



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN
CAMPUS TUXTEPEC

INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES de *p53*, *BCL-2*,
CASPASAS 3, 6, 8 y 9 EN LA LÍNEA CELULAR MCF-7 DESPUÉS
DEL TRATAMIENTO CON LA PARASPORINA A24-2.

T E S I S

Que para obtener el título de
INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA

Presenta:

BRITANNI SUGEY TAPIA HERNÁNDEZ

Director:

DR. MIGUEL ÁNGEL PEÑA RICO

Co-Directora:

DRA. LUZ DEL CARMEN CAMACHO CASTILLO

San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, México 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 06 de diciembre de 2023 a las 11:00 h, los miembros de la comisión revisora de tesis designada por la Jefatura de Carrera de la Ingeniería en Biotecnología se reunieron en la sala de juntas del Instituto de Biotecnología de la Universidad del Papaloapan, con la finalidad de examinar la tesis titulada "Evaluación de la expresión de los genes de *p53*, *Bcl-2*, *caspasas 3*, *6*, *8* y *9* en la línea celular MCF-7 después del tratamiento con la parasporina A24-2" presentada por la alumna Britanni Suguey Tapia Hernández, con número de matrícula 16090402, 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 06 de diciembre de 2023.

ATENTAMENTE
LA COMISIÓN REVISORA

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

Dra. Ana Karín Navarro Martínez
Profesor Investigador Titular "B"
Universidad del Papaloapan
Revisor de Tesis

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

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

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



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN
CAMPUS TUXTEPEC

INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

Tuxtepec, Oaxaca, a 08 de enero de 2023
Oficio No. JCIB/002/01/2023

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

Con base en el dictamen de la comisión revisora, se autoriza la impresión del trabajo de tesis de la alumna **Britanni Sughey Tapia Hernández**, con número de matrícula 16090402, con título final **“Evaluación de la expresión de los genes de *p53*, *Bcl-2*, *caspasas 3, 6, 8 y 9* en la línea celular MCF-7 después del tratamiento con la parasporina A24-2”**, para ser presentado como trabajo de tesis para obtener el título de Licenciado en **Ingeniería en Biotecnología**, toda vez que cumple satisfactoriamente con la reglamentación establecida para tal fin.

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

Dra. Ana Karin Navarro Martínez (Presidente, Universidad del Papaloapan)
Dra. Karla Viridiana Castro Cerritos (Secretario, Universidad del Papaloapan)
Dr. Edgar Baldemar Sepúlveda García (Vocal, Universidad del Papaloapan)
Dr. Enrique Villalobos Amador (Primer Suplente, Universidad del Papaloapan)
Dr. Paul Mauricio Sanchez Ocampo (Segundo Suplente, Universidad del Papaloapan)

Sin más por el momento le envío un cordial saludo.

Atentamente

*Terra uberrima, mens aperta
Bou Lo-tama, chi ji jú*



EFATURA DE INGENIERÍA
EN BIOTECNOLOGÍA
CAMPUS TUXTEPEC

Jacqueline Capataz Tafur

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

Tania Zúñiga Marrón

Vo.Bo. Dra. Tania Zúñiga Marrón
Encargada del Despacho de Vice Rectoría
Académica
Universidad del Papaloapan



VICE-RECTORIA
ACADEMICA

c.c.p. Dr. Miguel Angel Peña Rico, Director de tesis, Para su conocimiento
c.c.p. Britanni Sughey Tapia Hernández, 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

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.

AGRADECIMIENTOS

A mi director de tesis el **Dr. Miguel Ángel Peña Rico** por guiarme en la realización de este proyecto y por su apoyo para poder culminarlo, por compartir su tiempo y conocimiento, por motivarme cada día a hacer las cosas con paciencia, dedicación y detalles. Por sus consejos fuera y dentro del laboratorio.

A **MB. Alain Cruz Nolasco**, por compartirme sus conocimientos y su tiempo en mostrarme las técnicas para la realización de esta tesis.

A mi co-directora de tesis la **Dra. Luz Camacho Castillo**, por todo el conocimiento compartido durante la fase final de mis experimentos durante mi estancia en el Laboratorio de Nutrición Experimental del Instituto Nacional de Pediatría.

A los **miembros de mi comité tutorial**: por brindarme un provechoso asesoramiento, por sus revisiones certeras y por su interés en mi desarrollo profesional.

A mis **amigos y compañeros de clases**, gracias a ustedes mi paso por la carrera fue más agradable.

Al equipo Parasporin, por brindarme su apoyo y sus buenos momentos, la realización de esta tesis no hubiera sido la misma.

Al apoyo del proyecto otorgado por **CONAHCyT** con numero de registro 321009 durante la realización de esta investigación.

A todos los profesores que contribuyeron a mi formación académica.

A la **Universidad del Papaloapan** mi segunda casa.

DEDICATORIAS

A **Dios**, siempre presente en todos los proyectos que realizo. Gracias por permitirme llegar hasta este momento.

A **mis padres Toribio y Félix**, por su confianza en todo momento, por brindarme la oportunidad de obtener una formación académica, por su apoyo incondicional, por sus consejos y amor infinito. A ustedes dedico todos mis logros. Los amo con mi vida, gracias por luchar conmigo hasta el final.

A mis hermanos **Fabiola, Lila, Edward, Oscar, Juan, Doris**, gracias por su apoyo siempre. Mis éxitos son suyos también, los amo.

A todos **mis sobrinos** por su amor incondicional y permitirme ser alguien de inspiración para ustedes.

I. CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN.	14
2. ANTECEDENTES.	15
2.1 <i>Bacillus thuringiensis</i> .	15
2.2 PARASPORINAS.	17
2.2.1 Mecanismo de acción de las parasporinas.	19
2.3 CÁNCER.	20
2.3.1 Cáncer de mama.	21
2.3.2 Tratamientos actuales contra el cáncer.	22
2.3.2.1 Quimioterapia.	22
2.3.2.2 Radioterapia.	23
2.3.2.3 Hormonoterapia.	24
2.3.2.4 Inmunoterapia.	24
2.4 MECANISMOS DE MUERTE CELULAR.	25
2.4.1 Apoptosis.	25
2.4.1.1 Vía extrínseca de la apoptosis	28
2.4.1.2 Vía intrínseca de la apoptosis	29
2.4.2 Inducción de apoptosis mediada por <i>p53</i> .	30
2.5 OTROS TIPOS DE MUERTE CELULAR.	32
2.5.1 Necrosis.	32
2.5.2 Autofagia.	32
2.6 ANTECEDENTES.	34
3. JUSTIFICACIÓN.	35
4. HIPÓTESIS.	36
5. OBJETIVOS.	36
Objetivo general.	36
Objetivos específicos.	36
6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.	37

7. MATERIALES Y MÉTODOS.....	38
7.1 OBTENCIÓN DE PARASPORINAS.	38
7.1.2 Cultivo de la cepa A24.	38
7.2 PURIFICACIÓN DE LAS PARASPORINAS.....	38
7.2.1 Cuantificación de la proteína por método de Lowry.....	39
7.3 CULTIVO CELULAR.....	41
7.3.1 Expansión y disgregado de células MCF-7 y HEK-293T.....	41
7.4 BIOENSAYOS.....	42
7.4.1 Ensayo de viabilidad celular en células MCF-7 y HEK-293T.....	42
7.4.2 Ensayo de hemólisis.....	42
7.4.3 Tratamiento en línea celular MCF-7 y HEK.293T.....	43
7.5 OBTENCIÓN DE ARN y RETROTRANSCRIPCIÓN.....	44
7.5.1 Extracción de ARN total.	44
7.5.2 Síntesis de cDNA.	45
7.6 ANÁLISIS DE LA APOPTOSIS COMO MECANISMO DE MUERTE CELULAR PRODUCIDO POR LA INCLUSIÓN PROTEICA A24-2.	45
7.6.1 Determinación de la expresión de las <i>caspasas 3, 8 y 9</i> y genes antiapoptóticos <i>Bcl-2</i> y <i>p53</i> por qPCR.....	45
7.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	46
8. RESULTADOS.	47
8.1 OBTENCIÓN DE LAS PARASPORINAS.....	47
8.2 BIOENSAYO DE VIABILIDAD CELULAR EN CÉLULAS MCF-7 Y HEK- 293T.....	51
8.3 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD HEMOLÍTICA DE A24-2.....	53
8.4 BIOENSAYOS Y EXTRACCIÓN DE ARN TOTAL.	56
8.4.1 Bioensayos en células HEK-293T.	56
8.4.1.1 Aislamiento de ARN total de células HEK-293T y retrotranscripción.....	58
8.4.2 Bioensayos en la línea celular MCF-7.	61
8.4.2.1 Aislamiento de ARN total de células MCF-7 y retrotranscripción.....	62

8.5 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES <i>p53</i> , <i>Bcl-2</i> Y CASPASAS 3, 6, 8 Y 9 TRAS EL TRATAMIENTO CON LA INCLUSIÓN PROTEICA A24-2.....	65
8.5.1 Expresión de las <i>caspasas 3, 6, 8, 9, p53</i> y <i>Bcl-2</i>	65
9. CONCLUSIÓN.	73
10. PERSPECTIVAS	74
11. REFERENCIAS	75
12. ANEXOS.	93

II. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Micrografía electrónica de <i>B. thuringiensis</i>	16
Figura 2. Modo de acción de la parasporina-1	19
Figura 3. A) Anatomía de la mama femenina y B) Tumor formado en la mama	21
Figura 4. Vía extrínseca e intrínseca de la apoptosis.....	26
Figura 5. Mecanismos de apoptosis inducida por <i>p53</i>	31
Figura 6. Estrategia experimental.....	37
Figura 7. Perfil proteico del cristal parasporal producido por la cepa A24 de <i>B. thuringiensis</i>	47
Figura 8. Perfil protéico de la cepa A24 producida por <i>B. thuringiensis</i>	48
Figura 9. SDS-PAGE al 10 % de la proteína A24-2 producida por <i>B. thuringiensis</i>	49
Figura 10. Viabilidad celular de las células HEK-293T.....	51
Figura 11. Viabilidad celular de las células MCF-7.....	52
Figura 12. Actividad hemolítica de la proteína A24-2.	54
Figura 13. Actividad hemolítica en % de la proteína A24-2.....	55
Figura 14. Análisis morfológico de células HEK-293T.....	57
Figura 15. Cambios morfológicos en células MCF-7	51

Figura 16. Expresión relativa del gen <i>p53</i> en células MCF-7 y HEK-293T.....	66
Figura 17. Expresión relativa de Bcl-2 en células MCF-7 y HEK-293T.....	67
Figura 18. Expresión relativa del gen <i>Casp 9</i> en células MCF-7 y HEK-293T..	68
Figura 19. Expresión relativa de genes <i>Casp 8 y 3</i> en células MCF-7 y HEK-293T.....	69
Figura 20. Expresión relativa del gen <i>Casp 6</i> , en células MCF-7 y HEK-293T..	70

III. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Curva del método de Lowry.	40
Tabla 2. Secuencias forward y reverse de cebadores.....	46
Tabla 3. Cuantificación medida por el método de Lowry.....	50
Tabla 4. Pureza y concentración de las muestras de RNA total de las células HEK-293T tratadas con la proteína A24-2.	59
Tabla 5. Concentración de cADN de células HEK-293T tratadas con la proteína A24-2. ...	60
Tabla 6. Pureza y concentración de las muestras de ARN total de las células MCF-7 tratadas con la proteína A24-2	63
Tabla 7. cDNA de las células MCF-7 tratadas con la proteína A24-2.....	64

IV. ABREVIATURAS

HEK-293T	Células humanas de riñón embrionario	Doc	Doxicolato
ARN	Ácido ribonucleico	BSA	Álbumina sérica bovina
PS	Parasporina	ATCC	Colección Americana de cultivos.
DMEM	Medio Eagle modificado por Dulbecco	CO2	Dióxido de carbono
AIF	Factor inductor de apoptosis	CMSP	Células mononucleares de sangre periférica
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico	ADNc	Acido dexorribonucleico complementario
INC	Instituto Nacional del Cáncer	mA	miliamperes
HRBC	Glóbulos rojos humanos	DMSO	Dimetilsulfóxido
CASP	Caspasa	CARD	Dominio de reclutamiento de caspasa
APAF	Factor activador de las proteasas apoptóticas.	DEPC	Pirocarbonato de dietilo
RT	Transcripción inversa	WHO	Organización mundial de la salud
ACS	Asociación americana del cáncer	ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
MOMP	Membrana externa mitocondrial	Bcl-2	Proto-oncogén de linfoma de células B.
PBS	Fosfato de buffer salino	Bax	Proteína x asociada a Bcl-2
dATP	Desoxi adenosin trifosfato	DD	Dominio de muerte
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa	GAPDH	Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa
DED	Dominio efector de muerte		
NaCl	Cloruro de Sodio		
V	voltios		
FADD	Dominio de muerte asociado a FAS		

V. RESUMEN.

El cáncer de mama es la principal causa de muerte por cáncer en el mundo, siendo en México principal causa de muerte por cáncer en mujeres, en este sentido, se siguen desarrollando novedosas estrategias que sirvan como fuentes alternativas para su tratamiento. De lo anterior, los grupos de investigación de *B. thuringiensis* han llevado al descubrimiento de inclusiones proteicas que contienen a un grupo único de proteínas denominadas "Parasporinas". Estas proteínas tienen la cualidad de tener actividad citotóxica preferente o selectiva sobre las células de origen canceroso, muchas de ellas activan la muerte celular denominada apoptosis, y mejor aún no son tóxicas para las células no cancerosas además de no causar hemólisis.

Estudios previos en el grupo de trabajo demostraron que la parasporina A24-2 posee actividad citotóxica contra células MCF-7. Sin embargo, no se conocía si la parasporina A24-2 al igual que otras parasporinas activan la apoptosis como el mecanismo que lleva a la muerte de las células MCF-7. El resumen de resultados de este trabajo indica que se confirmó la actividad citotóxica en células MCF-7 mediante ensayos de MTT, así como la nula actividad en células HEK-293T y la no inducción de hemólisis. Además, se realizaron bioensayos de 24 horas de tratamiento en células MCF-7 y HEK-293T con la parasporina A24-2 de los cuales se extrajo el ARN total. Se evaluó la expresión de genes de *caspasas 3, 6, 8, 9, p53* y *Bcl-2* involucrados en la vía extrínseca e intrínseca de la apoptosis mediante qPCR. La parasporina A24-2 no indujo cambios morfológicos significativos en células HEK-293T, mientras que sí hubo cambios morfológicos característicos de apoptosis en células MCF-7 después de 24 horas de tratamiento. El análisis por qPCR mostró que todos los genes evaluados tuvieron una expresión similar a la encontrada en el control negativo, resultado que evidencia que a las 24 horas de exposición con la parasporina A24-2 no se logra detectar la inducción de la apoptosis como mecanismo de muerte de las células MCF-7, resultados que contradicen lo observado en las micrografías donde se observaron cambios morfológicos característicos de apoptosis. Mientras que en las células HEK-293T hay una disminución de la expresión del gen *p53* y un incremento de la expresión génica de *Bcl-2*, un factor que inhibe la apoptosis y por ello el nulo incremento de la expresión de las caspasas analizadas en las células HEK-293T.

VI. ABSTRACT.

Breast cancer is the world's main cause of death, and Mexico is no exception. In this sense, novel strategies are being developed to serve as alternative sources for its treatment. Thus, several research groups about *B. thuringiensis* have discovered parasporal inclusions that contain a special group of proteins called Parasporins. These proteins have the quality of having preferential or selective cytotoxic activity on cells of cancerous origin, many of them activate cell death called apoptosis, and even better are not toxic to non-cancerous cells in addition to not causing hemolysis.

Previous studies in the working group demonstrated that parasporin A24-2 has cytotoxic activity against MCF-7 cells. However, it was not known whether parasporin A24-2 like other parasporins activates apoptosis as the mechanism leading to MCF-7 cell death. The summary of results of this work indicates that the cytotoxic activity in MCF-7 cells was confirmed by MTT assays, as well as the null activity in HEK-293T embryonic kidney cells and the non-induction of hemolysis. In addition, bioassays of 24 hours of treatment with parasporin A24-2 were carried out from which total RNA were extracted. The expression of *caspase 3, 6, 8, 9, p53*, and *Bcl-2* genes involved in the extrinsic and intrinsic pathway of apoptosis was evaluated by qPCR. Parasporin A24-2 did not induce significant morphological changes in HEK-293T cells, while morphological changes characteristic of apoptosis were observed in MCF-7 cells after 24 hours of treatment. The qPCR analysis showed that all the genes evaluated had an expression similar to that found in the negative control, a result that shows that after 24 hours of exposure to parasporin A24-2, it is not possible to detect the induction of apoptosis as a mechanism of death of MCF-7 cells, these results contradict what was observed in the micrographs in which characteristic morphological changes were seen with apoptosis. By contrast, in HEK-293T cells there was a decrease in the expression of the p53 gene and an increase in the gene expression of Bcl-2, a factor that inhibits apoptosis, and therefore there is no increase in the expression of the caspases analyzed in the HEK-293T cells.

1. INTRODUCCIÓN.

Las parasporinas (PS) son proteínas de inclusión cristalina de cepas no insecticidas y no hemolíticas de *Bacillus thuringiensis* que poseen actividad citotóxica específica contra un amplio espectro de células cancerosas humanas, Mizuki *et al.*, (2000). Actualmente el “Comité de Clasificación y Nomenclatura de Parasporinas”, clasifica a estas proteínas en 6 familias (PS1 a PS6 respectivamente), Okumura *et al.*, (2010). Las parasporinas tienen diferente tamaño y efecto citotóxico preferencial contra líneas celulares de cáncer. Es bien conocido que muchas de estas actúan sobre diferentes tipos de cáncer, por ejemplo, la familia PS1 se sabe actúa contra células HeLa de cáncer cérvico uterino, Kitada *et al.*, (2005). PS2 contra 5 líneas celulares cancerosas HepG2, Jurkat, HL-60, MOLT-4 y Sawano, Kitada *et al.*, (2006). PS4 es la parasporina que ha mostrado citotoxicidad hacia líneas celulares de cáncer de colon, Okumura *et al.*, (2005). Una característica importante de estas proteínas es su poco o nulo efecto tóxico contra células normales, por lo que actualmente representan una nueva alternativa como posible diana terapéutica contra diferentes tipos de cáncer, Okumura *et al.*, (2010). El mecanismo de acción de las parasporinas difiere entre las familias, así como el espectro citotóxico y el nivel de actividad, Ohba *et al.*, (2009), algunos autores señalan que cada parasporina podría tener su propio mecanismo de inducción a la muerte celular. El grupo de trabajo a aislado diferentes cepas de *B. thuringiensis* de campos de cultivo de la cuenca del Papaloapan, Cruz-Nolasco, (2014), de algunas de las cuales se han encontrado PS con actividad citotóxica específica contra las líneas celulares de cáncer de mama MCF-7, MDA MB 231 y HepG2, Cruz-Nolasco, (2017); Castrejón-Arroyo, (2020). De estas PS aún se desconocen varios aspectos relacionados con su mecanismo de acción. Por lo que este trabajo tiene como objetivo evaluar la expresión de un grupo de cistein-proteasas (caspasas) activadoras de la muerte celular denominada apoptosis.

2. ANTECEDENTES.

2.1 *Bacillus thuringiensis*.

Bacillus thuringiensis (*B. thuringiensis*) fue identificado por primera vez en 1902, por Ishiwata, quien informó que *B. thuringiensis* infectaba a *Bombyx mori* (gusano de la seda), Beegle y Yamamoto, (1992). En aquel momento, el autor lo denominó *Bacillus sotto*, que significa blando y flácido, en referencia al aspecto de las larvas infectadas. Posteriormente, en la ciudad de Turingia (Alemania), Berliner aisló una bacteria en las larvas de la polilla *Ephestia kuehniella*, e ignorando la nomenclatura de Ishiwata, la llamó *Bacillus thuringiensis*, Roh *et al.*, (2007).

B. thuringiensis es una bacteria Gram (+) productora de esporas que sintetiza inclusiones proteicas durante la esporulación, Roh *et al.*, (2007). Presenta dos fases principales a lo largo de su ciclo de vida: 1) crecimiento vegetativo, que es la forma en la que la bacteria se duplica y 2) esporulación, que es un programa de diferenciación de bacteria a espora y le permite sobrevivir en ambientes adversos, Schnepf *et al.* (1998). Las cepas de *B. thuringiensis* se aíslan en todo el mundo a partir de suelo, insectos, polvo almacenado y hojas caducifolias y coníferas, Jensen *et al.*, 2003; Roh *et al.*, (2007).

B. thuringiensis pertenece al grupo del *Bacillus cereus*, y se distingue, como se mencionó anteriormente, por su capacidad de producir inclusiones proteicas durante la fase de esporulación, llamadas delta endotoxinas (**Figura 1**), Okassov *et al.*, (2015).

Las proteínas cristalinas se clasifican actualmente en dos familias: Proteínas Cry y Cyt.

Las proteínas Cyt presentan actividad citolítica contra una variedad de células de invertebrados y vertebrados. Las secuencias de aminoácidos de las proteínas Cyt no tienen ninguna relación con las de las proteínas Cry, la familia de las proteínas Cry está formada por proteínas insecticidas específicas, Hcftc, (1980), y son altamente tóxicas para una amplia variedad de importantes plagas de insectos agrícolas y plagas de insectos, así como a otros invertebrados (sobre todo específicas para insectos y nemátodos), Roh *et al.*, (2007).

Se cree que el modo de acción de las proteínas delta endotoxinas implica: (i) la solubilización del cristal en el intestino medio del insecto, (ii) la activación proteolítica de la protoxina por parte de las proteasas del intestino medio, Hofte y Whiteley ,(1989).

Tras la ingestión de los cristales y la activación de la pro-toxina por el pH alcalino del tracto digestivo de las larvas, los cristales Cry y Cyt se unen a los receptores de la membrana celular,

desencadenando dos tipos de respuestas: (1) la apertura de canales de iones en la membrana; y (2) la activación de la apoptosis con la entrada de Ca^{+2} en la célula, Vachon *et al.* (2012); Xu *et al.* (2014). En ambos casos, el resultado final es la muerte del organismo susceptible, ya sea por desequilibrio iónico y ruptura de la membrana celular o por la cascada de reacciones que activan la muerte celular apoptótica, Melo y Kitada, (2020).

A finales del siglo XX, Mizuki *et al.* (1999) descubren proteínas con actividad citotóxica sobre diferentes tipos de células cancerígenas durante experimentos *in vitro*, iniciando una nueva área de investigación del microorganismo, Mizuki *et al.* (1999), y particularmente centrada en estas proteínas denominadas parasporinas (PS).



Figura 1. Micrografía electrónica de *B. thuringiensis* hacia el final de la esporulación, se muestra la espora y el cristal de proteína. Tomado y modificado de Sanchis, (2010).

2.2 PARASPORINAS.

Las parasporinas son definidas como un nuevo grupo de proteínas Cry sintetizadas por *B. thuringiensis*, que presentan actividad biológica específica contra células de cáncer y tienen baja o nula actividad sobre células no cancerosas normales, Mizuki *et al.* (2000) y no presentan hemólisis, Periyasamy *et al.* (2016).

Mizuki *et al.* en 1999 fue el primer grupo que informaron de delta endotoxinas del *B. thuringiensis* con citotoxicidad selectiva contra células de leucemia, que incluía proteínas parasporales digeridas por proteasas de 1744 cepas de *B. thuringiensis*, 1700 cepas fueron aisladas en Japón, mientras que 44 se obtuvieron del Instituto Pasteur de París, Mizuki *et al.* (1999). De las cepas aisladas, 60 presentaron actividad de hemólisis y fueron eliminadas por contener genes Cyt, el resto de las cepas se sometieron a pruebas *in vitro* de actividad citócida contra células MOLT-4 y actividad insecticida, del total de cepas los autores seleccionaron sólo dos (A1190 y A1462), porque producían toxinas que mataban selectivamente a las células leucémicas en lugar de a las células T normales, Mizuki *et al.* (1999).

Esto condujo a la clasificación de un nuevo tipo de proteínas Cry llamadas parasporinas (PS), Okumura *et al.* (2010) que demostraron tener actividad anticancerígena con acción selectiva y baja o nula actividad contra células sanas, Espino-Vázquez *et al.* (2012).

La mayoría de las parasporinas de *B. thuringiensis* se obtienen de cepas aisladas en el continente asiático (Japón, Vietnam, Malasia e India), aunque existen reportes de este tipo de cepas en el continente americano, como de Islas del Caribe, Canadá y México, Espino-Vázquez *et al.*, (2012). Como una de las principales características identificadas de PS, se resalta que en el cristal parasporal producido por *B. thuringiensis*, se encuentran como protoxinas y para ser tóxicas deben primero ser solubilizadas a pH alcalino o ácido y posteriormente ser digeridas por serín proteasas, como la proteinasa K o la tripsina, Mizuki *et al.* (2000); Saitoh *et al.* (2006); Ohba *et al.* (2009).

Hasta el momento, se han identificado 19 PS y se han clasificado en seis niveles desde la PS 1 a la PS 6, por el “Comité de Clasificación y Nomenclatura de Parasporinas”. Se clasifican en base en la homología entre sus secuencias proteicas primarias, Okumura *et al.* (2010).

La PS1Aa1 (Cry31Aa1) fue la primera toxina PS identificada. Como protoxina es un polipéptido de 81 kDa, cuya secuencia aminoacídica contiene los cinco bloques conservados, comúnmente

descritos para las proteínas Cry insecticidas, Ohba, *et al.* (2009), es responsable de la actividad tóxica frente a células HeLa (cáncer de cuello uterino humano) y HL60 (células de leucemia mieloide) Katayama *et al.*, (2007). Para PS1Aa2 (Cry31Aa2) se realizaron pruebas similares concluyendo que solo la digestión con tripsina genera el fragmento tóxico a pesar de ser también tratada con quimotripsina y proteinasa K, Jung *et al.* (2007). El potencial apoptótico selectivo de la PS1 sobre las células cancerosas y no sobre las células sanas confirma que pertenece a una clase privilegiada de proteínas citotóxicas anticáncer, Katayama *et al.* (2007)

Dos de las principales PS2 son producidas por las cepas *B. thuringiensis* A1547 (PS2Aa1) y A1470 (PS2Aa2). Son proteínas de 37 kDa como protoxina, Kitada *et al.* (2006), y se diferencian entre ellas en tan solo cuatro residuos de aminoácidos. Dichas protoxinas al ser cortadas por proteasas por los extremos amino y carboxilo terminal, se genera un fragmento tóxico de aproximadamente 30 kD, Okumura *et al.* (2013). Esta proteína ha mostrado citotoxicidad frente a líneas celulares como HepG2 (hepatocarcinoma), Jurkat (leucemia de linfocitos T) y poca actividad hacia células HeLa y hepatocitos normales, Ito *et al.* (2004).

Las PS3 producidas por *B. thuringiensis* A1462 tienen un peso de 88 kDa y cuando está activa su tamaño es de 64 kDa. Aparentemente, estas parasporinas son formadoras de poros, aumentando la permeabilidad de las células cancerígenas, Yamashita *et al.* (2005).

La PS4 son de 31 kDa, pero una vez activadas son de 27 kDa presenta una fuerte actividad citotóxica contra líneas celulares humanas con cáncer como MOLT-4, CACO-2 (cáncer humano de colon), TCS (cáncer humano de cuello uterino), y células HL60, Chengchen *et al.* (2014).

La PS5 (Cry64Aa) es la única de esta clase reconocida a la fecha por el comité de nomenclatura de PS; fue aislada y purificada de la cepa A1100 de *B. thuringiensis tohokuensis* y presenta actividad citotóxica contra células T humanas con leucemia (MOLT-4). Esta parasporina presenta una masa molecular de 33.8 kDa en su forma de protoxina, pero cuando es cortada por proteinasa K se produce un fragmento activo de 29.8 kDa, Ekino *et al.* (2014).

La PS6 (Cry63Aa) se aisló de las cepas de *B. thuringiensis* M109 y CP84, Nagamatsu *et al.* (2010). Las protoxinas de las PS1 y PS6 están relacionadas entre sí en algunos aspectos ya que comparten secuencias conservadas en sus primeros 50 residuos de aminoácidos. Además, tras ser activadas por proteólisis, dos de tres péptidos generados en el proceso, conforman un heterodímero tóxico,

Lenina *et al.* (2014) presenta mayor actividad citotóxica hacia células HepG2 y HeLa, Nagamatsu *et al.* (2010).

La actividad citotóxica específica para las células cancerosas convierte a las parasporinas en potencial agente terapéutico en la oncología clínica. Sin embargo, para que un medicamento obtenga la aprobación, debe ser seguro y mostrar eficacia, además de comprender su mecanismo de acción. En este sentido, se sabe que algunas de las parasporinas pueden causar citotoxicidad en las células tumorales, a través del daño a nivel de membrana plasmática induciendo la activación del mecanismo apoptótico, Okassov *et al.* (2015). Por lo que surge la necesidad de identificar si las parasporinas aisladas por el grupo de trabajo tienen como mecanismo de muerte celular la apoptosis.

2.2.1 MECANISMO DE ACCIÓN DE LAS PARASPORINAS.

Las parasporinas tienen menos de un 25% de homología en la secuencia de aminoácidos con las toxinas Cry Ohba *et al.*, (2009). A pesar de ello, se cree que su mecanismo de acción es muy similar. Existen indicios que señalan que las PS reconocen receptores de membrana específicos en las células cancerosas para desencadenar la muerte celular (**Figura 2**), Kotze *et al.* (2005).

Las PS puede causar toxicidad en las células tumorales tanto por la apertura de canales iónicos como por la activación del mecanismo apoptótico, Okassov *et al.* (2015).

El modo de acción de las parasporinas difiere entre las familias, así como el espectro citotóxico y el nivel de actividad, Ohba *et al.* (2009).

La PS1 se une con los receptores de la proteína G o por las proteínas G heterotriméricas provocando un aumento en el flujo de Ca^{2+} , induciendo probablemente, apoptosis en las células cancerígenas, Katayama *et al.* (2007).

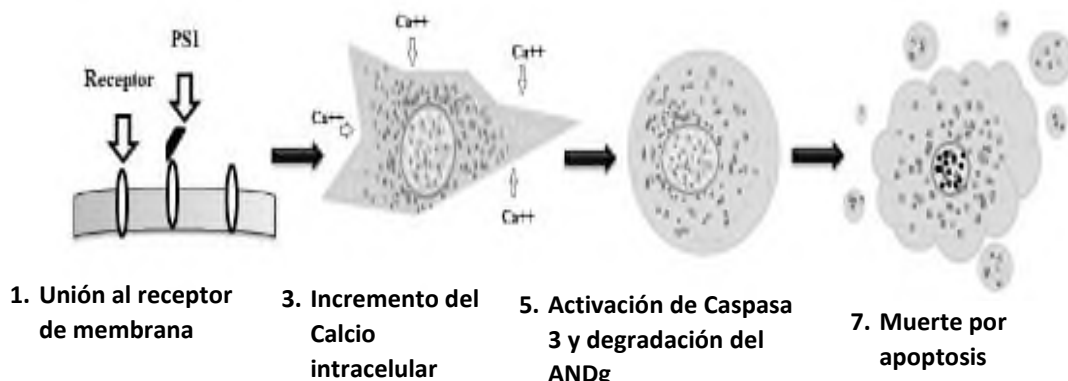


Figura 2. Modo de acción de la parasporina-1. Tomada y modificada de Espino-Vázquez, (2014).

PS2Aa1, aumenta la permeabilidad de la membrana plasmática de las células tumorales, Ohba *et al.* (2009). El paso inicial de la acción citotóxica de la PS2Aa1 es la unión específica de la toxina a una putativa proteína receptora, aún no identificada, localizada en la balsa lipídica de la membrana plasmática de las células tumorales susceptibles a esta proteína. En seguida sigue la formación de oligómeros de PS2Aa1 en las membranas plasmáticas, lo que lleva a la formación de poros y a la lisis celular, Akiba *et al.* (2009). esta proteína es una toxina formadora de poros que se acumula en las balsas lipídicas de las células tumorales, Abe *et al.* (2005).

PS3Aa1 actúa como una toxina formadora de poros en la membrana plasmática de las células cancerosas. Esto se apoya en parte por el hecho de que PS3Aa1 aumenta la permeabilidad de la membrana plasmática de las células objetivo, Ohba *et al.* (2009).

Nadarajah *et al.* (2008) estudiaron el mecanismo de acción de las parasporinas Cry 15Aa, Cry 24Aa, Cry 25Aa en la línea celular leucémica humana CEM-SS y demostraron que el mecanismo de eliminación de las células tumorales es la apoptosis.

Phonnok *et al.* (2010) descubrieron que en todas las líneas celulares de cáncer tratadas con parasporina se observaba la escisión del ADN cromosómico, detectada como patrón de escalera de ADN por electroforesis en gel, así como la activación de la actividad celular de la caspasa-3, un sello distintivo de la apoptosis. Estas características sugieren que el mecanismo de apoptosis es inducido por la mayoría de las parasporinas, Phonnok *et al.* (2010).

2.3 CÁNCER.

El cáncer es un gran grupo de enfermedades que pueden comenzar en casi cualquier órgano o tejido del organismo cuando las células anormales crecen de manera incontrolable, van más allá de sus límites habituales, para invadir partes adyacentes del cuerpo y / o diseminarse a otros órganos. Este último proceso se denomina metástasis y es una de las principales causas de muerte por cáncer. Una neoplasia y un tumor maligno son otros nombres comunes usados para referirse al cáncer, WHO, (2021).

Es posible que el cáncer comience en cualquier parte del cuerpo humano, formado por billones de células. En condiciones normales, las células humanas se forman y se multiplican mediante un proceso que se llama división celular para formar células nuevas a medida que el cuerpo las necesita. Cuando las células envejecen o se dañan, mueren y las células nuevas las reemplazan.

A veces el proceso no sigue este orden y las células anormales o células dañadas se forman y se multiplican cuando no deberían, INC, (2021).

El cáncer es una de las principales causas de muerte en todo el mundo, con casi 10 millones de muertes en 2020, Ferlay *et al.* (2020). Las neoplasias más comunes en 2020 (en términos de nuevos casos de cáncer) fueron:

- mama (2,26 millones de casos);
- pulmón (2,21 millones de casos);
- colon y recto (1,93 millones de casos);
- próstata (1,41 millones de casos);
- piel (no melanoma) (1,20 millones de casos); y
- estómago (1,09 millones de casos).

2.3.1 CÁNCER DE MAMA.

El cáncer de mama surge en las células de revestimiento (epitelio) de los conductos (85%) o lobulillos (15%) en el tejido glandular de la mama (**Figura 3**). Inicialmente, el crecimiento canceroso se limita al conducto o lobulillo (*“in situ”*) donde generalmente no causa síntomas y tiene un potencial mínimo de diseminación (metástasis), WHO, (2021).

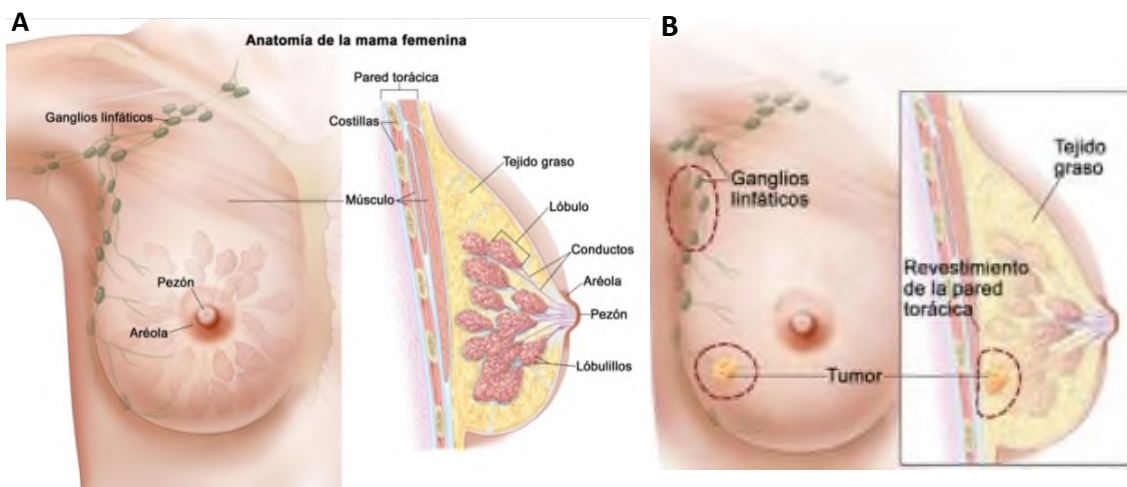


Figura 3. A) Anatomía de la mama femenina y B) Tumor formado en la mama (Fuente: Instituto Nacional del Cáncer).

El cáncer de mama no tiene una causa única; se han identificado una serie de factores que contribuyen en su aparición y desarrollo; por ejemplo la edad, conforme las personas envejecen aumenta el riesgo de padecerlo; el inicio temprano de la menstruación (antes de los 12 años) e inicio tardío de la menopausia (después de los 55 años); antecedentes de cáncer de mama o de ovario; la obesidad y el sobrepeso; el tabaquismo y la ingesta de alcohol; algunas terapias de reemplazo hormonal y ciertos anticonceptivos orales; así como mutaciones genéticas heredadas en los genes BRCA1 y BRCA2 (Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades, 2020).

En 2020, hubo 2.3 millones de mujeres diagnosticadas con cáncer de mama y 685,000 muertes en todo el mundo. A fines de 2020, había 7.8 millones de mujeres vivas a las que se les diagnosticó cáncer de mama en los últimos 5 años, lo que lo convierte en el cáncer más prevalente en el mundo. Hay más años de vida ajustados por discapacidad (AVAD) perdidos por mujeres a causa del cáncer de mama en todo el mundo que cualquier otro tipo de cáncer. El cáncer de mama se presenta en todos los países del mundo en mujeres a cualquier edad después de la pubertad, pero con tasas crecientes en la edad adulta, WHO, (2021).

El INEGI reporta el cáncer de mama como la primera causa de muerte en mujeres en México. En 2020 fallecieron 97,323 personas por tumores malignos. De estos, 7,880 fueron por tumores malignos de mama, lo que equivale a 8% de este total. Debido al cáncer de mama, en 2020 fallecieron 7,821 mujeres y 58 hombres. La tasa más alta de defunciones de mujeres por cáncer de mama se registra en el grupo de edad de 60 años o más (49.08 por cada 100 mil mujeres de este grupo de edad), INEGI, (2020).

2.3.2 TRATAMIENTOS ACTUALES CONTRA EL CÁNCER.

Actualmente existen un gran número de tratamientos contra el cáncer cuya administración se decide de acuerdo con el tipo y avance de la enfermedad, sin embargo, la mayoría de los pacientes pueden recibir una combinación de tratamientos como cirugía con quimioterapia (aplicación de fármacos para atacar las células malignas) o con radioterapia (dosis de radiación para reducir/eliminar tumores), Hernández-Salas *et al.* (2019).

2.3.2.1 QUIMIOTERAPIA.

Un tratamiento convencional por quimioterapia es reconocido como terapia estándar, tradicional o citotóxica que utiliza diversos fármacos fuertes, Hernández-Salas *et al.* (2019).

La quimioterapia (quimio) consiste en usar medicamentos contra el cáncer que se pueden administrar por vía intravenosa o por vía oral. Los medicamentos pasan a través del torrente sanguíneo para llegar a las células cancerosas en la mayoría de las partes del cuerpo. En ocasiones, se puede administrar quimioterapia directamente en el líquido cefalorraquídeo que rodea el cerebro y la médula espinal.

La quimioterapia se puede administrar antes de la cirugía (neoadyuvante) o después de la cirugía (adyuvante). En la mayoría de los casos, la quimioterapia es más eficaz cuando se utilizan combinaciones de medicamentos.

Medicamentos adyuvantes y neoadyuvantes

- Antraciclinas, como la doxorubicina (Adriamycin) y la epirubicina (Ellence)
- Taxanos, como el paclitaxel (Taxol) y el docetaxel (Taxotere)
- 5-fluorouracilo (5-FU) o capecitabina
- Ciclofosfamida (Cytosan)
- Carboplatino (Paraplatin)

Con más frecuencia, se usan combinaciones de dos o tres de estos medicamentos (ACS, 2019).

2.3.2.2 RADIOTERAPIA.

La radioterapia es un tratamiento con rayos (o partículas) de alta energía que destruyen las células cancerosas. Algunas mujeres con cáncer de mama necesitarán radiación, además de otros tratamientos. La radioterapia se utiliza en varias situaciones:

- Después de la cirugía con conservación del seno para ayudar a reducir la probabilidad de que el cáncer regrese en el mismo seno o en los ganglios linfáticos adyacentes
- Después de una mastectomía, especialmente si el cáncer medía más de 5 cm (aproximadamente 2 pulgadas), o si se encuentra cáncer en muchos ganglios linfáticos, o si ciertos márgenes quirúrgicos tienen cáncer, como los de la piel o los músculos
- Si el cáncer se ha propagado a otras partes del cuerpo, como los huesos o el cerebro
- Los tipos principales de radioterapia que se pueden utilizar para tratar el cáncer de seno son la radioterapia con rayo externo (EBRT) y la braquiterapia, ACS, (2019).

2.3.2.3 HORMONOTERAPIA.

Algunos tipos de cáncer de mama son afectados por hormonas, como estrógeno y progesterona. Las células del cáncer de mama tienen receptores que se unen al estrógeno y a la progesterona, e inducen la proliferación celular. Los tratamientos que impiden que estas hormonas se unan a estos receptores se denomina terapia hormonal o endocrina. La terapia hormonal puede alcanzar a las células cancerosas en casi cualquier parte del cuerpo y no sólo en la mama. Se recomienda para las mujeres con tumores que son receptores de hormonas positivos. Sin embargo, no ayuda a las mujeres cuyos tumores negativos para receptores hormonales, ACS, (2019).

2.3.2.4 INMUNOTERAPIA.

La inmunoterapia es un tratamiento que utiliza el propio sistema inmunitario de una persona para combatir el cáncer. La inmunoterapia puede reforzar o cambiar el funcionamiento del sistema inmunitario para que pueda encontrar y atacar las células cancerosas, ACS, (2019).

Los efectos secundarios de las inmunoterapias son el resultado del daño inmunológico a los tejidos normales, Postow *et al.* (2015); Marthey *et al.* (2016). Esto se debe a que los tratamientos se basan en la alteración de las interacciones entre las células cancerosas y el sistema inmunitario. Los lugares más comúnmente afectados son la piel y las mucosas, el tracto gastrointestinal luminal, el hígado y el sistema endocrino. Las erupciones cutáneas suelen ser el primer efecto secundario y pueden ser de naturaleza eritematosa, reticular o maculopapular, mientras que la mucositis puede presentarse con sequedad de boca. La afectación endocrina suele dar lugar a síntomas inespecíficos como cefalea, náuseas y fatiga, Postow *et al.* (2015).

Un desafío importante en la terapia contra el cáncer es mejorar la selectividad y eficacia de los medicamentos contra el cáncer y reducir sus efectos secundarios para mejorar la calidad de vida de los pacientes con cáncer.

Los agentes quimioterapéuticos contra el cáncer convencionales son en su mayoría no selectivos para las células cancerosas que provocan efectos secundarios graves, como toxicidad en los órganos, inmunosupresión y también contribuyen al desarrollo de resistencia a los medicamentos en las células cancerosas, Sharma *et al.* (2021). En su mayoría las terapias conducen a la muerte celular por apoptosis.

2.4 MECANISMOS DE MUERTE CELULAR.

2.4.1 APOPTOSIS.

La apoptosis se ha descrito ampliamente como un mecanismo de muerte altamente regulada, que se produce no sólo como resultado del daño celular o del estrés externo, sino que también tiene lugar durante el desarrollo normal y la morfogénesis, Nikolettou, (2013).

La apoptosis fue definida de acuerdo con criterios exclusivamente morfológicos: el desprendimiento de los llamados cuerpos apoptóticos se relacionó metafóricamente con la caída de las hojas en otoño, Kerr y col. (1972). La apoptosis está así ligada a una serie muy clara de fenómenos morfológicos: redondeamiento celular, condensación nuclear, reducción de volumen celular, compartimentalización de la célula en cuerpos apoptóticos y fagocitosis de estos por macrófagos, Lawen, (2003); Okada y Mak, (2004).

Los procesos bioquímicos implicados en la apoptosis habitualmente se agrupan en dos rutas principales: puede ser iniciada por la propia célula cuando detecta el daño a través de una serie de sensores intracelulares; un mecanismo conocido como la vía intrínseca. Alternativamente, puede ser el resultado de la interacción entre una célula del sistema inmunitario y una célula dañada, lo que se conoce como la vía extrínseca de la apoptosis, Sica *et al.* (1990); Oppenheim *et al.* (2001). Ambas vías apoptóticas, la extrínseca y la intrínseca, pueden conducir a la misma terminal (vía de ejecución) (**Figura 4**), Elmore, (2007); Goldar *et al.* (2015). Ambas rutas son mutuamente interdependientes y acaban convergiendo en sus pasos finales.

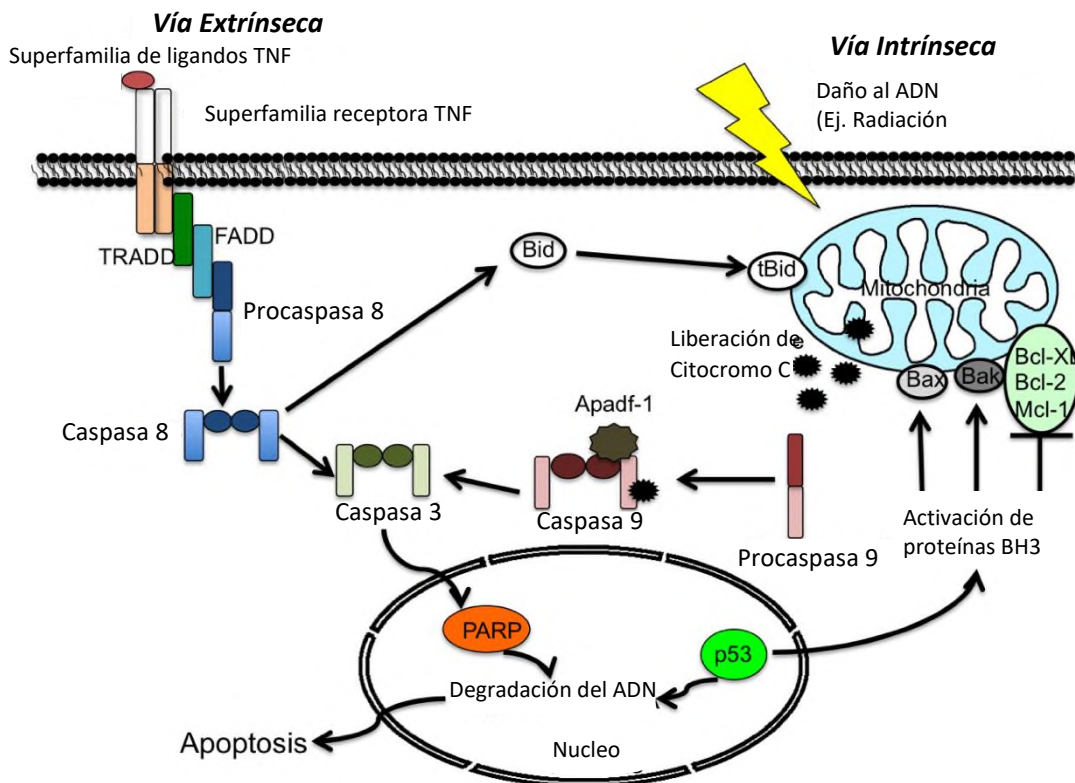


Figura 4. Vía extrínseca e intrínseca de la apoptosis. Tomado y modificado de Yuan et al., 2012.

La transducción de la señal apoptótica se da a través de un balanceo de inhibiciones, Huang, (2002), llegándose como resultado a un “punto de no retorno”. La naturaleza de ese punto se considera comúnmente marcada por la activación de proteasas específicas de los procesos de muerte celular, Danial y Korsmeyer, (2004); Galluzzi y col. (2007).

Las caspasas (proteasas de cisteinil-aspartato) han sido consideradas generalmente como representativas de dicho punto en la apoptosis, Kumar, (2007); Rupinder y col, (2007). Son las enzimas que se encargan de degradar los sustratos clave, para que se desarrollen los caracteres morfológicos que definen a la apoptosis.

Una vez que la célula entra en apoptosis induce la activación de caspasas, que son proteasas con un residuo de cisteína (C) que fragmentan proteínas inmediatamente después de los residuos de aspartato (Asp). Las caspasas son zimógenos compuestos por tres dominios definidos: el prodominio, el dominio catalítico grande (~p20) y el dominio catalítico pequeño (~p10). La escisión entre los tres dominios generalmente se requiere para formar la enzima activa. Para que una caspasa se active, debe estar en una configuración de dímero preformada o inducida,

Boatright *et al.* (2003). La enzima activa es, por tanto, un heterotetrámero de los dominios catalíticos compuestos por dos subunidades grandes y dos pequeñas (p20/p10) (Walker *et al.*, 1994). Cada caspasa tiene una especificidad de sustrato específica, pero todas comparten la preferencia por un residuo de aspartato inmediatamente antes del sitio de escisión, Thornberry *et al.* (1997).

Existen dos categorías de caspasas, las caspasas iniciadoras y las caspasas efectoras (Elmore, 2007). Las caspasas iniciadoras tienen un prodominio largo que codifica un motivo de interacción proteína-proteína utilizado para facilitar la dimerización de los dominios catalíticos. Estos motivos incluyen el dominio de reclutamiento de caspasa (CARD) que se encuentra en caspasa-2 y caspasa-9, y el dominio efector de muerte (DED), que se encuentra en los prodominios de caspasa-8 y caspasa-10, Hofmann *et al.*, (1997) y las caspasas efectoras tienen en común un prodominio corto de 20 a 30 residuos que carece de cualquier motivo definido o sitio de interacción de proteínas, Martin y Green, (1995). Una vez detectado el daño celular, las caspasas iniciadoras, las caspasas 8 y 9, que se encuentran inactivas o como procaspasas, activan a las caspasas efectoras (caspasas 3, 6 y 7).

Caspasa-3 es responsable de la escisión de la mayoría de los sustratos asociados a la apoptosis conocidos Walsh *et al.* (2008), Slee *et al.* (2001).

Las caspasas ejecutoras están presentes en las células como dímeros preformados que se activan por escisión, Boatright *et al.* (2003) o zimógenos, es decir, como precursores enzimáticos inactivos que requieren de un cambio bioquímico para que se exponga su sitio activo y así puedan tener actividad catalítica, Shi, (2004). Se activan cuando el conector entre la subunidad grande y la pequeña es escindido por una caspasa aguas arriba u otra proteasa como la granzima B, Darmon *et al.* (1995). Cuando la caspasa está en su forma no escindida, el sitio activo está ocupado bloqueando la formación de un sitio funcional de unión al sustrato. A diferencia de las caspasas ejecutoras, las caspasas iniciadoras se activan por dimerización.

La activación de las caspasas efectoras inicia una cascada de acontecimientos que da lugar a la fragmentación del ADN a partir de la activación de las endonucleasas, la destrucción de las proteínas nucleares y del citoesqueleto, el entrecruzamiento de proteínas, la expresión de ligandos para las células fagocíticas, Martinvalet *et al.* (2005); Poon *et al.* (2014), la condensación del ADN y la disminución del tamaño celular y nuclear. En este tipo de muerte, la integridad de la

membrana plasmática se mantiene intacta hasta que comienza la formación de cuerpos apoptóticos, cuya función es contener el material celular y evitar que éste actúe como desencadenante de la muerte de otras células. Una vez finalizada la apoptosis, otras células especializadas fagocitan los cuerpos apoptóticos, Saraste, (2000). Si los restos de células apoptóticas no se fagocitan, como en el caso de un entorno de cultivo celular artificial, sufrirán una degradación que se asemeja a la necrosis y la condición se denomina necrosis secundaria, Ziegler y Groscurth, (2004).

La muerte celular apoptótica pertenece a las numerosas funciones celulares en las que el Ca^{2+} ejerce un papel regulador complejo, Berridge *et al.* (2000); Clapham (2007); Rimessi *et al.*, (2008). Es importante destacar que el Ca^{2+} es una señal de sensibilización crítica en la transición proapoptótica de las mitocondrias que desempeña un papel clave en la regulación de la muerte celular, Kroemer y Reed (2000). La sobrecarga de Ca^{2+} mitocondrial es una de las formas proapoptóticas de inducir la inflamación de las mitocondrias, con perturbación o ruptura de la membrana externa y, a su vez, la liberación de factores apoptóticos mitocondriales en el citosol, Giorgi *et al.* (2008), tales como el citocromo *c*, el factor inductor de la apoptosis (AIF), la procaspasa-9, Smac/DIABLO y la endonucleasa G, Ferri y Kroemer, (2001); Martinou *et al.* (2000); Joza *et al.* (2001); Verhagen *et al.* (2000); Parrish *et al.* (2001).

2.4.1.1 VÍA EXTRÍNSECA DE LA APOPTOSIS.

La vía extrínseca, también conocida como la vía del receptor de la muerte (RM) de la apoptosis, Igney y Krammer (2002) inducida por la participación de los receptores de muerte por sus ligandos afines en la membrana celular.

Los receptores de muerte son todos miembros de la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNFR), pero los receptores de muerte tienen en común un dominio de muerte (DD) en su C-terminal. Los ligandos de la muerte, que al unirse a los RM en la membrana de la célula diana inducen la vía extrínseca a través de la activación de la procaspasa 8 a caspasa 8, Kim *et al.* (2004). Para activar la caspasa 8, un ligando de muerte debe unirse a un RM, lo que resulta en el reclutamiento de la procaspasa 8 monomérica a través de su dominio inductor de muerte (DID) a un complejo de señales inductoras de muerte (CSIM) situado en el dominio citoplasmático del RM unido al ligando. El CSIM también incluye una proteína adaptadora conocida como dominio de muerte asociado a FAS (FADD) o dominio de muerte asociado al receptor de TNF

(TNFR) (TRADD), que facilita la interacción de la procaspasa 8 con el CSIM (Kim *et al.*, 2004). El reclutamiento de varios monómeros de procaspasa 8 en el CSIM da lugar a su dimerización y activación, y la caspasa 8 resultante puede inducir la apoptosis, Spencer *et al.* (2009).

2.4.1.2 VÍA INTRÍNSECA DE LA APOPTOSIS.

La vía regulada por BCL-2 (también llamada intrínseca, mitocondrial o de estrés) que se activa por condiciones de estrés, como la privación de citoquinas, estrés ER o daño en el ADN, Igney y Krammer (2002) implica una variedad de estímulos que actúan sobre múltiples objetivos dentro de la célula. Los estímulos internos como el daño genético irreparable, la hipoxia, las concentraciones extremadamente altas de Ca⁺ citosólico y el estrés oxidativo severo son algunos de los desencadenantes del inicio de la vía mitocondrial intrínseca, Kroemer *et al.* (2007). Estos estímulos convergen en las mitocondrias que conducen a la permeabilización de la membrana externa mitocondrial (MOMP) y la liberación de citocromo c desde el espacio intermembrana mitocondrial al citosol, una vez en el citosol el citocromo c se une al Apaf-1 citosólico (factor activador de la proteasa de la apoptosis-1), el citocromo c induce la apoptosis al unirse al dominio WD de los monómeros de APAF1, lo que provoca un cambio conformacional en APAF1 exponiendo un dominio de unión de nucleótidos y de oligomerización que es capaz de unirse al desoxi ATP (dATP). Esta unión induce un cambio conformacional adicional en APAF1, exponiendo sus dominios CARD y de oligomerización, permitiendo así que varios APAF1 se ensamblen en un complejo conocido como apoptosoma, Acehan *et al.* (2002). El apoptosoma contiene en su centro abierto varios dominios CARD expuestos, que luego reclutan y activan varias proteínas procaspasas 9, Cain *et al.* (2002). El proceso, a su vez, activa el ejecutor aguas abajo de las caspasas-3, -6 y -7 para la escisión de sustratos celulares que conducen a la muerte celular apoptótica, Slee *et al.* (1999); Kuribayashi *et al.* (2006). Tanto la vía extrínseca como la intrínseca convergen en el mismo punto (fase de ejecución). La fase de ejecución se refiere a la vía final de la apoptosis, Sankari, (2012).

La vía intrínseca está controlada por interacciones entre miembros proapoptóticos y antiapoptóticos de la familia de proteínas Bcl-2. Hay al menos 20 proteínas en la familia Bcl-2, que se dividen en 3 grupos. Los miembros del grupo I son antiapoptóticos, mientras que los grupos II y III son proapoptóticos. Los miembros de la familia Bcl-2 pueden definirse por la presencia de

motivos de secuencia conservados conocidos como dominios de homología Bcl-2 (BH1 a BH4). Cada uno de estos dominios BH tiene una función diferente y los miembros de la familia contienen uno o más de ellos. Mientras que la mayoría de las proteínas antiapoptóticas (incluidas Bcl-2, Mcl-1, Bcl-w, Bcl-xL y A1) contienen los cuatro dominios de homología Bcl-2 y protegen a las células expuestas a diversas condiciones citotóxicas, las proteínas proapoptóticas pueden carecer de uno o varios de estos dominios. los dominios BH y se pueden dividir en dos subgrupos. Los miembros del primer grupo, Las proteínas de dominio solo BH3 (incluidas Bid, Bim, Bik, Bad, Bmf, Noxa, Puma y Hrk) actúan como sensores de daño y antagonistas directos de Bcl-2 y las otras proteínas pro-supervivencia. El otro grupo proapoptótico contiene los dominios BH 1-3 (Bax, Bak, Bok y Bcl-x_s) y activa directamente a otros miembros de la familia proapoptótica. Las proteínas antiapoptóticas Bcl-2 ejercen su actividad uniéndose a los miembros proapoptóticos Bax y Bak, previniendo el daño mitocondrial, Scorrarno y Korsmeyer (2003).

2.4.2 INDUCCIÓN DE APOPTOSIS MEDIADA POR P53.

p53 se considera el "guardián del genoma" debido a su importante papel en la prevención de la tumorigénesis y la inhibición de la progresión del cáncer, Levine, (2020). En respuesta a varios tipos de estrés, p53 se activa a través de diferentes modificaciones postraduccionales (PTM), Liu *et al.* (2019); Wen and Wang (2022) para actuar como un factor de transcripción en el núcleo (Riley *et al.*, 2008) o un inductor de apoptosis en el citoplasma, Green y Kroemer, (2009).

p53 provoca la apoptosis a través de la activación transcripcional de la expresión de los genes pro-apoptóticos, como Puma, Bax y Noxa, Oda *et al.* (2000); Nakano *et al.* (2001). Noxa se traslada a la mitocondria e interactúa con los miembros antiapoptóticos de BCL-2, lo que lleva a la activación de la caspasa-9 y la apoptosi, Shibue *et al.* (2003). Tres grupos independientes descubrieron que PUMA, también conocido como BBC3, era otro gen solo BH3 crítico para la apoptosis inducida por p53. PUMA se une e inhibe BCL-2 y BCL-X L en las mitocondrias, Han *et al.* (2001); Nakano y Vousden (2001); Yu *et al.* (2001). La inhibición de las proteínas BCL-2 antiapoptóticas conduce a la activación de las proteínas formadoras de poros, BAX y BAK, que es un requisito previo para MOMP y la liberación de citocromo c (**Figura 5**), Oltvai *et al.* (1993); Chittenden *et al.* (1995); Farrow *et al.* (1995); Kiefer *et al.* (1995).

También se cree que p53 regula la apoptosis mitocondrial a través de una vía independiente de la transcripción, Aubrey *et al.* (2018). Se descubrió que p53 activado por estrés se transloca a la mitocondria, provocando así la liberación de citocromo c y la activación de caspasa tanto en células primarias como cancerosas, Marchenko *et al.* (2000); Mihara *et al.* (2003).

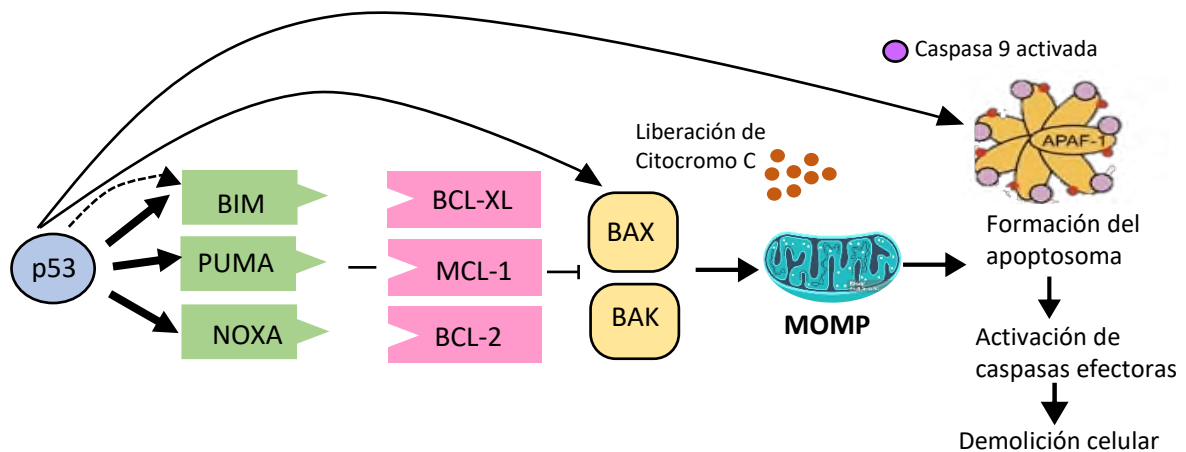


Figura 5. Mecanismos de apoptosis inducida por p53. Tomado y modificado de Aubrey *et al.*, 2017.

Aunque el papel de p53 en la inducción de la apoptosis está ampliamente aceptado, también hay informes de que p53 puede regular otras vías de muerte celular no apoptóticas. Por ejemplo, se informó que p53 abre el poro de transición de permeabilidad mitocondrial para inducir así la muerte celular necrótica, Vaseva *et al.* (2012). Además, también se ha informado que p53 sensibiliza las células a la ferroptosis, una forma de muerte celular no apoptótica, Dixon *et al.* (2012).

Independientemente de que la apoptosis se desencadene por las vías intrínsecas o extrínsecas, su estricta regulación es esencial. En el cáncer, por ejemplo, la célula no consigue iniciar la apoptosis debido a mutaciones en los distintos mecanismos de iniciación. Si esto ocurre al mismo tiempo que la célula no responde a las señales externas, que normalmente provocarían la vía extrínseca o inhibirían la proliferación, la célula crecerá y se dividirá sin control, lo que dará lugar a la formación de un tumor benigno o a un cáncer, Philchenkov *et al.* (2004).

La apoptosis (puede distinguirse de la forma no programada de muerte celular necrosis tanto visualmente bajo el microscopio como mediante una serie de técnicas de biología molecular;

entre ellas, la citometría de flujo con tinción de Annexina V-FITC y los ensayos de fragmentación del ADN.

2.5 OTROS TIPOS DE MUERTE CELULAR.

2.5.1 NECROSIS.

La necrosis abarca una amplia variedad de procesos de muerte celular con un denominador común: la pérdida de la integridad de la membrana plasmática seguida de una fuga citoplasmática, Yuan y Kroemer, (2010). La necrosis puede producirse simplemente como consecuencia de un daño tan extenso que la integridad de la célula se ve alterada, por ejemplo, a altas temperaturas, tras la congelación y descongelación, o por estrés mecánico. En estos casos, la muerte celular es pasiva y no requiere la activación de ninguna vía de señalización en particular, Green y Llambi, (2015).

A diferencia de la apoptosis, la necrosis es una forma alternativa e incontrolada de muerte celular que es inducida por una lesión externa, como la hipoxia o la inflamación, Elmore, (2007).

Este proceso suele implicar la regulación al alza de diversas proteínas y compuestos proinflamatorios, como el factor nuclear- κ B, lo que da lugar a la ruptura de la membrana celular que provoca el derrame del contenido de la célula en las zonas circundantes, lo que da lugar a una cascada de inflamación y daño tisular. La célula suele responder con una hinchazón, (proceso conocido como oncosis) al no poder mantener la homeostasis con su entorno, D'Arcy, (2019).

La necrosis suele observarse como un estado final en el cultivo celular por la presencia de fragmentos celulares en el medio, lo que se describe en muchos casos en un entorno de cultivo celular como necrosis suele ser simplemente los restos de células apoptóticas tardías, cuyos cuerpos apoptóticos han perdido la integridad, D'Arcy, (2019).

2.5.2 AUTOFAGIA.

La autofagia, es un proceso celular muy conservado en los eucariotas, proceso catabólico que se lleva a cabo bajo estrés metabólico (como de nutrientes y el fracaso de la bioenergética), para asegurar la disponibilidad de productos intermedios metabólicos críticos. También es importante para la eliminación de orgánulos dañados (incluidas las mitocondrias), agregados de proteínas y organismos infecciosos, Levine y Kroemer, (2008); Kroemer *et al.* (2010).

La autofagia, en general, es un proceso de supervivencia. Su presencia durante la llamada muerte celular autofágica (tipo II) suele representar un intento fallido de superar el estrés letal, y la interrupción de este proceso promueve, en lugar de inhibir, la muerte celular en muchos casos. Esta forma de muerte celular suele denominarse muerte celular independiente de las caspasas acompañada de autofagia, Levine y Kroemer, (2008); Shen *et al.* (2012).

La autofagia puede iniciarse por diversos factores de estrés, sobre todo por la privación de nutrientes (restricción calórica) o puede ser el resultado de señales presentes durante la diferenciación celular, la embriogénesis y en la superficie de los orgánulos dañados. Aunque la autofagia se utiliza a menudo para reciclar componentes celulares, puede dar lugar a la destrucción de la célula y, de este modo, se ha relacionado con la eliminación de las células senescentes de los tejidos envejecidos y la destrucción de las lesiones neoplásicas, Mizushima *et al.* (2008).

Se han identificado tres formas distintas de autofagia: macroautofagia, microautofagia y autofagia selectiva, Cuervo, (2004). En la forma de autofagia más descrita, la "macroautofagia", regiones enteras de la célula se encierran en vesículas de doble membrana denominadas autofagosomas. Estos autofagosomas se fusionan con los lisosomas para convertirse en autofagolisosomas y su contenido es degradado por las proteasas presentes en ellos. En la microautofagia, la carga (orgánulos o regiones del citosol) interactúa directamente con los lisosomas y se fusiona con ellos, Li *et al.* (2012) a, b.

La muerte celular se ha observado en los cánceres durante mucho tiempo, pero inicialmente se informó en gran medida en el contexto de la necrosis observada en las zonas hipóxicas en los tumores en crecimiento, Thomlinson y Gray (1955). La muerte celular también se ha asociado durante mucho tiempo a la terapia contra el cáncer, ya que la radiación y la quimioterapia se diseñaron para causar la muerte de las células malignas, pero esto tiene el coste de causar también la muerte de muchas células normales, Ballantyne (1975); Katz y Glick (1979); O'Connor (2015).

Para desarrollar tratamientos eficaces contra el cáncer y otras enfermedades caracterizadas por anomalías en la regulación de la muerte celular, es necesario comprender las diferentes formas en que las células pueden perder viabilidad y finalmente morir, D'Arcy. (2019).

2.6 ANTECEDENTES

Los avances en la biotecnología han permitido generar múltiples soluciones a problemáticas de salud humana, y el cáncer no es la excepción. En la búsqueda de nuevas alternativas a tratamientos contra el cáncer, se ha puesto especial atención en principios activos de origen natural, Demain y Arnold, (2014). El grupo de trabajo de la Universidad del Papaloapan se ha dado a la tarea de aislar diversas cepas de *B. thuringiensis* de campos de cultivo de la región de la cuenca del Papaloapan, Cruz-Nolasco (2014). De las cuales, se han identificado las parasporinas (AX-2 y A34-2 entre otras) con actividad citotóxica sobre las líneas celulares de cáncer de mama MCF-7 y MDA MB 231, Cruz-Nolasco (2017). Además, Castrejón-Arroyo, (2020) identificó también parasporinas (A13-2, A13-5 y A24-6) de las cepas A24 y A13, encontrando que poseen actividad anticancerígena contra células MCF-7 y probó la seguridad farmacológica de estas contra CMSP y HEK-293T, cuantificó ADN de doble cadena sugiriendo muerte por apoptosis en células MCF-7. Así mismo, Becker *et al.* (2021) demostraron que la apoptosis observada sobre las células MCF-7 tratadas con PS A13-2 no fue derivada de un incremento del estrés oxidativo.

Rendón-Marín *et al.* (2021) evaluaron el efecto sobre la inducción de genes apoptóticos (p53 y casp 9) contra la línea celular MCF-7 tratada con la parasporina BTM-P1 (3.6 μ M), mostrando que a las 3 horas de exposición la parasporina indujo la activación de p53 y apoptosis. Además, Chubicka *et al.* (2018) demostraron que la parasporina P-KAU 41 (1 μ g/ mL) induce apoptosis por la vía intrínseca en células HeLa.

Además, el grupo de trabajo aún cuenta con otro grupo de PS de las que no hay evidencia del mecanismo de muerte que inducen sobre varios tipos de cáncer.

3. JUSTIFICACIÓN.

Actualmente existen diversas estrategias terapéuticas para el tratamiento contra el cáncer de mama. Sin embargo, los tratamientos son invasivos y tienen poca o nula selectividad celular, como consecuencia los pacientes experimentan efectos secundarios no deseados lo que resulta en un deterioro en su calidad de vida. Esto ha llevado a la búsqueda de tratamientos menos invasivos, más selectivos y consecuentemente menos efectos secundarios no deseados en los pacientes. Así, las parasporinas surgen como una potencial herramienta de uso farmacológico para tratamiento del cáncer, dada su alta selectividad por las células de origen canceroso, propiedad que podría reducir los efectos secundarios no deseados, representando una potencial diana. Por lo tanto, es indispensable conocer los mecanismos involucrados con su actividad antiproliferativa y citotóxica específica sobre las células cancerosas. En este sentido, el grupo de trabajo cuenta con grupos de PS que han demostrado una significativa actividad antiproliferativa sobre las líneas celulares de cáncer de mama. No obstante, se desconoce cuál es el mecanismo de muerte asociado a la actividad citotóxica observada, así como la seguridad sobre células no cancerosas. Este proyecto de tesis tuvo como objetivo principal dar un primer acercamiento del mecanismo de muerte asociado a la actividad citotóxica de la inclusión proteica A24-2 aislada de la cepa A24 de *B. thuringiensis* a través de la evaluación de la expresión de genes implicados en el proceso de muerte celular conocido como apoptosis, además de determinar la seguridad de la proteína A24-2.

4. HIPÓTESIS.

La actividad citotóxica de la inclusión proteica A24-2 sobre las células MCF-7 llevan al incremento en los niveles de expresión de los genes apoptóticos *p53*, *Bcl-2*, *caspasas 3, 6, 8 y 9*, además la inclusión proteica A24-2 no afecta la viabilidad de las células no cancerosas HEK-293T ni causa hemólisis de los eritrocitos.

5. OBJETIVOS.

Objetivo general.

Determinar si la actividad citotóxica producida por la inclusión proteica A24-2 sobre la línea celular de cáncer de mama MCF-7 está asociada con la activación de la apoptosis.

Objetivos específicos.

1. Obtener y purificar la inclusión proteica A24-2 a partir de la cepa A24 de *B. thuringiensis*.
2. Determinar la inocuidad de inclusión proteica A24-2 sobre las células no cancerosas.
3. Obtener el RNA total a las 24 horas post tratamiento con la inclusión proteica A24-2 en la línea celular de cáncer de mama MCF-7 y células HEK-293T.
4. Analizar los niveles de expresión de los genes *caspasa 3, 6, 8, 9* así como de *Bcl-2* y *p53* y determinar si existe una relación con el proceso de muerte denominado apoptosis.

6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.

La metodología experimental realizada en este trabajo se resume en la **Figura 6**.

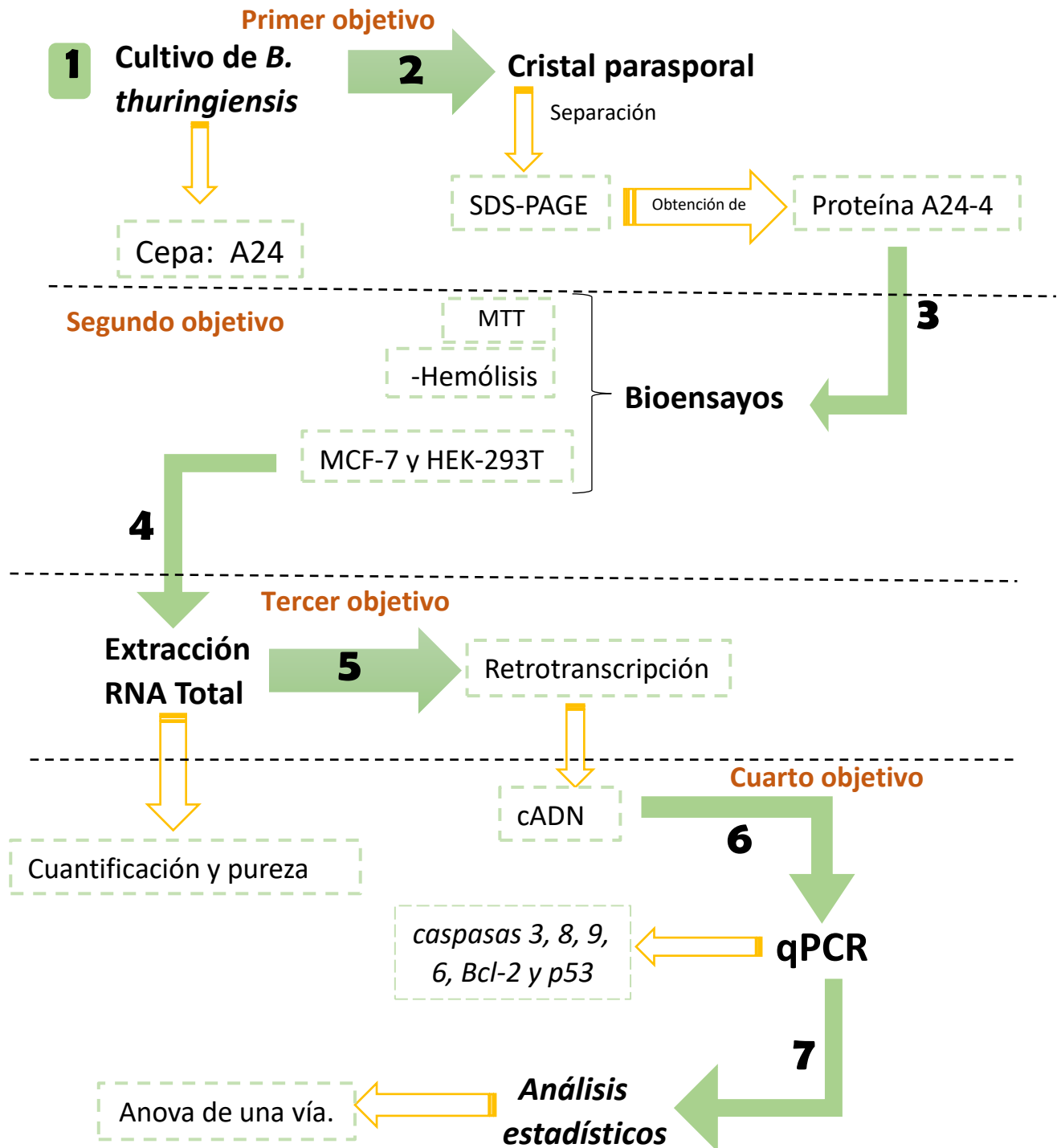


Figura 6. Estrategia experimental.

7. MATERIALES Y MÉTODOS.

7.1 OBTENCIÓN DE PARASPORINAS.

7.1.2 CULTIVO DE LA CEPA A24.

Para la obtención de la proteína A24-2 se realizó el cultivo de la cepa A24 de *B. thuringiensis* en dos tipos de medio, el primero fue en medio agar nutritivo en cajas Petri de 60 x 55 mm, las cuales se mantuvieron en incubación por 4 días a 30 °C utilizando una incubadora (Novatech) y posteriormente 3 días de incubación a 4 °C, esto para conseguir que la bacteria liberará al cristal parasporal (lisis celular). Posteriormente, el agar fue lavado con agua destilada estéril para recuperar el sedimento que contenía las esporas y cristal proteico, y los diversos componentes bacterianos.

El segundo cultivo se realizó en 350 mL de medio caldo nutritivo, las condiciones del cultivo fueron 30 °C a 130 rpm en un agitador orbital (Incubator Shaker series New Brunswick Scientific E24R), el cual se mantuvo durante 7 días. Metodología descrita en Cruz-Nolasco, (2017).

El material resultante (de ambos cultivos) que contenía las proteínas insolubles se lavaron dos veces con una solución isotónica de NaCl al 0.85% (*p/v*), el mosto fue centrifugado a 3700 *g* por 15 minutos, finalmente se realizó un lavado con agua destilada y se centrifugó bajo las mismas condiciones que en el paso anterior, a continuación, se realizaron lavados con solución de agua acidificada a un pH de 2.5 también por duplicado, centrifugando a 3700 *g* por 15 minutos en cada lavado y nuevamente un lavado con agua destilada a las mismas condiciones de centrifugación. Al término de los lavados se hizo una centrifugación final a 3700 *g* por 15 minutos y la pastilla resultante se resuspendió en 3 mL de agua destilada. Las centrifugaciones realizadas en cada paso fueron llevadas a cabo en una centrifuga Thermo Scientific Megafuge 16R.

7.2 PURIFICACIÓN DE LAS PARASPORINAS.

Estudios previos de Castrejón-Arroyo, (2020) con la cepa A24 de *B. thuringiensis* informó del hallazgo de una banda de proteína de entre 20 y 25 kDa con actividad antiproliferativa contra la línea celular de cáncer de mama MCF-7 y determinó su IC₅₀ de 12 $\mu\text{g/mL}$, a esta proteína la denominó A24-2, Castrejón-Arroyo, (2020).

Para contar con la inclusión proteica A24-2 recién aislada y asegurar que esta poseyera la actividad reportada por Castrejon-Arroyo, (2020), se realizaron los cultivos de la cepa A24, aislándose los cristales parasporales de este nuevo cultivo, los cristales se solubilizaron según el método de Laemmli, Laemmli (1970) en una relación 2:1 (proteína: Laemmli) a 5 min a 95 °C en baño María, las proteínas se separaron por movilidad electroforética en geles desnaturalizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 10 % en una cámara de electroforesis (Mini protean II, Bio-rad). Las condiciones de la electroforesis fueron 2 h a 100 V, Cruz- Nolasco (2017). Las bandas de entre 20-25 kDa fueron cortadas de los geles de poliacrilamida, y se fragmentaron en trozos pequeños, que se sometieron a elución a 10 mA por 3 horas, con el fin de recuperar la proteína contenida en los geles. Al finalizar la elución la proteína se sometió a diálisis, para eliminar los interferentes como el SDS, que es tóxico para las células MCF-7, la presencia de este detergente daría un falso positivo en las pruebas de citotoxicidad. Para la diálisis se empleó una membrana de diálisis (Sigma Aldrich) de MWCO: 12000. Como amortiguador de diálisis se usó PBS, las proteínas se colocaron dentro de la membrana, una vez sellada la bolsa de diálisis, ésta fue sumergida en el amortiguador por 24 horas cambiándolo cada 4 horas en agitación.

Las muestras de proteína dializada fueron concentradas en una columna Amicon Ultra-2mL Ultracel- 10k (10000 NMWL).

Las muestras se analizaron nuevamente en geles SDS-PAGE al 10 % a 100 V por 1 hora para asegurar la presencia de una sola banda, con este paso se monitoreo el proceso de purificación de la proteína.

7.2.1 CUANTIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA POR MÉTODO DE LOWRY.

Para conocer la concentración de la proteína aislada se utilizó el método de Lowry. La cuantificación se realizó de la siguiente manera, se prepararon las siguientes soluciones.

Reactivo A: Na_2CO_3 al 2%, NaOH 0.1M (carbonato de sodio, hidróxido de sodio)

Reactivo B: $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ al 1% (Sulfato de cobre pentahidratado)

Reactivo C: Tartrato sódico-potásico al 2%

Reactivo de Lowry: Se preparó al momento de iniciar el ensayo, mezclando A, B y C en relación (10: 0.1: 0.1) volumen.

Reactivo Doc: Desoxicolato de sodio al 0.4%

Reactivo Folin: Relación 1:2 (agua: reactivo de Folin)

Las concentraciones de albúmina sérica bovina (BSA) utilizadas fueron de 0, 5, 10, 30, 50 mg/mL, preparadas a partir de una solución patrón de BSA en concentración 1 mg/mL.

En microtubos de 1.5 mL se pipeteó el volumen de BSA de acuerdo con cada concentración establecida y se completó el volumen restante con agua para completar un volumen final de 50 μ L en cada tubo.

Después a todos los tubos se le agregó el reactivo DOC preparado anteriormente.

Posteriormente se preparó el reactivo de Lowry y se pipeteó a cada tubo, el contenido de cada tubo se mezcló en el vortex y se dejó reposar por 10 min. Se preparó el reactivo de Folin, después de los 10 min se agregó a todos los tubos y se homogenizó con el vortex, hasta dispersar el color, los volúmenes de los reactivos para la cuantificación se especifican en la **Tabla 1**.

Los tubos se colocaron 30 minutos en oscuridad, luego de ese tiempo se pipetearon 200 μ L de cada tubo en una placa de 96 pozos, la absorbancia a 540 nm fue adquirida en un lector de microplacas Bio-rad iMark.

Tabla 1. Curva del método de Lowry.

Tubo	H ₂ O milli Q	BSA (1mg/mL)	Muestra	DOC 0.4 %	Reactivo de Lowry	Reactivo de Folin
0	50 μ L	-----	-----	100 μ L	1 mL	100 μ L
5	45 μ L	5 μ L	-----	100 μ L	1 mL	100 μ L
10	40 μ L	10 μ L	-----	100 μ L	1 mL	100 μ L
30	20 μ L	30 μ L	-----	100 μ L	1 mL	100 μ L
50	-----	50 μ L	-----	100 μ L	1 mL	100 μ L
Muestra	45 μ L	-----	-----	100 μ L	1 mL	100 μ L

7.3 CULTIVO CELULAR.

La línea celular embrionaria de riñón humano HEK-293T y la línea celular MCF-7 utilizadas en los bioensayos fueron obtenidas del banco de células del laboratorio de Biomedicina de la Universidad del Papaloapan, y del Laboratorio de Nutrición Experimental del Instituto Nacional de Pediatría, mismas que fue obtenidas de la casa comercial (ATCC CRL-3216, HTB-22 respectivamente).

7.3.1 EXPANSIÓN Y DISGREGADO DE CÉLULAS MCF-7 Y HEK-293T

Para la expansión de las células se descongelaron viales de células MCF-7 y HEK-293T, a tubos Falcon de 15 mL se agregaron 6 mL de medio DMEM (Biowest) suplementado con L-glutamina 1 %, suero fetal bovino 10 % y antibiótico (penicilina/estreptomicina) al 1 %, y se le vertieron las células de los viales de crioconservación, los tubos fueron centrifugados a 180 g durante 5 minutos, se decantó el sobrenadante de los tubos Falcon y se agregó 5 mL de medio DMEM suplementado (como se menciona previamente), las células homogenizadas y disgregadas fueron decantadas en frascos de cultivo para su expansión, las células fueron mantenidas con medio DMEM suplementado (mencionado previamente), las condiciones del cultivo fueron a una atmósfera de 5 % de CO₂ y humedad saturada (95 %) a 37 °C, las características morfológicas fueron monitoreadas todos los días con un microscopio invertido trinocular Motic™ AE31E - Fisher Scientific a aumentos de 20 y 10x, hasta que las células (MCF-7 y HEK-293) se establecieron.

Una vez que las células se establecieron y alcanzaron su máxima confluencia, se levantaron y se realizó el conteo de células. Para esto, se aspiró el medio de cultivo y se realizó un lavado con 5 mL de PBS estéril, para despegar las células adheridas a la caja se agregó 1 mL de tripsina y se incubó por 1 minuto hasta que todas las células se disgregaron, posteriormente se agregaron 2 mL de medio DMEM suplementado con L-glutamina 1 %, suero fetal bovino 10 % y antibiótico penicilina/estreptomicina al 1 %, para inactivar la tripsina, las células con el medio se pasaron a un tubo cónico de 50 mL y se centrifugaron a 180 g durante 3 minutos, se decantó el sobrenadante y el paquete celular se resuspendió en 1 mL de medio DMEM suplementado con L-glutamina 1 %, suero fetal bovino 10 % y antibiótico (penicilina/estreptomicina) al 1 %. El conteo de células se realizó en una cámara de Neubauer, brevemente en microtubos de 200 µL se agregaron 20 µL de las células homogenizadas (HEK-293T y MCF-7) por separado y 20 µL de azul de tripán a cada tubo para teñir las células. Con el número total de células contadas HEK-293T y

MCF-7 se realizaron los cálculos para plaquear (1×10^4 y 2.5×10^5 células por pozo) en cajas de 96 y 6 pozos respectivamente.

7.4 BIOENSAYOS.

7.4.1 ENSAYO DE VIABILIDAD CELULAR EN CÉLULAS MCF-7 Y HEK-293T.

La actividad antiproliferativa de la proteína A24-2 fue determinada mediante el ensayo de MTT, el cual mide la reducción del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) en un producto insoluble de formazán por las deshidrogenasas mitocondriales. El ensayo MTT es una detección cuantitativa y sensible de la proliferación celular, ya que mide la tasa de crecimiento de las células en virtud de una relación lineal entre la actividad celular y la absorbancia, Van Meerloo *et al.* (2011).

El ensayo de viabilidad celular fue realizado en microplacas de 96 pozos, que fueron plaqueadas con 1×10^4 células MCF-7 y células HEK- 293T por pozo, las cajas fueron incubadas por 24 horas para alcanzar su adherencia, luego de ese tiempo se aplicaron los tratamientos con la proteína A24-2 por triplicado, sólo se probó la viabilidad celular con la IC_{50} de la proteína A24-2 ($12 \mu\text{g}/\text{mL}$) reportada por Castrejón-Arroyo, (2020), como control negativo se utilizó medio DMEM, mientras que como control positivo se usó DMSO.

Después de aplicar tratamientos, las cajas se incubaron bajo condiciones 5% de CO_2 a 37°C y 95% de humedad. Después de 48 horas postratamiento se pipeteo a cada pozo $10 \mu\text{L}$ del reactivo MTT a una concentración de $5 \text{ mg}/\text{mL}$ disuelto en PBS y se incubó por 3 horas bajo las mismas condiciones, después del tiempo de incubación se aspiró el medio con el reactivo MTT y posteriormente a cada pozo se le agregó $100 \mu\text{L}$ de DMSO para solubilizar los cristales, las células fueron nuevamente incubadas durante 1 hora, pasado el tiempo se midió absorbancia a 570 nm en un lector de microplacas Bio-rad iMark Microplate Absorbance reader.

7.4.2 ENSAYO DE HEMÓLISIS.

Para evaluar y demostrar que la proteína A24-2 cumple los criterios para ser reconocida como una parasporina se realizó la prueba de hemólisis, Aberkane *et al.* (2019).

Para el ensayo de hemólisis se siguió el protocolo descrito por (Borin *et al.*, 2021). Brevemente, se recolectó sangre de un voluntario sano, siguiendo los protocolos de bioética y la Declaración

de Principios Éticos para las Investigaciones Médicas en Seres Humanos de la Asociación Médica Mundial, establecida en Helsinki, Finlandia, en 1964, World Medical Association (2013).

Se obtuvieron 8 mL de sangre periférica en tubos Vacutainer recubiertos con K2-EDTA para evitar la coagulación, la sangre se pasó a tubos de 15 mL y fue centrifugada 5 min a 500 *g*, después se marcó el volumen de plasma y hematocrito en el tubo, se aspiró el plasma y se desechó en el depósito de residuos biológico-infecciosos. El tubo con el hematocrito se llenó hasta la línea marcada del nivel original del plasma con solución de NaCl 150 mM y fue mezclado suavemente vertiendo el tubo, la sangre se centrifugó a 500 *g* durante 5 minutos. Este paso de lavado se repitió una vez más.

A continuación, se aspiró el sobrenadante y se reemplazó con PBS estéril, el tubo de sangre fue centrifugado a 500 *g* durante 5 minutos, nuevamente se aspiró el sobrenadante y se agregó PBS en relación 12 mL para 3 mL de suspensión de eritrocitos, se mezcló por inversión.

En microtubos de 1.5 mL, 190 μ L de la suspensión de eritrocitos fue agregada, para el tratamiento se aplicó 10 μ L de la inclusión proteica A24-2 con la IC₅₀ (12 μ g/mL) reportada previamente por Castrejón- Arroyo, (2020), los ensayos se realizaron por triplicado.

Se utilizó una solución de SDS a diferentes porcentajes (10, 5, 2.5, 1.125, 0.625, 0.312, 0.156) como control positivo de hemólisis y PBS como control negativo, los tubos fueron incubados a 37°C durante 1 hora.

Posteriormente, los tubos fueron centrifugados 5 min a 500 *g* para sedimentar los eritrocitos intactos, se transfirieron 100 μ L de sobrenadante de cada tubo a una placa de 96 pozos, la absorbancia a 595 nm fue medida en un lector de microplacas Bio-rad iMark.

7.4.3 TRATAMIENTO EN LÍNEA CELULAR MCF-7 Y HEK.293T.

Para los ensayos de citotoxicidad y extracción de ARN total se utilizaron placas de 6 pozos plaqueadas con 2.5 X10⁵ células MCF-7 y HEK-293T, las placas se incubaron 24 horas para lograr la adherencia de las células, a las condiciones de cultivo de 37 °C con 5% de CO₂ y humedad del 90%.

Se aplicó el tratamiento con la inclusión proteica A24-2 por triplicado con la IC₅₀ = 12 μ g/mL de la proteína A24-2 que fue obtenida del ensayo de viabilidad celular, teniéndose controles negativos

BSA (el cuál se le realizó el mismo procedimiento que a la proteína) y doxorubicina un agente antineoplásico se utilizó como control positivo a una concentración de 4 μM , el tratamiento con doxorubicina provoca un exceso de estrés oxidativo y daño mitocondrial que desencadena vías de muerte celular, incluida la apoptosis mediante la activación de la vía extrínseca, Shi Y *et al.* (2011); Wenningmann *et al.* (2019); Shi J *et al.* (2011); Fogli *et al.* (2004), la concentración utilizada de doxorubicina para los bioensayos es la IC_{50} reportada por Pilco-Ferreto y Calaf, (2016) que induce citotoxicidad para células MCF-7 a 24 horas postratamiento.

Las células MCF-7 y HEK-293T fueron mantenidas durante 24 horas en incubación bajo las condiciones de cultivo de una atmósfera de 5 % CO_2 y humedad saturada (95 %) a 37 °C. Después del tiempo de incubación se retiró el medio de cultivo de cada uno de los pozos y las células fueron lavadas con 1 mL de PBS estéril, después del lavado se agregó 500 μL de la mezcla fenol/cloroformo (karal) directo en los pozos, la recolección de las células de las cajas de cultivo se realizó mediante el método de raspado para despegar las células utilizando un raspador de células, la mezcla se pasó a microtubos de 1.5 mL para la extracción de ARN.

7.5 OBTENCIÓN DE ARN y RETROTRANSCRIPCIÓN.

7.5.1 EXTRACCIÓN DE ARN TOTAL.

A cada muestra de células MCF-7 y HEK-293T recuperadas de las cajas de cultivo luego de 24 horas de incubación postratamiento, como se menciona en la sección previa y que contenían la mezcla fenol/cloroformo se le añadieron 200 μL de cloroformo frío, se dejaron reposando 5 min en hielo. En seguida los tubos se centrifugaron a 9400 g por 20 min para luego recuperar la fase traslúcida (fase acuosa), a la cual se le agregaron 500 μL de isopropanol grado molecular frío, se mezclaron suavemente y se incubaron a -20 °C durante 10 min. Concluido este tiempo, la mezcla se centrifugó a 9400 g por 20 min a 4 °C. A continuación, se eliminó el sobrenadante, la pastilla resultante se le realizó un lavado con 1 mL de etanol grado molecular al 75 %, los tubos con el RNA disuelto en etanol se centrifugaron a 9400 g durante 10 minutos. Se decantó el sobrenadante y cada tubo con el pellet de RNA se dejó secando hasta que el etanol se evaporara. El botón de ARN obtenido se resuspendió con 20 μL de agua tratada con DEPC. Para cada muestra, la concentración y pureza fue adquirida en un BioTek Epoch Microplate Spectrophotometer a 260

nm y se aplicó el criterio de pureza de ARN A260/A280 de entre 1.8 y 2.0. El ARN se conservó a -70 °C hasta su uso.

7.5.2 SÍNTESIS DE CDNA.

La retrotranscripción del ARN total a cDNA se llevó a cabo de acuerdo con las especificaciones del kit proveedor Thermo Scientific RevertAid Reverse Transcriptase. En breve, se empleó 1 µg de ARN total en un volumen total de 20 µL de la mezcla de reacción por muestra.

La retrotranscripción se llevó a cabo en un termociclador de PCR de punto final mediante ciclos de 65 °C durante 5 min, seguido de 42 °C por 60 min. Para finalizar la retrotranscripción se incrementó la temperatura a 70 °C durante 5 min. Todas las muestras obtenidas se cuantificaron en un BioTek Epoch Microplate Spectrophotometer. Las muestras se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

7.6 ANÁLISIS DE LA APOPTOSIS COMO MECANISMO DE MUERTE CELULAR PRODUCIDO POR LA INCLUSIÓN PROTEICA A24-2.

La apoptosis es un proceso esencial tanto en el desarrollo multicelular como en el mantenimiento de la homeostasis celular. La incapacidad de las células dañadas para inducir apoptosis contribuye a la progresión del cáncer, puesto que permite la persistencia del ADN de las células dañadas. De tal forma es importante entender las vías de señalización apoptótica en diferentes tipos de cáncer. Un elemento central del proceso apoptótico es una familia de cisteína proteasas denominadas caspasas, que son efectores cruciales de este proceso de muerte celular, Mooney *et al.* (2002).

7.6.1 DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LAS CASPASAS 3, 6, 8 Y 9, BCL-2 Y P53 POR QPCR.

El análisis cuantitativo de ácidos nucleicos ha desempeñado un papel importante en muchos campos de la investigación y el diagnóstico molecular. La medición de la expresión génica (ARNm) se ha utilizado ampliamente en el seguimiento de las respuestas biológicas a diversos estímulos, Tan *et al.* (1994); Huang *et al.* (1995) a,b; Prud'homme *et al.* (1995).

Para medir los niveles de expresión de genes asociados con la apoptosis, se empleó la técnica de RT-qPCR. Los ensayos de expresión de los genes de *caspasa 3, 6, 8 y 9*, así como de los genes *Bcl-2* y *p53*, fueron realizados en un termociclador en tiempo real Step One de Applied Biosystems,

las condiciones de reacción fueron: Activación de la DNA polimerasa de 2 min/ 95°C, desnaturalización de 40 ciclos de 5 seg/95°C, alineamiento/extensión, 30 seg/65°C. Se utilizó como control de mantenimiento de la expresión génica GAPDH. Se utilizó como control negativo agua tratada con DEPC. La cuantificación de la expresión génica relativa al gen GAPDH se calculó según el método comparativo Ct (método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$), los cebadores empleados se muestran en la **Tabla 2**, los perfiles de expresión se evaluaron usando SyBR-Green (NZYSpeedy qPCR Green Master Mix).

Tabla 2. Secuencias forward y reverse de cebadores utilizados para la qPCR.

Primer	Forward (5'-3')	Reverse (3'-5')	Referencias
CASP 3	CTCGGTCTGGTACAGATGTCTGA	CATGGCTCAGAAGCACACAAAC	Sofwat <i>et al.</i> , 2021
CASP 8	GGTCACTTGAACCTTGGGAA	AGGCCAGATCTTCACTGTCC	Huang <i>et al.</i> , 2016
CASP 9	GTGGACATTGGTTCTGGAGGAT	CGGAACTTCTCACAGTCGATG	Sofwat <i>et al.</i> , 2021
CASP 6	GGACCACAGGAGGAGAGGAATTGC	GCACATCGTGCTGGTTCCCGAC	Waldron-Ruby <i>et al.</i> , 2015
GAPDH	GAAGGTGAAGGTCGGAGTCA	TTGAGGTCAATGAAGGGGTC	Huang <i>et al.</i> , 2016
Bcl-2	GAGGATTGTGTGGCCTTCTTTGAGT	AGTCATCCACAGGGCGATGT	Da Costa Araldi <i>et al.</i> , 2018
P53	GAGGTTGGCTCTGACTGTACC	TCCGTCCCAGTAGATTACCAC	Yunhua Liu <i>et al.</i> , 2015

7.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos se analizaron utilizando un ANOVA de una vía (Análisis de varianza) con el software GraphPad Prism versión 8.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, EE. UU.). Se aplicó la prueba de Dunnet para comparar cada tratamiento con el control, con una significancia estadística de $P < 0.05$.

8. RESULTADOS.

8.1 OBTENCIÓN DE LAS PARASPORINAS.

Se obtuvo la separación de las proteínas que constituyen al cristal proteico producido por la cepa A24 de *B. thuringiensis* para seleccionar la banda correspondiente a la inclusión proteica a utilizar. Cabe destacar que, para este proceso, la cepa A24 se cultivó en medio sólido en agar nutritivo, ya que como se observa en la **Figura 7**, el perfil de corrimiento proteico fue difuso cuando *B. thuringiensis* se cultivó en medio líquido. La confirmación de la presencia de la banda correspondiente a la proteína A24-2 de 25 kDa, se hizo mediante movilidad electroforética del extracto proteico en un gel SDS-PAGE de 0.75 mm de grosor al 10% de acrilamida/bis-acrilamida, con estas condiciones se logró la separación de las diferentes proteínas que constituyen al cristal proteico, ver **Figura 7**.

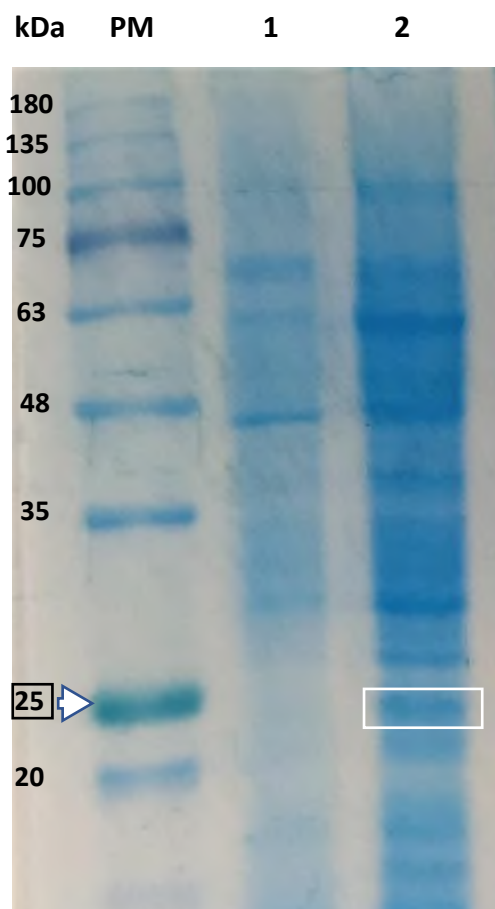


Figura 7. Perfil proteico del cristal parasporal producido por la cepa A24 de *B. thuringiensis*. El análisis se realizó por SDS-PAGE al 10 % y posteriormente la tinción con azul de coomassie. En el carril 1 se muestra el cultivo en medio líquido, en el carril 2 el recuadro blanco muestra la banda de ~25 kDa que contiene a la proteína A24-2 obtenida mediante medio sólido.

Una vez identificada la banda de interés se procedió a hacer una serie de geles de poliacrilamida al 10% de 1.5 mm de grosor y de un solo pozo para recuperar la mayor cantidad de proteína (ver **Figura 8**).

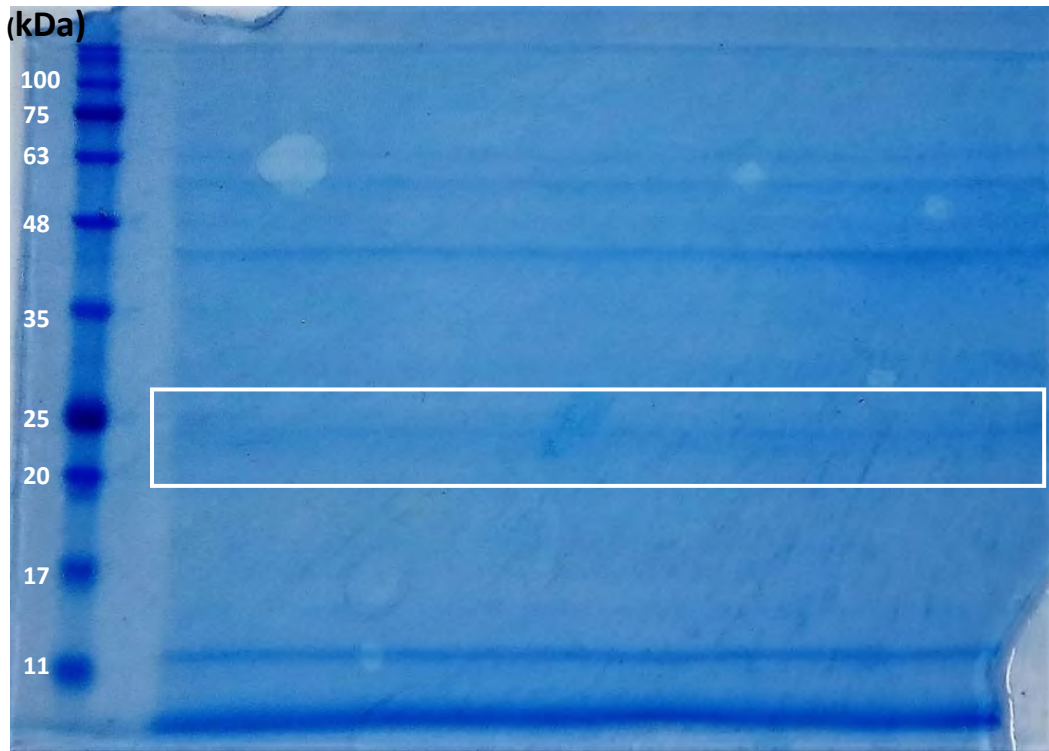


Figura 8. SDS-PAGE al 10 % del perfil proteico de la cepa A24 producida por *B. thuringiensis*, los geles fueron teñidos con azul de coomassie para la visualización de las bandas. El recuadro en blanco indica la banda de ~25 kDa correspondiente a la banda que contiene a la proteína A24-2.

Como parte del seguimiento y control de purificación de la proteína recuperada, se realizó un gel SDS-PAGE al 10 % de 0.75 mm para comprobar la presencia de la banda recuperada en las muestras dializadas y muestra concentrada mediante la columna de concentración, como se muestra en la **Figura 9**, sólo puede observar una única banda de ~25 kDa más definida en la muestra concentrada que indica la presencia de una única proteína, mientras que en las muestras de proteína solo dializadas no se logra observar ninguna banda. Cada etapa de purificación de las proteínas es parte crucial para el desarrollo de este trabajo, ya que se debe obtener la proteína sin que pierda su actividad.

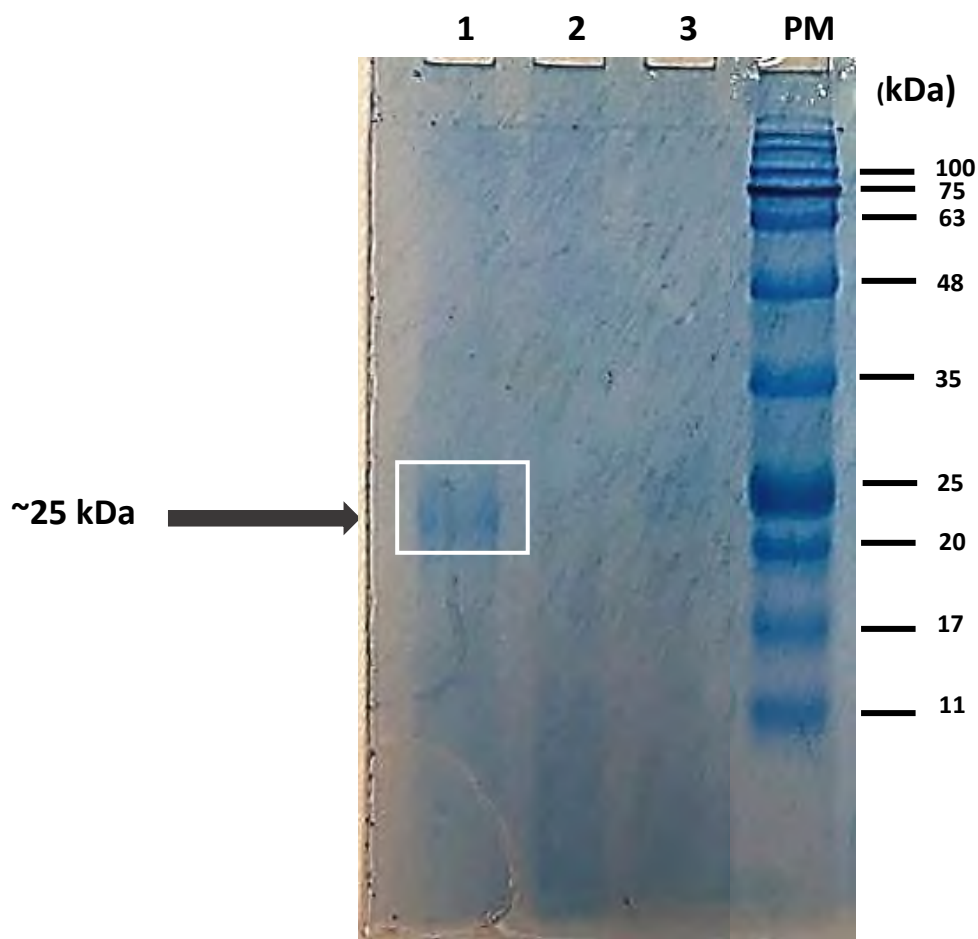


Figura 9. SDS-PAGE al 10 % de la proteína A24-2 producida por *B. thuringiensis* cepa A24. En el carril 1 se observa la muestra de proteína analizada la cual fue electroeluida, después dializada y por último concentrada. Carriles 2 y 3 muestra proteína solo dializada después de la electroelución. Peso molecular =PM

Finalmente, se cuantificó las muestras de proteínas luego de concentrarlas, ver **Tabla 3**.

Tabla 3. Cuantificación medida por el método de Lowry. Se muestra la concentración obtenida de la proteína A24-2

Proteína	Tamaño (kDa)	Concentración ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
A24-2	~25	371.8

Obteniéndose concentraciones por arriba a las reportadas por Castrejón-Arroyo, (2020) para las parasporinas A13-2, A13-5 y A24-2 (136 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 165 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 318 $\mu\text{g}/\text{mL}$) respectivamente, por otro lado, Cruz-Nolasco (2017) reportó concentraciones para dos proteínas purificadas de la cepa A13 (67 y 75 kDa) de 540 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 460 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectivamente, similares a las obtenidas en este trabajo.

Así mismo, fue importante controlar que en cada paso no se perdiera proteína, por lo que hay que reducir el número de pasos en la purificación. Sin embargo, algunos autores han optado por incluir más pasos y otras técnicas en el proceso de purificación, tal como lo describe Grace *et al.* (2019), quienes para la purificación de la proteína utilizaron una columna de Intercambio aniónico (DEAE-Sepharose) seguido de una purificación mediante filtración en gel, a pesar de que las técnicas son más aptas para la purificación de proteínas conllevan a una recuperación final del extracto de menos 50% inicial, Grace *et al.* (2019). En este contexto, se decidió usar una columna concentradora Amicon Ultra de 10000 NMWL (Millipore).

8.2 BIOENSAYO DE VIABILIDAD CELULAR EN CÉLULAS MCF-7 Y HEK- 293T.

Para confirmar que la proteína A24-2 aislada tiene actividad antiproliferativa contra la línea celular MCF-7 y no contra las células HEK-293T (prueba de bioseguridad), se diseñaron e hicieron los bioensayos con la proteína A24-2.

Para los ensayos de viabilidad celular se utilizó la IC_{50} previamente encontrada para la proteína A24-2, Castrejón-Arroyo (2020). Los resultados mostraron, ver **Figura 10**, que después de 48 horas de exposición al péptido, las células HEK-293T no presentaron cambios significativos en su viabilidad celular, detectándose el 75 % de viabilidad celular, lo que indica que la proteína A24-2 tiene mínima toxicidad contra células no cancerosas, en comparación con el control positivo (DMSO) que disminuyó la viabilidad celular de manera significativa, mientras que el control negativo (DMEM suplementado) exhibieron el valor más alto de células viables tomándose este como 100% de viabilidad celular.

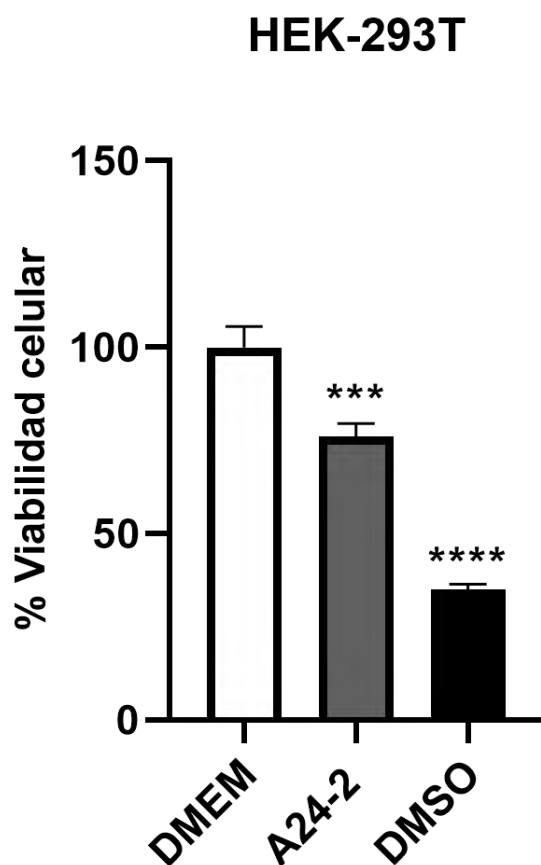


Figura 10. Viabilidad celular de las células HEK-293T después de 48 horas de tratamiento con la IC_{50} de A24-2 (12 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Los datos están representados como el promedio de los porcentajes de viabilidad \pm la desviación estándar. Para la significancia estadística se hizo una ANOVA de una vía y la prueba Dunnet. *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ vs el Control negativo. Control negativo (DMEM) y Control positivo (DMSO).

Borin *et al.*, 2021 reportaron que la parasporina A13-2 no mostró cambios significativos en la viabilidad celular en células Hek-293, por otro lado, Castrejón- Arroyo, (2020) previamente evaluó el efecto de la parasporina A24-2 y A13-5 en células mononucleares de sangre periférica (CMSP) y células Hek-293 en las que se observó bajo efecto citotóxico, con disminución de la viabilidad celular de 26 y 28 %, respectivamente, utilizando la IC₅₀ de 12 µg/mL a 24 y 48 hrs, valores que concuerdan con los obtenidos en este trabajo.

En cuanto a la viabilidad de las células MCF-7 a las 48 horas después del tratamiento con 12 µg/mL de la proteína A24-2, ver **Figura 11**, tal como se esperaba esta disminuyó al 50%, en comparación al control negativo, el cual tuvo el 100% de células viables. En cuanto que el tratamiento con DMSO, este mostró una disminución de la viabilidad celular de casi el 80%.

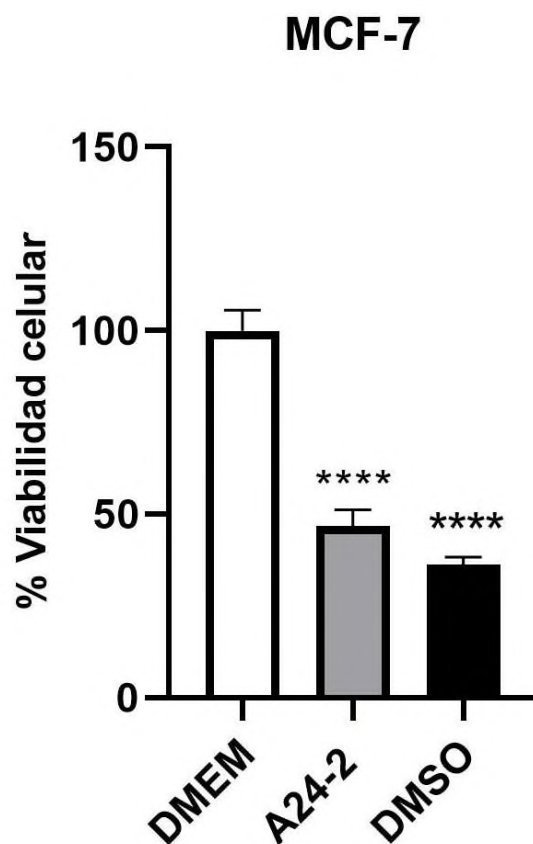


Figura 11. Viabilidad celular de las células MCF-7 después de 48 horas de tratamiento con la IC₅₀ de A24-2 (12 µg/mL). Los datos están representados como el promedio de los porcentajes de viabilidad \pm la desviación estándar. Para evaluar la significancia estadística se hizo una ANOVA de una vía y la prueba Dunnet. **** $P < 0.0001$ vs el Control negativo. Control negativo (DMEM) y Control positivo (DMSO).

El porcentaje de viabilidad obtenido del tratamiento con la proteína A24-2 concuerda por la reportado por Castrejón-Arroyo, (2020), utilizando la misma proteína (A24-6, ~25 kDa) de la cepa A24, dado que la IC50 (misma utilizada para este trabajo) causó similar comportamiento en la viabilidad de las células MCF-7 a las 48 horas de tratamiento.

En conjunto, los resultados demuestran que la proteína A24-2 posee citotoxicidad selectiva por las células de origen canceroso, confirmando los hallazgos de Castrejón-Arroyo, (2020).

8.3 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD HEMOLÍTICA DE A24-2.

La actividad hemolítica de un compuesto permite valorar varios aspectos de una molécula de interés terapéutico; en el caso de las PS es un parámetro determinante para ser considerado una PS. Es por ello por lo que se evaluó la capacidad hemolítica de la proteína A24-2 mediante la prueba de hemólisis utilizando glóbulos rojos humanos (HRBC) de sangre periférica.

Los resultados demostraron que la proteína A24-2 no causa la lisis de los glóbulos rojos, encontrando un patrón muy similar al observado en los pozos tratados con PBS, control negativo del ensayo de hemólisis; en contraste, el SDS que fue el control positivo usado en la prueba, causó la hemólisis total de los eritrocitos, detectándose después de incubar 1 hora una coloración roja intensa producto de la liberación de la hemoglobina ver **Figura 12**. La cuantificación del sobrenadante, ver **Figura 13**, indicó que la hemólisis causada por la inclusión proteica A24-2 no fue significativa en comparación con el control negativo (PBS), a diferencia de lo detectado con las diferentes concentraciones de SDS en las cuales se ve claramente el incremento de la lisis eritrocitaria a medida que se incrementa la concentración del detergente.

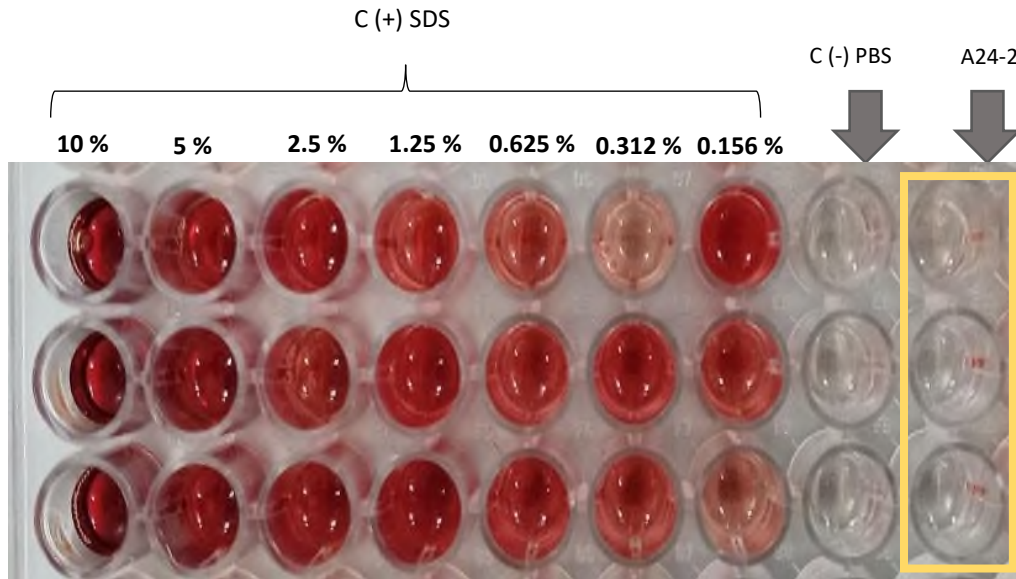


Figura 12. Actividad hemolítica de la proteína A24-2. Los eritrocitos fueron tratados con 12 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de proteína A24-2, como control positivo se usó SDS a diferentes concentraciones y como control negativo PBS.

El tratamiento con la IC_{50} de 12 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de la proteína A24-2 no produjo hemólisis e incluso fue estadísticamente significativo inferior a la observada en el control positivo, ver **Figura 13**.

La actividad hemolítica de la proteína se determinó comparando el porcentaje de hemólisis de los ensayos con tratamientos con la proteína A24-2 contra el control tratado con 10 % de SDS.

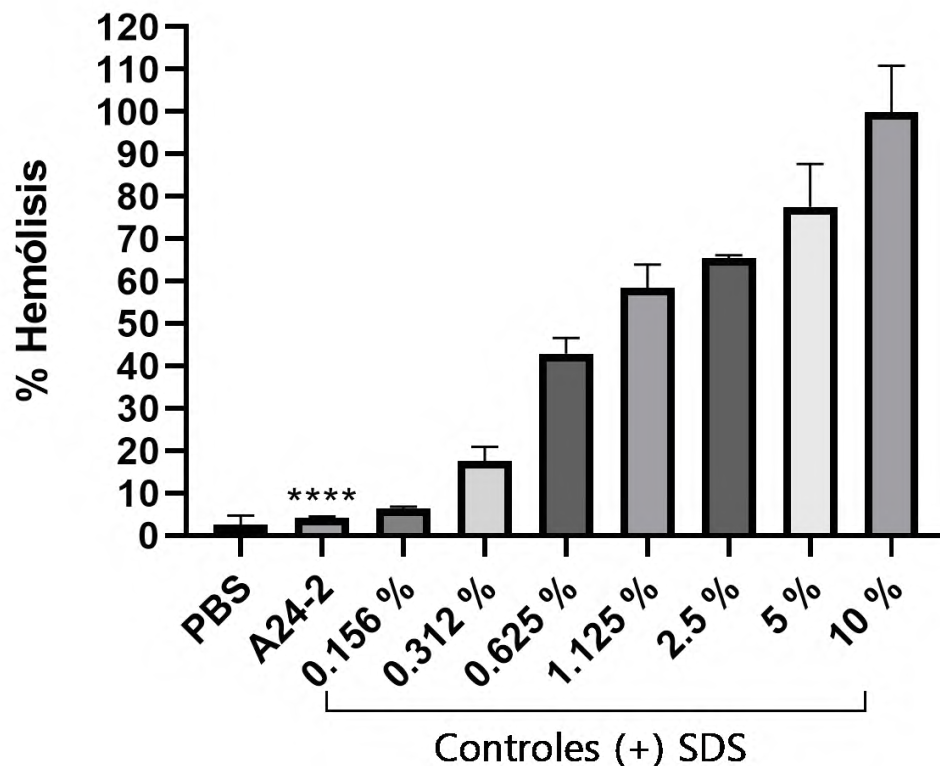


Figura 13. Actividad hemolítica de la proteína A24-2. Los resultados son expresados como el promedio del porcentaje de hemólisis de tres experimentos independientes \pm desviación estándar. Se utilizó PBS (control negativo) y DSD a diferentes concentraciones (control positivo). **** $P < 0.0001$ vs el SDS. Para la significancia estadística se hizo una ANOVA de una vía y la prueba Dunnett.

El gráfico de barras de la **Figura 13** indica que el porcentaje de lisis de glóbulos rojos observado después del tratamiento con la inclusión proteica A24-2 fue solo del 4.1%, valor estadísticamente significativo menor a la producida con todas las concentraciones de SDS usadas. Los resultados observados son comparables con los reportados por Rendón-marín *et al.* (2021) y Borin *et al.* (2021), quienes probaron las parasporinas BTM-P1 y A13-2 respectivamente, hallando que sus parasporinas no producían hemólisis. Por ejemplo, la actividad hemolítica de la parasporina BTM-P1 utilizando una concentración de 25 μ M fue de 4.6%. así como los resultados obtenidos para la parasporina A13-2 (4.13 y 8.25 μ g/mL) causando hemólisis de 2.5 y 8.5 % respectivamente. Además, hay autores que incluso han encontrado valores de 24% de hemólisis, Jenniffer Cruz *et al.* (2021), que están por encima de lo encontrado en este trabajo.

Los resultados en conjunto permiten concluir que la proteína A24-2 no es hemolítica para eritrocitos humanos. El Committee of Parasporin Classification and Nomenclature, establece que una parasporina debe cumplir algunos criterios entre ellos la baja o nula toxicidad hacia las células normales y no son hemolíticas, Kitada *et al.* (2006), por tanto y basado en los resultados positivos de citotoxicidad hacia células MCF-7 y baja citotoxicidad contra células HEK-293T, además de hemólisis nula, podemos considerar a la proteína A24-2 como una parasporina.

8.4 BIOENSAYOS Y EXTRACCIÓN DE ARN TOTAL.

La investigación sobre la expresión génica permite dar información sobre la fisiología de una célula o grupo de células en un determinado momento. La expresión génica depende de la expresión espacio-temporal en un tejido o célula, y necesita una evaluación e interpretación críticos. Por lo que para dar una aproximación del mecanismo de muerte asociado a la actividad citotóxica provocada por la inclusión proteica A24-2, se evaluó la expresión de los genes: Caspasa 3, 6, 8, 9, Bcl2 y p53, además del gen de referencia GAPDH.

8.4.1 BIOENSAYOS EN CÉLULAS HEK-293T.

Los cambios morfológicos sufridos por las células HEK-293T tratadas con 12 µg/mL de la inclusión proteica A24-2 y sin tratamiento fueron registraron a las 24 horas después de tratamiento. La **Figura 14** muestra las micrografías. Observándose que, las células HEK-293T tratadas con de la proteína A24-2 mantuvieron su morfología de normal de tipo epidermal, es decir, forma piramidal y alargada, lo que indicó que no hubo efecto citotóxico sobre dichas células.

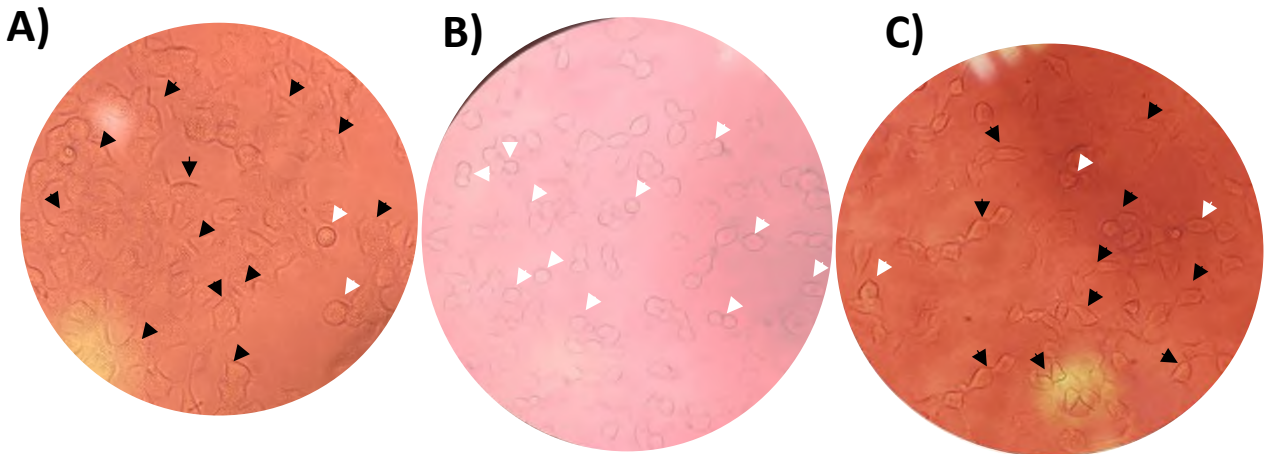


Figura 14. Análisis morfológico de células HEK-293T. Micrografía tratada con **A)** BSA (12 $\mu\text{g}/\text{mL}$) **B)** doxorubicina (4 μM) y **C)** A24-2 (12 $\mu\text{g}/\text{mL}$) de proteína. Micrografías tomadas a las 24 horas post tratamiento con el objetivo 20x. Las puntas de flecha blanca señalan células con características apoptóticas. Las puntas de flecha negra muestran las células con morfología normal.

Los ensayos de citotoxicidad mediante la prueba de MTT, ver **Figura 10** demostró que existen mínimos efectos citotóxicos que se ven reflejados en la viabilidad en células HEK- 293T tratadas con la proteína A24-2, lo que concuerda con los cambios morfológicos observados en las células en la **Figura 14**. Así mismo se detectó que las células tratadas con BSA mantuvieron su morfología piramidal característico del cultivo. Este tratamiento permitió demostrar que el medio empleado como vehículo en todos los compuestos analizados no es un interferente en los resultados obtenidos, y, por otro lado, permitió descartar que las células usadas en este trabajo fueran sensibles a cualquier proteína. En cuanto a las células tratadas con 4 μM de doxorubicina el control positivo de los ensayos, mostraron los cambios morfológicos característicos de células en proceso de apoptosis a las 24 horas de incubación, entre ellos estrechamiento celular, las células son de menor tamaño debido al citoplasma denso y orgánulos más apretados, además de adquisición de una fragmentos oscuros redondos relacionado a la condensación de la cromatina, características de la muerte celular apoptótica, Elmore, (2007). La nula actividad citotóxica observada tras el tratamiento con la proteína A24-2 en células HEK 293T demuestra claramente que la proteína A24-2 cumple con la propiedad que poseen las parasporinas de no afectar a las células no cancerosas.

Un ejemplo es Brasseur *et al.* (2015) reportaron que la línea HIESC una línea celular normal no mostró daño al ser tratadas con la parasporina 4R2 utilizando una concentración de 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Por otro lado, Borin *et al.* (2021) probaron la citotoxicidad de la parasporina A13-2 (26 kDa) producida por la cepa A13 de *B. thuringiensis* en CMSP y en células HEK-293T tratadas con concentraciones de (0.020 a 24 $\mu\text{g}/\text{mL}$), encontrando que tales concentraciones no afectaron la viabilidad sobre esta línea celular, ni en CMSP.

Por lo que el mínimo efecto citotóxico detectado mediante los ensayos de MTT y nulos cambios morfológicos observados demuestran que A24-2 es una parasporina.

Beena *et al.* (2019) probaron que la inclusión proteica producida por la cepa KAU 59 de *B. thuringiensis* a 48 horas de incubación en linfocitos tratados con 2.913 $\mu\text{g}/\text{mL}$, las proteínas de inclusión tóxicas para las células leucémicas no son tóxicas para los linfocitos normales al no observar cambios morfológicos.

8.4.1.1 AISLAMIENTO DE ARN TOTAL DE CÉLULAS HEK-293T Y RETROTRANSCRIPCIÓN

Se cuantificó y midió la calidad del ARN mediante un lector de absorbancias, los valores obtenidos del RNA extraído se muestran en la **Tabla 4**.

Obteniendo concentraciones diferentes para cada muestra, relacionada al volumen recuperado de la fase acuosa durante la extracción de ARN.

Las muestras con menor concentración de ARN (muestras 3A y 2B) de 15.24 $\text{ng}/\mu\text{L}$ y 20.68 $\text{ng}/\mu\text{L}$ respectivamente, que se muestran en la **Tabla 4** fueron descartadas para la retrotranscripción.

Tabla 4. Parámetros de pureza y concentración de las **muestras de RNA total** de las células HEK-293T tratadas con 12 µg/mL de la proteína A24-2, BSA (12 µg/mL) y 4 µM de doxorrubicina

Muestra	Absorbancia	1	2	Concentración de ARN
1A) HEK (BSA)	A ₂₆₀	0.315	0.301	0.308
	A ₂₈₀	0.187	0.176	0.1815
	A _{260/280}	1.684	1.715	1.6995
		252.28	240.84	246.56 ng/µL
2A) HEK (BSA)	A ₂₆₀	0.152	0.147	0.1495
	A ₂₈₀	0.107	0.105	0.106
	A _{260/280}	1.412	1.399	1.4055
		121.32	117.96	119.64 ng/µL
3A) HEK (BSA)	A ₂₆₀	0.018	0.02	0.019
	A ₂₈₀	0.02	0.021	0.0205
	A _{260/280}	0.908	0.923	0.9155
		14.68	15.8	15.24 ng/µL
1B) HEK (Doxo)	A ₂₆₀	0.15	0.152	0.151
	A ₂₈₀	0.073	0.07	0.0715
	A _{260/280}	2.06	2.18	2.12
		120.12	121.88	121 ng/µL
2B) HEK (Doxo)	A ₂₆₀	0.024	0.028	0.026
	A ₂₈₀	0.015	0.022	0.0185
	A _{260/280}	1.621	1.275	1.448
		19.32	22.04	20.68 ng/µL
3B) HEK (Doxo)	A ₂₆₀	0.809	0.793	0.801
	A ₂₈₀	0.512	0.501	0.5065
	A _{260/280}	1.579	1.582	1.5805
		646.92	634.12	640.52 ng/µL
1C) HEK (A24-2)	A ₂₆₀	0.196	0.19	0.193
	A ₂₈₀	0.111	0.104	0.1075
	A _{260/280}	1.771	1.823	1.797
		156.6	152.12	154.36 ng/µL
2C) HEK (A24-2)	A ₂₆₀	0.259	0.251	0.255
	A ₂₈₀	0.142	0.139	0.1405
	A _{260/280}	1.822	1.805	1.8135
		207.32	200.52	203.92 ng/µL
3C) HEK (A24-2)	A ₂₆₀	0.201	0.199	0.2
	A ₂₈₀	0.113	0.11	0.1115
	A _{260/280}	1.78	1.808	1.794
		160.52	159.56	160.04 ng/µL

Para la retrotranscripción se partió de 1 μg de ARN total extraído para obtener el cADN de cada una de las muestras de ARN obtenidas. La concentración y calidad del cADN se verificó mediante un lector de absorbancias (ver **Tabla 5**).

Tabla 5. Concentración de cADN. Las células HEK-293T fueron tratadas con la 12 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de proteína A24-2, BSA (12 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y 4 μM de doxorrubicina.

Muestra	Absorbancias	1	2	Concentración de cADN
1A) HEK (BSA)	A ₂₆₀	2.548	2.534	2.541
	A ₂₈₀	1.656	1.642	1.649
	A _{260/280}	1.539	1.543	1.541
		2548.45	2533.85	2541.15 ng/μL
2A) HEK (BSA)	A ₂₆₀	2.231	2.218	2.2245
	A ₂₈₀	1.451	1.437	1.444
	A _{260/280}	1.537	1.543	1.54
		2230.65	2217.75	2224.2 ng/μL
1B) HEK (Doxo)	A ₂₆₀	3.251	3.126	3.1885
	A ₂₈₀	2.287	2.28	2.2835
	A _{260/280}	1.422	1.371	1.3965
		3251.35	3126.25	3188.8 ng/μL
3B) HEK (Doxo)	A ₂₆₀	2.498	2.483	2.4905
	A ₂₈₀	1.628	1.619	1.6235
	A _{260/280}	1.534	1.534	1.534
		2497.55	2483.15	2490.35 ng/μL
1C) HEK (A24-2)	A ₂₆₀	2.245	2.229	2.237
	A ₂₈₀	1.434	1.418	1.426
	A _{260/280}	1.565	1.572	1.5685
		2244.75	2228.75	2236.75 ng/μL
2C) HEK (A24-2)	A ₂₆₀	2.997	3.029	3.013
	A ₂₈₀	2.14	2.139	2.1395
	A _{260/280}	1.401	1.416	1.4085
		2996.65	3028.85	3012.75 ng/μL
3C) HEK (A24-2)	A ₂₆₀	2.91	2.851	2.8805
	A ₂₈₀	1.964	1.914	1.939
	A _{260/280}	1.482	1.49	1.486
		2910.15	2851.25	2880.7 ng/μL

8.4.2 BIOENSAYOS EN LA LÍNEA CELULAR MCF-7

Se capturaron micrografías a las 24 horas post tratamiento para evaluar los cambios morfológicos derivados de los tratamientos y extraer el RNA total. Los resultados mostrados en la **Figura 15** indicaron que las células MCF-7 utilizadas como control tratadas con BSA no mostraron cambios en su morfología manteniendo una forma poligonal, por otro lado, morfologías irregulares fueron evidentes en células tratadas con la proteína A24-2 a las 24 horas de incubación, se observaron células contraídas presentadas con menor tamaño, además de células en forma de una masa redonda u ovalada de color oscuro resultado de la condensación de la cromatina característica de células en apoptosis, es por esto que los resultados se consideraron como primeros indicios de la muerte celular apoptótica inducida por la proteína A24-2.

Por otro lado, el tratamiento con 4 μ M de doxorrubicina mostraron los cambios morfológicos característicos de la apoptosis, contracción celular y formación de cuerpos apoptóticos, luego de 24 horas de incubación.

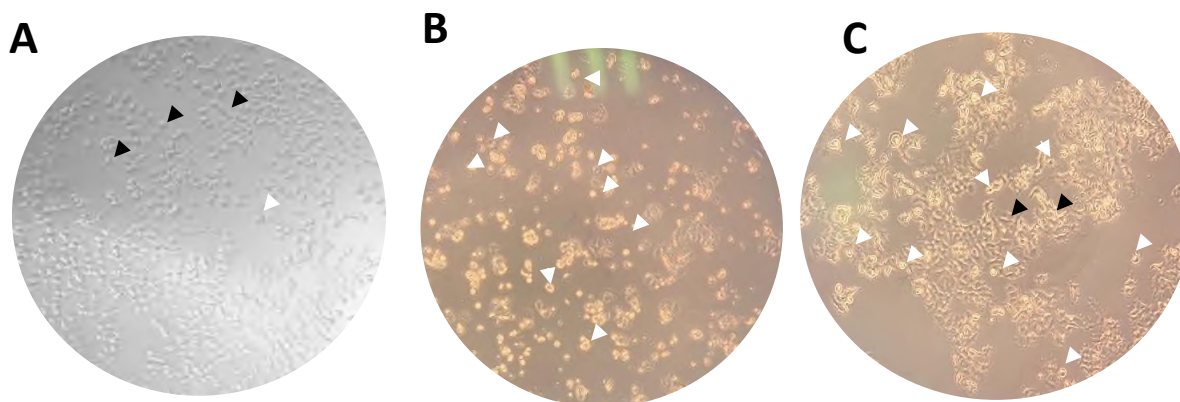


Figura 15. Cambios morfológicos en células MCF-7 tras el tratamiento con la proteína A24-2 después de 24 horas **A)** BSA (12 μ g/mL), **B)** doxorrubicina (4 μ M) y **C)** A24-2 (12 μ g/mL). Micrografías tomadas a un aumento de 10 X. Las puntas de flecha blanca señalan células con características apoptóticas. Las puntas de flecha negra muestran las células con morfología normal.

Estas características de muerte celular observadas concuerdan con lo reportado por otros autores como Brasseur *et al.* (2015) quienes observaron las características morfológicas de células MCF- después de 24 horas, tratadas con 1 μ g/mL con la parasporina producida por la cepa 4R2 de *B. thuringiensis*, el encogimiento celular, característico de la apoptosis fue observado bajo microscopía óptica.

Por otro lado, podemos observar que los cambios morfológicos característicos de la apoptosis inducidos por la proteína A24-2 fueron visibles a 24 horas después de incubación, ver **Figura 15**, a pesar de que la proteína induce citotoxicidad a 48 horas, por ejemplo, Borin *et al.* (2021) estudiaron cambios morfológicos a 48 horas postratamiento en células MCF-7 tratadas con la 4 y 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de la proteína A13-2, observando cambios como morfología irregular, además de formación de fragmentos oscuros asociados a la fragmentación de la cromatina y sin embargo, los ensayos con citometría de flujo reflejaron que las células MCF-7 en su mayoría estaban en estadio de necrosis, dando a conocer el proceso final de apoptosis inducido por la parasporina A13-2.

Melo y Kitada, (2020) evaluaron el efecto de la parasporina A14d2 en células MCF-7 a 25 y 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, observando cambios morfológicos característicos de apoptosis, tales como células reducidas, estructuras internas compactadas y picnosis nuclear (mismas observadas en células MCF-7 tratadas con la proteína A24-2, ver **Figura 15**), por lo que la parasporina A24-2 indujo cambios morfológicos relacionados a la muerte celular apoptótica a menor concentración.

Otros autores como Beevi *et al.* (2010) realizaron ensayos en células MCF-7 tratadas con extractos de raíces de *Rhapanus sativus L* y observaron cambios morfológicos, tales como cambio de su morfología normal de forma piramidal a una forma redonda, contracción celular, que finalmente lleva a la pérdida de la adherencia de las placas de cultivo, la prueba de yoduro de propidio confirmó fragmentación del ADN que fue asociado con la apoptosis.

El desprendimiento y encogimiento celular son características de muerte celular apoptótica que puede observarse en las células tratadas con la proteína A24-2 mostradas en **la Figura 15**, mientras que el control negativo conservó la adherencia y la morfología característica del cultivo.

8.4.2.1 AISLAMIENTO DE ARN TOTAL DE CÉLULAS MCF-7 Y RETROTRANSCRIPCIÓN

El RNA total de las células MCF-7 tratadas con la proteína A24-2 fue extraído después de 24 horas del tratamiento. Se cuantificó y midió la calidad del RNA mediante un lector de absorbancias, los valores obtenidos se muestran en la **Tabla 6**.

Tabla 6. Parámetros de pureza y concentración de las muestras de ARN total de las células MCF-7 tratadas con la 12 µg/mL de proteína A24-2, BSA (12 µg/mL) y 4 µM de doxorubicina.

Muestra	Absorbancias	1	2	Concentración de ARN
1A) HEK (BSA)	A ₂₆₀	0.775	0.72	0.7475
	A ₂₈₀	0.344	0.335	0.3395
	A _{260/280}	2.255	2.149	2.202
		620.36	576.04	598.2 ng/µL
2A) HEK (BSA)	A ₂₆₀	0.139	0.026	0.0825
	A ₂₈₀	0.079	0.03	0.0545
	A _{260/280}	1.755	0.847	1.301
		111.08	120.3	115.69 ng/µL
1B) HEK (Doxo)	A ₂₆₀	0.68	0.678	0.679
	A ₂₈₀	0.335	0.343	0.339
	A _{260/280}	2.033	1.975	2.004
		544.2	542.36	543.28 ng/µL
2B) HEK (Doxo)	A ₂₆₀	0.393	0.41	0.4015
	A ₂₈₀	0.207	0.212	0.2095
	A _{260/280}	1.902	1.931	1.9165
		314.6	327.64	321.12 ng/µL
3B) HEK (Doxo)	A ₂₆₀	0.352	0.317	0.3345
	A ₂₈₀	0.174	0.115	0.1445
	A _{260/280}	2.023	2.764	2.3935
				267.68 ng/µL
1C) MCF-7 (A24-2)	A ₂₆₀	0.571	0.561	0.566
	A ₂₈₀	0.27	0.266	0.268
	A _{260/280}	2.12	2.113	2.1165
		457.08	448.84	452.96 ng/µL
2C) MCF-7 (A24-2)	A ₂₆₀	0.221	0.214	0.2175
	A ₂₈₀	0.113	0.109	0.111
	A _{260/280}	1.95	1.967	1.9585
		176.6	171.4	174 ng/µL
3C) MCF-7 (A24-2)	A ₂₆₀	0.266	0.267	0.2665
	A ₂₈₀	0.132	0.134	0.133
	A _{260/280}	2.016	1.991	2.0035
		212.68	213.8	213.24 ng/µL

Posteriormente para la síntesis del cDNA se realizó la retrotranscripción del RNA extraído de células MCF-7 tratadas y los controles. Las muestras de cADN obtenido se cuantificaron en un lector de absorbancias, los valores se muestran en la **Tabla 7**.

Tabla 7. cADN de las células MCF-7 tratadas con la proteína 12 µg/mL A24-2, BSA (12 µg/mL) y 4 µM de doxorubicina.

Muestra	Absorbancia	1	2	Concentración de cDNA
1A) MCF-7 (BSA)	A ₂₆₀	2.21	2.164	2.187
	A ₂₈₀	1.431	1.404	1.4175
	A _{260/280}	1.544	1.541	1.5425
		2210.25	2163.55	2186.9 ng/µL
1B) MCF-7 (BSA)	A ₂₆₀	2.135	2.236	2.185
	A ₂₈₀	1.467	1.448	1.4575
	A _{260/280}	1.536	1.580	1.558
		2550.35	2288.7	2269.5 ng/µL
1B) MCF-7 (Doxo)	A ₂₆₀	2.729	2.71	2.7195
	A ₂₈₀	1.802	1.804	1.803
	A _{260/280}	1.515	1.502	1.5085
		2729.15	2709.65	2719.4 ng/µL
2B) MCF-7 (Doxo)	A ₂₆₀	2.475	2.437	2.456
	A ₂₈₀	1.62	1.583	1.6015
	A _{260/280}	1.528	1.54	1.534
		2475.15	2437.35	2456.25 ng/µL
3B) MCF-7 (Doxo)	A ₂₆₀	2.273	2.236	2.2545
	A ₂₈₀	1.467	1.448	1.4575
	A _{260/280}	1.549	1.545	1.547
		2272.65	2236.25	2254.45 ng/µL
1C) MCF-7 (A24)	A ₂₆₀	2.088	2.04	2.064
	A ₂₈₀	1.347	1.317	1.332
	A _{260/280}	1.549	1.549	1.549
		2087.55	2040.35	2063.95 ng/µL
2C) MCF-7 (A24)	A ₂₆₀	2.055	2.026	2.0405
	A ₂₈₀	1.316	1.297	1.3065
	A _{260/280}	1.562	1.562	1.562
		2054.65	2025.65	2040.15 ng/µL
3C) MCF-7 (A24)	A ₂₆₀	2.851	3.019	2.935
	A ₂₈₀	1.914	2.122	2.018
	A _{260/280}	1.49	1.423	1.4565
		2850.65	3018.65	2934.65 ng/µL

El cDNA obtenido a partir de los bioensayos con la línea celular MCF-7 y células HEK-293T (**Tabla 7**) se utilizó para los ensayos de qPCR.

8.5 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES *p53*, *Bcl-2* Y CASPASAS 3, 6, 8 Y 9 TRAS EL TRATAMIENTO DE 24 HORAS CON LA INCLUSIÓN PROTEICA A24-2.

La apoptosis es un mecanismo de muerte celular que se caracteriza morfológicamente por una contracción celular acompañada de burbujas superficiales transitorias, que en última instancia resultan en la separación de la célula en un grupo de cuerpos unidos a membranas. Los estudios moleculares sobre la apoptosis han permitido descubrir un conjunto de proteínas que regulan el compromiso celular con la muerte; entre estas proteínas se encuentran los moduladores de la familia Bcl-2 y las caspasas. En la apoptosis intervienen dos vías principales de transducción de señales: la vía mitocondrial y la vía del receptor de muerte, Feng *et al.* (2007). Se sabe que algunas proteínas de origen parasporal con citotoxicidad específica sobre algunas células de origen canceroso activan la apoptosis como mecanismo de muerte, Brasseur *et al.* (2015), Chubicka *et al.* (2018), Borin *et al.* (2021). Dado que la proteína parasporal A24-2 demostró actividad antiproliferativa se decidió analizar algunos genes responsables o asociados con la apoptosis.

8.5.1 EXPRESIÓN DE LAS CASPASAS 3, 6, 8, 9, P53 Y BCL-2.

Las células cancerígenas son capaces de evadir la apoptosis y consecuentemente, de dividirse continuamente a pesar de sus anormalidades. La desregulación de la apoptosis se asocia con la proliferación celular descontrolada, el desarrollo y la progresión del cáncer y la resistencia a las terapias farmacológicas actuales, Plati *et al.* (2008); Fulda, (2009). Actualmente, una de las estrategias terapéuticas involucra el desarrollo de moléculas que favorezcan la activación de la apoptosis, Gimenez-Bonafe *et al.* (2009), Fulda, (2015). La parasporinas representan a un grupo de pequeñas proteínas inductoras, la mayoría de ellas, de la apoptosis.

El tratamiento a las 24 horas con la proteína A24-2 en las células HEK-293T demostraron que no afectó los niveles de expresión del gen proapoptótico *p53* en comparación con el grupo control, efecto también observado en la línea celular MCF-7. *p53* regula las moléculas involucradas, tanto con el receptor de muerte (vía extrínseca) así como en la vía apoptótica dependiente de las mitocondrias (vía intrínseca) su activación es crítico en la muerte celular apoptótica, Vousden, (2000). Los bajos niveles de expresión de *p53* observados en este trabajo demuestra que la proteína A24-2 no activa la apoptosis en las células HEK-293T ver **Figura 16** y por lo tanto su

viabilidad celular no se afecta, resultado que correlaciona con los nulos cambios morfológicos observados dicha línea celular (**Figura 14**). Por el contrario, en el caso de la línea celular MCF-7 sí se detectan los cambios morfológicos típicos ya reportados para las células MCF-7 en estado apoptótico que son células redondeadas, condensadas y se separadas de la placa (ver **Figura 15**), esto tras el tratamiento de 24 horas con la proteína A24-2 y doxorubicina.

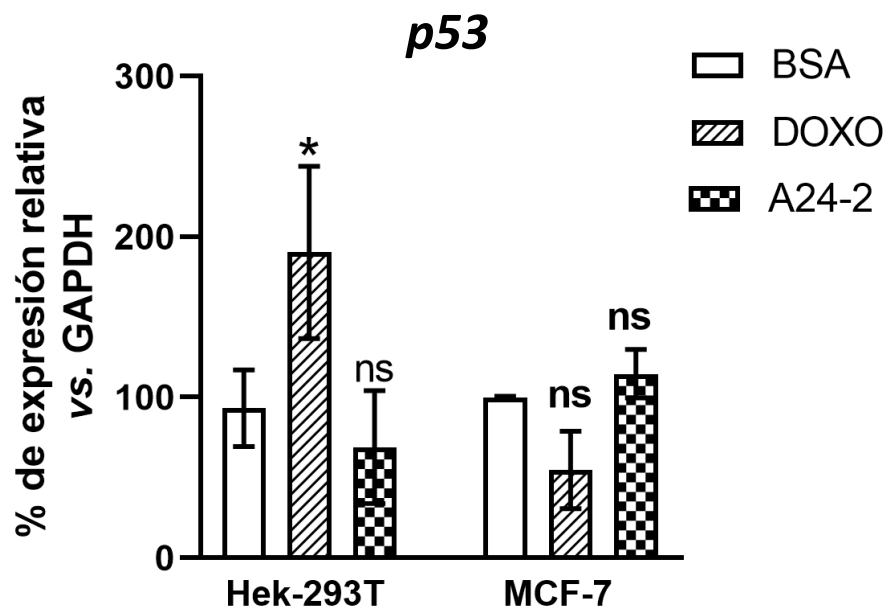


Figura 16. Expresión relativa del gen proapoptótico p53 en células MCF-7 y HEK-293T. Los datos son expresados como el promedio de los porcentajes de tres experimentos independientes * $P < 0.05$ vs el control negativo y ns (valores estadísticamente no significativos). ANOVA de una vía y la prueba Dunnett fue calculada para determinar la significancia estadística.

Está bien documentado que la doxorubicina actúa por diversos mecanismos moleculares a nivel celular, entre ellos, su capacidad intercalante en la doble hélice del ADN, además de ser un generador de radicales libres, ambos conducen a la ruptura de las cadenas de ADN, inhibidora de enzimas de la cadena respiratoria en las mitocondrias, oxidación de los lípidos de la membrana, interferencia con desenrollado del ADN y actividad helicasa, e inducción de apoptosis en respuesta a la inhibición de la topoisomerasa II, Minotti *et al.* (2004). Así mismo, disminuye la expresión de la proteína *Bcl-2*, una biomolécula antiapoptótica, Pilco-Ferreto & Calaf, (2016), Lin *et al.* (2018) que en el caso de las células HEK-293T no se activaron como se observa en la **Figura 17**.

En este sentido, los estudios indican que la sobreexpresión de *Bcl-2* o *Bcl-x_L* puede bloquear la apoptosis actuando a nivel de las mitocondrias, Shimizu *et al.* (1996); Susin *et al.* (1997); Yang *et al.* (1997). Los datos recabados en la línea celular MCF-7 en este trabajo muestra que la expresión de *Bcl-2* no sufre cambios significativos con respecto al control negativo (ver **Figura 17**), lo que sugiere que la apoptosis por la vía mitocondrial no es el mecanismo de muerte que lleva a la disminución de la proliferación celular tras el tratamiento con la proteína A24-2 observada en las células MCF-7. Para el caso de las células HEK-293T se detecta que hay una tendencia a aumentar los niveles de expresión del gen *Bcl-2*, que como se mencionó líneas arriba, es una proteína antiapoptótica, es decir que está favoreciendo la viabilidad celular de HEK- 293T.

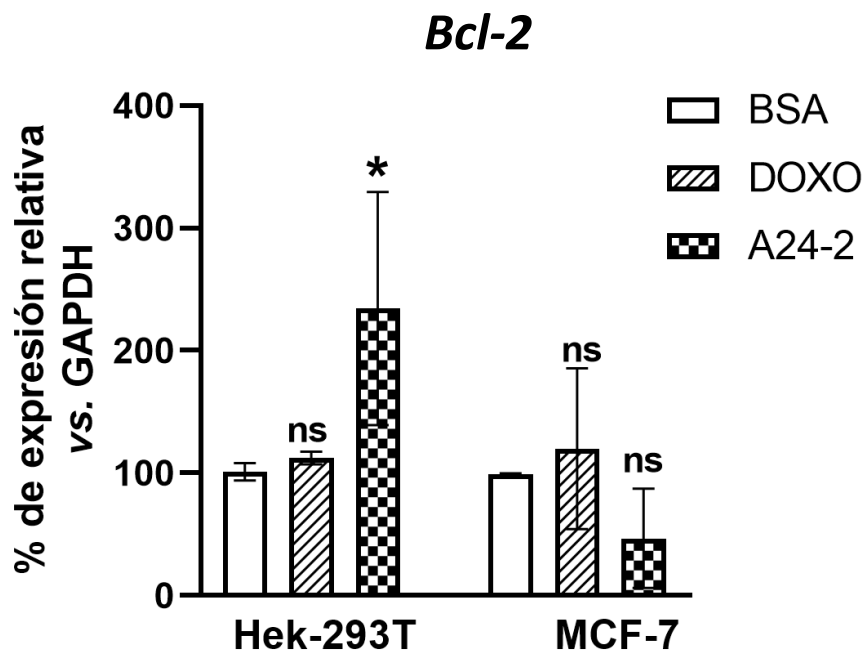


Figura 17. Expresión relativa de *Bcl-2* en células MCF-7 y HEK-293T. Los datos son expresados como el promedio de los porcentajes de tres experimentos independientes \pm desviación estándar, * $P < 0.05$ y ns (valores estadísticamente no significativos) vs control negativo. ANOVA de una vía y la prueba Dunnett fue calculada para determinar la significancia estadística.

Por otro lado, cuando se analizaron los niveles de expresión relativa de *caspa* 9, en las células HEK-293T y MCF-7, ninguna de las dos líneas celulares (tratadas con la proteína A24-2) mostró cambios significativos con respecto al control negativo (ver **Figura 18**).

Caspasa 9

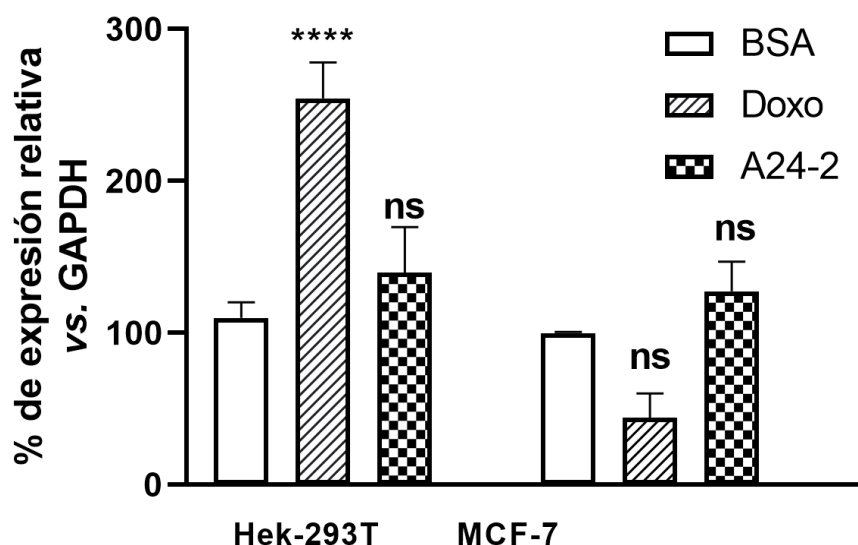


Figura 18. Expresión relativa del gen apoptóticos Casp 9 en células MCF-7 y HEK-293T. Las diferencias significativas entre los tratamientos vs control negativo son mostradas como **** $P < 0.0001$, y ns (valores estadísticamente no significativos). Los datos son expresados como el promedio del porcentaje de tres experimentos independientes, una ANOVA de una vía y la prueba Dunnett y fue calculada para determinar la significancia estadística.

De la misma forma sucedió con los niveles de expresión de los genes de *caspasa 3* y *caspasa 8*, los cuales no tuvieron cambios significativos (ver **Figura 19**). Para el caso de *caspasa 9* se sabe que es clave en activación de la vía intrínseca (también conocida como vía mitocondrial) que es estimulada por diferentes eventos que incluyen las quimioterapias, agentes inductores de estrés y radiación. *Caspasa 9* es tan importante que incluso si esta no se activa traería profundos efectos fisiológicos y fisiopatológicos, llevando a trastornos degenerativos, del desarrollo e incluso cáncer, Li *et al.* (2018). Se sabe que algunos micro ARNs tienen la capacidad de inhibir tanto la expresión de la proteína como del ARNm de *caspasa 9* y *caspasa 3* lo que trae severas consecuencias, Floy *et al.* (2014) que como se hizo mención líneas arriba, su expresión no se vio afectada. A nivel proteína *caspasa 9* induce a la activación de *caspasa 3* y por lo tanto la apoptosis, Brentnall *et al.* (2013), lo que indica, por un lado, y que como se esperaba en HEK-293T, no hay activación de la apoptosis dado que caspasas no fueron requeridas y por lo tanto no fue necesario que transcripcionalmente se expresaran las caspasas analizadas. Sin embargo, en el caso de MCF-

7 y considerando los datos morfológicos ya descritos, sí se esperaba que los genes *caspara 9* o *caspara 3* estuvieran sobre expresados.

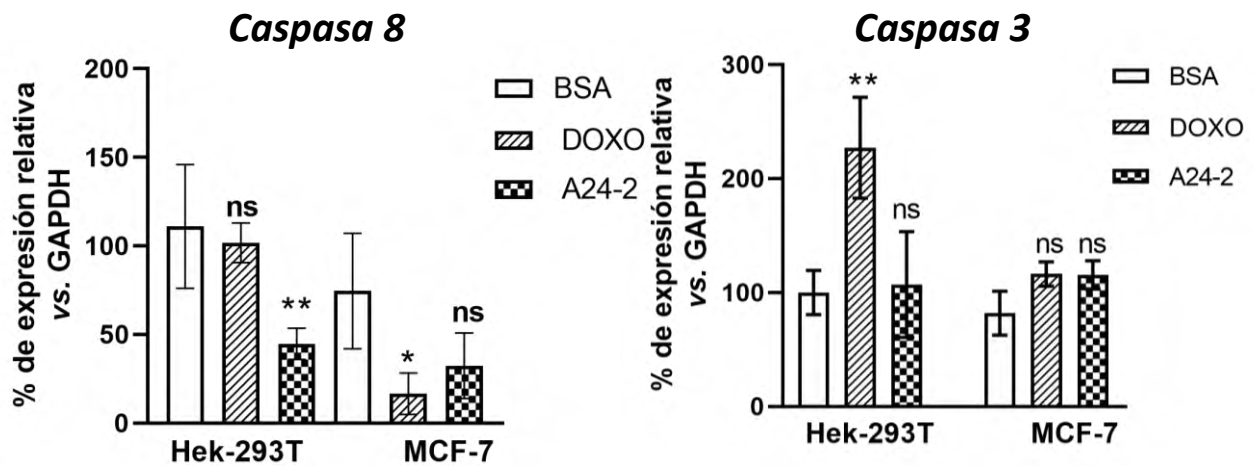


Figura 19. Expresión relativa de genes apoptóticos Casp 8 y 3 en células MCF-7 y HEK-293T. Las diferencias significativas entre los tratamientos vs control negativo son mostradas como ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ y ns (valores estadísticamente no significativos). Los datos son expresados como el promedio del porcentaje de tres experimentos independientes. Una ANOVA de una vía y la prueba Dunnett y fue calculada para determinar la significancia estadística.

No obstante, hay que destacar que la síntesis de proteínas se regula negativamente en las células de mamíferos tras la inducción de la apoptosis. Se conoce que la inhibición ocurre al nivel de iniciación de la cadena polipeptídica a través de la fosforilación de la subunidad α del factor de iniciación eIF2 e incluso algunas de las caspasas participan en la hidrólisis de los factores de iniciación eIF4G, eIF4B, eIF2 α y la subunidad p35 de eIF3, Clemens *et al.* (2000). Lo anterior, fortalece la propuesta de evaluar la apoptosis a tiempos cortos, independientemente de la técnica de determinación, ya que a largo plazo hay una pérdida de información a todos los niveles celulares y moleculares.

Mientras que los niveles de expresión del gen de la *caspara 6* (caspara efectora), ver **Figura 20**, enzima que depende *caspara 3/caspara 7*, Sahoo *et al.* (2023) disminuyeron significativamente después del tratamiento con la proteína A24-2 en comparación con el control negativo. Los estudios indican que únicamente cuando *caspara 6* está sobre expresada tiene la capacidad de activar a la apoptosis, a diferencia del resto de las caspasas que solo se requiere la presencia de ellas para que se active la apoptosis, MacLachlan & El-Deiry, (2002).

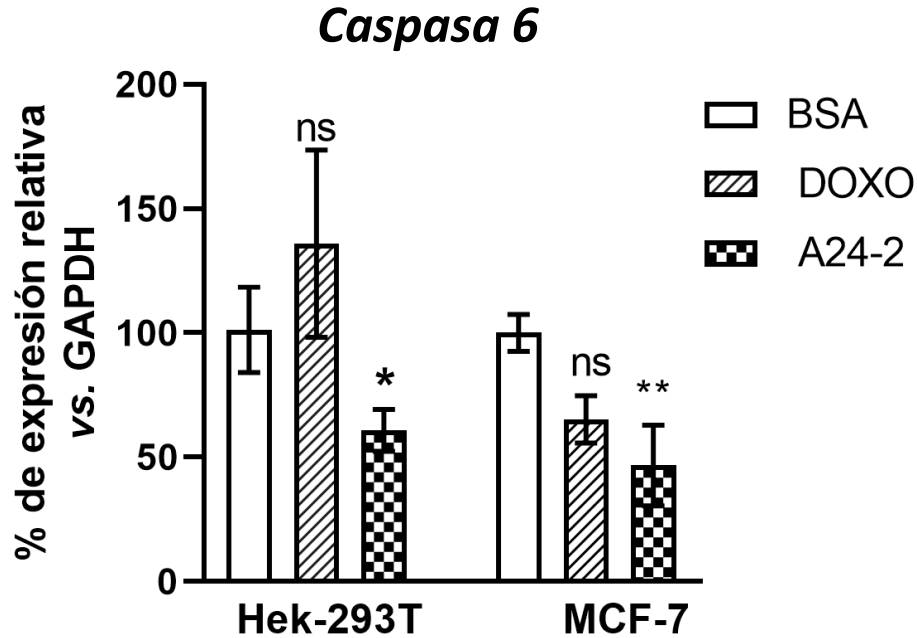


Figura 20. Expresión relativa del gen apoptótico 6, en células MCF-7 y HEK-293T. Las diferencias significativas entre los tratamientos con los controles son mostradas ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ y ns (valores estadísticamente no significativos) vs el control negativo. Los datos se muestran como porcentajes respecto al control negativo. ANOVA de una vía y la prueba Dunnett y fue calculada para determinar la significancia estadística.

En conjunto, los resultados de expresión de los genes *p53*, *Bcl-2* y, las *caspasas* 3, 6, 8 y 9, sugieren que la proteína A24-2 no induce la vía apoptótica de muerte celular en las células HEK-293T y MCF-7. Sin embargo, los cambios morfológicos observados en las células MCF-7, contradicen los resultados de expresión génica después de 24 horas de tratamiento con la proteína A24-2. Como se ha dicho, que durante la apoptosis la cascada de señalización desencadena la activación de proteínas de muerte celular, las denominadas caspasas, que llevan a cambios internos en la célula, Tibbetts *et al.* (2003). Esta cascada de señalización es un conjunto de procesos que requieren algunas 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, en la apoptosis, por ejemplo. Durante este evento, 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, sin embargo, la célula ya ha parado totalmente su metabolismo, Majno and Joris, (1995), Tibbetts *et al.* (2004). A pesar de que la expresión de los genes analizados no permite demostrar que la apoptosis es el mecanismo que lleva a la muerte observada tras el tratamiento con la PS A24-2. Es bien sabido que no solo las PS, sino otras proteínas pequeñas tienen una actividad anticancerígena, la cual se basa en la inducción de la apoptosis y necrosis de las células cancerosas mediante la lisis de la membrana o la formación de poros en la membrana, Droin *et al.* (2009). El hecho de que las células MCF-7 morfológicamente adquieran un fenotipo apoptótico tras 24 horas de tratamiento con la PS A24-2 fortalece la idea de que la apoptosis es el mecanismo preferentemente inducido por la proteína evaluada en este trabajo. Además, abre la necesidad de analizar rutas alternas de activación de la apoptosis, como por ejemplo la vía de TAK-1. En la actualidad, se sabe que la muerte celular programada es activada bajo diversos eventos biológicos que incluyen inflamación, lesión tisular y durante el desarrollo. TAK1 se induce mediante una serie de factores estresantes, como citoquinas y ligandos bacterianos. Se conoce a TAK1 que una biomolécula como un poderoso papel de supervivencia al activar la vía I κ B quinasa (IKK)-NF- κ B, que tiene varios genes diana, muchos de los cuales bloquean la apoptosis, promueven la proliferación celular y estimulan respuestas inflamatorias. Pérdida de TAK1 sensibiliza las células hasta la muerte a través de muchas de las innumerables vías que se sabe que activan TAK1, incluido el TNF α . A destacar de TAK1 es su participación en la vía de necroptosis mediada por RIPK1 y RIPK3 en algunas circunstancias, Mihaly *et al.* (2014). No obstante, una consideración primordial a evaluar es la realización de un ensayo de curso temporal iniciando de tiempos cortos de tratamiento con la proteína A24-2. Ya líneas anteriores se mencionó la rápida activación de la apoptosis después del tratamiento con algunas proteínas aisladas de *B. thuringiensis*, Aboul-Soud *et al.* (2019). Algunos estudios han descrito que, dependiendo del daño celular, la apoptosis puede incluso activarse en las primeras horas, detectándose la liberación de citocromo c, daño a nivel de membrana plasmática y fragmentación de ADN, además de la disminución de los niveles de la proteína caspasa 6, Mooney *et al.* (2002). Una de las perspectivas a considerar en el proyecto de las parasporinas es la detección de citocromo c, que como ya se mencionó, es uno de los primeros eventos que se observan en la vía intrínseca de la apoptosis. Por otro lado, Aboul-Soud *et al.* (2019) destacan en las mediciones de la inducción del mecanismo de muerte es en las

primeras horas del tratamiento con la parasporina aislada de la cepa *Bt5*, esto en células HeLa de cáncer cervicouterino, en las que se logra ver la expresión relativa de dos genes clave de la apoptosis, *caspasa 3* y *caspasa 9* después de 4 horas de tratamiento. De igual forma, Rendon-Marín *et al.* (2021) probaron que la proteína BTM-P1 derivada de la cepa Cry11Bb en la línea celular MCF-7, induce apoptosis después de 3 horas de exposición, analizando la vía de expresión de *p53* con una concentración de 3.6 µg/mL (IC₅₀).

En la actualidad, una de las estrategias promisorias para el tratamiento contra el cáncer es el uso de pequeñas proteínas anticancerígenas. Sus propiedades están determinadas por la composición de aminoácidos y la adición de grupos funcionales, lo que afecta su conformación, carga, estabilidad, biodisponibilidad, penetración tumoral/tejido más eficiente que otras moléculas, Xie *et al.* (2020). Algunos péptidos han sido evaluados en células MCF-7 y MDA-MB 231 y se ha logrado establecer que algunos de estos tienen mayor citotoxicidad en las células MCF-7, células ricas en receptores hormonales, Meschenmoser *et al.* (2012) Algunos de los péptidos evaluados inducen la expresión de los genes *caspasa 9* y *caspasa 3* en MCF-7 y MDA-MB 231 respectivamente, Han *et al.* (2013), Soleimani *et al.* (2019).

Evidentemente, la apoptosis es un mecanismo de muerte dependientes de diversos factores que involucran el tiempo de exposición del agente en estudio, de la propia molécula evaluada y de las características del tipo celular usada, por ejemplo Yang *et al.* (2020) evaluaron la expresión de genes apoptóticos *casp 3*, *7*, *9* y *p53* a distintos tiempos (6 y 24 horas) de exposición a nanopartículas de óxido de Zinc que contienen en la línea celular HEK-293T con una concentración de 50 µg/mL, encontrando que los niveles de ARNm de *casp 7* y *9* incrementaron (15 y 5 veces) respectivamente, respecto al tiempo, por otro lado Czemplik *et al.* (2016) evaluaron el efecto sobre la apoptosis de células MCF-7 después de 6, 12 y 24 h de tratamiento con extractos semillas de lino, observaron que la expresión de genes apoptótico *bax*, *p53*, *casp 7*, *8* y *9* medidos en células MCF-7 tratadas decrecían considerablemente respecto al tiempo de tratamiento (6, 12 y 24 horas), indicando que en esta línea celular la expresión se da en las primeras horas de exposición, apoyando así la idea que la expresión de los genes apoptóticos medidos en este trabajo transcurrieron a tiempos cortos de exposición con la parasporina A24-2, por tal motivo es necesario replantear los tiempos del análisis de la apoptosis en el modelo de estudio.

9. CONCLUSIÓN.

- La inclusión proteica A24-2 posee actividad citotóxica contra células MCF-7 y mínima actividad contra células HEK-293T.
- El tratamiento con la inclusión proteica A24-2 mantuvo la morfología de las células HEK-293T.
- Los cambios morfológicos observados en células MCF-7 después de 24 horas de tratamiento corresponden a fenotipos apoptóticos.
- La inclusión proteica A24-2 no es hemolítica contra eritrocitos humanos, causando 4.1% de hemólisis.
- Dada su baja actividad citotóxica sobre las células HEK-293T y su nula actividad hemolítica la inclusión proteicas A24-2 se le puede considerar una parasporina.
- La inhibición de la expresión del gen de *p53* y la sobreexpresión de *Bcl-2* inducida por la inclusión proteica A24-2 sobre las células HEK-293T, son los responsables de la inhibición de la apoptosis, y por lo tanto, que no haya efecto citotóxico sobre las células HEK- 293T.
- La nulos cambios en expresión de genes de *casp 9*, *3*, *6* y *p53* detectados a 24 horas postramiento no proporcionaron datos necesarios para apoyar la hipótesis de que el mecanismo de muerte asociado con la actividad citotóxica de la inclusión proteica A24-2 es la apoptosis.

10. PERSPECTIVAS

De acuerdo con lo obtenido en este trabajo se presentan las siguientes perspectivas de estudios para el seguimiento de los mecanismos de muerte asociados con la actividad citotóxica de la parasporina A24-2.

- Realizar un ensayo de curso temporal para evaluar apoptosis con la parasporina A24-2 tomando en cuenta que la inducción de tal mecanismo puede activarse en las primeras horas de exposición a la inclusión proteica, así como, las técnicas de detección.
- Evaluar apoptosis mediante citometría de flujo y ensayos de anexina/IP en células MCF-7 tratadas con la parasporina A24-2.
- Implementar ensayos de Western Blot para detección de proteínas asociadas a las vías de muerte celular apoptótica.
- Analizar el flujo de intracelular de calcio y liberación de citocromo c.
- Realizar ensayos para medir muerte celular (necrosis o autofagia) en células MCF-7 tratadas con la proteína A24-2.

11. REFERENCIAS

- äkel,C.E., Meschenmoser, K., Kim, Y., Weiher, H. and Schmidt Wolf,I.G.(2012). Efficacy of a proapoptotic peptide towards cancer cells. *In Vivo* **26**, 419–426.
- Abe, Kitada S, Y, Ito A et al. (2005). Molecular identification and cytotoxic action of parasporin, a protein group of novel crystal toxins targeting human tumor cells. In: Côté JC, Otvos IS, Schwartz JL, Vincent C (Eds): 6th Pacific Rim Conference on the Biotechnology of *Bacillus thuringiensis* and its Environmental Impact, Érudit, Montréal, pp 23-27
- Aberkane, L., Nacer-Khodja, A., Djenane, Z., Djouadi, L. N., Ouafek, A., Bouzlama, L., Grib, H., Mameri, N., Nateche, F., & Djefal, A. (2019). In vitro cytotoxicity of parasporins from native Algerian *Bacillus thuringiensis* strains against laryngeal and alveolar cancers. *Current Microbiology*, *77*(3), 405-414.
- Acehan D, Jiang X, Morgan DG, Heuser JE, Wang X, Akey CW. (2002). Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation. *Molecular cell* *9*(2): 423–432.
- Akiba T, Abe Y, Kitada S et al. (2009). Crystal structure of the parasporin-2 *Bacillus thuringiensis* toxin that recognizes cancer cells. *J Mol Biol*; *386*:121-133.
- American Cancer Society. (2019). What is Breast Cancer? Recuperado el 17 de enero de 2021, disponible en: <https://www.cancer.org/cancer/breastcancer/about/what-is-breast-cancer>
- André L.A. Melo, Sakae Kitada. (2020). Selection of the *Bacillus thuringiensis* Berliner strain to produce a parasporin with cytotoxic activity against MCF-7 breast cancer cells.
- Aubrey, B., Kelly, G., Janic, A. *et al.* (2018). How does p53 induce apoptosis and how does this relate to p53-mediated tumour suppression? *Cell Death Differ* **25**, 104–113.
- Ballantyne, A.J. (1975). Late sequelae of radiation therapy in cancer of the head and neck with reference to the nasopharynx. *Am. J. Surg.* *130*, 433-436.

- Beegle CC, Yamamoto T. (1992). History of *Bacillus thuringiensis* Berliner research and development. *Can Entomol*, 124, 587–616.
- Beena, V., Ramnath, V., Sreekumar, K. M., Karthiayini, K., Philomina, P. T., & Girija, D. (2019). Crystal protein of a novel *Bacillus thuringiensis* strain inducing cell cycle arrest and apoptotic cell death in human leukemic cells. *Scientific Reports*, 9(1).
- Beevi, S. S., Mangamoori, L. N., Subathra, M., & Edula, J. R. (2010). Hexane extract of *Raphanus sativus* L. roots inhibits cell proliferation and induces apoptosis in human cancer cells by modulating genes related to apoptotic pathway. *Plant Foods for Human Nutrition*, 65(3), 200-209.
- Berridge M.J., Lipp P., Bootman M.D. (2000). The versatility and universality of calcium signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol* ;1:11–21.
- Boatright, M. Renatus, FL Scott, S. Sperandio, H. Shin, IM Pedersen, JE Ricci, WA Edris, DP Sutherlin, DR Green, GS Salvesen, (2003). A unified model for apical caspase activation., *Mol. Celda* 11 529–541.
- Borin, D. B., Castrejón-Arroyo, K., Cruz-Nolasco, A., Peña-Rico, M., Sagrillo, M. R., Santos, R. C., ... & Navarro-Mtz, A. K. (2021). Parasporin a13-2 of *Bacillus thuringiensis* isolates from the papaloapan region (Mexico) induce a cytotoxic effect by late apoptosis against breast cancer cells. *Toxins*, 13(7), 476).
- Brasseur K, Auger P, Asselin E, Parent S, Côté J-C, Sirois M. (2015). Parasporin-2 from a New *Bacillus thuringiensis* 4R2 Strain Induces Caspases Activation and Apoptosis in Human Cancer Cells. *PLoS ONE* 10(8): e0135106.
- Brentnall, M., Rodriguez-Menocal, L., De Guevara, R. L., Cepero, E., & Boise, L. H. (2013). Caspase-9, caspase-3 and caspase-7 have distinct roles during intrinsic apoptosis. *BMC cell biology*, 14, 1-9)

- Cain K, Bratton SB, Cohen GM. (2002). The Apaf-1 apoptosome: a large caspase-activating complex. *BIOCHIMIE* 84(2): 203–14.
- Castrejón- Arroyo. (2020). 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. Universidad del Papalopan, México.
- Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades. (2020). https://www.cdc.gov/spanish/cancer/breast/basic_info/risk_factors.htm.
- Chen, Y. et al. Structure of p53 binding to the BAX response element reveals DNA unwinding and compression to accommodate base-pair insertion. *Nucleic Acids Res* **41**, 8368–8376 (2013).
- Chengchen, X; Bi-cheng, W; & Ming, S. (2014). Structural Insights into *Bacillus thuringiensis* Cry, Cyt and Parasporin Toxins. *Toxins*, 6(9), 2732-2770.
- Chipuk, J. E. et al. Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis. *Science* **303**, 1010–1014 (2004).
- Chittendent, Harrington EE. UU., O'Connorr et al. (1995). Induction of apoptosis by Bcl-2 homologue. Bak. *Naturaleza* 374, 733–736.
- 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, 407-416.
- Clapham D.E. (2007). Calcium signaling. *Cell*. ;**131**:1047–1058.
- Clemens, M. J., Bushell, M., Jeffrey, I. W., Pain, V. M., & Morley, S. J. (2000). Translation initiation factor modifications and the regulation of protein synthesis in apoptotic cells. *Cell Death & Differentiation*, 7(7), 603-615.

- Cruz Nolasco, A. (2014). Aislamiento e identificación de cepas de *Bacillus thuringiensis* productoras de proteína Cry. (Tesis de pregrado, Universidad del Papaloapan, Campus Tuxtepec, México).
- Cruz-Nolasco, A. (2017). Síntesis de nanoliposomas que contienen parasporinas de *Bacillus thuringiensis* con actividad antiproliferativa. Tesis de Maestría. Universidad del Papaloapan, México.
- Cuervo AM. (2004). Autophagy: many paths to the same end. *Mol Cell Biochem* 263(1): 55–72.
- Czabotar PE, Lessene G, Strasser A, Adams JM. (2014). Control of apoptosis by the BCL-2 family of proteins: implications for physiology and therapy.. *Nat Rev Mol Cell Biol*; **15** : 49–63.
- D’Arcy, M. (2019). Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biology International*, 43(6), 582-592.
- Da Costa Araldi, I. C., Bordin, F. P. R., Cadoná, F. C., Barbisan, F., Azzolin, V. F., Teixeira, C. F., Baumhardt, T., Da Cruz, I. B. M., Duarte, M. M. M. F., & De Freitas Bauermann, L. (2018). The in vitro radiosensitizer potential of resveratrol on MCF-7 breast cancer cells. *Chemico-Biological Interactions*, 282, 85-92.
- Darmon, DW Nicholson, RC Bleackley, (1995). Activation of the apoptotic protease CPP32 by cytotoxic T cell-derived granzyme B., *Nature* 377 446–448.
- Demain, A. L. (2014). Importance of microbial natural products and the need to revitalize their discovery. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 41: 185–201
- Dixon SJ, Lemberg KM, Lamprecht MR, Skouta R, Zaitsev EM, Gleason CE *et al.* (2012). Ferroptosis: a form of iron-dependent non-apoptotic cell death.. *Célula*; **149** : 1060–1072.

- Droin, N.; Hendra, J.-B.; Ducoroy, P.; Solary, E. Human Defensins as Cancer Biomarkers and Antitumour Molecules. *J. Proteom.* **2009**, *72*, 918–927).
- Eck-Enriquez K. Kiefer TL,, spriggs LL y Hill SM (2000). *Breast Cancer Res. Treat*, *61*, 229-239
- Ekino, K; Okomura, S; Ishikawa, T; Kitada, S; Saitoh, H; Akao, T; Oka, T; Nomura, Y; Ohba, M; Shin, T; & Mizuki, E. (2014). Cloning and Characterization of a Unique Cytotoxic Protein Parasporin-5 Produced by *Bacillus thuringiensis* A1100 Strain. *Toxins*, *6*(6), 1882-1895.
- Elmore S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathology* *35*(4): 495–516.
- Espino-Vázquez, A; Gómez-Treviño, A; Galán-Wong, L; & Pereyra-Alfárez, B. (2012). Isolation of *Bacillus thuringiensis* strains with cytotoxic activity against MOLT4, a leukemia cell line. In *Microbes in Applied Research: Current Advantages and Challenges*, p147-151.
- Espino-Vázquez AN. 2014. Caracterización biológica de Parasporinas en cepas nativas de *Bacillus thuringiensis*. Tesis de Doctorado. Universidad Autónoma de Nuevo León, México.
- Feng, Y., Wu, J., Feng, X., Tao, D., Hu, J., Qin, J., ... & Gong, J. (2007). Timing of apoptosis onset depends on cell cycle progression in peripheral blood lymphocytes and lymphocytic leukemia cells. *Oncology reports*, *17*(6), 1437-1444.
- Ferlay J, Ervik M, Lam F, Colombet M, Mery L, Piñeros M, et al. (2020). Observatorio Global del Cáncer: Cancer Today. Lyon: Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer; (<https://gco.iarc.fr/today> , consultado en febrero de 2021).
- Ferri K.F., Kroemer G. (2001). Organelle-specific initiation of cell death pathways. *Nat. Cell Biol.* **3**:E255–E263.
- Floyd, D. H., Zhang, Y., Dey, B. K., Kefas, B., Breit, H., Marks, K., ... & Purow, B. W. (2014). Novel anti-apoptotic microRNAs 582-5p and 363 promote human glioblastoma stem cell survival via direct inhibition of caspase 3, caspase 9, and Bim. *PloS one*, *9*(5), e96239),

- Fogli, S., Nieri, P., Cristina & Breschi, M. (2004). Role of nitric oxide in anthracycline toxicity and the prospects for pharmacological prevention of cardiac damage. *FASEB J.* **18**, 664–675
- Freed-Pastor WA, Prives C . (2012). Mutant P53: one name, many proteins. *Genes Dev*; **26**: 1268–1286.
- Goldar S, Khaniani MS, Derakhshan SM, Baradaran B. (2015). Molecular mechanisms of apoptosis and roles in cancer development and treatment. *Asian Pac J Cancer Prev* 2015;16(6):2129-44. doi: 10.7314/APJCP. 16.6. 2129.
- Grace, J. J., Ramani, G., & Shenbagarathai, R. (2019). Enhancement of purified human Colon Cancer-Specific Parasporal Toxin from *Bacillus thuringiensis*-LDC-501. *Current Microbiology*, 77(1), 104-114.
- Green DR y Kroemer G. (2004). The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science*. 305:626-629..
- Green DR, Evan GI. (2002). A matter of life and death. *Cancer Cell*. Feb; 1(1):19-30.
- Green DR, Kroemer G. (2009). Cytoplasmic functions of the tumour suppressor p53. *Nature*. Apr 30;458(7242):1127-30.
- Han j, Flemington C., HoughtonABet al. (2001). Expression of bbc3, a proapoptotic gene unique to BH3, is regulated by diverse cell survival and cell death signals. *proc. Academia Nacional. ciencia EE.UU98*, 11318–11323.
- Han, Y. Y., Liu, H. Y., Han, D. J., Zong, X. C., Zhang, S. Q., & Chen, Y. Q. (2013). Role of glycosylation in the anticancer activity of antibacterial peptides against breast cancer cells. *Biochemical Pharmacology*, 86(9), 1254-1262).
- (Soleimani, M., Sadeghi, H. M., & Jahanian-Najafabadi, A. (2019). A Bi-functional targeted P28-NRC chimeric protein with enhanced cytotoxic effects on breast cancer cell lines. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research: IJPR*, 18(2), 735.

- Hçfte H, Whiteley HR. (1989). Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol Rev* 53:242–255.
- Huang, F. Li, X. Liu, W. Li, W. Shi, FF Liu, B. O'Sullivan, Z. He, Y. Peng, AC Tan, L. Zhou, J. Shen , G. Han, XJ Wang, J. Thorburn, A. Thorburn, A. Jimeno, D. Raben, JS Bedford, CY Li. (2011). Stimulation of caspase-3-mediated tumor cell repopulation during cancer radiotherapy, *Nat. Medicina*. 17 860–866.
- Huang, S.K., H.Q. Xiao, T.J. Kleine, G. Paciotti, D.G. Marsh, L.M. Lichtenstein, and M.C. Liu. (1995a). IL-13 expression at the sites of allergen challenge in patients with asthma. *J. Immun.* 155: 2688-2694.
- Ibrahim, M. D., Kntayya, S. B., Ain, N. M., Iori, R., Ioannides, C., & Razis, A. F. A. (2018). Induction of apoptosis and cytotoxicity by raphasatin in human breast adenocarcinoma MCF-7 cells. *Molecules*, 23(12), 3092.
- Igney FH y Krammer PH. (2002). Death and anti-death: tumor resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer* ;2:277-88
- INEGI. (2021). Estadísticas de mortalidad. Consulta interactiva de datos. SNIEG. Información de Interés Nacional.
- Instituto Mexicano del Seguro Social. (2015). Cáncer de mama. Introducción. <http://www.imss.gob.mx/salud-en-linea/cancer-mama>.
- Ito, A; Sasaguri, Y; Kitada, S; Kusaka, Y; Kuwano, K; Masutomi, K; & Ohba, M. (2004). A *Bacillus thuringiensis* crystal protein with selective cytotoxic action to human cells. *Journal of Biological Chemistry*, 279 (20), 21282-21286.
- Janicke RU, Sprengart ML, Wati MR y Porter AG. (1998). *J. Biol. Chem*, 273, 9357-936
- Jenniffer Cruz, Miguel Orlando Suárez-Barrera, Paola Rondón-Villarreal, Andrés Olarte-Díaz, Fanny Guzmán, Lydia Visser, Nohora Juliana Rueda-Forero. (2021). Computational study,

synthesis and evaluation of active peptides derived from Parasporin-2 and spike protein from Alphacoronavirus against colorectal cancer cells. *Biosci Rep* 22; 41 (12): BSR20211964.

- Jensen GB, Hansen BM, Eilenberg J, Mahillon J. (2003). The hidden lifestyles of *Bacillus cereus* and relatives. *Environmental Microbiology* 5:631-640.
- Joza N., Susin S.A., Daugas E., Stanford W.L., Cho S.K., Li C.Y., Sasaki T., Elia A.J., Cheng H.Y., Ravagnan L., Ferri K.F., Zamzami N., Wakeham A., Hakem R., Yoshida H., Kong Y.Y., Mak T.W., Zuniga-Pflucker J.C., Kroemer G., Penninger J.M. (2001). Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature*. ;**410**:549–554.
- Jung, YC; Mizuki, E; Akao, T; & Côté, JC. (2007). Isolation and characterization of a novel *Bacillus thuringiensis* strain expressing a novel crystal protein with cytotoxic activity against human cancer cells. *Journal of Applied Microbiology*, 103(1), 65-79.
- Katayama H, Kusaka Y, Yokota H, Akao T, Kojima M, Nakamura O, Mekada E, Mizuki E. (2007). Parasporin-1 a novel cytotoxic protein from *Bacillus thuringiensis*, induces Ca^{2+} influx and a sustained elevation of the cytoplasmic Ca^{2+} concentration in toxin-sensitive cells. *J Biol Chem* 282(10):7742–7752.
- Katz, M. E., and Glick, J.H. (1979). Nitrosoureas: a reappraisal of clinical trials. *Cancer Clin. Trials* 2, 297-316.
- Ke F, Bouillet P, Kaufmann T, Strasser A, Kerr J, Voss AK. (2013). Consequences of combined loss of BOK and BAK or BOK and BAX. *muerte celular Dis* ; **4** : e650.
- Kiefer MC, Brauer M.J., Potestades CV et al. (1995). Modulation of apoptosis by the widely distributed Bcl-2 homologue Bak. *Naturaleza* 374,736–739.
- Kim JH, Lee SY, Oh SY, Han SI, Park HG, Yoo M, Kang H. (2004). Methyl jasmonate induces apoptosis through induction of Bax/Bcl-2 and activation of caspase-3 via ROS production in A549 cells. *Oncol Rep* 12(6): 1233–8.

- Kitada S, Abe Y, Shimada H et al. (2006). Cytocidal actions of parasporin-2, an anti-tumor crystal toxin from *Bacillus thuringiensis*. *J Biol Chem*;281:26350-26360.
- Kitada, S; Abe, Y; Shimada, H; Kusaka, Y; Matsuo, Y; Katayama, H; & Sasaguri, Y. (2006). Cytocidal actions of parasporin-2, an anti-tumor crystal toxin from *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Biological Chemistry*, 281(36), 26350-26360.
- Kotze, A.C.; Grady, J.O.; Gough, J.M.; Pearson, R.; Bagnall, N.H.; Kemp, D.H.; Akhurst, R.J. (2005). Toxicity of *Bacillus Thuringiensis* to Parasitic and Free-Living Life-Stages of Nematode Parasites of Livestock. *Int. J. Parasitol.* 35, 1013–1022.
- Kroemer G, Galluzzi L, Brenner C. (2007). Permeabilization of the mitochondrial membrane in cell death. *Physiol Rev.*;87:99-163..
- Kroemer G, Marino G, Levine B. (2010). Autophagy and the integrated stress response. *Mol Cell* 40: 280–293.
- Kroemer G., Reed J.C. (2000). Mitochondrial control of cell death. *Nat. Med.* ;6:513–519.
- Kuida K, Haydar TF, Kuan CY, Gu Y, Taya C, Karasuyama H *et al* . (1998) Reduced apoptosis and cytochrome c-mediated caspase activation in mice lacking caspase 9. *Cell* ; 94 : 325–337.
- Kuribayashi K, Mayes PA, El-Dery WS. (2006). What do caspases 3 and 7 do upstream of mitochondria?. *Cancer Biol Ther.*;5:763-765..
- Lenina, N.K; Naveenkumar, A; Sozhavendan, AE; Balakrishnan, N; Balasubramani, V; & Udayasuriyan, V. (2014). Characterization of parasporin gene harboring Indian isolates of *Bacillus thuringiensis*. *3 Biotech*, 4(5), 545-551.
- Leu, J. I. J. et al. Mitochondrial p53 activates Bak and causes disruption of a Bak-Mcl1 complex. *Nat. Cell Biol.* 6, 443–450 (2004).
- Levine A.J. (2020). p53: 800 million years of evolution and 40 years of Discovery. *Nat. Rev. Cáncer*20,471–480.

- Levine B, Kroemer G. (2008). Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell* 132: 27–42.
- Li J, McQuade T, Siemer AB, Napetschnig J, Moriwaki K, Hsiao YS, Damko E, Moquin D, Walz T, McDermott A, Chan FKM. (2012a). The RIP1/RIP3 necrosome forms a functional amyloid signaling complex required for programmed necrosis. *Cell* 150(2): 339–50.
- Li WW, Li J, Bao JK. (2012b). Microautophagy: lesser-known self- eating. *Cell Mol Life Sci* 69(7): 1125–36.
- Li, P., Zhou, L., Zhao, T., Liu, X., Zhang, P., Liu, Y., ... & Li, Q. (2017). Caspase-9: structure, mechanisms and clinical application. *Oncotarget*, 8(14), 23996.
- Liang Y, Nylander KD y Schor NF. (2001). *Pediatr. Res*, 49, 211^a
- Lin, R. W., Ho, C. J., Chen, H. W., Pao, Y. H., Chen, L. E., Yang, M. C., ... & Wang, C. (2018). P53 enhances apoptosis induced by doxorubicin only under conditions of severe DNA damage. *Cell Cycle*, 17(17), 2175-2186.),
- Liu y Tavana o,Guw (2019). p53 modifications: exquisite decorations of the mighty guardian.*J. Mol. Biol celular*. 11, 564–577.
- MacLachlan, T. K., & El-Deiry, W. S. (2002). Apoptotic threshold is lowered by p53 transactivation of caspase-6. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(14), 9492-9497).
- Marchenko N.D., Zaika A., Moll U.M. (2000). Death signal-induced localization of p53 protein to mitochondria. A potential role in apoptotic signaling. *J. Biol. Chem.* 275, 16202–16212.
- Marthey L, Mateus C, Mussini C, et al. (2016). Cancer Immunotherapy with anti-CTLA-4 monoclonal antibodies induces an inflammatory bowel disease. *J Crohns Colitis*; 10:395–401.
- Martin, Green. (1995). Protease activation during apoptosis: death by a thousand cuts? *Celda* 82 (349–352).

- Martinou J.C., Desagher S., Antonsson B. (2000). Cytochrome c release from mitochondria: all or nothing. *Nat. Cell Biol.* 2:E41–E43.
- Martinvalet D, Zhu P, Lieberman J. (2005). Granzyme A induces caspase-independent mitochondrial damage, a required first step for apoptosis. *Immunity* 22(3): 355–70.
- Melo, A. L. A., & Kitada, S. (2020). Selection of the *Bacillus thuringiensis* Berliner strain to produce a parasporin with cytotoxic activity against MCF-7 breast cancer cells. *Breast disease*.
- Mihaly, S. R., Ninomiya-Tsuji, J., & Morioka, S. (2014). TAK1 control of cell death. *Cell Death & Differentiation*, 21(11), 1667-1676.
- Mihara METRO., Erster S., Zaika A. et al. (2003). p53 has a direct apoptogenic role in mitochondria. *mol. Celúla* 11, 577–590.
- Minotti G, Menna P, Salvatorelli E, Cairo G and Gianni L: Anthracyclines: Molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacol Rev* 56: 185-229, 2004
- Mizuki, E.; Ohba, M.; Akao, T.; Yamashita, S.; Saitoh, H.; 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.
- Mizuki, E; Park, Y. S; Saitoh, H; Yamashita, S; Akao, T; Higuchi, K; & Ohba, M. (2000). Parasporin, a human leukemic cell-recognizing parasporal protein of *Bacillus thuringiensis*. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 7(4), 625-634.
- Mizushima N, Levine B, Cuervo AM, Klionsky DJ. (2008). Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature* 451(7182): 1069–75.
- Mooney, L. M., Al-Sakkaf, K. A., Brown, B. L., & Dobson, P. R. M. (2002). Apoptotic mechanisms in T47D and MCF-7 human breast cancer cells. *British journal of cancer*, 87(8), 909-917.

- Nadarajah VD, Ting D, Chan KK et al. (2008). Selective cytotoxic activity against leukemic cell lines from mosquito-derived *Bacillus thuringiensis* parasporal inclusions. *Southeast Asian J Trop Med Publ Health*;39:235-243
- Nagamatsu, Y; Okamura, S; Saitou, H; Akao, T; & Nagamatsu, E. (2010). Three Cry toxins in two types from *Bacillus thuringiensis* strain M019 preferentially kill human hepatocyte cancer and uterus cervix cancer cells. *Bioscience Biotechnology Biochemistry*, 74(3), 494-498.
- Nakano K., Vousden K.H. (2001). PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Mol. Cell* 7, 683–694.
Naturaleza 458, 1127–1130.
- Nikolettou V, Markaki M, Palikaras K, Tavernarakis N. (2013). Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. *Biochim Biophys Acta* 2013;1833(12):3448-59.
- O'connor, M.J. (2015). Targeting the DNA Damage Response in Cancer. *Mol. Cell* 60, 547-560.
- Oberhammer F, Wilton JW, Dive C, Morris ID, Hickman JA, Wakeling AE, Walker PR y Sikorska M. (1993) *EMBO j.*, 12, 3679-3684
- Oda E., Ohki R., Murasawa H. et al. (2000). Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science* 288, 1053–1058.
- Ohba, M; Mizuki, E; & Uemori, A. (2009). Parasporin, a new anticancer protein group from *Bacillus thuringiensis*. *Anticancer Research*, 29(1), 427-433.
- Okassov A, Nersesyan A, Kitada S, Ilin A. (2015). Parasporins as new natural anticancer agents: a review, *Journal of BUON*, 1: 5–16.
- Okumura, S., Ohba, M., Mizuki, E., Crickmore, N., Côté, J.-C., Nagamatsu, Y., Kitada, S., Sakai, H., Harata, K. y Shin, T. (2010). "Nomenclatura de parasporinas" <http://parasporin.fitc.pref.fukuoka.jp/> (consultado el 30 de octubre de 2020).

- Okumura, S; Ishikawa, T; Saitoh, H; Akao, T; & Mizuki, E. (2013). Identification of a second cytotoxic protein produced by *Bacillus thuringiensis* A1470. *Biotechnology letters*, 35(11), 1889-1894.
- Oltvai Z.N., Milliman C.L., Korsmeyer S.J. (1993). Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 74, 609–619.
- Oppenheim RW, Flavell RA, Vinsant S, Prevette D, Kuan CY, Rakic P. (2001). Programmed cell death of developing mammalian neurons after genetic deletion of caspases. *J Neurosci* 21(13): 4752–60.
- Parrish J., Li L., Klotz K., Ledwich D., Wang X., Xue D. (2001) Mitochondrial endonuclease G is important for apoptosis in *C. elegans*. *Nature*; **412**:90–94.
- Periyasamy, A; Kkani, P; Chandrasekaran, B; Ponnusamy, S; Viswanathan, S; Selvanayagam, P; y Rajaiah, S. (2016). Detection and characterization of a non-insecticidal *Bacillus thuringiensis* strain that produces parasporal protein with selective toxicity against human colon cancer cell lines. *Anales de Microbiología* , 66 (3), 1167-1178.
- Philchenkov A, Zavelevich M, Krocak TJ, Los MJ. (2004). Caspases and cancer: mechanisms of inactivation and new treatment modalities. *Exp Oncol* 26(2): 82–97.
- Phonnok S, Tanechpongamb WU, Wongsatayanon BT. (2010). Anticancer and apoptosis-inducing activities of microbial metabolites. *Electronic J Biotechnol*; 13
- Pilco-Ferreto, N., & Calaf, G. M. (2016). Influence of doxorubicin on apoptosis and oxidative stress in breast cancer cell lines. *International journal of oncology*, 49(2), 753-762.)
- Poon IK, Lucas CD, Rossi AG, Ravichandran KS. (2014). Apoptotic cell clearance: basic biology and therapeutic potential. *Nat Rev Immunol* 14(3): 166–80.
- Postow MA. Managing immune checkpoint-blocking antibody side effects. (2015). *Am Soc Clin Oncol Educ Book*:76–83.

- Prud'homme, G.J., D.H. Kono, and A.N. Theofilopoulos. (1995). Quantitative polymerase chain reaction analysis reveals marked overexpression of interleukin-1 beta, interleukin-1 and interferon-gamma mRNA in the lymph nodes of lupus-prone mice. *Mol. Immunol.* 32: 495-503.
- Riley T., Sontag E., Chen P. et al. (2008). Transcriptional control of human p53-regulated genes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 402–412.
- Rimessi A., Giorgi C., Pinton P., Rizzuto R. (2008). The versatility of mitochondrial calcium signals: from stimulation of cell metabolism to induction of cell death. *Biochim. Biophys. Acta.* ;**1777**:808–816.
- Roh JY, Choi JY, Li MS, Jin BR, Je YH. (2007). *Bacillus thuringiensis* as a specific, safe, and effective tool for insect pest control. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 17:547-559.
- Safwat, G. M., Hassanin, K. M. A., Mohammed, E., Ahmed, E., Rheim, M. R. A., Ameen, M. A., Abdel-Aziz, M., Gouda, A. M., Peluso, I., Almeer, R., Abdel-Daim, M. M., & Abdel-Wahab, A. (2021). Synthesis, anticancer assessment, and molecular docking of novel Chalcone-Thienopyrimidine derivatives in HEPG2 and MCF-7 cell lines. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2021, 1-27.
- Sahoo, G., Samal, D., Khandayataray, P., & Murthy, M. K. (2023). A Review on Caspases: Key Regulators of Biological Activities and Apoptosis. *Molecular Neurobiology*, 1-33),
- Saitoh, H; Okumura, S; Ishikawa, T; Akao, T; Mizuki, E; & Ohba, M. (2006). Investigation of a novel *Bacillus thuringiensis* Gene Encoding a Parasporal Protein, Parasporina-4, That preferentially Kills Human Leukemia T Cells. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 70(12), 2935-2941.
- Sankari SL, Masthan KM, Babu NA, Bhattacharjee T, Elumalai M. (2012). Apoptosis in cancer--an update. *Asian Pac J Cancer Prev*;13(10):4873-8.

- Schnepf E, Crickmore N, Van Rie J, Lereclus D, Baum J, Feitelson J, et al. (1998). *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol Mol Biol Rev*; 62: 775-806.
- Scorrano L, Korsmeyer SJ. (2003) Mechanisms of cytochrome c release by proapoptotic BCL-2 family members. *Biochem Biophys Res Commun* ; 304: 437–44
- Shen S, Kepp O, Kroemer G. (2012). The end of autophagic cell death? *Autophagy* 8: 1 –3.
- Shi Y. (2004). Caspase activation, inhibition, and reactivation: a mechanistic view. *Protein Sci.*; 13 (8): 1979-1987.
- Shi, J., Abdelwahid, E. & Wei, L. (2011). Apoptosis in anthracycline cardiomyopathy.. *actual pediastra Rev.* **7** , 329–336.
- Shi, Y., Moon, M., Dawood, S., McManus, B. y Liu, PP. (2011). Mechanisms and management of doxorubicin cardiotoxicity. *Hertz* **36** , 296–305.
- Shibue T., Takeda K., Oda E. et al. (2003). Integral role of Noxa in p53-mediated apoptotic response. *Genes Dev.*17, 2233–2238.
- Sica A, Wang JM, Colotta F, Dejana E, Mantovani A, Oppenheim JJ, Larsen CG, Zachariae CO, Matsushima K. (1990). Monocyte chemotactic and activating factor gene expression induced in endothelial cells by IL-1 and tumor necrosis factor. *The Journal of Immunology* 144(8): 3034–3038.
- Slee EA, Adrian C, Martin SJ. (1999). Serial killers: ordering caspase activation events in apoptosis. *Cell Death Diff.*;6:1067-1074.
- Slee, C. Adrian, SJ Martin. (2001). Executioner caspase-3, -6 and -7 perform distinct non-redundant and defined roles during the demolition phase of apoptosis., *J. Biol. Química.* 276 7320–7326.
- Spencer SL, Gaudet S, Albeck JG, Burke JM, Sorger PK. (2009). Non-genetic origins of cell-to-cell variability in TRAIL- induced apoptosis. *Nature* 459(7245): 428–32.

- Strasser and Vaux. (2020). Cell Death in the Origin and Treatment of Cancer, *Molecular Cell*.
- Taatjes, D. J., Sobel, B. E., & Budd, R. C. (2007). Morphological and cytochemical determination of cell death by apoptosis. *Histochemistry and Cell Biology*, *129*(1), 33-43.
- Tan, X., X. Sun, C.F. Gonzalez, and W. Hsueh. (1994). PAF and TNF increase the precursor of NF-kappa B p50 mRNA in mouse intestine: Quantitative analysis by competitive PCR. *Biochim. Biophys. Acta* *1215*: 157-162.
- Thomlinson, R.H., and Gray, L.H. (1955). The histological structure of some human lung cancers and the possible implications for radiotherapy. *Br. J. Cancer* *9*, 539-549.
- 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. Ziegler, U., and Groscurth, P. (2004). Morphological features of cell death. *Physiology* *19*, 124–128. Majno, G., & Joris, I. (1995). Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *The American journal of pathology*, *146*(1), 3.
- Vachon V, Laprade R, Schwartz JL. (2012). Current models of the mode of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins: a critical review. *Journal of Invertebrate Pathology*, *111*(1): 1– 12.
- Van Meerloo, J., Kaspers, G. J. L., & Cloos, J. (2011). Cell Sensitivity Assays: The MTT Assay. *Methods in Molecular Biology*, 237-245.
- Vaseva AV, Marchenko ND, Ji K, Tsirka SE, Holzmann S, Moll UM. (2012). p53 opens the mitochondrial permeability transition pore to trigger necrosis. *Célula*; **149** : 1536–1548.
- Verhagen A.M., Ekert P.G., Pakusch M., Silke J., Connolly L.M., Reid G.E., Moritz R.L., Simpson R.J., Vaux D.L. (2000). Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins *Cell*; **102**:43–53.

- Vousden KH. (2000). P53: Death Star. *Cell*. 103:691-694.
- Waldron-Roby E, Hoerauf J, Arbez N, Zhu S, Kulcsar K, Ross CA. (2015). Sox11 Reduces Caspase-6 Cleavage and Activity. *PLoS ONE* 10(10): e0141439.
- Walker, RV Talanian, KD Brady, LC Dang, NJ Bump, CR Ferez, S. Franklin, T. Ghayur, MC Hackett, LD Hammill, et al. (1994). Crystal structure of the beta-converting enzyme cysteine protease beta-converting enzyme interleukin-1: a homodimer (p20/p10)₂, *Cell* 78. 343–352 .
- Walsh, SP Cullen, C. Sheridan, AU Luthi, C. Gerner, SJ Martin (2008).
- Executioner caspase-3 and caspase-7 are functionally distinct proteases., *Proc. Nacional. Academia ciencia EE. UU.* 105,12815–12819.
- Wang, S., Konorev, E. A., Kotamraju, S., Joseph, J., Kalivendi, S., & Kalyanaraman, B. (2004). Doxorubicin induces apoptosis in normal and tumor cells via distinctly different mechanisms: intermediacy of H₂O₂-and p53-dependent pathways. *Journal of Biological Chemistry*, 279(24), 25535-25543.
- Wei, H. et al. Structural insight into the molecular mechanism of p53-mediated mitochondrial apoptosis. *Nat. Commun.* **12**, 2280 (2021).
- Wen j, Wang D. (2022). Deciphering the PTM codes of the p53 tumor suppressor..*J. Mol. Biol celular.* 13, 774–785.
- Wenningmann N., Knapp M., Ande A., Vaidya T., Ait-Oudhia S. (2019). Insights into doxorubicin-induced cardiotoxicity: molecular mechanisms, preventive strategies and early monitoring. *mol. Farmacol.* **96** , 219–232.
- Wong RS. (2011). Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *J Exp Clin Cancer Res.* 26;30:87

- World Health Organization (WHO). (2020). Cancer. Available online: <https://www.who.int> (accessed on 30 November, 2021).
- World Medical Association Declaration of Helsinki. (2013). Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects. *JAMA*. 310(20):2191-2194.
- Xie, M.; Liu, D.; Yang, Y. Anti-Cancer Peptides: Classification, Mechanism of Action, Reconstruction and Modification. *Open Biol.* **2020**, *10*, 200004.
- Xu C, Wang BC, Yu Z, Sun M. (2014). Structural insights into Bacillus thuringiensis Cry, Cyt and parasporin toxins, *Toxins*6(9): 2732–2770.
- Yamashita, S., Katayama, H., Saitoh, H., Akao, T., Park, Y. S., Mizuki, E., Ohba, M. & Ito, A. (2005). Typical three-domain Cry proteins of Bacillus thuringiensis strain A1462 exhibit cytotoxic activity on limited human cancer cells. *J Biochem* 138:663–672.
- Yu j,zhang l, Hwang PM et al. (2001). PUMA induces rapid apoptosis of colorectal cancer cells. *.mol. Celúla* 7,673–682.
- Yuan J, Kroemer G. (2010). Alternative cell death mechanisms in development and beyond. *Genes Dev* 24: 2592–2602.
- Yuan, C., Filippova, M., & Duerksen-Hughes, P. J. (2012). Modulation of apoptotic pathways by human papillomaviruses (HPV): Mechanisms and implications for therapy. *Viruses*, *4*(12), 3831-3850.
- Ziegler U, Groscurth P. (2004). Morphological features of cell death. *Noticias Physiol Sci.* 19: 124-128. 10.1152/nips.01519.

12. ANEXOS.

1. Preparación medio líquido

En un matraz Erlenmeyer de 1 L agregar 200 mL de agua destilada, agregar la cantidad de reactivo medido, disolver el medio y aforar al volumen a ocupar.

Medio	Para 1L	Para 350 mL
Caldo nutritivo	23 g	2.8 g
Agar nutritivo	23 g	2.8 g

Esterilizar el medio, esperar a que se atempere e inocular

Para el medio sólido esperar a que se atempere el medio esterilizado y vaciar en las cajas petri e inocular.

2. LAEMMLI al 2X para la solubilización de proteínas

Reactivo	Volumen
Tris-HCl 0.5 M pH 6.8	5 mL
SDS al 20 %	2 mL
Glicerol	2 mL
2 mercaptoetanol	1 mL
Azul de bromofenol al 0.02 %	1 mL
	11 mL

Esta solución se deja en un frasco tono ámbar a temperatura de 4° para su uso posterior.

3. Buffer para preparar geles de acrilamida

Reactivo	Cantidad
Buffer tris a 1.5 M pH 8.8	18.2g
Buffer tris a 0.5 M pH 6.8	6.5g

Ajustar el pH con HCl según se requiera a los pH indicados en la tabla anterior y aforar con agua destilada a 100 mL.

4. Buffer para corrimiento electroforetico de geles de acrilamida.

Cantidades para 1L

Reactivo	Cantidad
Tris base	3.04 g
Glicina	15 g
SDS	1 g

5. Reactivos para teñir y destenir geles

Reactivo	Cantidad
TCA 12.5 %	12.5 g
Azul de comassie al 0.1 %	0.1 g
Met/Ac.acet/Agua	25 mL de metanol + 10 mL de acido acetico + 65 mL de agua

Procedimiento para teñir y destenir los geles

1. Preparar TCA al 12.5 % (25 minutos)
2. Tinción con azul de comassie al 0.1 % (4 horas en agitacion)
3. Desteñido con metanol/acido acetico/agua (2 horas en agitación a 70 rpm)
4. Desteñido con agua destilada hasta que las bandas sean visibles.

6. Preparación de geles al 10% SDS-PAGE

Preparación para geles de 1.5 mm

Gel separador

Porcentaje	Reactivos	1 gel	2 geles	3 geles	4 geles
10%	Agua destilada	3 mL	6 mL	9 mL	12 mL
	1.5 M Tris-HCl (pH 8.8)	2.2 mL	4.4 mL	6.5 mL	8.7 mL
	Acrilamida/Bis (30%)	2.7 mL	5.4 mL	8.1 mL	10.8 mL
	Persulfato de Amonio (PA 12.5%)	0.1 mL	0.2 mL	0.3 mL	0.4 mL
	TEMED 8.4 %	0.08 mL	0.15 mL	0.22 mL	0.3 mL

Gel concentrador

Reactivo	1 gel	2 geles	3 geles	4 geles
Agua destilada	0.8 mL	1.5 mL	2.3 mL	3 mL
0.5 M Tris-HCl (pH 6.8)	0.7 mL	1.3 mL	2 mL	2.6 mL
Acrilamida/Bis (30%)	0.5 mL	0.9 mL	1.3 mL	1.7 mL
Persulfato de Amonio (PA 12.5%)	0.07 mL	0.13 mL	0.19 mL	0.25 mL
TEMED 8.4 %	0.04 mL	0.08 mL	0.12 mL	0.15 mL

7. Preparación de 1 L de PBS al 1X

Esta solución se prepara con el reactivo de la marca SIGMA-ALDRICH DPBS, donde se prepara con 9.55 g/L. O preparar con los siguientes reactivos

Reactivo	Concentración	Cantidad
NaCl	13.7 mM	0.8 g
KCl	2.7 mM	0.2 g
Na ₂ HPO ₄	8 mM	1.44 g
KH ₂ PO ₄	2mM	0.24 g

Aforar el pH a 7.4 con HCl o NaOH según corresponda, antes de aforar.

8. Buffer para elucion de proteínas

Reactivo	Cantidad (g)
Tris base	3.0
Glicina	14.4
SDS	1.0

Se deja en refrigeración a 4°C.

9. Preparación de la solución de MTT (Bromuro 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol)

- Pesar 5 mg de MTT para 1mL, tomando en cuenta que se agrega 10 μ L de la solución a cada pozo de las placas de cultivo
- Disolver el MTT en PBS 1X estéril
- Filtrar una membrana de 0.22 μ m

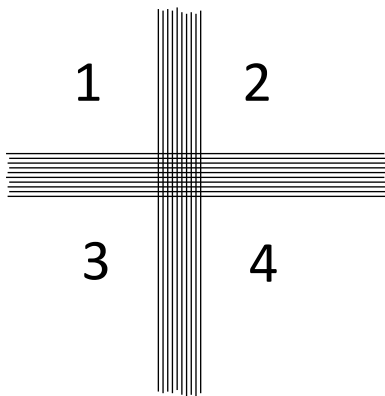
10. Preparación de medio de cultivo DMEM alto en glucosa suplementado.

- En un vaso de precipitado agregar aproximadamente 800 μ L de H₂O miliQ, poner en agitación y agregar 13.5 g de medio DMEM alto en glucosa en polvo.
- Pesar 3.7 g de bicarbonato de sodio y agregarlo al medio en agitación, el pH queda en 7.4.
- Vaciar el medio preparado en un matraz volumétrico y aforar a 1L.
- En la campana de flujo agregar al medio 1% (10 mL) de antibiótico penicilina/estreptomicina.
- Esterilizar mediante filtración utilizando una bomba de vacío.
- A 500 μ L de medio filtrado agregar 10 % (50 mL) de suero fetal bovino
- Hacer alicuotas de 50 μ L para evitar contaminaciones.

11. Protocolo para cálculos de concentración celular.

1. Se aspira el medio de cultivo de las cajas utilizando una pipeta pasteur esteril y una bomba de vacío
2. Se agregarn 5 mL de PBS estéril para retiras sobrantes de medio de cultivo
3. Aspirar el PBS, utilizado para el lavado de las células, utilizando una pipeta pasteur esteril y una bomba de vacío

4. Se agrega 1 mL de tripsina con una pipeta serológica.
5. Se deja incubando las células con la tripsina por 1 min a 37 °C, posterior a ese tiempo observar las células al microscopio.
6. Se agregan 3 mL de medio de cultivo para inactivar la tripsina, con mucho cuidado con una micropipeta se homogenizan las células con el medio.
7. Recolectar medio con las células en un tubo de 50 mL
8. Centrifugar las células a 1200 rpm x 3 min.
9. Decantar medio y agregar 1 mL de medio DMEM suplementado, con cuidado homogenizar
10. En un tubo eppendorf agregar 20 µL de las células y 20 uL de azul de tripán
11. En la cámara de Neubauer se agregan 10 µL de la mezcla células/azul de tripán
12. Para el conteo de células se procede a contar las células por cuadrantes bajo un microscopio



La concentración celular se calcula de la siguiente manera

$$\text{Concentración celular} = \text{células contadas} / \text{cuadrantes contados} \times 10000$$

Nota: se si realizó una dilución, multiplicar por el factor de dilución.

12. Componentes mezcla de reacción para retrotranscripción.

Master mix

Reactivo	Cantidad	
	X1	X17
5x reaction buffer	4 μL	68 μL
Ribolock RNase	1 μL	17 μL
10 mM dNTP mix	2 μL	34 μL
Revert Aid RT	1 μL	17 μL
Oligo dT	1 μL	17 μL
cDNA (1000 ng)		
H ₂ O	Completar	
Volumen final	20 μL	170 μL

13. Componentes para reacción de PCR en tiempo real

Reactivo	Cantidad	
	X1	X47
Taq polimerasa	5 μL	235 μL
Primer Fw (10 μM)	1 μL	47 μL
Primer Rv (10 μM)	1 μL	47 μL
cDNA (100 ng)	5 μL (solo para 3 pozos)	
H ₂ O	3 μL	141 μL
Volumen final	15 μL	170 μL

Se realizaron diluciones para cDNA para tomar 5 μL con 100 ng de muestra.



LA PARASPORINA A24-2 INDUCE APOPTOSIS E INHIBE LA CAPACIDAD FORMADORA DE COLONIAS EN LA LÍNEA CELULAR MCF-7.

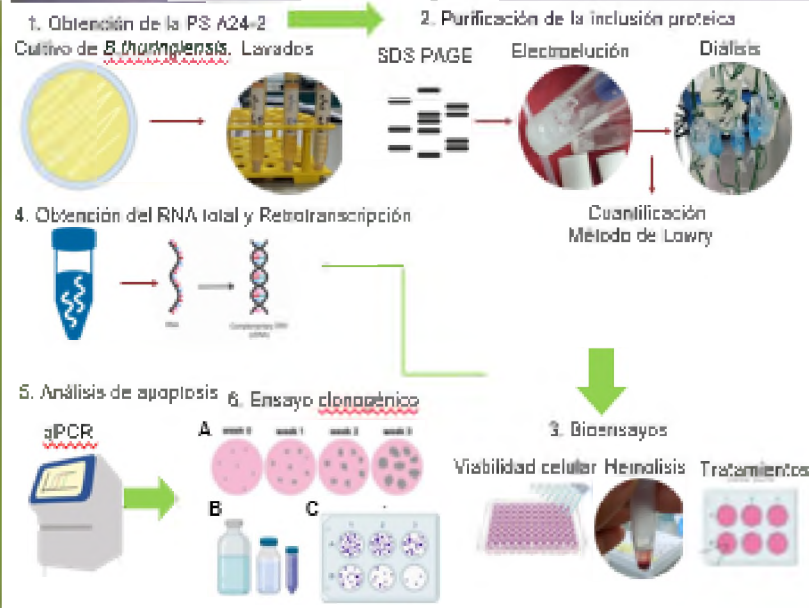
Brittanni Suguey Tapia Hernández¹; Danilo Cruz García¹; Alain Cruz-Nolasco²; Miguel Ángel Peña-Rico³; Karín Navarro-Martínez¹; Luz Gamacho⁴
¹msapeña@unpa.edu.mx
¹Centro de Investigaciones Científicas, Instituto de Biotecnología, Universidad del Papaloapan, Circuito Central 200, Col. Parque Industrial, Tuxtpec, 68301, Oaxaca, México.
²División de estudios de Posgrado, Universidad del Papaloapan, Circuito central 200, Parque industrial, 68301 Tuxtpec, Oaxaca, Mexico.
³Laboratorio de Nutrición Experimental, Instituto Nacional de Pediatría, Ciudad de México



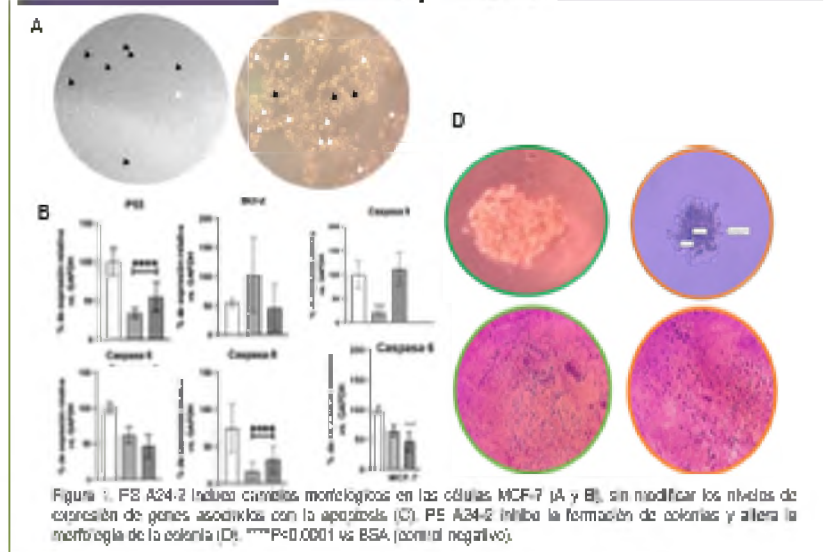
Introducción

El cáncer de mama es la principal causa de muerte por cáncer en mujeres en México y el resto del mundo (1). *B. thuringiensis* es una alternativa para el desarrollo de nuevas terapias antineoplásicas. Esta bacteria produce un cristal parasporal, constituido por las proteínas conocidas como parasporinas (PS), que tienen citotoxicidad selectiva sobre las células cancerosas (2). El grupo de trabajo demostró que la PS A24-2 posee citotoxicidad contra células MCF-7. Sin embargo, se desconoce si la PS A24-2 activa la apoptosis, en dicha línea celular. Por otro lado, un agente anticancerígeno, debería tener la propiedad de inhibir la capacidad de migración celular y la formación de nuevo tumor. Ambas características son responsables de la metástasis. La metástasis es el causal de la muerte de los pacientes con cáncer (3). El éxito de un tratamiento depende de generar compuestos que inhiban estas dos propiedades de las células neoplásicas. Este trabajo evaluó capacidad de la PS A24-2 para inhibir la formación de tumores, así como la apoptosis, en la línea celular MCF-7.

Metodología.



Resultados y discusión.



Agradecimientos

Al proyecto CONAHCYT # 3213009, quien financia este proyecto.

Conclusiones

La PS A24-2 conduce a cambios morfológicos asociadas a la apoptosis, sin afectar, los niveles de expresión de los genes apoptóticos. Además de inhibir la formación de tumores al alterar la morfología de estos.

Referencias

- a) OMG, 2023
- b) Bano, D. E., Castiello-Arroyo, M., Cruz-Nolasco, A., Peña-Rico, M., Suguey, M. K., Santos, R. C., Luna-Silva, D. E., Gonzalez-Perez, Luz Gamacho & Navarro-Ma, A. K. (2023). Parasporin A24-2 of *Bacillus thuringiensis* isolates from the Papaloapan River basin induce a crystal allelic *Ch* in apoptosis against breast cancer cells. *Toxins* (17), 476.
- c) Liu, D., Li, Y., Li, X., & Sun, Z. (2018). Algenin inhibits proliferation, migration and invasion and induces apoptosis by blocking the Ras signaling pathway in human breast cancer cells. *Molecular Medicine Reports*, 18(4), 3093-3110.