

**UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN**  
CAMPUS TUXTEPEC

**INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

---

**Capacidad de inhibición en la migración de la línea celular  
cancerígena MCF-7 de la parasporina AX-2**

**TESIS**

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**Ingeniera en biotecnología**

**PRESENTA:**

**SIBEL DE JESUS ESTRADA ESCOBEDO**

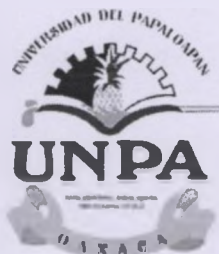
**DIRECTOR**

**DRA. ANA KARIN NAVARRO MARTINEZ**

**CO-DIRECTOR**

**DRA. LUZ DEL CARMEN CAMACHO CASTILLO**

**SAN JUAN BAUTISTA TUXTEPEC, OAXACA      2024**



# UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

## CAMPUS TUXTEPEC

### INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

#### ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la ciudad de San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, el día 23 de febrero de 2023 a las 12:00 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 "**Capacidad de inhibición en la migración de la línea celular cancerígena MCF-7 de la parasporina AX-2**" presentada por la alumna **Sibel de Jesús Estrada Escobedo**, con número de matrícula 17090049, 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 23 de febrero de 2023.

ATENTAMENTE  
LA COMISIÓN REVISORA

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

**Dr. Óscar Abelardo Ramírez Marroquín**  
Profesor Investigador Titular "A"  
Universidad del Papaloapan  
Revisor de Tesis

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

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

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



**UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN**  
CAMPUS TUXTEPEC

**INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

Tuxtepec, Oaxaca, a 19 de marzo de 2024  
Oficio No. JCIB/008/03/202024

**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 **Sibel de Jesús Estrada Escobedo**, con número de matrícula 17090049, con título definitivo "Capacidad de inhibición en la migración de la línea celular cancerígena MCF-7 de la parasporina AX-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.

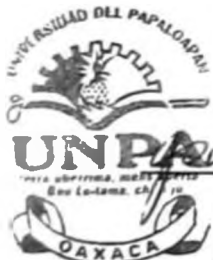
El Jurado de Examen Profesional estará compuesto por los siguientes profesores:

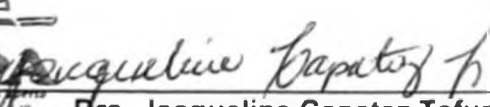
- Dr. Óscar Abelardo Ramírez Marroquin (Presidente, Universidad del Papaloapan)
- Dra. Angelica Sofía Martínez Ramírez (Secretario, Universidad del Papaloapan)
- Dr. Miguel Ángel Peña Rico (Vocal, Universidad del Papaloapan)
- Dr. Paul Mauricio Sánchez Ocampo (Primer Suplente, Universidad del Papaloapan)
- Dr. Enrique Villalobos Amador (Segundo Suplente, Universidad del Papaloapan)

Sin más por el momento le envío un cordial saludo.


**Atentamente**

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



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

JEFATURA DE INGENIERÍA  
EN BIOTECNOLOGÍA  
CAMPUS TUXTEPEC

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



c c p Dra. Ana Karín Navarro Martínez, Director de tesis, Para su conocimiento  
c c p Sibel de Jesús Estrada Escobedo, 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](http://www.unpa.edu.mx)

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

### **Hoja de originalidad**

El presente trabajo nombrado Capacidad de inhibición en la migración de la línea celular cancerígena MCF-7 de la parasporina AX-2, no ha sido aceptado o empleado para otorgamiento del título o grado diferente o adicional al actual. Esta tesis es el resultado de mis investigaciones, excepto donde se referencia a las fuentes de información consultadas. Otorgo mi 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 la Dra. Ana Karin Navarro Martínez por su orientación académica. Apoyo continuo y por ser más que una guía académica. Su experiencia y dedicación fueron un gran soporte para la realización de este trabajo de investigación.

Al equipo de trabajo y compañeros, por su apoyo en todo momento, Dr. Miguel A. Peña Rico, Mt. Alain Cruz Nolasco y Luisa Sevilla, les agradezco por la ayuda y consejos durante mi estadía en el laboratorio.

A mis tías, María del S. Estrada Cabrera y Avelina Cabrera Campos por darme consejos sabios, mucho cariño en todos estos años y apoyarme en mis decisiones, siempre estaré agradecida con ustedes.

Para mi tío Max, le agradezco sus buenos consejos y apoyo incondicional en todo este trayecto, de todo corazón muchas gracias.

A mis hermanos Joaquín y Moisés Estrada Escobedo por siempre estar presentes en los buenos y malos momentos y por apoyarme. No los defraudaré... los quiero mucho hermanos míos.

A mi compañero, amigo y novio Angel Ortela Gregorio, por apoyarme, guíame, estar presente en todo momento, formar parte de mi vida...gracias cariño mío, te amo.

A mis amigos por estar presentes en cada acontecimiento, por darme fortaleza y energía.

Para aquellas personas que estuvieron presentes a lo largo de este recorrido y ya no están...gracias por haber sido parte de mi vida.

A CONAHCYT por el financiamiento dado para la investigación del proyecto No. 321009.

## **Dedicatoria**

Para mis dos grandes ángeles, mi madre y mi abuela; siempre están presentes en los momentos difíciles y felices, sé que en algún momento nos volveremos a encontrar...

# I. Índice

1.Introducción .....	14
2. Antecedentes .....	16
2.1. Cáncer.....	17
2.1.1 Cáncer de mama.....	19
2.1.2. Tratamientos contra el cáncer de mama. ....	20
2.1.3. Parasporinas contra el cáncer de mama. ....	21
2.2 Metástasis. ....	21
2.2.1 Movilidad celular.....	25
2.2.2 Prueba de herida.....	25
3.Justificación .....	27
4.Hipótesis.....	28
5.Objetivos .....	29
6.Diagrama experimental.....	30
7.Materiales y métodos .....	31
7.1. Producción y purificación de la parasporina.....	31
7.2 Determinación de la citotoxicidad <i>in vitro</i> de las parasporinas. ....	32
7.2.1. Líneas celulares. ....	32
7.2.2. Condiciones de cultivo. ....	33
7.2.3. Determinación de la citotoxicidad de las PS empleando el ensayo de MTT.....	34
7.2.4. Ensayo de hemólisis .....	35
7.2.5. Análisis morfológico. ....	36
7.2.6. Determinación de la migración celular. ....	36
7.2.7. Análisis estadístico .....	37
8.Resultados y discusión .....	38
8.1. Producción y selección de la parasporina .....	38

8.2. Purificación de la proteína dializada .....	39
8.3. Ensayo MTT sobre la línea celular de cáncer de mama MCF-7.....	40
8.4. Ensayo de hemolisis para evaluar la actividad de la parasporina AX-2. ....	42
8.5. Estandarización de la técnica de herida.....	43
8.6. Ensayos de la técnica de herida en células tratadas con AX-2.....	49
9.Conclusiones .....	56
10. Referencias.....	57

## II. Índice de Figuras

Figura 1. <i>B. thuringiensis</i> en fase estacionaria visto en microscopio de contraste .....	15
Figura 2. Estadísticas sobre la tasa de defunciones por tumores malignos.....	18
Figura 3. Anatomía dela glándula mamaria femenina .....	19
Figura 4. Cascada metastásica. ....	24
Figura 5. Diagrama experimental.....	30
Figura 6. Línea celular MCF-7 .....	33
Figura 7: Reacción química de la prueba de MTT para la evaluación de citotoxicidad en el cultivo celular.....	34
Figura 8. SDS-PAGE al 8% de la cepa AX-2 .....	38
Figura 9,10. Ensayo de MTT de la proteína AX-2 contra las células MCF-7 .....	41
Figura 11. Ensayo de hemólisis con la parasporina AX-2 en eritrocitos humanos.....	42
Figura 12. Micrografías con medio RPMI basal en un periodo de 0 a 72 h a 4X y 10X. ....	44
Figura 13. Micrografías con medio RPMI al 1% de SFB en un periodo de 0 a 72 h a 4X y 10X. ....	45
Figura 14. Micrografías con medio DMEM basal en un periodo de 0 a 72 h a 4X y 10X. ....	46
Figura 15. Micrografías con medio DMEM al 1% de SFB en un periodo de 0 a 72 h a 4X y 10X. ....	47
Figura 16. Gráficos de la estandarización de la técnica de heridade 0 a 72 h .....	48
Figura 17. Control positivo con Doxorubicina en medio RPMI al 1% SFB de 0 a 72 h. ....	49
Figura 18. Micrografías del control negativo con PBS en medio RPMI al 1% de SFB de 0 a 72 h. ....	51
Figura 19. Micrografías con tratamiento de la proteína AX-2 a una concentración de 22.10 µg/mL con medio RPMI 1% de SFB de 0 a 72 h. ....	52
Figura 20. Micrografías con tratamiento de la proteína AX-2 con una concentración de 17.68 µg/mL con medio RPMI 1% de SFB de 0 a 72 h.....	53
Figura 21. Gráfico de la técnica de herida estandarizada de 0 a 72 h .....	54
Tabla 1- Formulación de los componentes del medio agar nutritivo.....	31

### III. Índice de Tablas

Tabla 1- Formulación de los componentes del medio agar nutritivo.....	31
---	----

## IV. Abreviaturas

**DMEM** - Dulbecco Modified Eagle Medium.

**DMSO** – Dimetilsulfóxido.

**HCl** - Ácido Clorhídrico.

**HepG2** – Línea celular de cáncer hepático.

**MCF-7** – Michigan Cancer Foundation- 7, línea celular de cáncer de mama.

**MDA MB 231** – Línea celular de cáncer de mama.

**MTT** - 3-(4,5) dimetiltiazolil -2,5 difeniltetrazolio.

**NaOH** - Hidróxido de Sodio.

**OMS** - Organización Mundial de la Salud.

**PBS** - Buffer de Fosfatos Salinos.

**PS** – Parasporina.

**RPM** – Revoluciones por minuto.

**SDS** - Dodecil Sulfato de Sodio.

**SDS - PAGE**- Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico.

**SFB**-Suero Fetal Bovino

## RESUMEN

El cáncer es la segunda causa de muerte a nivel mundial siendo el cáncer de mama el de mayor incidencia en 2020, superando al cáncer de pulmón, con 2.3 millones de nuevos casos (OMS). En los tratamientos actuales para combatir esta enfermedad se administran fármacos que pueden tener efectos secundarios y llegan a dañar células sanas. La metástasis es la fase final del cáncer que inevitablemente lleva a la muerte de los pacientes. Dicho proceso se desarrolla a través de pasos secuenciales cuyo resultado final es la dispersión de células de tipo canceroso, desde el tumor primario a tejidos adyacentes. Es por ello, que diversos grupos de investigación han fincado su esfuerzo en la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas que inhiban alguno o todos los eventos relacionados con la cascada metastásica y la proliferación de las células cancerosas. En este sentido, la migración celular ha sido uno de los puntos centrales a atacar en el cáncer, ya que, si la célula se queda confinada en el tumor primario, el cáncer queda localizado, facilitando así su tratamiento. Es por lo que ha surgido la necesidad de buscar nuevas alternativas de tratamientos que no generen tantos efectos secundarios como son las parasporinas (PS). Las PS son cristales proteicos producidos durante la etapa de esporulación por *Bacillus thuringiensis*, una bacteria entomopatógena, Gram positiva y que tiene forma de bastoncillo. De acuerdo con la literatura, las parasporinas se les ha encontrado citotoxicidad contra líneas celulares cancerosas y con bajo o nulo efecto hacia células sanas. Se han reportado dos PS's con efecto citotóxico contra líneas celulares de cáncer de mama (MCF-7 Y MDA MB 231) y nula actividad contra células sanas. Por lo tanto, en el presente trabajo se estudió la inhibición de la migración celular provocada por la parasporina AX-2 con la línea celular de cáncer de mama MCF-7. Para ello se estandarizó la técnica de cierre de la herida en la línea celular MCF-7, las condiciones en medio RPMI al 1 % de SFB, con aumentos de 4X y 10X para las micrografías e incubadas a 5% de CO<sub>2</sub> por 72 h a 37 °C. La proteína AX-2 no tuvo actividad hemolítica significativa con concentraciones de 1.25, 2.5, 5 y 7.5 µg/mL.

## ABSTRACT

Cancer is the second leading cause of death worldwide, with breast cancer being the most commonly diagnosed type in 2020, surpassing lung cancer, with 2.3 million new cases (WHO). Current cancer treatments involve administration of drugs that can cause side effects and harm healthy cells. Metastasis is the final stage of cancer and inevitably leads to death. This process unfolds through sequential steps resulting in the spread of cancerous cells from the primary tumor to adjacent tissues. As a result, various research groups have focused their efforts on finding new therapeutic strategies to inhibit one or all events related to the metastatic cascade. Cell migration is a critical target in cancer research because confining cancer cells to the primary tumor site can facilitate treatment. Therefore, there is a growing need to explore new treatment alternatives that minimize side effects and do not harm healthy cells, such as parasporins (PS). PS are protein crystals produced during sporulation by *Bacillus thuringiensis*, a gram-positive entomopathogenic bacterium with a rod-like shape. According to the literature, parasporins exhibit cytotoxicity against cancer cell lines, with having little to no effect on healthy cells. Two PS variants have been reported to have cytotoxic effects against breast cancer cell lines (MCF-7 and MDA MB 231) but no activity against healthy cells. Therefore, this study aimed to investigate the inhibition of cell migration induced by parasporins in the breast cancer cell line MCF-7. Therefore, the present study investigated the inhibition of cell migration induced by parasporin AX-2 using the MCF-7 breast cancer cell line. To achieve this, the wound closure technique was standardized in the MCF-7 cell line under conditions of RPMI medium with 1% FBS, with magnifications of 4X and 10X for micrographs, and incubated at 5% CO<sub>2</sub> for 72 hours at 37°C. Protein AX-2 showed no significant hemolytic activity at concentrations of 1.25, 2.5, 5, and 7.5 µg/mL.

## 1.Introducción

*Bacillus thuringiensis* (*B. thuringiensis*) es una bacteria entomopatógena grampositiva que tiene forma de bastoncillo y que produce proteínas cristalinas paraesporales durante la esporulación (Figura 1) (Sajid *et al.*,2018). Pertenece a la familia *Bacillaceae* y se sitúa dentro del grupo 1 del género *Bacillus*. Es decir; forma parte del grupo de *Bacillus cereus*, el que incluye a *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. mycooides*, *B. pseudomycooides* y *B. weihenstephanensis*. (Sauka *et al.*, 2008).

Los cristales paraesporales de interés son un rasgo fenotípico característico de *B. thuringiensis* dado que llega a diferenciarlos de otros tipos de *Bacillus* y se encuentran formados por  $\delta$ -endotoxinas las cuales están divididas en dos grupos: toxinas Cyt (Cytolytic) y Cry (Crystal) (Vilas-Bôas *et al.*, 2007). Las proteínas Cry exhiben toxicidad *in vivo* contra dípteros, particularmente mosquitos y moscas negras, por lo que el principal uso de *B. thuringiensis* es como bioinsecticida (Butko,2003). Sin embargo, se exploraron otras áreas de aplicación de las proteínas Cry y se descubrieron cepas cuya función no es insecticida. Se probó la forma activa de la proteína contra líneas de células cancerosas, como HeLa y las células de leucemia promielocítica; además en células normales, En dichos experimentos se observó toxicidad sobre las células cancerosas, pero no se observó toxicidad con células normales. (Akiba & Okomura,2016). A estas proteínas se les denominó Parasporinas (PS), y se han clasificado con base en la homología entre sus secuencias proteicas primarias. Estas secuencias indicaron que, estructuralmente tienen semejanzas con las toxinas Cry de las familias Cry-3d, MTX y Bin (Krishnan, 2013).

Cruz-Nolasco en 2017 reportó dos parasporinas, de *B. thuringiensis* AX y A34 aisladas en la región del Papaloapan (Cruz-Nolasco,2014). Estas parasporinas presentaron actividad antiproliferativa contra líneas celulares de cáncer como MCF-7 y MDA MB 231. Es por ello que nuestro objetivo fue determinar la inhibición en la migración de la línea celular MCF-7 en presencia de la parasporina AX-2.



Figura 1. *B. thuringiensis* en fase estacionaria de crecimiento visto en microscopio de contraste (Flores *et al.*, 2010).

## 2. Antecedentes

Las parasporinas (PS) son cristales parasporales producido por *B. thuringiensis*, constituidos por protoxinas. Estas protoxinas para poder tener el efecto tóxico deben ser solubilizadas en PH alcalinos o ácidos y posteriormente ser digeridas por serín proteasas, como la proteinasa K o la tripsina. Esta característica de las PS sobre su toxicidad ha sido probada mediante ensayos in vitro (electroforesis SDS-PAGE) y la secuenciación aminoacídica donde se resalta la masa relativa de esta protoxina y de las toxinas (Mizuki et al., 2000).

Actualmente se han identificado 19 PS (Okumura et al., 2010). Las cuales se han clasificado en seis familias de parasporinas (PS1- PS6) esto de acuerdo con el Comité de Clasificación y Nomenclatura de Parasporinas (Yasutake et al.,2006). De acuerdo con el dendograma con secuencias PS reportadas en GenBank, se agrupan de acuerdo con la homología entre las PS y su identidad entre las secuencias de aminoácidos de cada parasporina (Velásquez et al.,2018).

En la actualidad, se desconoce con exactitud el o los mecanismos de acción de las parasporinas, solamente se tienen especulaciones con respecto a ello. Las investigaciones reportadas sugieren que cada PS tiene un mecanismo particular para inducir así, la muerte selectiva de las células cancerígenas blanco (Krishnan, 2013). En referencia con los estudios de los receptores de membrana para las PS, se infiere que al igual que en las proteínas Cry insecticidas, debe existir una interacción particular de cada PS con el receptor para darle la especificidad característica hacia las células blanco (Piggot et al.,2007).

Los mecanismos más reconocidos para explicar la acción anticancerígena que provocan las PS son la apoptosis y necrosis. Las células cancerosas tienen mecanismos de evasión de la apoptosis, y la evolución del cáncer favorece la selección de las células por su alta actividad proliferativa y capacidad de supervivencia (Ryan,2011). La apoptosis es un tipo de muerte celular, también conocido como muerte celular programada en la que conduce a la célula con una serie de procesos y estímulos a su muerte, el cuerpo utiliza este proceso para eliminar células anormales (NIH,2024). La necrosis es la destrucción de la membrana citoplasmática con la formación de poros. Esto se da con la unión de la molécula a un

receptor específico donde se oligomeriza e inserta la toxina para la formación de poros causando así un desequilibrio osmótico celular (Fernández et al.,2019).

## **2.1. Cáncer**

El cáncer es considerado la segunda causa de muerte a nivel mundial debido a que existen más de 200 diferentes tipos. Esta enfermedad se caracteriza por el desorden y el aceleramiento del crecimiento de células anormales provocando formación de agregados que crecen dañando tejidos vecinos, se nutren del organismo y alteran su fisiología. (Bustamante et al.,2012).

Las células normales tienen un proceso por el cual se transforman en cancerosas y es denominado carcinogénesis. La comprensión de este proceso se logró principalmente por el desarrollo de técnicas de estudio genético. Con ellas se estableció que la transformación progresiva de células normales a células altamente malignas se originaba por alteraciones en el material genético, es decir por mutaciones (Mitrus et al., 2012). Las mutaciones confieren a una célula la capacidad de dividirse a una tasa mayor que su cohorte y generar una descendencia que conserva esta mutación (clones). Posteriormente, las células hijas acumulan subsecuentes y diversas mutaciones que permiten generar distintos clones que presentan mayores capacidades de sobrevivencia y de crecimiento. Estas ventajas proliferativas, respecto a su contraparte normal permite generar un clon neoplásico persistente (Sánchez,2013).

Existen 2 tipos básicos de mutaciones genéticas que transforman las células sanas en cancerosas. El primer tipo, es la causa más frecuente, que son: mutaciones adquiridas que producen daño en los genes en una célula en un punto durante la vida de la persona. Es denominado cáncer esporádico y este tipo de mutación no se encuentran en cada célula del cuerpo y no se transmiten de padres a hijos. Los factores que causan estas mutaciones incluyen el tabaco, la radiación (UV), los virus y la edad. El segundo tipo son las mutaciones en la línea germinal, son menos frecuentes en donde una mutación de la línea germinal se produce en los espermatozoides y/u óvulos. Por lo que, se transmite directamente de padres a hijos al momento de la concepción, y a medida que el embrión crece y se desarrolla

el bebé. Las células del sistema inmune normalmente son capaces de eliminar a estas células tumorales en un proceso denominado inmunovigilancia tumoral. Sin embargo, algunos de estos clones pueden adquirir nuevas capacidades que le permiten evadir estos mecanismos de control y se desarrolla una neoplasia (Vesely et al.,2011; Valent et al.,2012).

A nivel mundial, en 2020 en las estadísticas de la Organización mundial de Salud se registraron casi 10 millones de muertes por cáncer. Los tipos de cáncer más comunes son el pulmonar (1.8 millones defunciones), colorrectal (916,000 de muertes), hepático (830,000 defunciones), gástrico (769,000 de muertes) y de mama (685,000 defunciones) (OMS,2022).

En México, entre enero y agosto de 2020 se registraron 683 823 defunciones, de las cuales 9% se deben a tumores malignos (60 421). Un año antes, en 2019, se registraron 747 784 defunciones, de las cuales 12% se deben a tumores malignos (88 683) (Figura 2). La distribución porcentual por sexo indica que hay más fallecimientos en mujeres (51%) que en los hombres (49%) por esta causa (INEGI,2021).

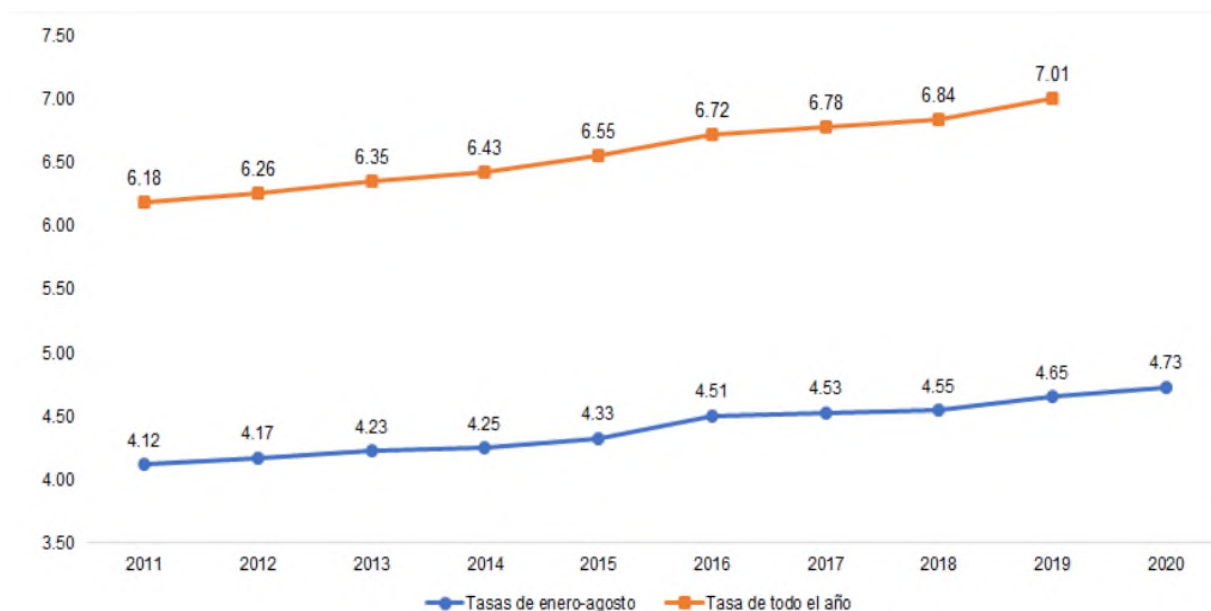


Figura 2. Estadísticas sobre la tasa de defunciones por tumores malignos por cada 10 000 habitantes en enero-agosto (2011-2020) y cierre del año (2011-2019). Fuente: INEGI.

El cáncer puede desarrollarse a cualquier edad, sin embargo, existen algunos tipos de ellos que tienen mayor incidencia conforme se incrementa la edad de las personas. La frecuencia de los tumores malignos de acuerdo con la población menor a 20 años son neuroblastoma, cáncer de hueso y algunos tipos de leucemia (NCI,2015). Con datos de 2017, se observa que las tasas de morbilidad para los principales tipos de cáncer, de manera general, tienen su valor más alto a partir de los 60 años. La tasa de morbilidad más alta en los hombres se observa en el grupo de 75 a 79 años para los que padecen cáncer de órganos genitales. Para las mujeres, la tasa más alta se ubica en el grupo de 60 a 64 años y es por cáncer de mama. (INEGI,2020).

### 2.1.1 Cáncer de mama

El cáncer de mama es originado en las células de revestimiento de los conductos mamarios, es decir el epitelio de los conductos o lóbulos del tejido glandular de los senos (Figura 3). Al principio el tumor canceroso está confinado en el conducto o lóbulo (*in situ*), donde generalmente no se presentan síntomas y tiene un mínimo potencial de diseminación (metástasis) (Riggio et al., 2021). El pasar del tiempo, el cáncer *in situ* (estadio 0) puede progresar e invadir el tejido mamario circundante (cáncer de mama invasivo) y propagarse a los ganglios linfáticos cercanos (metástasis regional) o llegar a otros órganos (metástasis distante). Cuando una mujer muere de cáncer de mama, es como consecuencia de la metástasis generalizada (OMS,2021).

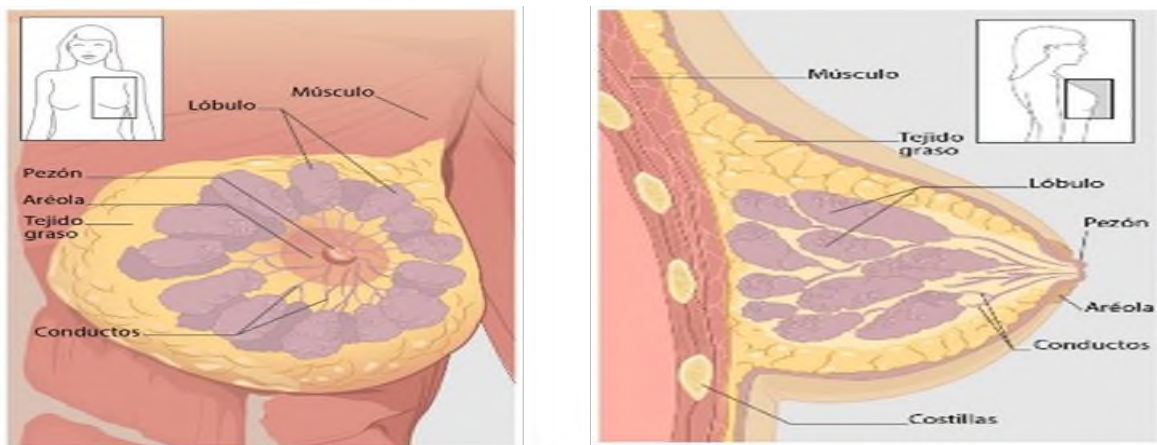


Figura 3. Anatomía de mama femenina. Fuente: CDC - [www.cdc.gov](http://www.cdc.gov)

Los genes mejor conocidos presentes en el cáncer de seno son BRCA1 y BRCA2 (del inglés: BReast CAncer genes 1 y 2). Se sabe que todos tenemos estos genes, pero existen algunas personas que han heredado una forma mutada de uno o ambos. El tener una mutación en los genes BRCA aumenta el riesgo de tener cáncer de seno y de ovario (Komen,2015).

Se han identificado cuatro subtipos moleculares de cáncer de mama: **1)** Luminal A, **2)** Luminal B, **3)** HER2 y **4)** tipo basal. La aplicación de perfiles de expresión génica es la mejor forma de clasificar los carcinomas de mama (Medina,2017). Se ha observado que los marcadores que expresan los distintos cánceres mamarios, son los receptores de estrógeno (E), progesterona (Pr) y factor de crecimiento epidérmico humano (proteína HER2 o c-erbB-2). Eventualmente, el EGFR (ErbB-1) y citoqueratinas (CK) 5/6, también y se obtienen con pruebas inmunohistoquímicas (IHQ) simples.

### **2.1.2. Tratamientos contra el cáncer de mama**

Existe varias maneras de tratar el cáncer de mama y esto dependerá del tipo y su grado de diseminación. Las personas con cáncer de mama a menudo reciben más de un tipo de tratamiento, los cuales pueden ser cirugía, quimioterapia, terapia hormonal, terapia biológica y radioterapia (CDC,2021). Los quimioterapéuticos son fármacos citotóxicos que actúan matando a las células cancerosas cuando empiezan a dividirse (CIM,2016). Algunos ejemplos de estos fármacos son: Taxano, Docetaxel y el Paclitaxel. Los antimetabolitos destruyen las células cancerosas actuando como bloques de construcción falsos en los genes de una célula cancerosa provocando que muera (CIM,2016). Algunos fármacos antimetabolitos son: Metotexano y Capecitabina. La Ciclofosfamida es un agente alquilante y la Doxurubicina, Epirubicina son Antraciclinas (Secretaria de Salud del Distrito Federal, 2014). La terapia hormonal puede detener el crecimiento de los cánceres que son sensibles a las hormonas (Diario oficial de la federación,2011). Algunos fármacos son: Acetato de Goserelina (agonista de LHRH); Letrozol (Inhibidor de la aromatasa); FULVESTRANT (bloqueador de los receptores de estrógeno) y TAMOXIFENO (modulador selectivo de los receptores de estrógeno) (CIM,2016). Las terapias biológicas son diseñadas y elaboradas para interferir con moléculas importantes para conservar el estado neoplásico o que son

expresadas selectivamente por las células tumorales (CDC,2021). Algunos ejemplos son: Trastuzumab (anticuerpo-monoclonal); y Pertuzumab (anticuerpo monoclonal) (CIM,2016).

Las desventajas de los tratamientos contra el cáncer es que pueden tener muchos efectos adversos, uno de estos efectos ocurre cuando el tratamiento daña las células no cancerosas. Dichos efectos secundarios pueden ser diferentes en cada persona y varios, según los distintos medicamentos y tratamientos (CDC,2021). Algunos efectos en común de los diversos tipos de tratamientos son: fatiga, lesión de corazón, lesión pulmonar, deterioro cognitivo con irradiación cerebral entre otros (CIM,2016).

### **2.1.3. Parasporinas contra el cáncer de mama**

Cruz-Nolasco (2017) obtuvo cuatro PS (AX-1, AX-2, A34-1 y A34-2) de *B. thuringiensis* aisladas en la región de la cuenca del Papaloapan. Las cepas se obtuvieron de diferentes tipos de cultivos e identificados por el grupo de investigación en la Universidad del Papaloapan. Dichas PS presentaron actividad antiproliferativa contra las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB 231. La parasporina AX-2 tiene una IC<sub>50</sub> de 3.9 µg/mL para MCF-7 y de 24 µg/mL para MDA-MB 231 (Cruz-Nolasco,2017).

Previo a este reporte, Sabiá Junior, (2015) reportó dos proteínas de la cepa S1338 de *B. thuringiensis* que mostraron toxicidad en líneas celulares MCF-7 con una IC<sub>50</sub> de 14.75 µg.

## **2.2 Metástasis**

La enfermedad metastásica es una de las principales causas de muerte de los pacientes con cáncer (Riggio et al., 2021). La metástasis es un proceso complejo, que se desarrolla a través de pasos secuenciales cuyo resultado final es la dispersión de células de tipo canceroso, desde el tumor primario a tejidos adyacentes. Los pasos son: 1) la célula cancerosa se desprende del tumor primario e invasión del o los tejidos adyacentes; 2) entrada en los vasos sanguíneos (intravasación); 3) Supervivencia en la circulación (supervivencia y crecimiento independientes del anclaje); 4) salida del sistema circulatorio en los sitios metastásicos (extravasación); y colonización y proliferación en el nuevo entorno formando

un nuevo tumor metastásico. La migración de las células tumorales es una etapa importante en la metástasis (Klein, 2009).

La metástasis puede suceder de *novo*, es decir, está presente en primera instancia en el diagnóstico original o manifestándose después del tratamiento definitivo (Siegel et al.,2020). Las células cancerosas que se desprenden físicamente de una fuente primaria y colonizan órganos distantes se les conoce como células tumorales diseminadas (CDT) (Klein,2009). Cuando las CDT pasan de un cáncer localizado a un cáncer sistémico se le denomina cascada metastásica (Talmadge et al., 2010). El primer paso de la cascada metastásica sucede cuando las células adquieren la capacidad de escapar del tumor primario, dicha capacidad se refiere a la adquisición de un fenotipo maligno por parte de la célula tumoral (figura 4). Luego estas células pasan a través de la membrana basal, penetran en la matriz extracelular y se intravasan hacia la circulación (Spano et al., 2012). El modelo lineal es determinado la progresión natural del cáncer, la correlación del tamaño del tumor y el riesgo de recaída. Por lo tanto, las células cancerosas completamente malignas son las que pueden separarse de la fuente primaria y dar lugar a metástasis mortales (Riggio et al., 2021). El modelo paralelo menciona que la diseminación metastásica es un evento precoz debido a que las células cancerosas metastásicas se desprenden del tumor primario y se propagan a otras partes del cuerpo tempranamente sufriendo mutaciones independientes del tumor primario (Klein,2009). El modelo paralelo de diseminación de células cancerosas es un evento más común de lo esperado, aunque se necesitan más pruebas convincentes para aclarar el patrón de la propagación de las células tumorales (Greene & Sobin, 2008).

La metástasis es la fase final del cáncer que inevitablemente lleva a la muerte de los pacientes. Es por ello, que diversos grupos de investigación han fincado su esfuerzo en la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas que inhiban alguno o todos los eventos relacionados con la cascada metastásica. En este sentido, la migración celular ha sido uno de los puntos centrales a atacar en el cáncer, ya que, si la célula se queda confinada en el tumor primario, el cáncer quedaría localizado facilitando así su tratamiento. La migración de las células tumorales es un proceso complejo que incluye la participación de un conjunto

de moléculas quimioattractoras, además de la matriz extracelular y el microambiente celular (Condeelis et al., 2003).

En este sentido, los tratamientos para el cáncer sólido deben ir completando con principios activos que inhiban la capacidad de las células cancerosas para invadir la matriz extracelular y diseminarse a tejidos adyacentes. Debido a esto, surge la necesidad de descubrir o diseñar nuevos fármacos que no solo actúen sobre la proliferación celular, sino que además tenga la propiedad de dañar los mecanismos relacionados con la motilidad, migración y/o invasión y metástasis. El motivo primordial de esta búsqueda es la abrumadora estadística que indica que en la mayoría de los pacientes diagnosticados el cáncer ya está presente (fase 4 de la enfermedad) (Riggio et al., 2021).

Es posible vivir meses o años con ciertos tipos de cáncer e incluso después de detectar la metástasis, los principales tratamientos para la metástasis son los que afectan a todo el cuerpo e incluyen la terapia sistémica en los cuales está la quimioterapia y otros medicamentos como la terapia dirigida, la terapia hormonal e inmunoterapia. Mientras que los tratamientos para áreas con cáncer son denominados terapia local donde incluye cirugía, radioterapia (ASCO, 2019).

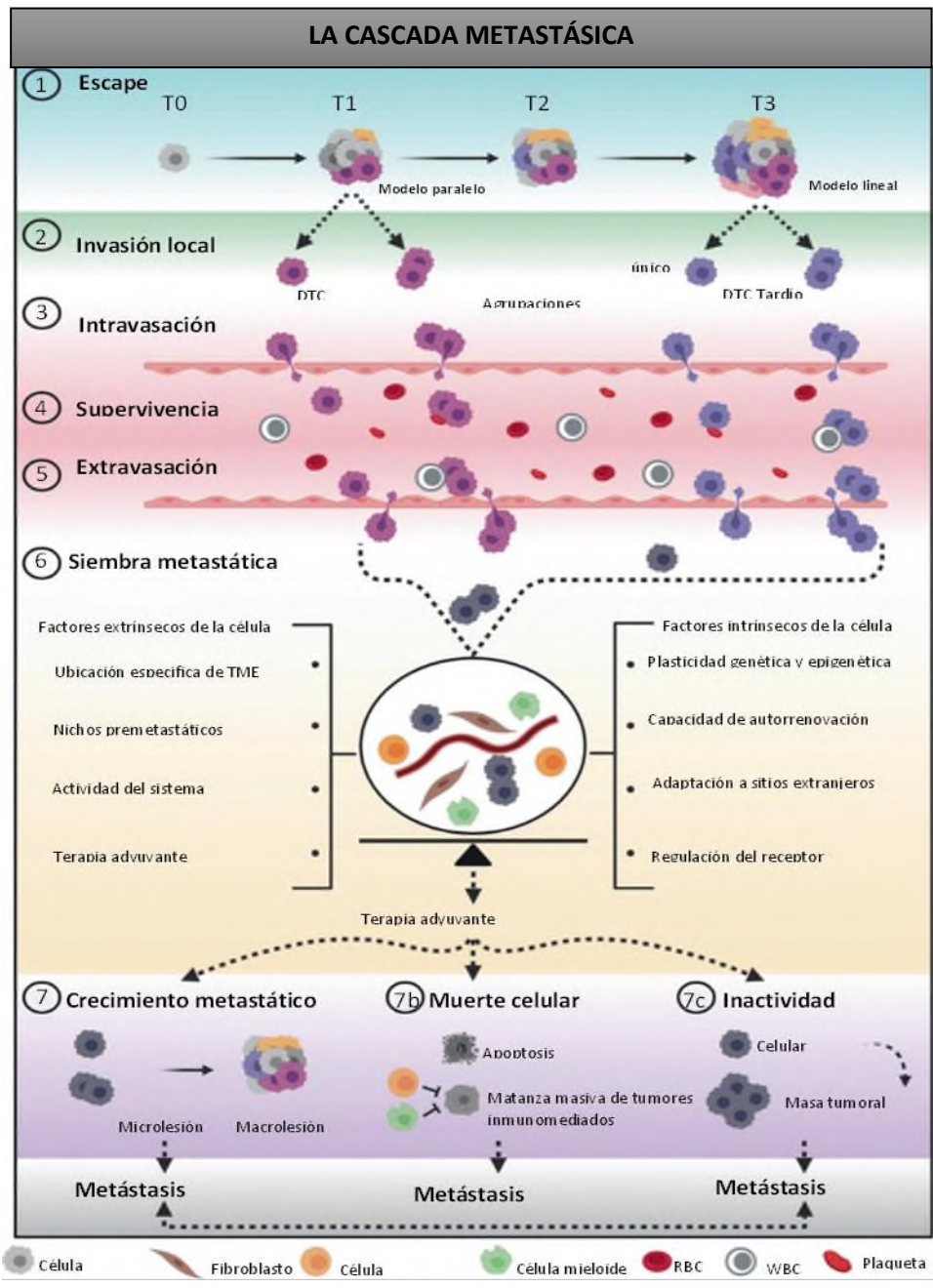


Figura 4. Cascada metastásica. Escape de DTC en las etapas tempranas (modelo paralelo) o tardías (modelo lineal) de la tumorigénesis en células individuales o agrupaciones. (Modificada de Riggio et al., 2021).

### **2.2.1 Movilidad celular**

La movilidad celular es el resultado de la coordinación de los movimientos generados por diferentes partes de la célula sana o cancerosa, su principal diferencia se encuentra en el movimiento ordenado y es esencial para diversas funciones como la migración de células en el desarrollo embrionario, reparación de tejidos, respuesta inmunitaria, el funcionamiento de órganos y sistemas (Gonzales et al.,2015).

En el caso de la migración de las células cancerígenas el paso inicial para la movilidad inicia cuando dichas células pierden su adhesión célula a célula y migra a través del tumor primario (Wolf et al.,2009). Para este proceso existen dos mecanismos: el mecánico en el cual la matriz extracelular se degrada a partir de la secreción de metaloproteinasas de matriz esto ayuda a la invasión de células cancerosas. Mientras que el segundo mecanismo es el corte de receptores de adhesión células-células como lo es NOTCH, efirinas o E-caderinas en la superficie celular (Mierke,2014)

### **2.2.2 Prueba de herida**

La migración es una propiedad importante de las células vivas, es fundamental para el desarrollo normal, para procesos patológicos, y para la respuesta inmunitaria como la metástasis de cáncer y la inflamación (Huertas,2013). Los ensayos de migración celular permiten conocer a profundidad los mecanismos de acción de los fármacos antineoplásico, evento que es de gran interés en la biomedicina, biología celular, biología del cáncer entre otras (Justus et al.,2014).

Una de las técnicas más utilizadas para poder observar la migración celular es la denominada “cierre de herida”. Este método ha sido eficaz para examinar la movilidad de células no cancerosas y de las cancerosas. La técnica se basa en la creación de una herida provocando la eliminación de una parte del crecimiento en monocapa de las células cancerosas. La migración se cuantifica contando el número de células que migran a la herida y midiendo la distancia recorrida desde el borde de la herida. Otra manera de hacerlo es mediante fotografías con un microscopio invertido en intervalos de tiempo y se cuantifica

la velocidad del cierre de herida y la migración celular (Van & Jessen, 2018; Justus et al., 2014).

El método de herida presenta varias ventajas (también conocido como ensayo de raspado): es de fácil desarrollo, de bajo costo, y es ampliamente utilizado en el área de investigación. Este método puede realizarse en placas de multipozo y las imágenes se adquieren con objetivos de poco aumento (4x y 10x) se puede obtener así un campo que cubra toda la herida permitiendo el enfoque de placas convencionales. Debido a que el movimiento de las células es hacia una dirección definida, lo que conduce al cierre de la herida, facilita el análisis de la velocidad de la migración (Justus et al., 2014). Una de las principales desventajas, cuando se realiza de manera manual (debido a que algunas veces se hace automatizado), es la forma y el ancho de las heridas, esto puede variar entre los mismos pocillos de un mismo ensayo (Kam et al., 2008).

### 3. Justificación

*B. thuringiensis* tiene propiedades particulares que son de importancia biotecnológica y en los cuales durante mucho tiempo estuvo involucrado en una sola área que fue control de entomopatógenos. Sin embargo, en las dos últimas décadas se ha observado que esta bacteria tiene una significativa actividad anticancerígena. La característica de citotoxicidad contra las células cancerígenas es debido a la producción de cristales proteicos de la bacteria que produce durante su etapa de esporulación y son llamados parasporinas.

El cáncer es una de las principales causas de mortalidad en México y en el mundo. Existen más de 200 tipos de los cuales el cáncer de mama es la segunda causa de muerte en las mujeres en México. Este padecimiento puede ser tratado en etapas iniciales mediante cirugía, pero no se puede garantizar que este no vuelva a resurgir, tampoco puede aplicarse este método si la enfermedad está avanzada y ha llegado a otras partes del cuerpo, es decir, cuando hay metástasis. Existen otros tratamientos como la quimioterapia y la radioterapia que son de gran ayuda, pero también afectan la calidad de vida de las personas que padecen esta enfermedad debido a sus numerosos efectos adversos. La comunidad científica está en constante análisis de nuevas formas para tratar el cáncer y reducir o eliminar por completo los efectos secundarios de los tratamientos. Es por ello que se han buscado nuevas alternativas como el uso de las proteínas parasporales producidas por *B. thuringiensis* debido a que produce una proteína que tiene actividad anticancerígena.

La metástasis inicia con la movilidad de las células cancerosas a partir de un tumor primario y finaliza con la migración hacia otros tejidos del cuerpo. No existen tratamientos que curen un cáncer en estado metastásico por lo que se busca tratamientos que eviten la movilidad celular.

Por lo tanto, en el presente trabajo se utilizó la parasporina AX-2 con actividad antiproliferativa contra MCF-7, para determinar su capacidad de inhibir la movilidad de dichas células cancerígenas y en consecuencia el proceso metastásico.

#### **4.Hipótesis**

La parasporina AX-2 inhibirá la migración en la línea celular cancerígena MCF-7.

## **5.Objetivos**

### **5.1 Objetivo general:**

Determinar la inhibición en la migración de la línea celular MCF-7 en presencia de la parasporina AX-2.

### **5.2 Objetivos Específicos:**

1. Obtener la dosis letal media de la parasporina AX-2 contra la línea MCF-7
2. Estandarizar la prueba de herida en la línea celular MCF-7
3. Obtener la capacidad de migración de la línea celular MCF-7 tratada con la parasporina AX-2

## 6. Diagrama experimental

El diagrama experimental que se siguió en el presente trabajo se presenta en la Figura 5.

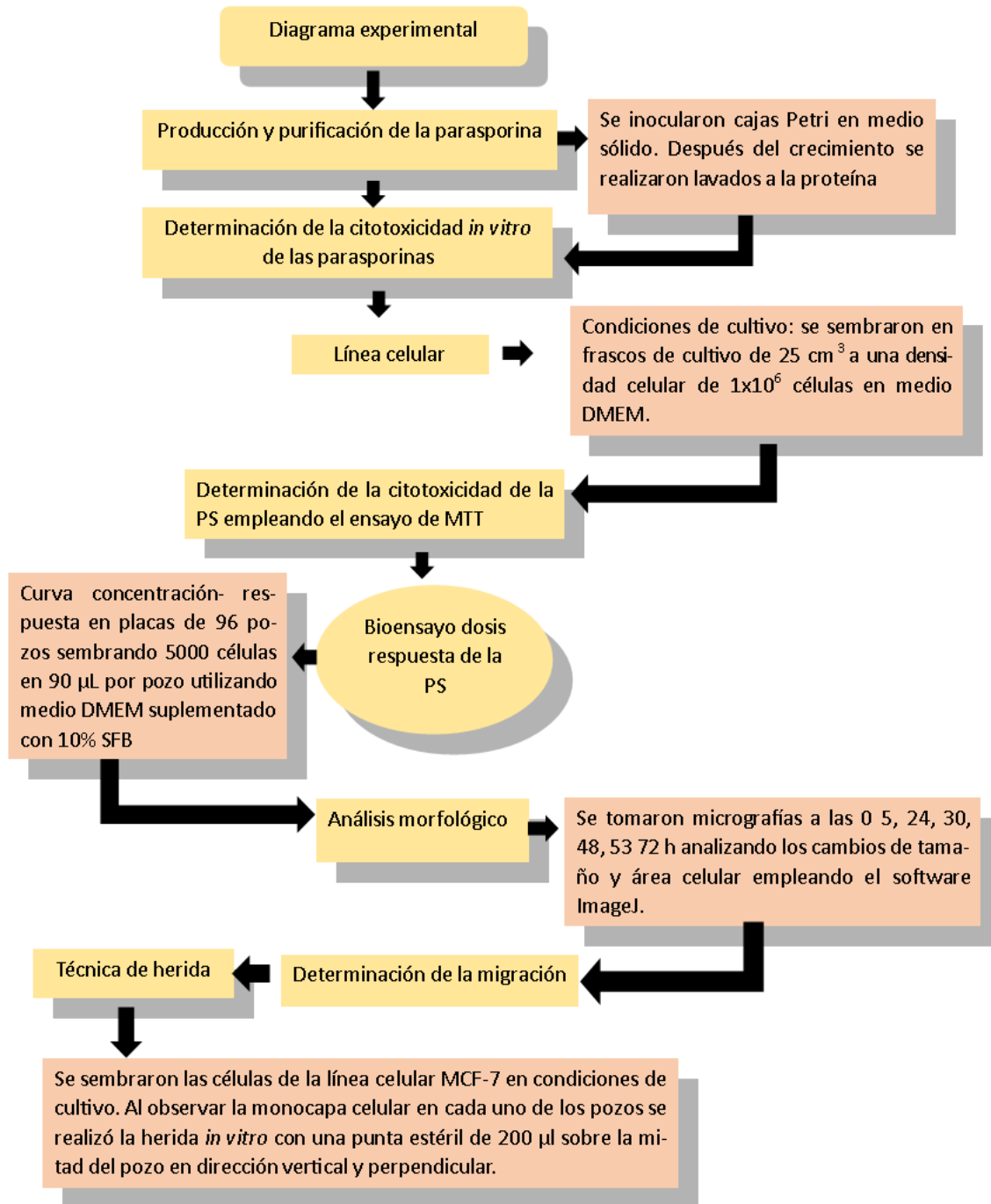


Figura 5. Diagrama experimental.

## 7. Materiales y métodos

### 7.1. Producción y purificación de la parasporina

De acuerdo al diagrama experimental (figura 5) se inició con la preparación de 200 mL de agar nutritivo, dado que la preparación es de 23 g del medio por litro de agua, se pesaron 4.6 g para el volumen deseado ajustándolo a un PH de 7.4. El medio se esterilizó en una autoclave CVQ-B50L (ECOSHEL) durante 15 min, 121°C y 14 lb. Posteriormente se decantó el medio en 40 cajas Petri y se inocularon dos cajas, posteriormente se incubaron a 30°C durante 72 horas en una incubadora NOVATECH FI60-AID (QUIMILAB). Al observar que las bacterias habían crecido se tomaron muestras para estriar las demás cajas dejándolas incubar a las mismas condiciones y tiempo mencionadas anteriormente. Se realizó un frotis para verificar la presencia de las esporas.

Tabla 1- Formulación de los componentes del medio agar nutritivo

<b>Componente</b>	<b>Cantidad (g) para 1 L</b>
Peptona de Gelatina	5.0
Extracto de Carne	3.0
Agar Bacteriológico	15.0

Una vez terminado el crecimiento se realizaron los lavados en una centrifuga Heraeus Megafuge 16 R (Thermo Scientific) para la obtención de la proteína. Para lo cual se centrifugó el medio de cultivo a 5500 rpm durante 15 min a 5°C, al obtener la pastilla se hizo un primer lavado con agua destilada y se volvió a centrifugar. Después se realizaron dos lavados con solución isotónica (NaCl 0.85% p/v), seguido de otro lavado con agua destilada y dos lavados con agua acidificada (PH 2.5). Finalmente realizó un lavado con agua destilada y se dejó la pastilla resuspendida en 2 mL agua destilada. Por cada paso se resuspendió las pastillas con el vortex y se aforó 1 mL de solución correspondiente.

Para la purificación y la selección de las inclusiones proteicas se utilizó la separación de proteínas mediante geles en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) en una cámara de electroforesis vertical Mini-PROTEAN (BIO-RAD). Se solubilizaron las muestras mediante el método de Laemmli (Laemmli,1970). Para comprobar que se encontraba la proteína de

interés se realizó un gel de 0.75 mm al 8 % de acrilamida y al observar la banda de un peso ~ 50 KDa, se produjeron geles al 10% de acrilamida de un solo peine para obtener mayor cantidad de proteína. Se empleó albúmina sérica bovina (BSA) como proteína de referencia (67 kDa), marcador de peso molecular (NZYColour Protein Marker II; 245, 180, 135, 100, 75, 63, 48, 35, 25, 20, 17, 1 kDa). La electroforesis se corrió en buffer Tris Glicina según lo reportado por Navarro (2001). Después, de los geles se cortó la banda de interés de ~ 50 kDa (el tamaño debido a investigaciones previas realizadas por el equipo de trabajo), la proteína de interés se recuperó por medio de una electroelución a 10 mA por 200 minutos en un Electroeluctor 422 (BIORAD). Las proteínas eluidas se dializaron por medio de membranas de Sigma-Aldrich MWCO 12,000 Daltons, con PBS (Phosphate Buffered Saline) como buffer para dicha técnica. Pasados las 24 h se cuantificó la proteína dializada fue cuantificada por NanoDrop 2000 Thermo Scientific con la aplicación Protein A280.

## **7.2 Determinación de la citotoxicidad *in vitro* de las parasporinas.**

### **7.2.1. Líneas celulares**

Como modelo experimental se utilizó la línea celular MCF-7 de cáncer de mama, obtenidas de la casa comercial ATCC (cat ATCC HTB-22). Estas células son adherentes y de morfología tipo epitelial (Figura 6). Son células positivas a los receptores de estrógenos y progesterona (Shirazi,2011; <https://www.atcc.org>). La línea celular MCF-7 se aisló por primera vez en 1970 del tejido mamario de una mujer caucásica de 69 años. MCF-7 es el acrónimo de Michigan Cancer Foundation-7, haciendo referencia al Instituto en Detroit, USA donde la línea celular fue establecida en 1973 por Herbert Soule y colaboradores (Reyes,2019).

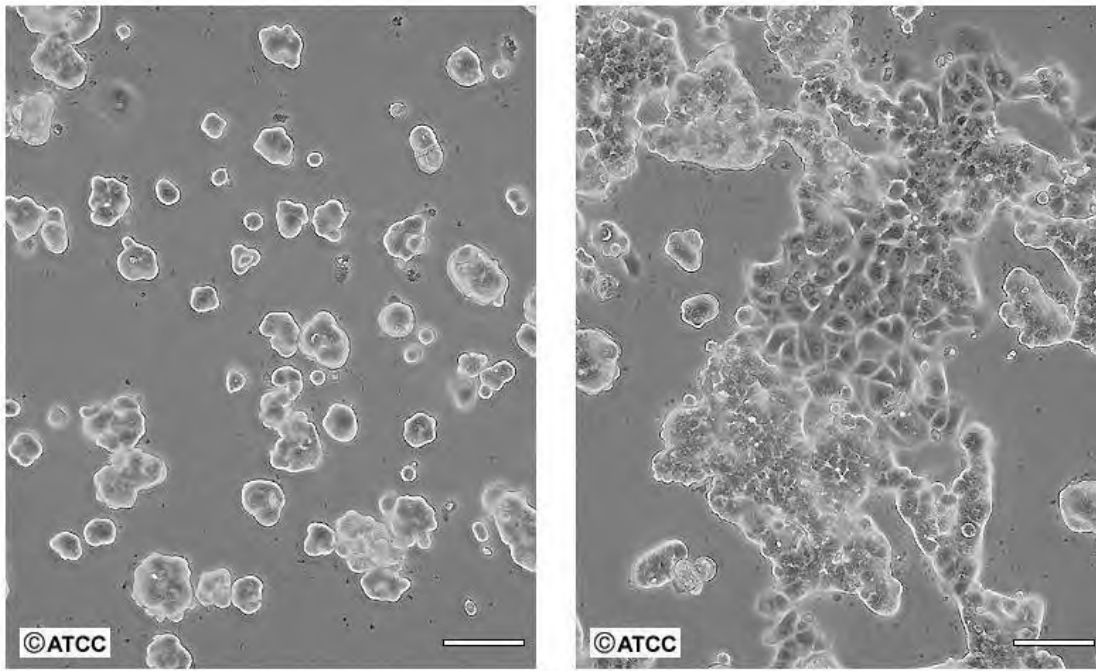


Figura 6. Línea celular MCF-7 utilizada para los bioensayos de actividad antiproliferativa. Imágenes tomadas de [www.atcc.org](http://www.atcc.org).

### 7.2.2. Condiciones de cultivo

Las células MCF-7 de cáncer de mama humano se sembraron en frascos de cultivo de 25 cm<sup>3</sup> a una densidad celular de  $1 \times 10^6$  células en medio de Eagle modificado por Dulbecco alto en glucosa (DMEM) suplementado con suero bovino fetal (SFB) al 10%, glutamina 2 Mm y penicilina/ estreptomina al 1% y se incubaron a 37°C en una atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> y humedad relativa del 95% en una incubadora de CO<sub>2</sub>, BJPX-C80 (BIOBASE). La renovación del medio se realizó 2 veces por semana, mientras que las células se resembraron cuando se alcanzó un 80% de confluencia.

Se disgregaron las células adheridas de la caja de cultivo empleando tripsina-EDTA de la marca de Biowest. Brevemente, se retiró el medio DMEM suplementado y se lavaron las células con 5 mL de PBS. Posteriormente a las cajas se les agregaron 1 mL de tripsina-EDTA y se incubaron durante dos minutos a 37° y 5% CO<sub>2</sub>. La actividad de la tripsina-EDTA se detuvo añadiendo un volumen de 5 mL de medio de DMEM suplementado con 10% de SFB. Las células se transfirieron a un tubo cónico de 15 mL y se centrifugaron a 1200 rpm durante 5 minutos. El paquete celular se resuspendió con 6 mL de medio de cultivo. Se realizó el

conteo de células viables en cámara Neubauer con una mezcla 1:1 de 20 µL azul tripano y 20 µL de células. Como último paso se llegó al volumen necesario de la mezcla para cultivar dichas células para los bioensayos.

### 7.2.3. Determinación de la citotoxicidad de las PS empleando el ensayo de MTT

El MTT es un método colorimétrico cuantitativo que se utiliza para determinar la supervivencia y capacidad de proliferación de las células fue desarrollado por Mosmann en 1983 (Castro,2006). Está basado en la reducción de la sal del 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio bromuro (MTT). Esta sal de color amarillo pálido es soluble en agua y es reducido por células viables (figura 7) (Van Meerloo et al., 2011). La transformación del MTT a formazan se debe principalmente a las deshidrogenasas mitocondriales, en particular la enzima succinato deshidrogenasa, pero también pueden intervenir reductasas citosólicas o de otros compartimentos subcelulares. Las coenzimas reducidas resultantes (NADH y NADPH) convertirán el MTT en su formazano (Bellamy, 1992).

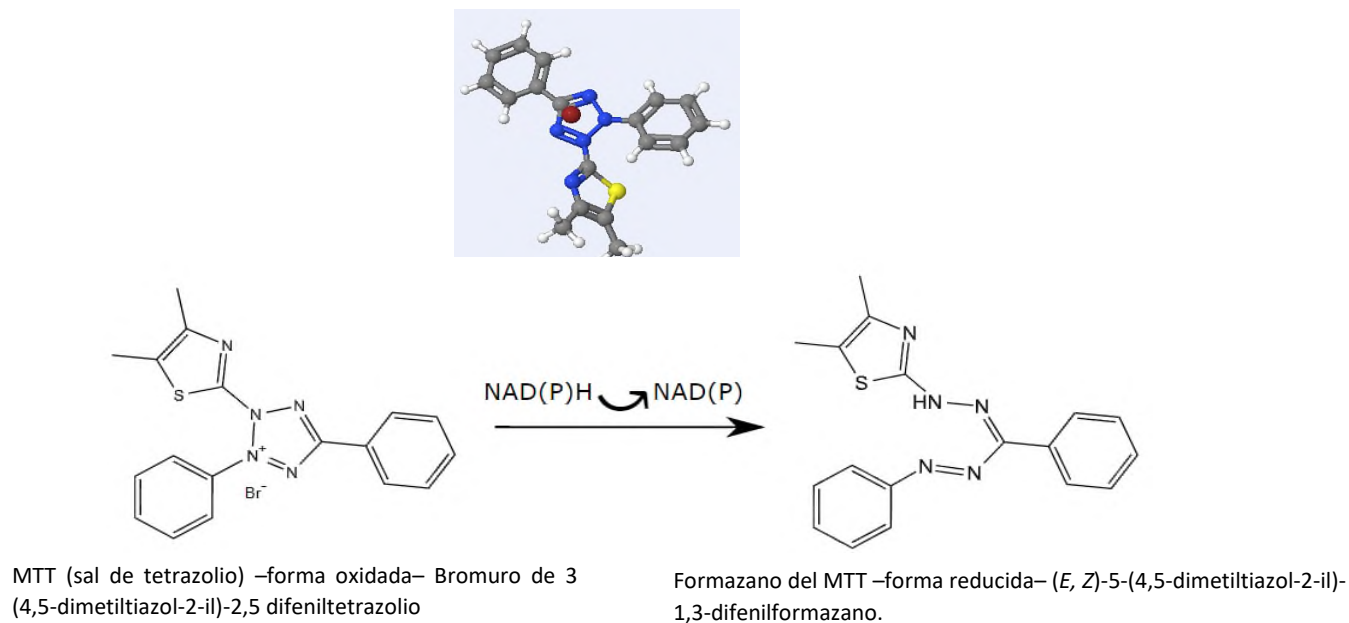


Figura 7: Reacción química de la prueba de MTT para la evaluación de citotoxicidad en el cultivo celular.

Las células MCF-7 son de las líneas celulares de cáncer de mama con la característica de expresar niveles importantes de los receptores de estrógenos (RE) alfa, por lo que este tipo de sistema modelo es valioso para la investigación del cáncer de mama positivo a receptores hormonales dado que puede responder a tratamientos hormonales específicos (MD,2023).

Se utilizó la línea celular de cáncer de mama (MCF-7) para la evaluación de la citotoxicidad de la parasporina AX-2 aproximadamente de ~50 KDa en placas de 96 pozos, se sembraron 20000 células/ 100 µL de DMEM por pozo y se incubaron al 5% de CO<sub>2</sub> durante 24 h a 37 °C. Después del periodo de incubación se agregaron los tratamientos de la proteína AX-2 a distintas concentraciones (1.10, 2.21, 4.42, 8.84, 13.26, 17.68, 22.1 y 24.31 µg/mL) y se le agregó a cada pozo 10 µL de reactivo MTT con una concentración de 5 mg/mL y se incubó nuevamente con las mismas condiciones ya descritas durante 4 h. Finalizado el tiempo, se retiró el sobrenadante y se agregó 100 µL de isopropanol y se incubó durante 15 min a temperatura ambiente. Se realizó la lectura de absorción a 595 nm en un espectrómetro de placas (Bio Rad iMark), se realizó el ensayo 2 veces.

#### **7.2.4. Ensayo de hemólisis**

La hemólisis es el deterioro de los glóbulos rojos esto puede ser provocado por algunas enfermedades, toxinas o medicamentos. Lo anterior puede provocar que los glóbulos rojos se lisen más rápido de lo normal (NIH, s.f). El ensayo de hemolisis mide la actividad hemolítica de muestras tales como péptidos o moléculas en los eritrocitos humanos, un porcentaje de hemólisis inferior al 2% es considerado no hemolítico (IVAMI.,2018).

Se realizó el ensayo de hemólisis partiendo de la obtención de la sangre donada por un paciente sano en un Vacutainer recubierto con K2-EDTA, se centrifugó la sangre a 2016.07 RPM durante 5 minutos, se aspiró el plasma y después se desechó. Se agregó NaCl (150 Mm) a 2016.07 RPM durante 5 minutos a los eritrocitos este paso se repitió dos veces. Después se aspiró el sobrenadante y se reemplazó por PBS (PH 7.4), se mezcló con los eritrocitos para centrifugarlos a 2016.07 RPM durante 5 minutos, se aspiró el sobrenadante y se agregaron 12 mL de PBS por cada 3 mL de suspensión de eritrocitos. Se añadieron 150

$\mu\text{L}$  de la suspensión de eritrocitos y se prepararon diluciones a diferentes concentraciones de la parasporina AX-2 (1.25, 2.5, 5 y 7.5). También se preparó SDS al 1.5% para usarse como control positivo, se dejaron incubar 1 h en una incubadora de  $\text{CO}_2$ . Pasado el tiempo de incubación las muestras se dividieron en dos fases y se tomó sólo la fase que se encontraba arriba para agregarlos a una placa de 90 pozos y cuantificarlos en un espectro fotómetro de microplacas (Bio Rad iMark) a 595 nm. Finalmente, se calculó el porcentaje de hemólisis con respecto a la absorbancia del control positivo.

#### **7.2.5. Análisis morfológico**

La evaluación de las características morfológicas celulares permite determinar los eventos celulares importantes como la presencia de apoptosis y son ampliamente utilizados en el estudio del desarrollo de tejidos y una variedad de enfermedades (Martinez,2009). Por lo que se evaluó los efectos morfológicos inducidos por la parasporina AX-2. Para lo cual se tomaron micrografías a las 0, 5, 24, 30, 48, 53 y 72 h, analizando los cambios del tamaño y área celular empleando los softwares ImageJ. El registro de imágenes se hizo empleando una cámara Motic AE31E, Moticom 5 plus acoplada a un microscopio trinocular AE31E y Motic a 10 X.

#### **7.2.6. Determinación de la migración celular**

Para la estandarización de la técnica de herida se utilizaron placas de 12 pozos en las cuales se sembraron 250,000 células en 1 mL por pozo, con medio DMEM suplementado con 10% de SFB y se incubaron a 5% de  $\text{CO}_2$  por 24 h a 37 °C. Posterior al tiempo de incubación se retiró el medio del día anterior, se agregó 1 mL de PBS y se realizaron las heridas verticales y horizontales con una punta estéril de 200  $\mu\text{L}$ , se retiró el PBS y se agregó medio RPMI suplementado al 1% de SFB, RPMI sin suplementar, medio DMEM suplementado al 1% de SFB y medio DMEM sin suplementar en un volumen final de 1 mL por triplicado para cada medio, la placa se incubó durante 24, 48, 56 y 72 horas a 5% de  $\text{CO}_2$  a 37°C y se llevó el seguimiento en con el software ImageJ calibrado. Se utilizó Doxorubicina con una concentración de 4  $\mu\text{M}$  como control positivo y PBS con una concentración de 1X como control negativo. Una vez estandarizada la técnica de herida, se aplicó la misma metodología descrita previamente. Sin embargo, posterior al lavado de PBS, se agregó el

medio RPMI al 1% junto con la proteína AX-2 a dos concentraciones de 22.10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y 17.68  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Así mismo se utilizaron los mismos controles, así como los periodos de incubación y su seguimiento mediante el software Motic ImageJ.

#### **7.2.7. Análisis estadístico**

El análisis estadístico de los datos en este trabajo se realizó mediante el software Graphpad Prism versión 8, se analizaron con un ANOVA (análisis de varianza) de una sola vía en conjunto con la prueba de Dunnett para comparar cada tratamiento con respecto al control y su significancia estadística se estableció una  $p < 0.05$ .

## 8. Resultados y discusión

### 8.1. Producción y selección de la parasporina

Se cultivó la cepa AX en medio sólido y se realizó la separación de las proteínas mediante electroforesis de proteínas en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE). Los resultados de la electroforesis se muestran en la Figura 8, en dicha figura también se observa la banda de interés ~50 kDa, además de las bandas aproximadamente de 30 y 28 kDa. Después de una producción considerable de geles se realizó la electroelución y se obtuvo la proteína.

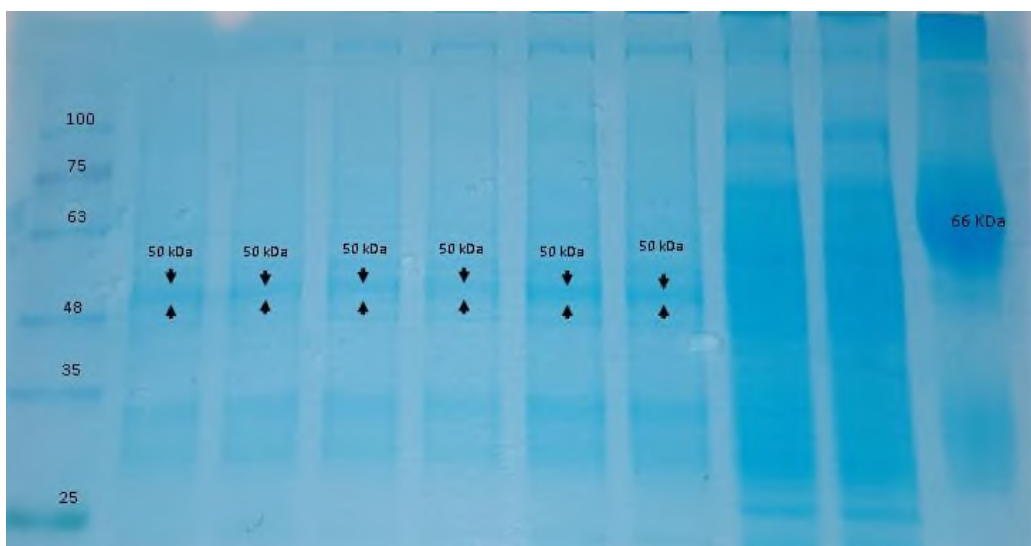


Figura 8. SDS-PAGE al 8% de la cepa AX-2. Las flechas negras indican la banda de aproximadamente ~50 kDa, la cual se seleccionó para la electroelución.

Cada cepa de *B. thuringiensis* tiene un patrón de bandas diferentes, es decir puede producir más de una proteína con diferentes tamaños y cantidades. Nasima et al. (2021) aisló cepas de *B. thuringiensis* de diferentes lugares de Bangladesh (tierra, polvo almacenado, hojas y arena) que creció en medio T3- agar, incubándolas 4 días a 30°C. Observaron que las cepas Dsf1-Dsf7 produjeron diferentes proteínas de diferentes pesos moleculares cada una. Siendo la proteína de 88 kDa la banda más prominente para los aislados Dsf2 y Dsf3; una de 65 kDa para DSb7, DSg1 y DSh1; y de 88 kDa y 34 kDa para DSc5, DSf2, DSf3 y DSg1. Además, reportan que los fragmentos, obtenidos tras la digestión proteolítica, de aproximadamente 65 kDa y 27 kDa de la proteína de 88 kDa fueron muy similares a la proteína PS1. Mientras

que el fragmento de la proteína de 27 kDa de la proteína de 34 kDa de aislado DSc5 es parecida a una PS3 (Nasima et al., 2021).

Por otro lado, Mourad et al. (2019) obtuvieron sesenta y ocho aislamientos de *B. thuringiensis* de diversos lugares de Arabia Saudita que fueron cultivados en medio agar nutritivo durante 5 días a 30 °C. Los geles de SDS-PAGE al 12% mostraron diferentes bandas de inclusiones parasporales. El aislado Bt5 mostró bandas de 155 kDa, 140 kDa, 82 kDa y 41 kDa; mientras que el aislado Bt7 mostró bandas de 83 kDa, 68 kDa, 64 kDa, 32 kDa, 25 kDa, 19 kDa y 15 kDa (Mourad et al.,2019).

En otra investigación se descubrió que Bt-LDC-501 produce una proteína parasporal aproximadamente de 25 kDa en medio Spizizen con una incubación durante 48 h a 37° C, por SDS-PAGE al 12% (Gracia et al.,2019).

## **8.2. Purificación de la proteína dializada**

Después de la electroelución se realizó una cuantificación mediante el NanoDrop 2000 y la concentración proteica después de la diálisis fue de 32.00 µg/mL. Debido a que la proteína estaba muy diluida se concentró con una columna Amicon Ultra-2 Centrifugal Filter Decives. Se cuantificó nuevamente la proteína obteniendo una concentración proteica de 2,210.33 µg/mL.

Así como una cepa puede producir diferentes proteínas de diferentes pesos, también las concentraciones de las proteínas varían con la cepa y medio ocupado. La proteína llamada Parasporina-3 crecida en placas de agar LB suplementadas con cloranfenicol e incubadas 3 días a 30°C produce 133 µg/mL (concentración cuantificada por el método de Bradford; Ampliado et al.,2022). Mourad (2019) con una parasporina llamada Cry41Aa produjo 12.5 µg/mL, cuantificada mediante la técnica de Lowry. Por otro lado, con la cepa KAU 59 cultivada en caldo T3 e incubada a 30°C se produjo una concentración de proteínas de 2 mg/mL, cuantificada con la técnica de Lowry (Beena et al., 2019). Ninguna de las técnicas reportadas para la cuantificación de las parasporinas es específica para dichas proteínas. Por lo que dependerá del proceso de purificación la cantidad de proteína medida. Esto y

que cada cepa produce diferentes proteínas en diferentes concentraciones hace que las concentraciones de parasporinas medidas sean tan distintas.

### 8.3. Ensayo MTT sobre la línea celular de cáncer de mama MCF-7

Los resultados del ensayo de viabilidad de la parasporina contra la línea celular MCF-7 se presentan en la Figura 9. Como se observa, el tratamiento de la proteína AX-2 con diferentes concentraciones (1.10, 2.21, 4.42, 8.84 y 13.26  $\mu\text{g/mL}$ ) y con una prueba estadística ANOVA de una vía seguido de Dunnett se mostró que no había un nivel de significancia para ningún tratamiento. Se realizó otro ensayo a concentraciones mayor de la proteína AX-2 (2.21, 4.42, 8.84, 13.26, 17.68, 22.1 y 24.31  $\mu\text{g/mL}$ ; Figura 10). El análisis estadístico mediante ANOVA de una vía seguido de la prueba de Dunnett no encontró significancia a las concentraciones probadas. Esto indica que la proteína AX-2 no tuvo actividad citotóxica contra las células MCF-7 como se muestra en las figuras 9 y 10 dado que las barras de los tratamientos superan a la barra del control indicando que el tratamiento de la proteína no mató a las células, sino que proliferaron aún más que el control.

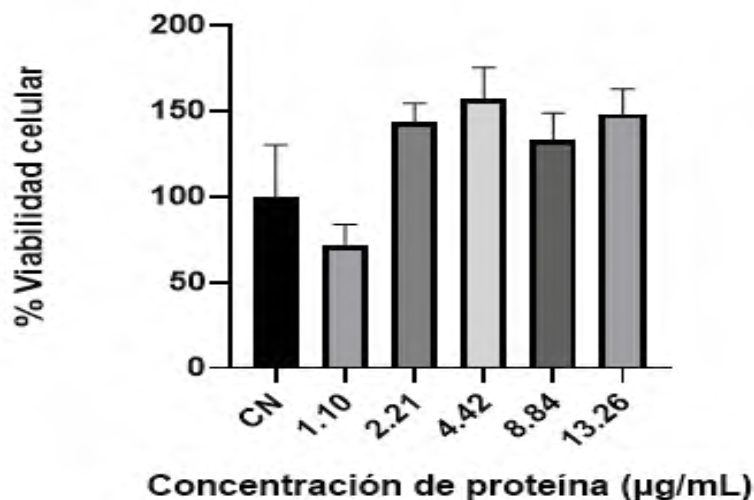


Figura 9. Ensayo de MTT de la proteína AX-2 contra las células MCF-7 con 48 h de incubación. Los datos son comparados con respecto al control (CN). Los datos son expresados como valores  $\pm$  desviación estándar (SD). El análisis estadístico fue realizado mediante un ANOVA de una vía con una prueba de post hoc Dunnett. Los valores con  $p < 0.05$  fueron considerados estadísticamente significantes. Siendo \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  and \*\*\*  $p < 0.001$ .

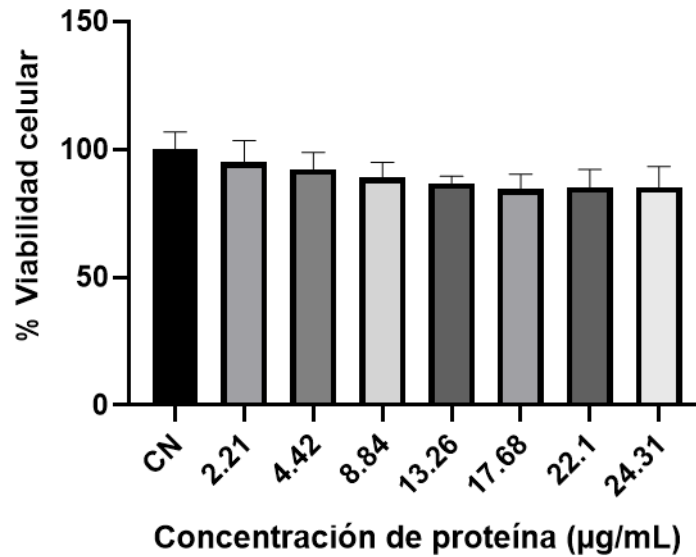


Figura 10. Ensayo de MTT de la proteína AX-2 contra las células MCF-7 con 48 h de incubación. Los datos son comparados con respecto al control (CN). Los datos son expresados como valores  $\pm$  desviación estándar (SD). El análisis estadístico fue realizado mediante un ANOVA de una vía con una prueba de post hoc Dunnett. Los valores con  $p < 0.05$  fueron considerados estadísticamente significantes. Siendo \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  and \*\*\*  $p < 0.001$ .

Cruz Nolasco (2017) reportó que la parasporina AX-2 tuvo una  $IC_{50}$  de  $3.9 \mu\text{g/mL}$ . Contrario a lo publicado por Nolasco en el presente trabajo la parasporina AX-2 no tuvo actividad citotóxica contra MCF-7. Lo anterior puede deberse a que en el presente trabajo la cepa fue crecida en un medio sólido y que se usaron cepas de tercer pase (es decir una misma cepa sembradas 3 veces). Se ha reportado que las cepas *B. thuringiensis* pierden su virulencia por las resiembras sucesivas (Farrera, 1998). Además, que la composición del medio y las condiciones de operación afectan la toxicidad de *B. thuringiensis* (Dulmage, 1971; Farrera 1998; Avignone-Rosa & Mignone, 1995). Sin embargo, Melo et al., 2020 reportó una parasporina llamada A14d2, probada en la línea celular MCF-7 y evaluando la citotoxicidad por el método MTT, encontraron una  $LD_{50}$  de  $14.83 \mu\text{g/mL}$ . Otro estudio, reportó una parasporina llamada A13-2, la cual se probó con el ensayo MTT, tiene una  $IC_{50}$  de  $6 \mu\text{g/mL}$  (Borin et al., 2021). En el caso de Brasseur et al., (2015) probó una parasporina llamada PS2Aa1 sintetizada por *B. thuringiensis* 4R2 en la línea celular MCF-7 con una concentración de  $1 \mu\text{g/mL}$ . Lo anterior indica que la  $LD_{50}$  en una misma línea celular es diferente para cada parasporina aplicada en la literatura.

#### 8.4. Ensayo de hemólisis de eritrocitos humanos para evaluar la actividad hemolítica de la parasporina AX-2

La definición de parasporina es ser citotóxica selectivamente contra células cancerosas y no hemolítica en células normales (Santos et al., 2022). Para saber si la proteína AX-2 cumple con los requisitos de ser una parasporina se realizó el ensayo de hemólisis tomando en cuenta la dosis letal media reportada por Cruz Nolasco para AX-2, además de darnos información sobre su efecto en células sanas.

En la figura 11 se muestran los resultados del ensayo de hemólisis de eritrocitos tratados con la proteína AX-2. Como se puede observar se aplicaron distintas concentraciones de la proteína (1.25, 2.5, 5 y 7.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y como control positivo se utilizó SDS al 3%. La concentración de 1.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  generó el 11% de muerte celular, mientras que en la concentración de 2.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  fue 20.2%, para la concentración de 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  fue 31.6% y la concentración de 7.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  fue 26.6%. Lo anterior indica que la proteína AX-2 a distintas concentraciones tiene un porcentaje de hemólisis bajo, tal como las características reportadas de las parasporinas (Mizuki et al., 2000).

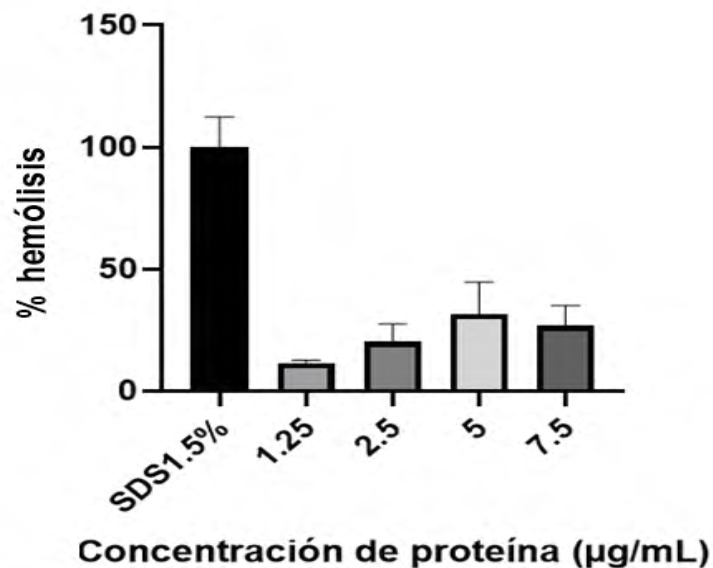


Figura 11. Ensayo de hemólisis con la parasporina AX-2 en eritrocitos humanos.

Se ha reportado que a una concentración de 100 µg/mL por cada mililitro de suspensión de eritrocitos una parasporina producida por la cepa KAU41 de *B. thuringiensis* no es hemolítica (Chubicka et al., 2018). Por otro lado, Nadarajah et al., (2006) realizaron ensayos hemolíticos en parasporinas de *B. thuringiensis* numeradas como (*Bt* 1, 2, 4, 7, 8, 9, 10, 18, 19, 20, j y IPS-82). Las cuales fueron probadas en eritrocitos humanos y no presentaron actividad hemolítica en una concentración de 0.2 mcg/mL. Poornima et al., (2010) reportó una proteína llamada LDC-391 proveniente de *Bacillus thuringiensis* con una concentración de 0.1 µg/µL y fue probada contra células U-937 en un ensayo de hemólisis en el cual tuvo una toxicidad moderada (Poornima et al., 2010). Por otro lado, se reportó una proteína producida por la cepa llamada BDzG proveniente de *Bacillus thuringiensis* los cuales no mostraron actividad hemolítica contra células normales con una IC<sub>50</sub> de 2.33 ± 0.69 µg/mL (Aberkane et al., 2020). Por lo que las concentraciones utilizadas para el ensayo de hemólisis están dentro de las reportadas, verificando que la proteína AX-2 es una parasporina.

#### **8.5. Estandarización de la técnica de herida**

El ensayo de herida ha sido uno de los primeros métodos desarrollados para evaluar la migración celular *in vitro*, esto realizando una herida en células que se encuentran en monocapa (Rodríguez, et al., 2004).

Primero se estandarizó la técnica de herida ya que no se había realizado previamente en el grupo de trabajo. Para estandarizarla se utilizaron 4 medios: medio DMEM basal, medio DMEM suplementado al 1% de SFB, medio RPMI basal y medio RPMI suplementado al 1% de SFB. Se midió el área en mm<sup>2</sup> de la herida en células MCF-7 en un periodo de 0 a 72 h. Además, se realizó un seguimiento con micrografías para observar la morfología de las células en cada medio probado a los distintos tiempos. Los resultados se presentan en las figuras 12-15. Para el medio RPMI basal en la hora 0 se realizó la herida haciendo una línea horizontal y vertical, la medición del área se hizo con el software Image J y fue de 2.83mm<sup>2</sup>. A las 30 h se observó muerte celular y a las 72 horas el área fue de 2 mm<sup>2</sup>, por lo que hubo una reducción de 30% (Figura 12). En el caso del medio RPMI al 1% de SFB se realizó el mismo procedimiento, en la hora 0 tenía un área aproximada 2.70 mm<sup>2</sup> y a partir de las 24 horas se observó movilidad celular, como lo muestra la figura 13. El área a este tiempo fue

de 2.5 mm<sup>2</sup>, por lo que hubo una reducción de 7.4 %. A partir de las 53 a 72 h no hubo mucha diferencia de movilidad quedando un área de 2 mm<sup>2</sup>, sin embargo, se observa muerte celular (puntos negros), es decir que desde la hora 0 hasta las 72 h hubo una reducción de 25.9 % (Figura 13).

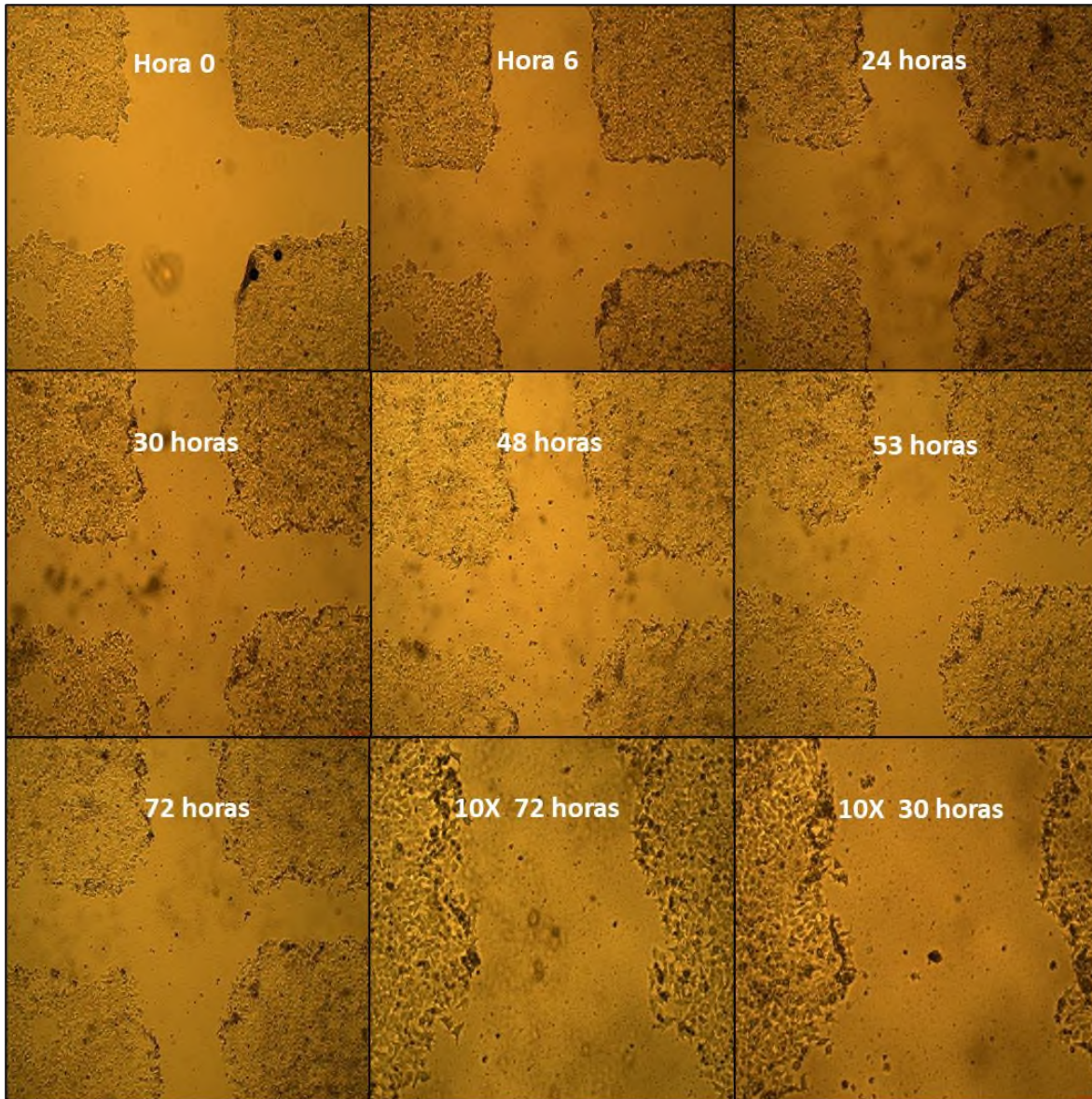


Figura 12. Micrografías con medio RPMI basal en un periodo de 0 a 72 h a 4X y 10X.

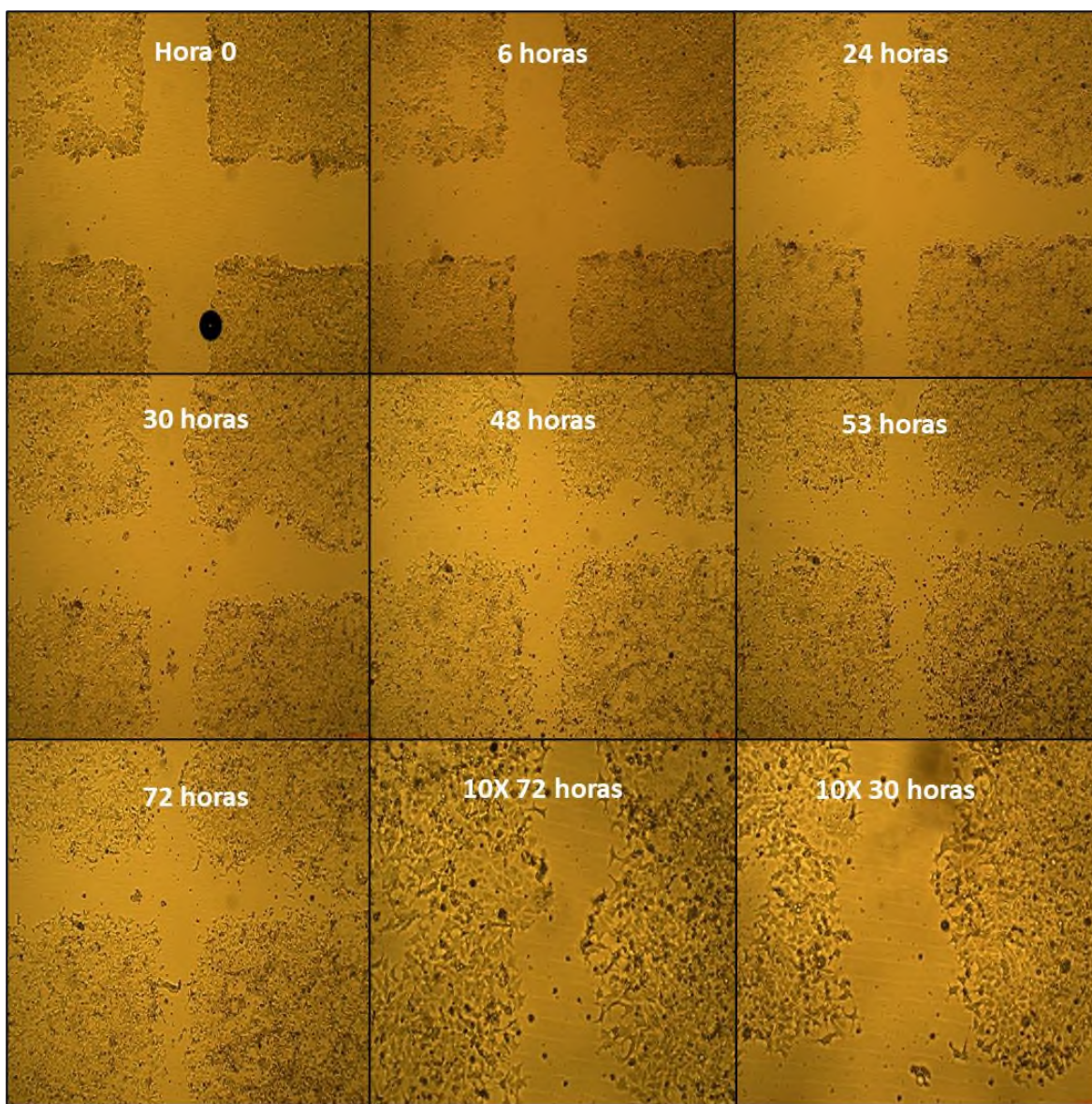


Figura 13. Micrografías con medio RPMI al 1% de SFB en un periodo de 0 a 72 h a 4X y 10X.

Se probó también la técnica de herida con el medio DMEM basal como se muestra en la figura 14. Como se observa en dicha figura a las 0 horas el área es de  $2.68 \text{ mm}^2$ , a partir de las 24 horas hubo una disminución de la herida hasta un área de  $2.25 \text{ mm}^2$ , lo cual se representa un 16% menos. A las 48 h el área fue  $1.892 \text{ mm}^2$ , pero también se observan cambios morfológicos como la muerte celular. En las siguientes horas se observó muerte celular y levantamiento de células, por lo que ya no fue posible apreciar la herida. En total de la hora 0 a la 48 hubo una reducción del 29% del área (Figura 14). En el caso del medio DMEM al 1% de SFB a la hora 0 su área fue de  $2.48 \text{ mm}^2$  (Figura 15). A partir de las 24 horas

se observa un área de 2.38 mm<sup>2</sup>, con una reducción del 4.03%. A partir de las 30 h se observó cambio en la morfología celular; a las 72 horas se observa muerte celular y un área de 0.88mm<sup>2</sup>. En los tiempos de 0 a las 72 h hubo una reducción de 64.5%. Para elegir el medio a utilizar en la prueba de herida en las células MCF-7 se buscó el medio en el que se cerrara la herida sin presentar cambios morfológicos de las células. Considerando esto se eligió el medio RPMI al 1% de SFB, que, aunque no fue en el que se cerró más la herida, la morfología celular se conservó en todos los tiempos y no hubo muerte celular (Figura 13).

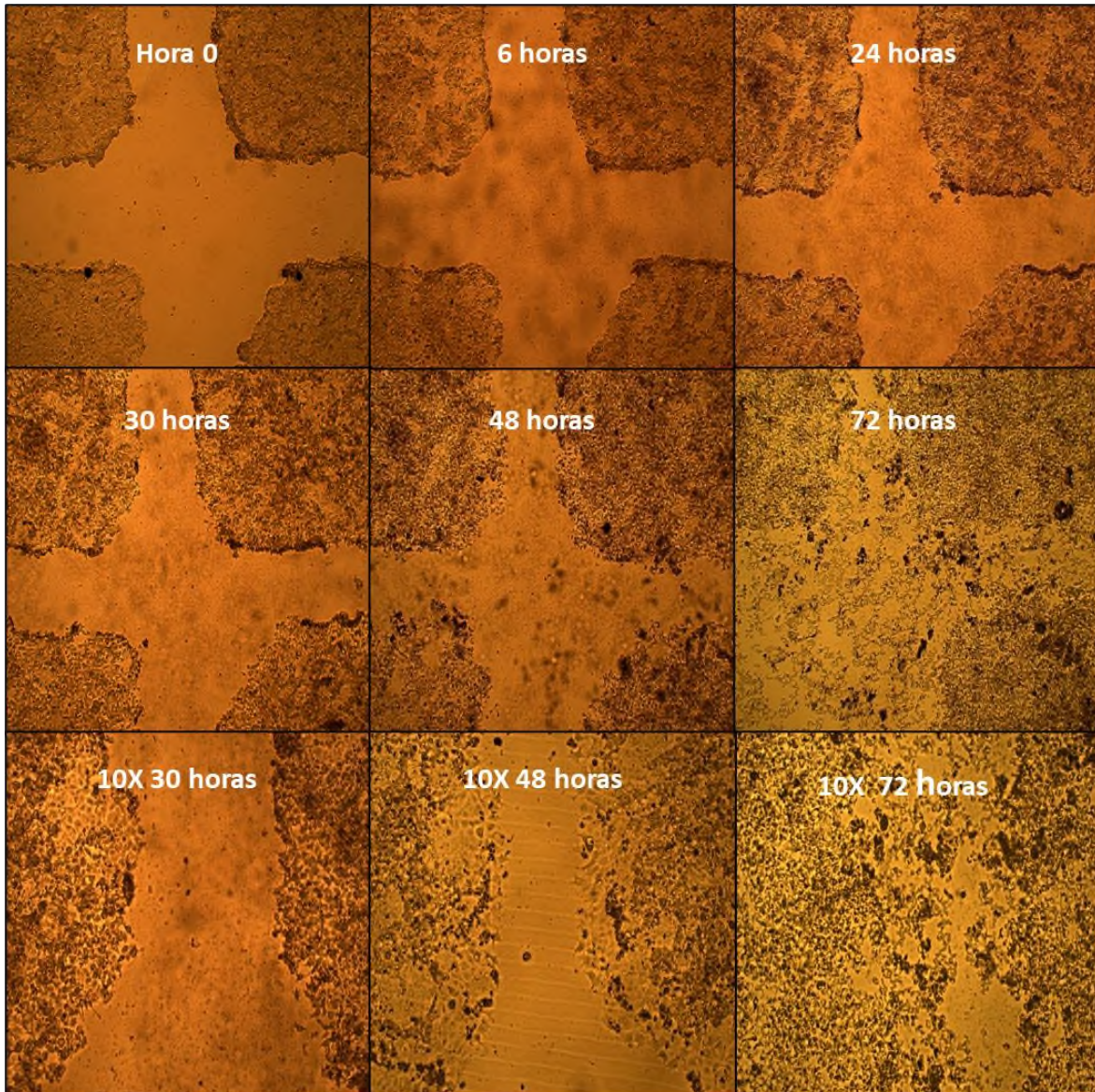


Figura 14. Micrografías con medio DMEM basal en un periodo de 0 a 72 h a 4X y 10X.

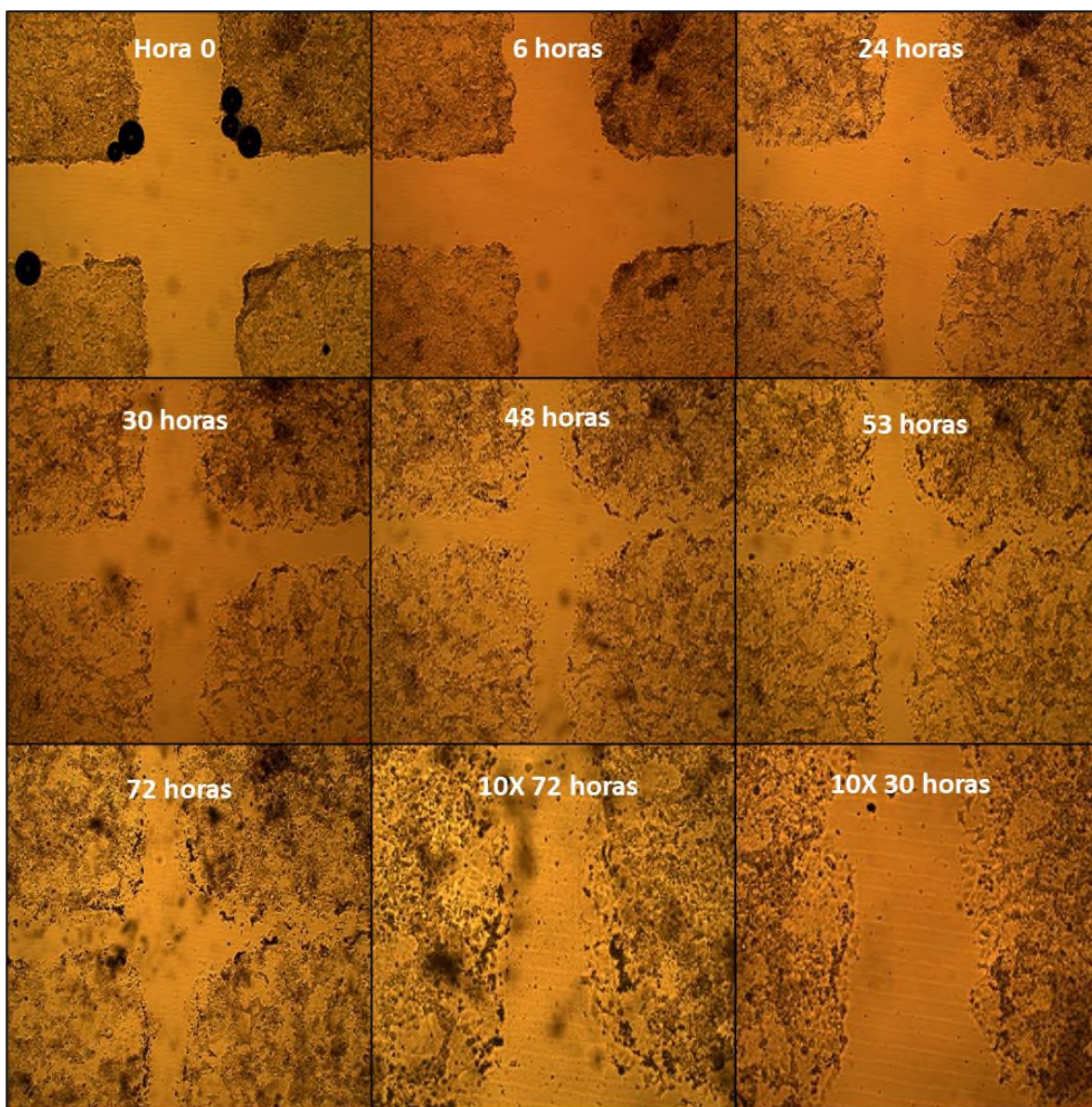


Figura 15. Micrografías con medio DMEM al 1% de SFB en un periodo de 0 a 72 h a 4X y 10X.

Se ha reportado que en el medio RPMI suplementado al 1% con SFB en un tiempo de 72 horas ha sido el más efectivo para mantener las células estables y que no proliferen demasiado (Lara, 2021). Lo anterior coincide con los resultados obtenidos en el presente trabajo. Por otro lado, Ahmadianka et al., (2016) estandarizaron la técnica con Medio DMEM, utilizaron una placa de 6 pozos y una punta estéril de 200  $\mu$ L para hacer la herida, incubando en un periodo de 24 h. En otro estudio se estandarizó la técnica de herida en medio DMEM al 10% de SFB en el cual se utilizó en células MCF-7 (Mera, 2023). En resumen, en general se utilizan el medio RPMI y DMEM con y sin suplemento. Considerando lo

anterior y nuestros resultados se eligió el medio RPMI suplementado con SFB al 1% para la técnica de herida debido que a las pruebas hechas dieron resultados óptimos en el cierre y se mantuvo la morfología. El resumen de las áreas obtenidas en los diferentes tiempos de los medios utilizados se presenta en la Figura 16. Como se puede observar en el medio RPMI basal, la herida mostró un cierre entre las 0 y 48 h. A partir de las 53 a 72 h la herida se mantuvo sin cambios en el área de la herida, es decir, no hubo más migración. Mientras que en el medio RPMI suplementando al 1% de SFB de las 0 a las 72 hubo un constante cierre de la herida. Por otro lado, el medio DMEM basal presenta una disminución del área entre las 0 y 48 h, después de este tiempo no fue posible medir el área debido a que las células se levantaron (Figura 14). Finalmente, el medio DMEM suplementado al 1% muestra una disminución del área en función del tiempo de incubación. Los medios donde más se cerró la herida fueron los medios suplementados. Esto era de esperarse debido a que el suplemento contiene una gran cantidad de factores nutricionales y quimioatrayentes que hacen que las células sean metabólicamente más activas favoreciendo su movilidad y proliferación. Cabe recalcar que no hay estudios que midan el área de la técnica de herida a distintos tiempos para poder comparar estos resultados.

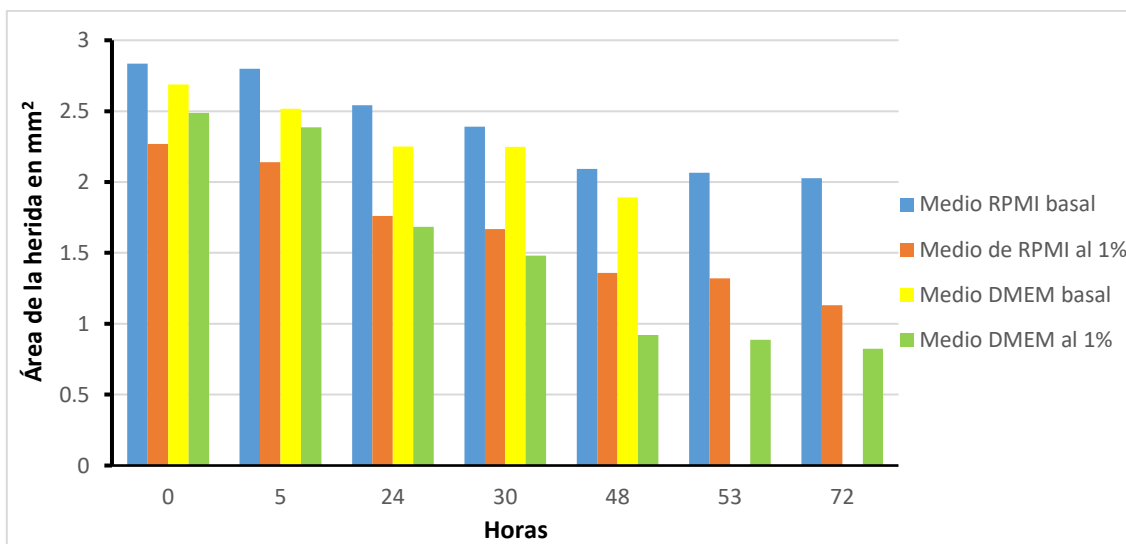


Figura 16. Áreas obtenidas en mm<sup>2</sup> de la herida con dos medios en dos condiciones distintas en la línea celular MCF-7 a diferentes tiempos. La hora 0 se toma como referencia inicial, a medida que avanza el tiempo, las áreas en cada uno de los medios va disminuyendo lo que indica que hubo migración celular.

### 8.6. Ensayos de la técnica de herida en células tratadas con AX-2

Posterior a la estandarización de la técnica de herida se realizaron los ensayos de herida en células MCF-7 tratadas con la parasporina AX-2. Se utilizó como control negativo PBS, como control positivo la Doxorrubicina y dos concentraciones distintas de la proteína AX-2 (22.10 y 17.68  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Los resultados se presentan en las figuras 17-20.

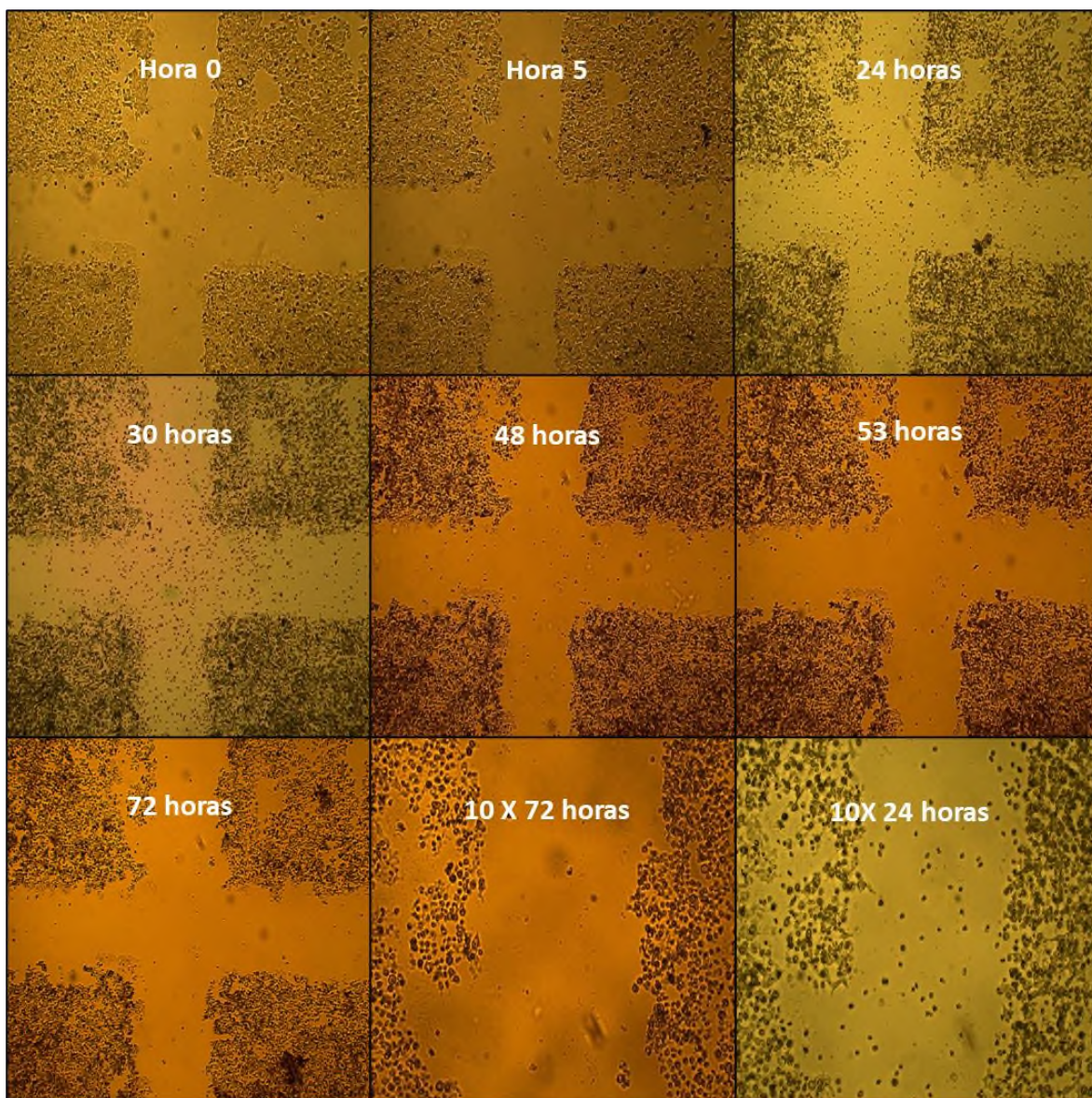


Figura 17. Control positivo con Doxorrubicina en medio RPMI al 1% SFB de 0 a 72 h.

El porcentaje de cierre de la herida se calculó respecto al tiempo 0 h de cada control y cada tratamiento, es decir, el tiempo cero representa el 100% del área de la herida.

Para el cultivo de MCF-7 con Doxorubicina (Figura 17), es decir el control positivo, se observa que en las 0 h junto con las 5 h la mayoría de las células conserva su morfología poligonal solo pocas se observan con morfología redonda (signo de apoptosis). Sin embargo, a las 24 h se pueden observar apoptosis en las células (se notan redondas y oscuras) y levantamiento celular (puntos negros en la herida). Para las 30 h no se observa migración, pero sí aumento de apoptosis y levantamiento celular. A partir de las 48, 53 y 72 h no se observa cambio de migración de la herida, pero sí apoptosis en todas las células (todas se ven redondas y oscuras). Mientras que con el control negativo (PBS; Figura 18) se observa que a las 0 h no existen ningún cambio, es decir, no hay migración. A las 5 h en la herida se observan residuos de células muertas, pero sin cambios morfológicos ni migración hacia la herida. A las 24 h se observa una notable reducción de la herida, es decir hubo migración celular y cambio morfológico (las células se notan de forma poligonal pero más alargadas lo que significa que se mueven o que migran hacia la herida). A las 30 h se observó migración y los puntos negros observados en la herida nos indican cuerpos apoptóticos (residuos de cuando se realizó la herida con la punta de 200  $\mu$ L). A las 48 h se siguió observando movimiento y cierre de herida, al igual que a las 53 h. A las 72 h aún se observó cierre de la herida sin muerte celular sin embargo no hubo cierre total de la herida.

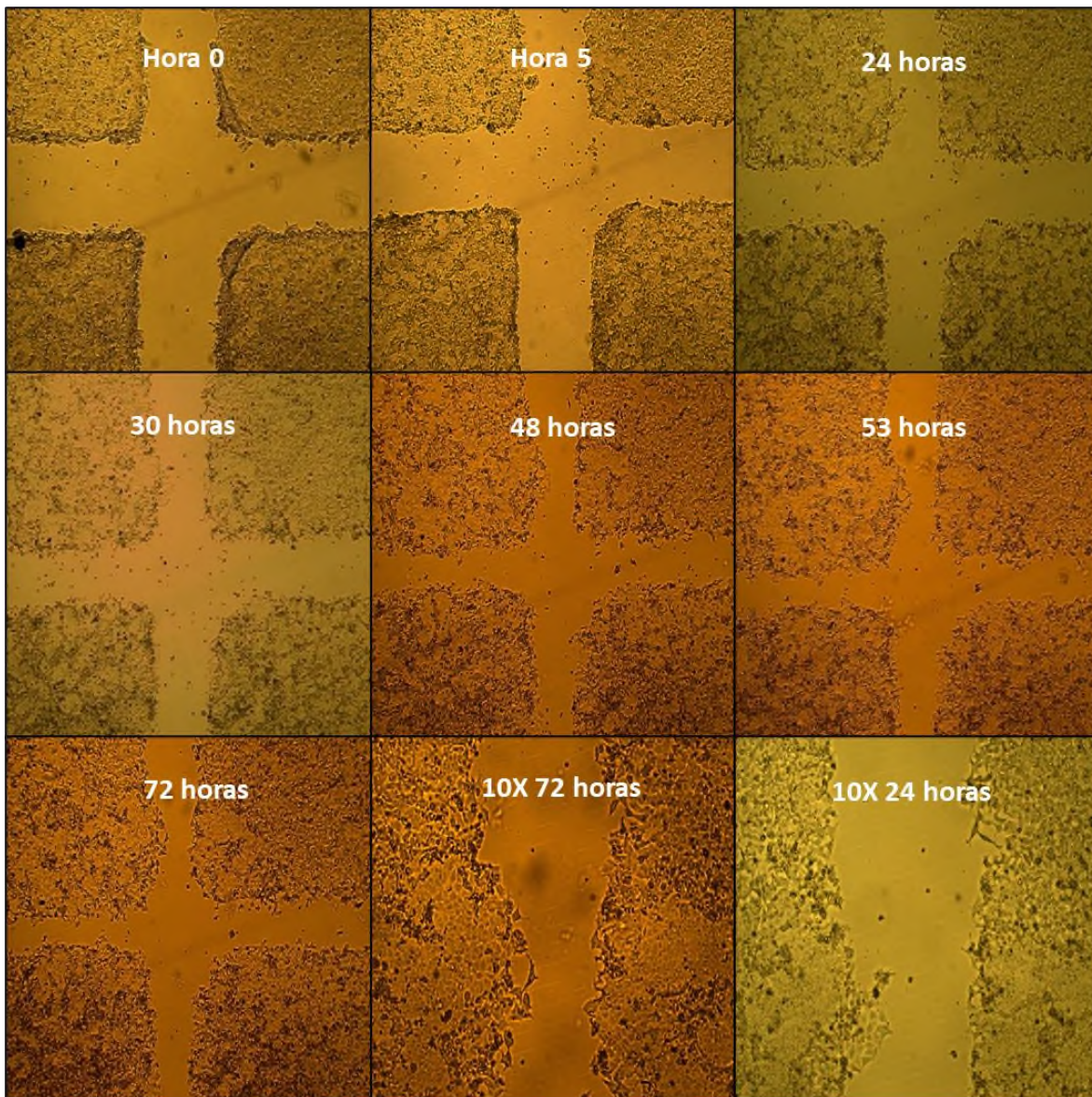


Figura 18. Micrografías del control negativo con PBS en medio RPMI al 1% de SFB de 0 a 72 h.

En el caso del tratamiento de la proteína AX-2 con una concentración de  $22.10 \mu\text{g/mL}$  (Figura 19) en la hora 0 inició con un área de  $1.57 \text{ mm}^2$ . Este tratamiento no tuvo una diferencia entre las 5 h y las 72 horas, dado que su área medida fue de  $1.58 \text{ mm}^2$ , durante todo este tiempo no se muestra un cambio en el movimiento celular lo que indica que no hay migración significativa. En el caso del tratamiento con la proteína AX-2 con una concentración  $17.68 \mu\text{g/mL}$  (Figura 20), en la hora 0 inició con un área de  $1.72 \text{ mm}^2$ . Entre las 5 y las 72 h no se observa migración. Su medición del área en estos tiempos fue de  $1.79$

mm<sup>2</sup> por lo que hay una pequeña diferencia con la medición de la hora 0, pero no se muestra un cambio significativo en la migración celular.

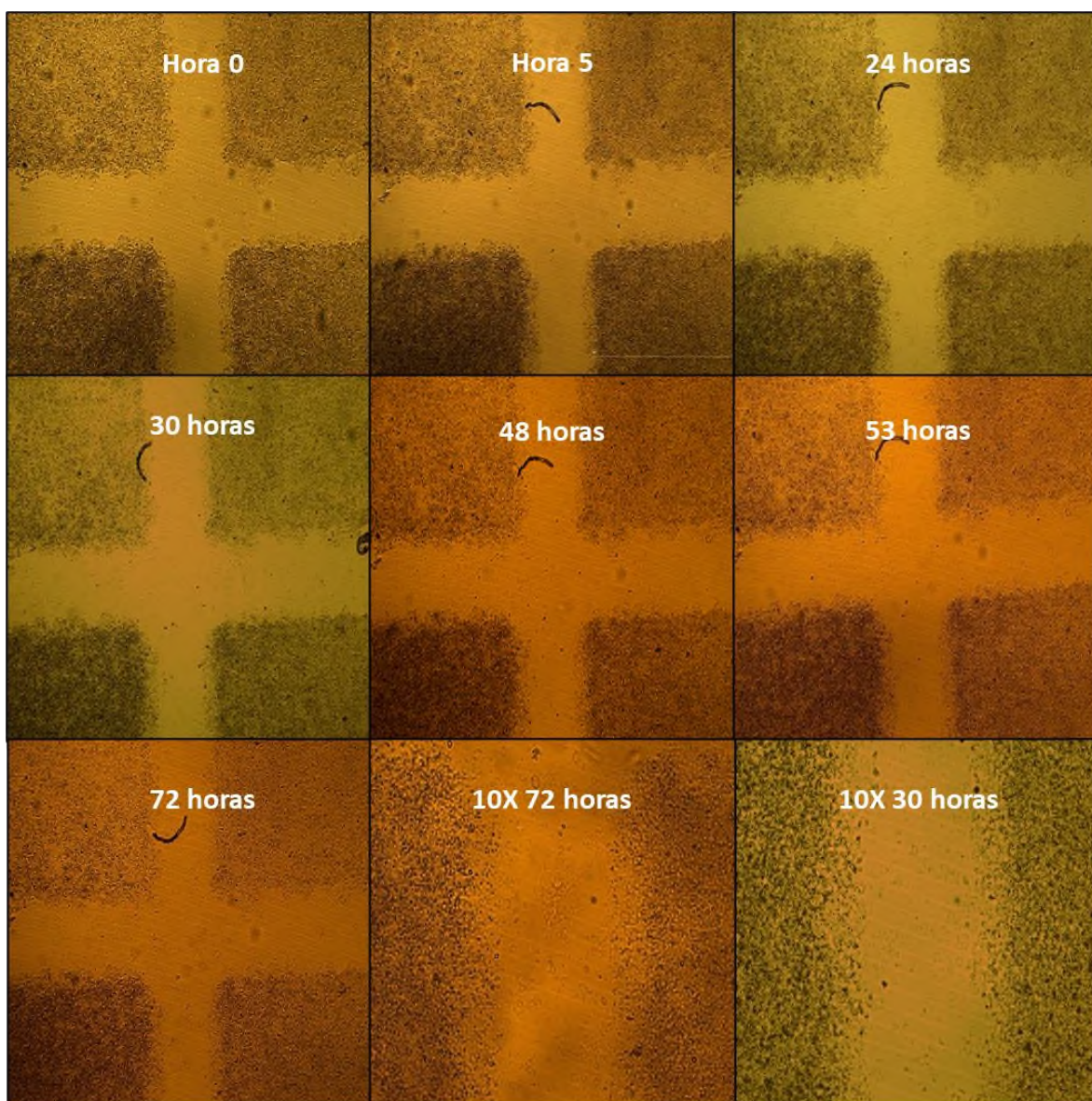


Figura 19. Micrografías con tratamiento de la proteína AX-2 a una concentración de 22.10 µg/mL con medio RPMI 1% de SFB de 0 a 72 h.

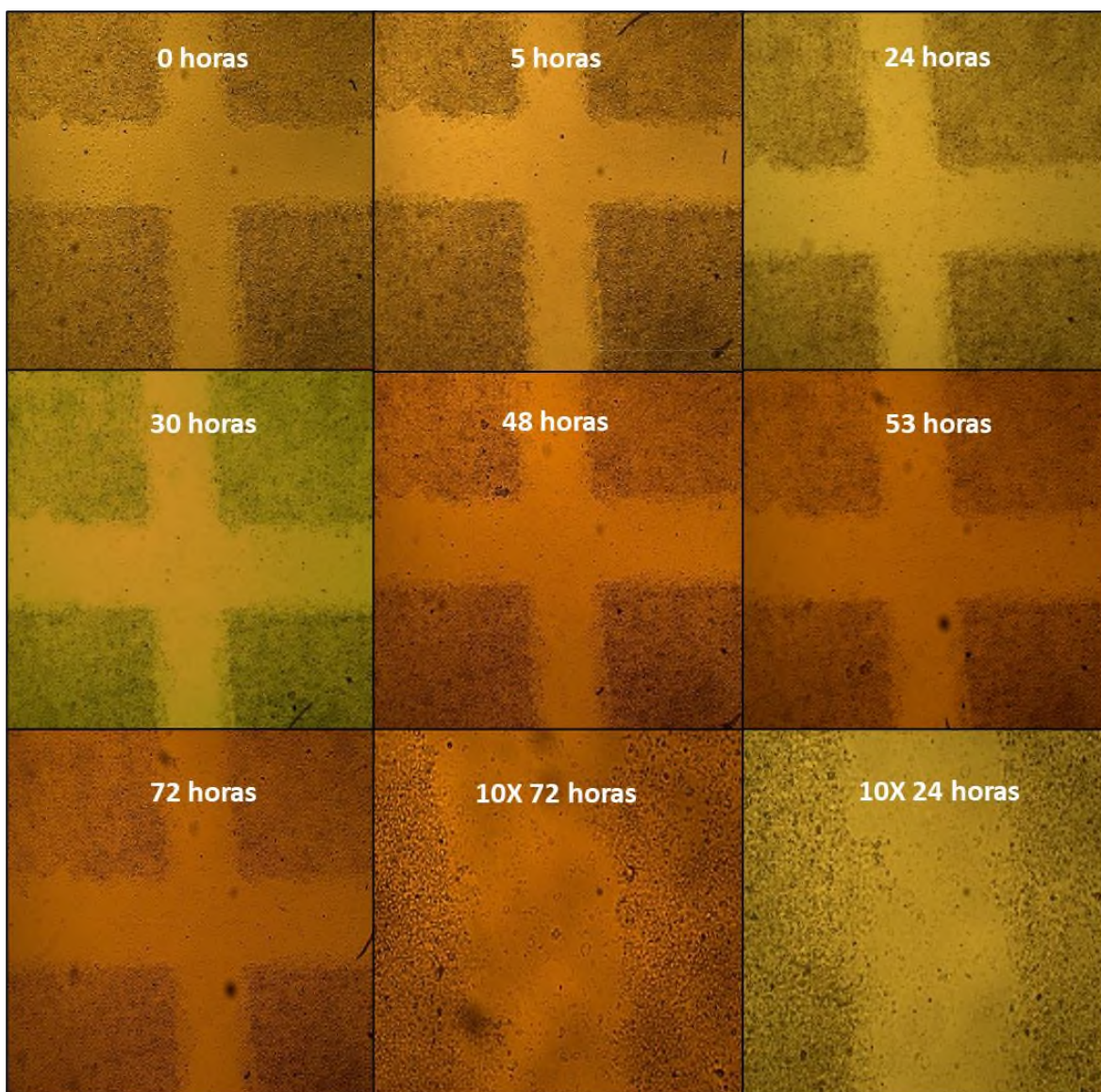


Figura 20. Micrografías con tratamiento de la proteína AX-2 con una concentración de 17.68  $\mu\text{g}/\text{mL}$  con medio RPMI 1% de SFB de 0 a 72 h.

El resumen de las áreas obtenidas en los diferentes tiempos de los controles y los tratamientos con la parasporina MCF-7 se presentan en la Figura 21. Como se puede observar el control positivo presentó una leve disminución hasta las 24 h seguida de otra entre los 48 y 53 h quedando por arriba del 80% de cierre de herida, lo que indicó que no tuvo mucha migración. Mientras que el control negativo tiene una disminución del porcentaje de cierre en función al tiempo de incubación, cerrando aproximadamente hasta el 50% por lo que podemos decir que el control negativo tuvo una mayor migración que el control positivo. Por otro lado, los tratamientos con la parasporina prácticamente no

mostraron cambios en el porcentaje de cierre de herida en función del tiempo de incubación. Lo anterior indica que, aunque la parasporina AX-2 no presentó toxicidad contra la línea celular MCF-7, si detiene su migración. Lo que la hace un potencial fármaco para mantener localizado el crecimiento de células cancerígenas.

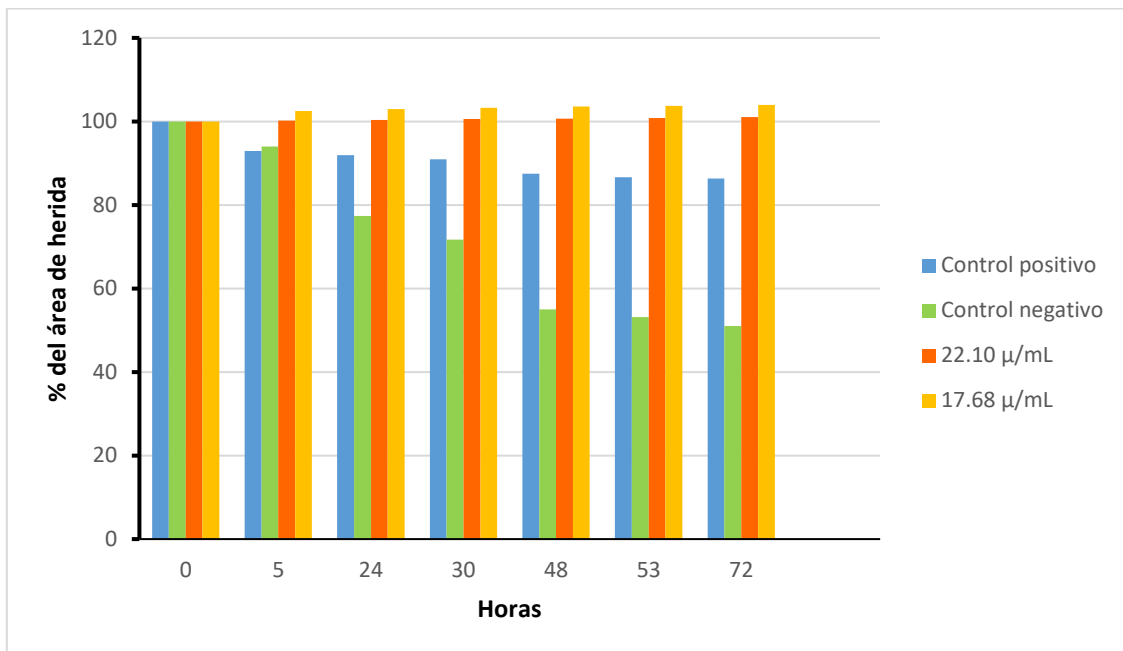


Figura 21. Áreas obtenidas de la técnica de herida de los tratamientos con la parasporina AX-2 en la línea celular MCF-7 a diferentes tiempos. El porcentaje del cierre de herida se calculó con respecto a la hora 0 de cada control y tratamiento con la proteína AX-2. Como control negativo fue utilizado PBS al 1 X y Doxorubicina con una concentración de 4 µM como control positivo.

Cabe recalcar que no hay estudios con los cuales podemos comparar la técnica de herida tratada con una parasporina en la línea celular MCF-7. Pero esta técnica se ha probado en dicha línea celular con tratamientos de prolactina. En dicho ensayo se buscaba saber si la prolactina promovía la migración colectiva en la línea celular MCF-7 en medio RPMI al 1%. Los autores observaron que la prolactina aumentó la migración celular en 100000 µm<sup>2</sup> (Reyes, 2021). Por otro lado, la técnica de herida se ha probado en la línea celular MCF-7 con tratamiento de melatonina y como control positivo la Doxorubicina (Menéndez, 2020). Se observó que la melatonina inhibió la migración con un 20% y el potencial invasivo en las células MCF-7 (Menéndez, 2020). En otro estudio de la línea celular MCF-7 con tratamiento de Aloperina extraído de *S. alopecuroide*, el cual tiene actividades antitumorales (Tian et al.,2018). Se observó que la Aloperina sí inhibió la migración e invasión de la línea celular

MCF-7 con un 35% de inhibición en la migración en dicha línea celular (Tian et al.,2018). Los *cladosporioides* son hongos endofíticos de algas marinas identificados como *Cladosporium cladosporioides* y fue probado como tratamiento para la migración de la línea celular MCF-7 con un periodo de incubación de 48 horas y una concentración de 1 mg/mL, comparando con un fármaco llamado Talidomida, en el cual el tratamiento probó ser inhibitorio en dicha línea celular con un 40 % con respecto al control negativo (Hulikelere et al.,2016). Por ello podemos decir que el medio utilizado (RPMI al 1%) funcionó para estandarizar la técnica de herida, y que nuestro tratamiento de la proteína AX-2 no se encuentra dentro de lo reportado con tratamiento de parasporinas sin embargo esta proteína ha sido capaz de inhibir la migración en la línea celular MCF-7.

## 9. Conclusiones

- Se estandarizó la técnica de cierre de la herida en la línea celular MCF-7, las condiciones en medio RPMI al 1 % de SFB, con aumentos de 4X y 10X para las micrografías e incubadas a 5% de CO<sub>2</sub> por 72 h a 37 °C.
- En el medio RPMI basal presenta muerte celular por falta de nutrientes a las 72 h y cambio morfológico, es decir, no conservaron su forma poligonal las células.
- En el medio RPMI al 1% de SFB hubo migración a partir de las 24 h y durante todo el ensayo conservaron su forma poligonal.
- El medio DMEM basal a las 48 h presenta cambios morfológicos de muerte celular, además de perder su forma poligonal.
- En el medio DMEM al 1% de SFB hubo migración desde las 24 h con cambios morfológicos celulares, es decir, perdieron su forma poligonal.
- La proteína AX-2 tuvo la capacidad de inhibir la migración de la línea celular MCF-7 en un 30% para la concentración de 22.10 µg/mL y un 28% para la concentración de 17.68 µg/mL.
- La proteína AX-2 no tuvo actividad hemolítica significativa con concentraciones de 1.25, 2.5, 5 y 7.5 µg/mL.

## 10. Referencias

1. Aberkane, L., Nacer-Khodja, A., Djenane, Z., Djouadi, L. N., Ouafek, A., Bouslama, L., Grib, H., Mameri, N., Nateche, F., & Djefal, A. (2020). In Vitro Cytotoxicity of Parasporins from Native Algerian *Bacillus Thuringiensis* Strains Against Laryngeal and Alveolar Cancers. *Current Microbiology*, 77(3). <https://doi.org/10.1007/s00284-019-01841-2>
2. Akiba, T. & Okumura, S. (2016). Parasporins 1 and 2: Their structure and activity. *Journal of Invertebrate Pathology* 142: 44–49.
3. American Society of Clinical Oncology., (2018). The Genetics of Cancer. Aprobado por el consejo editorial de Cancer.Net. ASCO. Recuperado de: <https://www.cancer.net/navigating-cancer-care/cancer-basics/genetics/genes-and-cancer>
4. Avignone-Rosa, C. & Mignone, C. (1995). EFECTO DE DISTINTAS CONDICIONES DE CULTIVO SOBRE LA TOXICIDAD Y ESPORULACION DE *BACILLUS THURINGIENSIS* var. *ISRAELENSIS*. [Tesis Doctoral]. Universidad Nacional de la Plata.
5. Beena, V., Ramnath, V., Sreekumar, K. P., 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).
6. Bellamy, W.T. (1992). Prediction of response to drugs therapy of cancer: a review of in vitro assay. *Drugs*. 44 (5): 690-708.
7. Bustamante, L. M., Marín, S. J., & Cardona, D. (2012). Mortalidad por cáncer: segunda causa de muerte del adulto mayor en Medellín, 2002-2006. *Revista Facultad Nacional de Salud Pública*, 30(1), 17-25.
8. Butko, P. (2003). Cytolytic Toxin Cyt1A and Its Mechanism of Membrane Damage: Data and Hypotheses. *applied and environmental microbiology* 69:2415–2422. doi:10.1128/AEM.69.5.2415-2422.2003
9. Castro de Pardo, C. (2006). Pruebas de tamizaje para determinar efectos citotóxicos en extractos, fracciones o sustancias, utilizando la prueba del MTT. Recuperado de: [http://publications.iupac.org/cd/medicinal\\_chemistry/Practica-IV-2.pdf](http://publications.iupac.org/cd/medicinal_chemistry/Practica-IV-2.pdf)
10. Centro de información de medicamentos (CIM) de la SEDESA. (2016). Boletín CIM2016-1: Medicamentos para el cáncer de mama.

11. Condeelis, J., & Segall, J. E. (2003). Intravital imaging of cell movement in tumours. *Nature Reviews Cancer*, 3(12), 921-930.
12. Cruz Nolasco, A. (2017). Síntesis de nanoliposomas que contienen parasporinas de *Bacillus thuringiensis* con actividad antiproliferativa. (Tesis de Maestría, Universidad del Papaloapan, Campus Tuxtepec, México).
13. Cruz-Nolasco, A. (2014). Aislamiento e identificación de cepas de *Bacillus thuringiensis* productoras de proteína Cry. Tesis de Licenciatura. Universidad del Papaloapan, México.
14. Diario Oficial de la Federación. (2015). Disponible en: [http://dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=5194157&fecha=09/06/2011](http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5194157&fecha=09/06/2011)
15. Dulmage, H. T. (1971). Production of  $\delta$ -endotoxin by eighteen isolates of *Bacillus thuringiensis*, serotype 3, in 3 fermentation media. *Journal of Invertebrate Pathology*, 18(3). [https://doi.org/10.1016/0022-2011\(71\)90037-1](https://doi.org/10.1016/0022-2011(71)90037-1)
16. Ellis, R.E., Yuan, J.Y. & Horvitz, H.R. (1991). Mechanisms and functions of cell death. *Annual Review of Cell Biology* 7: 663–698.
17. Eyles, J., Puaux, A. L., Wang, X., Toh, B., Prakash, C., Hong, M. (2010). Tumor cells disseminate early, but immunosurveillance limits metastatic outgrowth, in a mouse model of melanoma. *J. Clin. Investig.* 120:2030–2039.
18. Farrera, R.R. (1998) Efecto del medio de cultivo sobre la esporulación y síntesis de cry1A(c) en *Bacillus thuringiensis* var. kurstaki HD-73. Tesis Doctoral CINVESTAV-IPN.
19. Fearon, E. R. & Vogelstein, B. A. (1990). genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61:759–767.
20. Fernández-Chapa, D., Ramírez-Villalobos, J., & Galán-Wong, L. (2019). Toxic potential of *Bacillus thuringiensis*: an overview. *Protecting Rice Grains in the Post-Genomic Era*.
21. Greene, F. L. & Sobin, L. H. (2008). The staging of cancer: a retrospective and prospective appraisal. *CA Cancer J. Clin.* 58:180–190 (2008).
22. Hulikere M., Joshi, C. G., Jagadeesha P., & Ananda D. (2016). Antiangiogenic, wound healing and antioxidant activity of *Cladosporium cladosporioides* (Endophytic Fungus). From ResearchGate website:

- [https://www.researchgate.net/publication/311648684\\_Antiangiogenic\\_wound\\_healing\\_and\\_antioxidant\\_activity\\_of\\_Cladosporium\\_cladosporioides\\_Endophytic\\_Fungus\\_isolated\\_from\\_seaweed\\_Sargassum\\_wightii](https://www.researchgate.net/publication/311648684_Antiangiogenic_wound_healing_and_antioxidant_activity_of_Cladosporium_cladosporioides_Endophytic_Fungus_isolated_from_seaweed_Sargassum_wightii)
23. INEGI (2021). Estadísticas a propósito del día mundial contra el cáncer. Comunicado de prensa num. 105
  24. 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.
  25. Justus, C.R., Leffler, N., Ruiz-Echevarria, M., Yang, L.V. In vitro Cell Migration and Invasion Assays. *J. Vis. Exp.* (88), e51046, doi:10.3791/51046 (2014).
  26. Kam, Y., Guess, C., Estrada, L., Weidow, B., Quaranta, V. (2008). A novel circular invasion assay mimics in vivo invasive behavior of cancer cell lines and distinguishes single- cell motility in vitro. *BMC Cancer*.
  27. Katamaya, H., Shi, M., Kusaka, Y. & Shi, K. (2011). Parasporin-1 receptor and use thereof. Patent Application Publication.
  28. Klein, C. A. (2009). Parallel progression of primary tumours and metastases. *Nat. Rev. Cancer* 9:302–312.
  29. Komen, S. (2015). La genética y el cáncer de seno. Recuperado de: [www.komen.org](http://www.komen.org)
  30. Krishnan, V. (2013). Investigation of parasporins, the cytotoxic proteins from the bacterium *Bacillus thuringiensis* (Doctoral dissertation, University of Sussex).
  31. Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural protein during the assembly of head of the bacteriophage T4. *Nature* 227:680–685.
  32. Medina, G. (2017). Características clínicas y pronósticos de los subtipos moleculares de cáncer de mama determinados por inmunohistoquímica. Arequipa, Perú. *Rev. Perú. med. exp. salud pública* vol:34 no.3
  33. Mitrus, I., Bryndza, E., Sochanik, A., & Szala, S. (2012). Evolving models of tumor origin and progression. *Tumor Biology*, 33(4), 911-917.
  34. 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*. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 7: 625–634. <http://dx.doi.org/10.1128/CDLI.7.4.625-634.2000>.
35. National Cancer Institute. (2015). Age and cancer risk. <https://www.cancer.gov/about-cancer/causes-prevention/risk/age>
36. Navarro, K. (2001). Modelo termodinámico: Producción de proteína Cry por *Bacillus thuringiensis*. Tesis de Maestría. CINVESTAV. México.
37. Okumura, S., Ohba, M., Mizuki, E., Crickmore, N., Côté, J.C., Nagamatsu, Y., Kitada, S., Sakai, H., Harata, K. & Shin, T. (2010). "Parasporin nomenclature" <http://parasporin.fitc.pref.fukuoka.jp/>.
38. Organización Mundial de la Salud. (2018). Cáncer. Recuperado de: [https://www.who.int/es/health-topics/cancer#tab=tab\\_1](https://www.who.int/es/health-topics/cancer#tab=tab_1)
39. Organización mundial de la salud. (2021). Cáncer de mama. Recuperado de <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/breast-cancer>
40. Pigott, C.R., Rey, M.S., Ellar, D.J. (2008). Investigating the Properties of *Bacillus thuringiensis* Cry Proteins with Novel Loop Replacements Created Using Combinatorial Molecular Biology. applied and environmental microbiology 74(11):3497–3511. doi:10.1128/AEM.02844-07
41. Poornima, K., Selvanayagam, P., & Shenbagarathai, R. (2010). Identification of native *Bacillus thuringiensis* strain from South India having specific cytotoxic activity against cancer cells. Journal of Applied Microbiology, 109(1). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2010.04697.x>
42. Reyes, L. (2019). Actividad anti tumoral in vitro de compuestos derivados de la curcumina sobre células de cáncer de mama humano. [Tesis de licenciatura, universidad de Talca]. Repositorio institucional Universidad de Talca. <http://dspace.otalca.cl/bitstream/1950/11987/5/20190101.pdf>
43. Riggio, A.I., Varley, K.E. & Welm, A.L. (2021). The lingering mysteries of metastatic recurrence in breast cancer. British Journal of Cancer 124:13-26.
44. Ryan, K. M. (2011). P53 and autophagy in cancer: Guardian of the genome meets guardian of the proteome. European Journal of Cancer 47(1): 44–50.

45. Sabiá Júnior, E. F. (2015). Detecção e caracterização de proteínas parasporinas em *Bacillus thuringiensis*. (Tesis de Maestría, Universidad de Brasília, Brasília).
46. Sajid M, Geng C., Li M, Wang Y., Liu H, Zheng J., Peng D, Sun M. (2018). Whole-Genome Analysis of *Bacillus thuringiensis* Revealing Partial Genes as a Source of Novel Cry Toxins.
47. Sánchez, N. C. (2013). Conociendo y comprendiendo la célula cancerosa: Fisiopatología del cáncer. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 24(4), 553-562.
48. Santos, E. N., Menezes, L. P., Dolabella, S. S., Santini, A., Severino, P., Capasso, R., Zielinska, A., Souto, E. B., & Jain, S. (2022). *Bacillus thuringiensis*: From biopesticides to anticancer agents. In *Biochimie* (Vol. 192). <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2021.10.003>
49. Sauka, D. & Benintende, G. (2008). *Bacillus thuringiensis*: generalidades. Un acercamiento a su empleo en el biocontrol de insectos lepidópteros que son plagas agrícolas. *Revista Argentina de Microbiología* 40: 124-140.
50. Secretaría de Salud del Distrito Federal (2014). Agenda Estadística. Disponible en: [http://www.salud.df.gob.mx/portal/media/agenda2014\\_portal/inicio.html](http://www.salud.df.gob.mx/portal/media/agenda2014_portal/inicio.html)
51. Shirazi, F.H. (2011). Remarks in Successful Cellular Investigations for Fighting Breast Cancer Using Novel Synthetic Compounds. In: *Breast Cancer – Focusing Tumor Microenvironment, Stem Cells and Metastasis* (Gunduz M, Gunduz E (eds.). Rijeka, InTech, pp. 85-102).
52. Spano, D., Heck, C., De Antonellis, P., Christofori, G., & Zollo, M. (2012). Molecular networks that regulate cancer metastasis. In *Seminars in cancer biology* 3: 234-249.
53. Talmadge, J. E., & Fidler, I. J. (2010). AACR centennial series: the biology of cancer metastasis: historical perspective. *Cancer research*, 70(14), 5649-5669.
54. Tian, D., Li, Y., Li, X., & Tian, Z. (2018). Aloperine inhibits proliferation, migration and invasion and induces apoptosis by blocking the Ras signaling pathway in human breast cancer cells. *Molecular Medicine Reports*. <https://doi.org/10.3892/mmr.2018.9419>

55. Valent, P., Bonnet, D., De Maria, R., Lapidot, T., Copland, M., Melo, JV, ... & Eaves, C. (2012). Definiciones y terminología de células madre cancerosas: el diablo está en los detalles. *Nature Reviews Cancer*, 12 (11), 767-775.
56. Van De Vijver, M. J., He, Y. D., Van't Veer, L. J., Dai, H., Hart, A. A., Voskuil, D. W., ... & Bernards, R. (2002). A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *New England Journal of Medicine*, 347(25), 1999-2009.
57. Van Meerloo, J., Kaspers, G. J.L. & Cloos, J. (2011). Cell Sensitivity Assays: The MTT Assay. *Cancer Cell Culture: Methods and Protocols, Second Edition Methods in Molecular Biology* vol 731. DOI 10.1007/978-1-61779-080-5\_20
58. Vang Mouritzen, M., Jenssen, H. Optimized Scratch Assay for In Vitro Testing of Cell Migration with an Automated Optical Camera. *J. Vis. Exp.* (138), e57691, doi:10.3791/57691 (2018).
59. Velásquez, C., Rojas, T., Cerón S. (2018). Proteínas de *Bacillus thuringiensis* con actividad citotóxica: Parasporinas. *Revista Colombiana de Biotecnología* 2: 89-100.
60. Vesely, M. D., Kershaw, M. H., Schreiber, R. D., & Smyth, M. J. (2011). Natural innate and adaptive immunity to cancer. *Annual review of immunology*, 29, 235-271.
61. Vilas-Bôas, G. T., Peruca, A. P. S., & Arantes, O. M. N. (2007). Biology and taxonomy of *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis*, and *Bacillus thuringiensis*. *Canadian journal of microbiology*, 53(6), 673-687.
62. Vitelli-Flores, J., Gajardo, R., Lage, L., Fajardo, Y., Dorta, B., & Vidal Rodríguez, L. (2010). Aislamiento y caracterización molecular, ribotipificación, de cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* aisladas en suelos y larvas muertas de *Hylesia metabus* en la región nororiental de Venezuela. *Rev. Soc. Venez. Microbiol*, 30(2).
63. Xu, C., Wang, BC., Yu, Z. & Sun, M. (2014). Structural insights into *Bacillus thuringiensis* Cry, Cyt and parasporin toxins. *Toxins* 6(9): 2732-2770.
64. Xu, C., Wang, BC., Yu, Z. & Sun, M. (2014). Structural insights into *Bacillus thuringiensis* Cry, Cyt and parasporin toxins. *Toxins* 6(9): 2732-2770.
65. Yasutake, K., Binh, ND., Kagoshima, K., Uemori, A., Ohgushi, A., Maeda, M., Mizuki, E., Yu, YM. & Ohba, M. (2006). Occurrence of parasporin-producing *Bacillus thuringiensis* in Vietnam. *Can. J. Microbiol* 52: 365-372.

66. Yasutake, K., Binh, ND., Kagoshima, K., Uemori, A., Ohgushi, A., Maeda, M., Mizuki, E., Yu, YM. & Ohba, M. (2006). Occurrence of parasporin-producing *Bacillus thuringiensis* in Vietnam. *Can. J. Microbiol* 52: 365-372.