyllie, A.H. (1987). Cell death. *Cytol. Cell Physiol.* 755–785.
- Wyllie, A.H., Beattie, G.J., and Hargreaves, A.D. (1981). Chromatin changes in apoptosis. *Histochem. J.* 13, 681–692.
- Xu, C., Wang, B.-C., Yu, Z. & Sun, M., 2014. Structural Insights into *Bacillus thuringiensis* Cry, Cyt and Parasporin Toxins. *Toxins*, pp. 2732-2770.
- Ya Proskuryakov, S., G Konoplyannikov, A. & L Gabai, V., 2003. Necrosis: a specific form of programmed cell death?. *Experimental Cell Research*, pp. 1-16.
- Yábar Varas, C., 2003. *Manual de procedimientos de electroforesis para proteínas y ADN*, Lima, Perú: s.n.
- Yasunori Nagamatsu, S. O. H. S. T. A. E. M., 2010. Three Cry toxins in two types from *Bacillus thuringiensis* strain M019 preferentially kill human hepatocyte cancer and uterus cervix cancer cells. *Biosci Biotechnol Biochem*, 3(74), pp. 494-498
- Ziegler, U., and Groscurth, P. (2004). Morphological features of cell death. *Physiology* 19, 124–128.

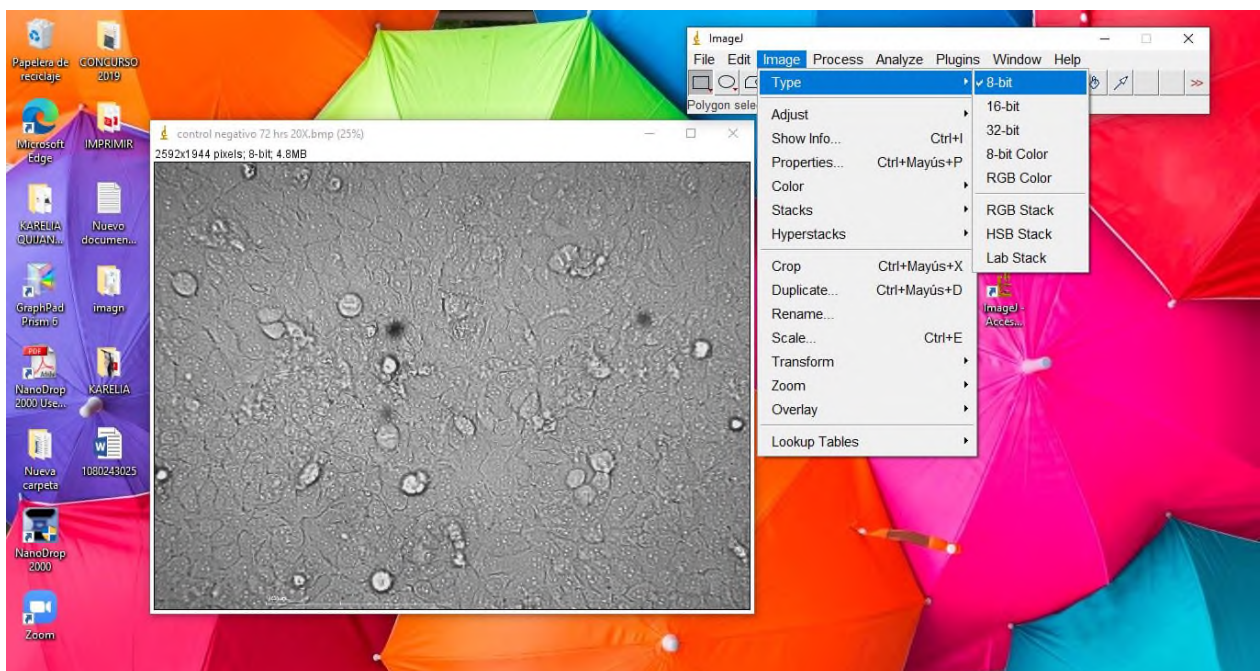
10.ANEXO

ANEXO A

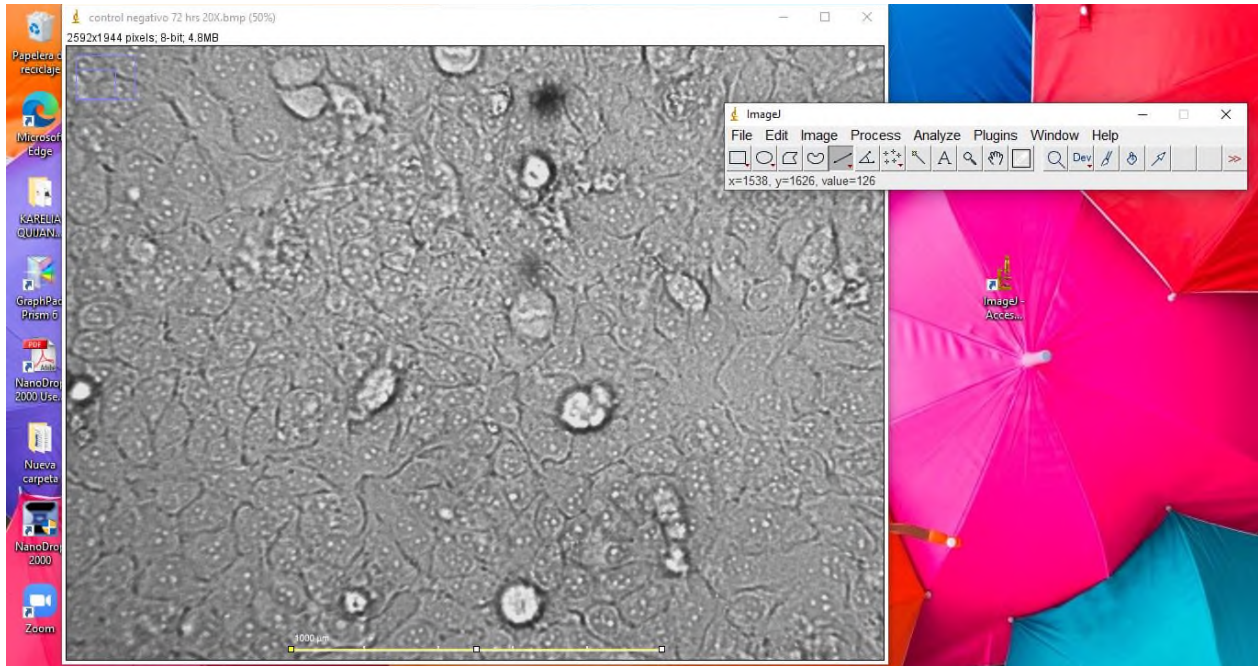
- 1) Iniciar el programa.
- 2) Seleccionar “file” y posteriormente “open” para analizar la imagen de interés.



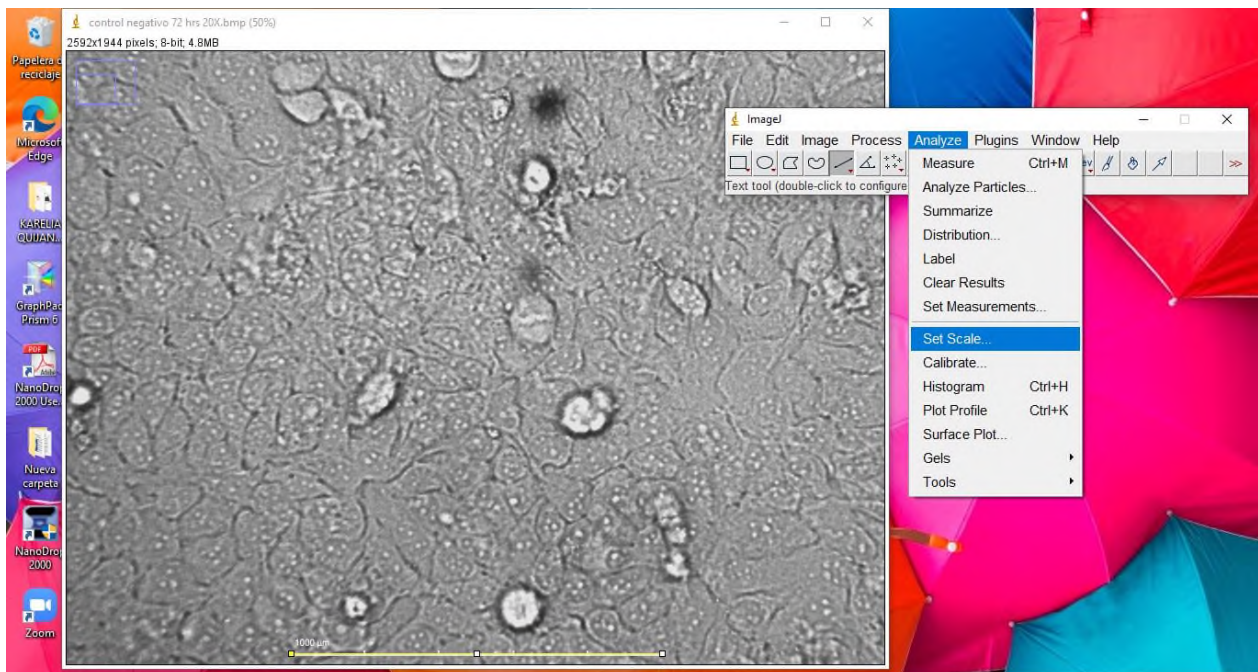
- 3) Dar clic en “Image” - “Type” y convertir la imagen a 8-bit.



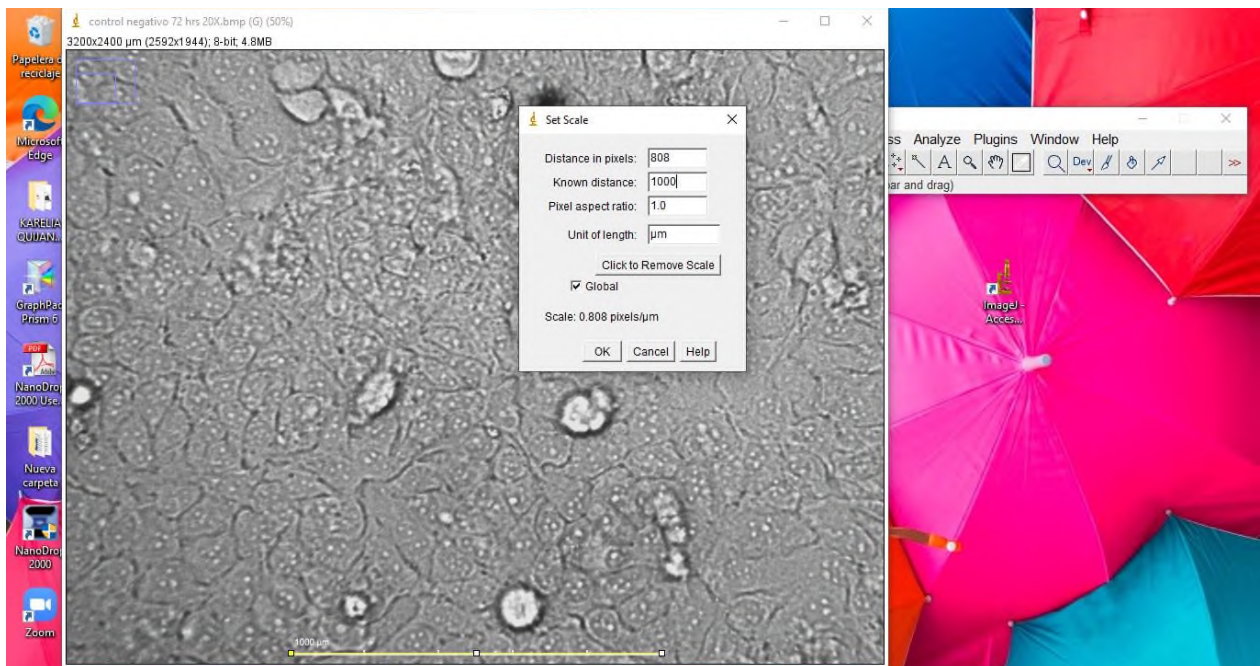
- 4) Una vez hecho lo anterior, acercar la imagen con la herramienta *lupa* que se encuentra debajo de “Plugins” y se observará una escala en la parte inferior de la imagen. Seleccionar la herramienta *recto* que se encuentra debajo de “image” y seleccionar la barra de escala como se muestra en la siguiente imagen (color amarillo).



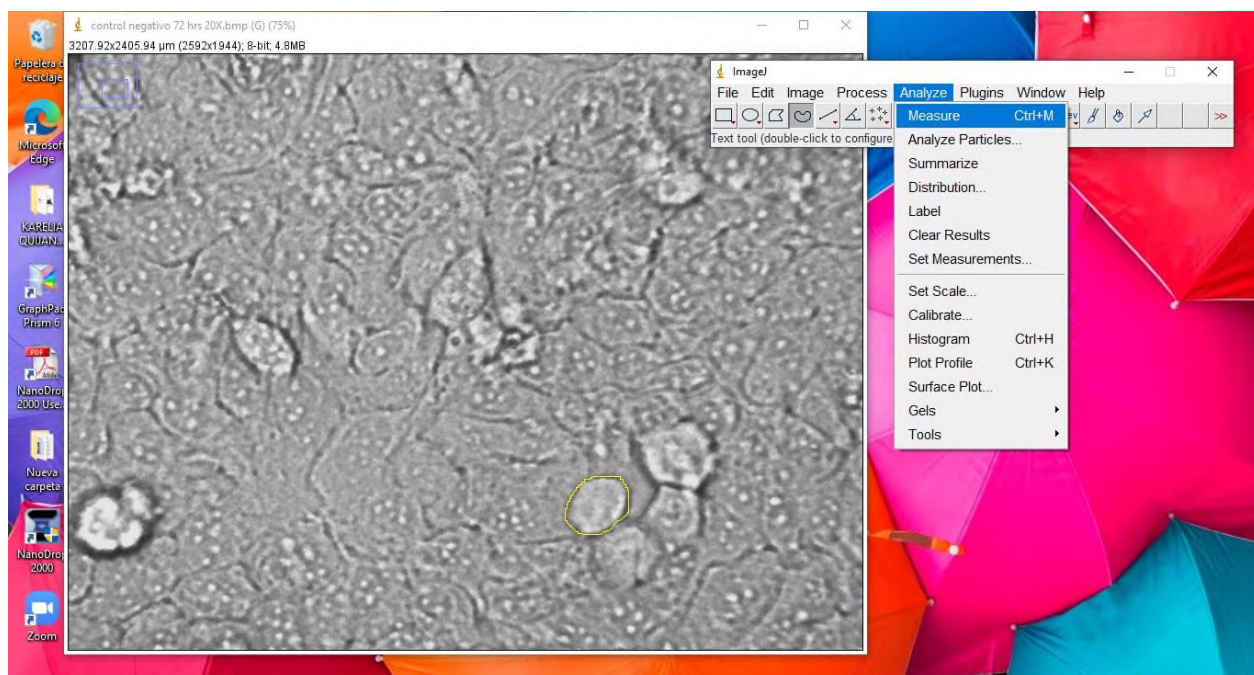
- 5) Una vez seleccionada la barra, dar clic en “Analyze” y “Set escala” como se muestra.



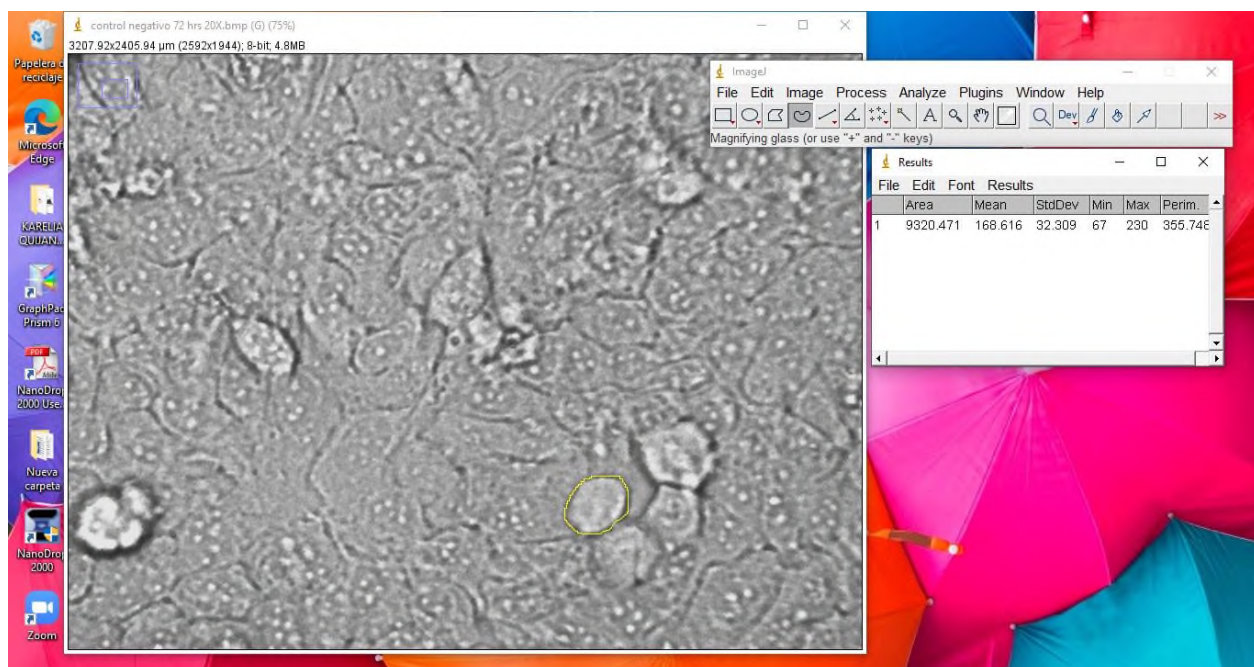
- 6) Aparecerá una ventana, donde se modificaron los datos. Marca la distancia en pixeles, ese dato no se modifica debido a que es la distancia de la barra medida en pixeles, en la segunda línea pide la nueva distancia, en esta parte se introduce el valor de barra, en este caso marca 1000 μm , se coloca solo el número, y para finalizar en la cuarta línea pide la unidad de distancia, en este caso serían los μm , y se colocan. Para fines de este trabajo y porque las fotografías fueron tomadas con el mismo equipo y objetivo seleccionamos con una paloma donde dice “Global”, es decir, que la distancia en pixeles sea siempre la misma en μm , para evitar realizar una nueva calibración cada que abrimos una imagen y seleccionamos “Ok”.



- 7) Ahora bien, automáticamente el programa nos da la medida de las áreas, pero si no lo hace, dar click en “Analyze”- “Set Measurements” y seleccionar los valores a evaluar. Las medidas de las áreas se pueden hacer automáticamente, pero en este caso se realizaron manualmente debido a que no existe una buena definición de los límites de las áreas y el programa no es capaz de distinguirlos. Con la herramienta de libre selección que se encuentra debajo de “Image” seleccionaremos de forma manual una de las células y posteriormente dar clic en “Analyze” y “Measure” para obtener el área.



- 8) Se abrirá una nueva ventana con el valor del área, entonces hacemos esto para cada una de las células de la imagen, para este trabajo se seleccionaron unas 30 células al azar. CTRL+M es una opción más veloz para agregar el valor del área a la lista.



- 9) Una vez terminado, se guardó el archivo tal y como aparece en la siguiente imagen.

