



**UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN**  
CAMPUS TUXTEPEC

---

---

OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO DE AISLAMIENTO DE  
PROTEÍNAS DE ORIGEN PARASPORAL PRODUCIDA  
POR LA CEPA AC8 de *Bacillus thuringensis*

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

Maestra en Biotecnología

PRESENTA:

PALOMA DE LOS ÁNGELES GARCÍA MUÑOZ

DIRECTOR:

DR. MIGUEL ÁNGEL PEÑA RICO

CODIRECTORA:

DRA. ANA KARÍN NAVARRO MARTÍNEZ

SAN JUAN BAUTISTA TUXTEPEC, OAXACA

2023



# UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

## DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

OFICIO	DEP-MB/2023/094
ASUNTO	Autorización de impresión de tesis

San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, a 20 de octubre de 2023

**DRA. TANIA ZÚNIGA MARROQUÍN**  
**ENCARGADA DEL DESPACHO DE LA VICERRECTORÍA ACADÉMICA**  
**UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN**

Sirva la presente para informarle que, el jurado evaluador del examen para obtener el grado de **Maestra en Biotecnología** de la **IB. Paloma de los Ángeles García Muñoz**, con número de **Matrícula 21140001**, ha autorizado la impresión del manuscrito que lleva por título "**Optimización del método de aislamiento de proteínas de origen parasporal producida por la cepa AC8 de *Bacillus thuringiensis***", para su posterior presentación y defensa por el sustentante.

Agradezco su atención y quedo a sus órdenes para cualquier duda o aclaración.

Atentamente  
*terra uberrima, mens aperta*  
 Bøu Lo-tama, chí jí jú



**Dr. José Abad Zavaleta**  
 Jefe de la División de Estudios de Posgrado



C.c.p. Dr. Miguel Ángel Peña Rico – Director de tesis.  
 C.c.p. Dra. Blanca Estela Barrera Figueroa – Coordinadora de la Maestría en Biotecnología.  
 C.c.p. M. E. Yesenia Barrientos Arenal – Jefa del Departamento de Servicios Escolares.  
 C.c.p. Archivo.

**CAMPUS TUXTEPEC**  
 C. Circuito central No. 200, Col. Parque Industrial.  
 C.P. 38301, Tuxtepec, Oax.  
 Tel. 01(287)8759240

[www.unpa.edu.mx](http://www.unpa.edu.mx)

**CAMPUS LOMA BONITA**  
 Av. Ferrocarril S/N, Ciudad universitaria.  
 C.P. 68400, Loma Bonita, Oax.  
 Tel. 01(281)8729230



# UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

## DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

OFICIO	DEP-MBT/2023/095
ASUNTO	Jurado para examen de grado

San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, a 20 de octubre de 2023

**IB. PALOMA DE LOS ÁNGELES GARCÍA MUÑOZ**  
**MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA**  
**UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN**

Por este medio le informo que el jurado de su examen para obtener el grado de **Maestra en Biotecnología** estará integrado por los siguientes investigadores.

Profesor Investigador	Jurado de Examen
Dr. Adolfo López Torres	Presidente
Dr. Miguel Ángel Peña Rico	Vocal
Dr. Paul Mauricio Sánchez Ocampo	Secretario
Dr. José Abad Zavaleta	Primer Suplente
Dra. Ana Karin Navarro Martínez	Segundo Suplente

Sin más por el momento, le envío saludos cordiales.

Atentamente

*terra uberrima, mens aperta*  
 Bøu Lo-tama, ch'í jí jú

  
**Dr. José Abad Zavaleta**  
 Jefe de la División de Estudios  
 de Posgrado



  
**Dra. Tania Zúñiga Marroquín**  
 Encargada del despacho de la  
 Vicerrectoría Académica  
 Vo. Bo.



C.c.p. Dr. Miguel Ángel Peña Rico – Director de tesis.  
 C.c.p. Dra. Blanca Estela Barrera Figueroa – Coordinadora de la Maestría en Biotecnología.  
 C.c.p. M. E. Yesenia Barrientos Arenal – Jefa del Departamento de Servicios Escolares.  
 C.c.p. Archivo

**CAMPUS TUXTEPEC**  
 C. Circuito central No. 200, Col. Parque Industrial.  
 C.P. 38301, Tuxtepec, Oax.  
 Tel. 01(287)8759240

[www.unpa.edu.mx](http://www.unpa.edu.mx)

**CAMPUS LOMA BONITA**  
 Av. Ferrocarril S/N, Ciudad universitaria.  
 C.P. 68400, Loma Bonita, Oax.  
 Tel. 01(281)8729230

## Hoja de Originalidad

El presente trabajo no ha sido aceptado o empleado para el otorgamiento de título o grado diferente o adicional al actual. La tesis es resultado de las investigaciones del autor, excepto donde se indican las fuentes de información consultadas. El autor otorga su consentimiento a la **Universidad del Papaloapan** para la reproducción del documento con el fin del intercambio bibliotecario siempre y cuando se indique la fuente.

## Agradecimientos

Quiero expresar mi más profundo agradecimiento a la **Universidad del Papaloapan** Campus Tuxtepec por abrirme las puertas y contribuir en mi formación profesional.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (**CONAHCYT**) por la beca otorgada y por fomentar la investigación científica en México a través de su programa de becas para estudiantes de posgrado.

A mi asesor el **Dr. Miguel Ángel Peña Rico** quien con su dirección, conocimiento, paciencia y enseñanza, permitió el desarrollo de este trabajo.

A la **Dra. Luz del Carmen Camacho Castillo**, por sus aportes a mi proyecto, y el apoyo recibido.

Al jefe de posgrado el **Dr. José Abad Zabaleta** y a la coordinadora de posgrado la **Dra. Blanca Estela Barrera Figueroa**, por su gran apoyo a lo largo de mi proyecto de maestría y las facilidades otorgadas.

Al personal que forma parte del centro de investigaciones científicas, a la química **Lety, Bety y a Diego** por su amabilidad y gran calidad humana.

Al **Dr. Lucio, la Dra. Delia, la Dra. Rubí, el Dr. Alejandro, la Dra. Ariana y el Dr. Paul** por su paciencia, los consejos y los conocimientos que me brindaron durante mis clases en la maestría.

## Dedicatoria

Este trabajo se lo dedico a Dios por brindarme la sabiduría para lograr mis objetivos y ser mi principal guía lo largo de este proyecto. Bendito y alabado seas por siempre.

A mis queridos padres **José Luis y Paulina**, por su apoyo incondicional, sus palabras de aliento y por enseñarme a lograr mis propósitos. Ustedes son el pilar de mi vida, los amo profundamente.

A mis hermanos **Miguel y Pepe**, por sus cuidados y consejos de adultos, también por sus regaños, los amo mucho.

A mi sobrino **José Miguel**, por ser la chispa que le da alegría a mi hogar, gracias por elegirme de tía, aunque ahora no lo entiendas por ser pequeño, esto va para ti.

A mi cuñada y amiga **Perla** por las carcajadas, los consejos y tu compañía a lo largo de mi crecimiento profesional y ser la hermana que no tuve, te quiero montones.

A mi prometido y compañero de vida **Alejandro**, gracias por estar conmigo bajo cualquier circunstancia y nunca soltarme, por tu apoyo a lo largo de este proyecto e inspirarme a cada día ser mejor. Te amo con todo mi corazón, esto apenas empieza.

A mi mejor amiga **Vivi** por ser la mejor confidente y enseñarme el verdadero valor de la amistad a pesar de los años, te adoro.

A mis compañeros y amigos **Bri, Dani, Mitzi, Sibel y Ángel** gracias por hacer más amena mi estadía en el laboratorio, por las grandes pláticas de todo y de nada. Los recordaré con mucho cariño.

A **Flavio, Hideky, Tere y Mariela** por el gran ambiente en el cubículo, con sus ocurrencias y bromas, extrañaré las grandes pláticas cafeteras. ¡Gracias por todo!

## CONTENIDO

1. RESUMEN .....	13
2. ABSTRAC .....	14
3. INTRODUCCIÓN.....	15
4. MARCO TEÓRICO .....	16
4.1 <i>B. thuringensis</i> .....	16
4.2 Ciclo celular de <i>B. thuringiensis</i> .....	16
4.3 Parasporinas (PS).....	18
4.4 Clasificación de las parasporinas.....	18
4.5 Cáncer.....	20
4.6 Cáncer de mama.....	23
4.7 Etapas del cáncer.....	24
4.8 Tratamientos contra el cáncer .....	25
4.9 Producción y purificación de parasporinas .....	28
4.9.1 Producción de PS.....	28
4.9.2 Purificación de cristales proteicos .....	29
5. JUSTIFICACIÓN .....	31
6. HIPÓTESIS.....	32
7. OBJETIVOS.....	33
7.1 Objetivo general .....	33
7.2 Objetivos específicos.....	33
8. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	34
9. MATERIALES Y MÉTODOS .....	35
9.1 Producción de cristales proteicos de la cepa AC8 de <i>B. thuringiensis</i> .....	35
9.1.1 Medio líquido.....	35
9.2 Recuperación de los cristales proteicos .....	35
9.2.1 Medio líquido.....	35
9.2.2 Medio sólido .....	36
9.3 Determinación morfológica de los cristales proteicos mediante SEM.....	36
9.4 Aislamiento de los cristales proteicos mediante electroforesis SDS-PAGE.....	37
9.5 Purificación de los extractos proteicos.....	37

---

9.6 Ensayos en la línea celular MCF-7 .....	38
9.7 Ensayos de bioseguridad.....	38
9.7.1 Células mononucleares de sangre periférica .....	38
9.7.2 Ensayo de hemólisis .....	39
9.8 Ensayos de citotoxicidad.....	39
9.8.1 Método del 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol.....	39
9.8.2 Ensayo de rojo neutro .....	39
10. ANALISIS ESTADÍSTICOS.....	40
11. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	41
11.1 Producción de cristales proteicos de <i>B. thuringensis</i> .....	41
11.2 Purificación de los cristales parasporales y morfología por SEM.....	44
11.3 Perfil de separación de proteínas y selección de las bandas proteicas.....	47
11.4 Purificación de los extractos proteicos .....	48
11.5 Ensayo de citotoxicidad en células mononucleares de sangre periférica .....	51
11.6 Ensayo de citotoxicidad en eritrocitos .....	53
11.7 Ensayos de citotoxicidad con MTT y rojo neutro en células MCF-7 .....	54
11.8 Cambios morfológicos por las proteínas de 14 y 26 kDa en células MCF-7 .	58
12. CONCLUSIONES.....	60
13. PERSPECTIVAS.....	61
14. BIBLIOGRAFÍA.....	62
14. ANEXOS.....	74

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Micrografía de <i>B. thuringensis</i> completamente esporulado.....	16
Figura 2. Diagrama esquemático del proceso de esporulación de <i>B. thuringensis</i> . .....	17
Figura 3. Representación de los mecanismos de muerte celular de las PS.....	20
Figura 4. Tasa de defunciones por tumores malignos por año de registro en México...	22
Figura 5. Incidencia de cáncer de mama en mujeres de 20 años o más.....	22
Figura 6. Representación gráfica de los tipos de carcinomas de mama .....	23
Figura 7. Medios de cultivo empleados en la evaluación de cristales proteicos .....	42
Figura 8. Monitoreo del crecimiento de <i>B. thuringensis</i> .....	43
Figura 9. Cristales proteicos de <i>B. thuringensis</i> .....	43
Figura 10. Tinción de esporas con verde malaquita. ....	45
Figura 11. Tinción de cristales con azul de coomassie. ....	45
Figura 12. Micrografías de la proteína de AC8 de <i>B.thuringensis</i> con SEM. ....	46
Figura 13. Perfil de separación de proteínas de AC8 en gel de poliacrilamida al 12%.	48
Figura 14. Perfil de separación de proteínas AC8 de <i>B.thuringensis</i> . ....	50
Figura 15. Curva dosis respuesta con las proteínas AC8 de <i>B. thuringensis</i> .....	52
Figura 16. Gráfica de hemólisis de las proteínas de 12, 26,32, 40, 66 y 87 kDa.....	54
Figura 17. Gráfica de viabilidad celular con MTT y rojo neutro en células MCF-7.....	57
Figura 18. Cambios morfológicos inducidos por las proteínas de 14 y 26 kDa. ....	59

---

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características de algunas <i>PS</i> .....	19
Tabla 2. Descripción de los estadios del cáncer.....	25
Tabla 3. Quimioterapéuticos más comunes usados en el cáncer de mama.....	26
Tabla 4. Efectos secundarios de los tratamientos oncológicos más comunes .....	27
Tabla 5. Concentraciones proteicas y rendimientos. ....	50
Tabla 6. Actividad hemolítica producida por las proteínas AC8 de <i>B. thuringensis</i> .....	54

## ABREVIATURAS

AJCC-TNM- Comité conjunto Americano del cáncer

CMSP-Células Mononucleares de Sangre Periférica

Cyt- Citolítico

DNA- Ácido Desoxirribonucleico

HCl- Ácido Clorhídrico

HeLa- Línea celular de Cáncer Cervicouterino

INEGI- Instituto Nacional de Estadística y Geografía

KDA- Kilodalton

UV- Ultravioleta

MTT - 3-(4,5)-Dimetilialzólil -2,5 Difeniltetrazólio

NaOH- Hidróxido de Sodio

OMS- Organización Mundial de la Salud

OMS- Organización Mundial de la Salud

PS- Parasporinas

RE-Receptor de estrógeno

SEM- Microscopia electrónica de barrido

SFB - Suero Fetal Bovino

VPH- Virus del papiloma humano

HER2- Receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano

NIH- Instituto Nacional del cáncer

SDS-PAGE– Dodecil Sulfato de Sódio- Gel de Electroforesis de Poliacrilamida

TNBC- Cáncer de mama triple negativo

MOLT-4-Línea de células de linfoblastos T

PBS – Buffer de Fosfatos Salinos

RPMI 1640- Roswell Park Memorial Institute

MCF-7 – Michigan Cáncer Foundation-7

RP-Receptor de progesterona

*Bt- Bacillus thuringiensis*

HepG2.2-Línea celular de carcinoma hepatocelular humano

DMSO – Dimetilsulfóxido

DMEM - Dulbecco Modified Eagle Medium

TCA- Ácido tricloroacético

SDS - Dodecil Sulfato de Sódio

HL60-Células de leucemia promielocítica humana

rpm-Revoluciones por minuto

P/V- Peso volumen

mg- Miligramo

g/L-Gramos por litro

°C- Grados centígrados

hr. -hora

min-Minutos

L-Litro

lb-Libra

V- Volt

mM – milimol

μL- microlitro

## 1. RESUMEN

Las Parasporinas (PS) producidas a partir de *Bacillus thuringensis* han sido reconocidas por su efecto citotóxico en algunos tipos de cáncer y tienen la capacidad de discriminar entre células cancerígenas y no cancerígenas. Estas propiedades han impulsado a investigadores a mejorar las condiciones para optimizar el proceso de este cultivo bacteriano, así como la recuperación y purificación de dichas proteínas, con el objetivo de proponerlas como una alternativa terapéutica en el tratamiento contra el cáncer.

Actualmente, en el grupo de trabajo existen protocolos para aislar proteínas (PS) de *B. thuringensis*, sin embargo, dichos protocolos carecen de reproducibilidad, por lo que el objetivo de este trabajo de investigación fue la utilización e implementación de cultivos en medio líquido (caldo nutritivo) y sólido (agar nutritivo), así como la recuperación y aislamiento mediante electroforesis SDS-PAGE, además, se evaluaron tres métodos de purificación para la obtención de mayor rendimiento proteico.

Los resultados demostraron que el cultivo en medio sólido permitió una producción abundante de cristales proteicos con pesos moleculares de 14, 26, 32, 40, 66 y 87 kDa y una morfología esférica con superficie ondulada. El método de electroelución y ultrafiltración demostraron concentrar la mayor cantidad de proteínas y eliminar los interferentes. Por último, los ensayos de seguridad farmacológica demostraron que las proteínas de 14, 26, 32, 66 y 87 kDa no generan daño en células sanas y las proteínas de 14 y 26 kDa son PS con efecto citotóxico en la línea celular MCF-7 de cáncer de mama.

## 2. ABSTRAC

Parasporins (PS) produced from *Bacillus thuringensis* have been recognized for their cytotoxic effect in some types of cancer and their ability to discriminate between cancerous and non-cancerous cells. These properties have prompted researchers to improve the conditions to optimize the process of this bacterial culture, as well as the recovery and purification of these proteins, to propose them as a therapeutic alternative in the treatment of cancer.

Currently, in the working group, there are protocols to isolate proteins (PS) from *B. thuringensis*, however, these protocols lack reproducibility, so the objective of this research work was the use and implementation of cultures in a liquid medium (nutrient broth) and solid (nutrient agar), as well as the recovery and isolation by SDS-PAGE electrophoresis, in addition, three purification methods were evaluated to obtain higher protein yield.

The results demonstrated that cultivation in a solid medium allowed abundant production of protein crystals with molecular weights of 14, 26, 32, 40, 66, and 87 kDa, a spherical morphology with a wavy surface. The electroelution and ultrafiltration methods demonstrated to concentrate the greatest amount of proteins and eliminate interferents. Finally, pharmacological safety trials demonstrated that the 14, 26, 32, 66, and 87 kDa proteins do not cause damage to healthy cells and the 14 and 26 kDa proteins are PS with a cytotoxic effect on the MCF-7 cell line breast cancer.

### 3. INTRODUCCIÓN

*B. thuringensis* es una bacteria que en su etapa de esporulación produce cristales parasporales (Mizuki et al., 1999). La producción de estos cristales es mediada por las tensiones ambientales que sufre la bacteria y la necesidad de mantener su linaje celular. Además, están constituidos por proteínas *Cyt*, *Cry* y parasporinas (*PS*). Cada proteína presenta características particulares en su morfología y mecanismo de acción. Las proteínas *Cyt* presentan actividad hemolítica, mientras que los *Cry* tienen actividad insecticida en diferentes ordenes de insectos, como (dípteros, lepidópteros y coleópteros y nematodos).

En el año 2000 Mizuki reportó una clase de proteínas que actuaban directamente con líneas celulares cancerígenas a las que denominó parasporinas (*PS*), estas proteínas presentan alta selectividad celular; siendo la capacidad que presentan algunas moléculas de provocar la muerte de las células cancerosas, sin afectar las células no cancerosas (Ohba et al., 2009). Esta característica le confiere a las *PS* el potencial de destacar sobre los tratamientos existentes y ser una excelente diana terapéutica en el tratamiento del cáncer. En la actualidad hay reportes de seis grupos de parasporinas (P1, P2, P3, P4, P5 y P6) y presentan efecto citotóxico en más de una línea celular de cáncer. Por esta razón algunos investigadores se han dado a la tarea de evaluar las condiciones óptimas de producción y purificación de *PS* con actividad citotóxica en células de origen canceroso y proponerlo como una diana terapéutica contra el cáncer.

Como parte de esa búsqueda, el grupo de trabajo ha aislado varias cepas de *B. thuringensis* y algunas se desconoce si son productoras de *PS*. En este proyecto se planteó como objetivo principal estandarizar un método para obtener concentraciones altas de proteínas y para tal propósito se usó la cepa AC8 de *B. thuringensis*, se identificó si la cepa es productora de una *PS* y se evaluó su efecto citotóxico en la línea celular MCF-7 de cáncer de mama.

## 4. MARCO TEÓRICO

### 4.1 *B. thuringiensis*

*B. thuringiensis* (ver Figura 1) es una bacteria cosmopólita, formadora de esporas, aerobia y gram positiva que se caracteriza bioquímicamente por la fermentación de carbohidratos (glucosa, fructosa, trealosa, maltosa, ribosa, hidroliza almidón, glucógeno, esculina y N-acetilglucosamina) (Palma et al., 2014). Su ciclo de vida comprende dos etapas, la primera corresponde a un crecimiento exponencial y la segunda a una fase de esporulación (Lereclus et al., 2000). Se distingue de otros géneros bacterianos por sus propiedades entomopatógenas y la producción de  $\delta$ -endotoxinas (Sauka y Benintende., 2008).



Figura 1. Micrografía de *B. thuringiensis* completamente esporulado con la presencia de la espora (Sp) y el cristal parasporal (Cr); barra equivalente a 1.0  $\mu$ m. Extraído de (Bulla et al., 1977) y modificada en el 2023.

### 4.2 Ciclo celular de *B. thuringiensis*

Algunos organismos como algas, plantas, hongos y bacterias para reproducirse utilizan un mecanismo de reproducción asexual llamada esporulación que consiste en generar esporas o endosporas que aseguran el linaje celular en tiempos de tensión ambiental (Petruzzello, M., 2019). Se conoce que las bacterias del género *Bacillus anthracis*, *cereus* y *thuringiensis* realizan la esporulación (Bechtel y Bulla., 1976). En la primera etapa cuando hay suficientes nutrientes en el medio se lleva a cabo la división celular por el mecanismo de bipartición cada 60 a 90 minutos, pero al comenzar la escasez de

nutrientes se inicia la etapa de esporulación, que consiste en la diferenciación de bacteria a espora (Bechtel y Bulla., 1976).

Las esporas son consideradas una forma de vida latente que resisten condiciones hostiles del medio, pero al encontrar condiciones favorables comienzan su proceso de diferenciación a bacteria nuevamente. Algunos autores señalan que las condiciones óptimas son 30°C y pH. 7 (Martín y Travers., 1989).

El desarrollo de la espora y el cristal parasporal están dados por las siguientes etapas (Bechtel y Bulla., 1976):

- Etapa I: La formación de filamentos axiales y la condensación del material genético.
- Etapa II: Formación de dos compartimientos donde se segrega el DNA.
- Etapa III: Primera aparición de la inclusión ovoide y el cristal parasporal.
- Etapa IV-VI: Formación de las cubiertas de la espora acompañado del nucleoide de la espora.
- Etapa VII: Maduración de la espora.

Al completarse el proceso de maduración de las esporas, son liberados al medio de cultivo, junto con el cristal. Este cristal parasporal con actividad citotóxica en algunos insectos plaga constituye la diferencia primordial entre *Bacillus anthracis* y *Bacillus cereus*.

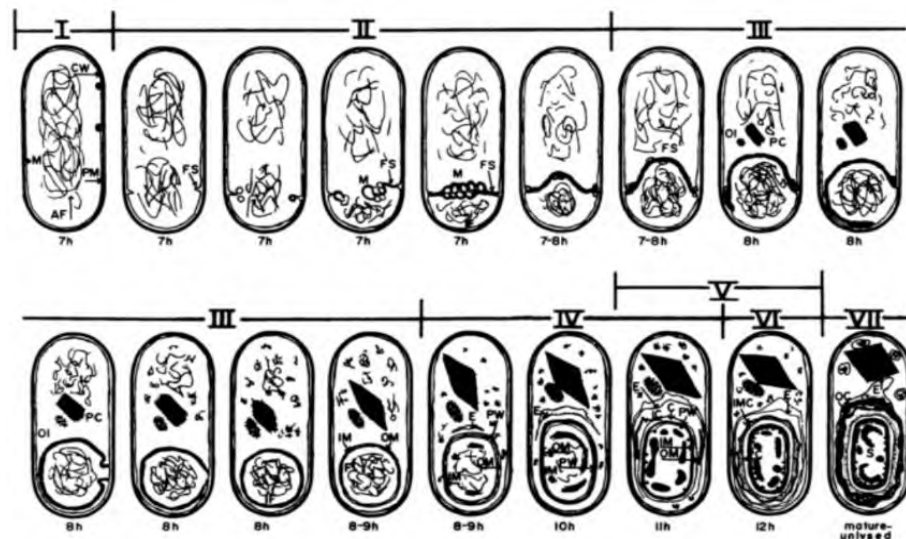


Figura 2. Diagrama esquemático del proceso de esporulación de *B. thuringiensis*, dividido en etapas y horas, (Bechtel y Bulla., 1976).

### 4.3 Parasporinas (*PS*)

El principal objetivo del aislamiento de cepas de *B. thuringensis* era identificar diferentes proteínas con capacidad insecticida, sin embargo, en el año 2000, tras investigaciones realizadas por Mizuki y colaboradores se demostró la existencia de cristales proteicos con actividad anticáncerígena (Mizuki et al., 1999).

Se analizaron más de 1700 aislamientos de los cuales 1684 cepas carecían de proteínas hemolíticas y se examinaron en busca de actividad citotóxica en células MOLT-4 (células T leucémicas humanas); del cual se obtuvieron 42 cepas positivas.

Resultó de particular interés que las cepas 84-HS-1-11 y 89-T-26-17 presentaron la capacidad de discriminar entre las células no cancerosas de las cancerosas (Mizuki et al., 2000).

Este hecho introdujo el concepto de parasporinas (*PS*), es decir la proteína parasporal que tiene la capacidad de inducir a muerte celular las células cancerosas (Mizuki et al., 1999; Ohba et al., 2009).

De esta manera surgió el interés de buscar e identificar cepas productoras de *PS* en cepas nativas, con importancia en el área de la salud (Velásquez, C et al., 2018).

### 4.4 Clasificación de las parasporinas

Las *PS* se caracterizan por su nula capacidad hemolítica, alta capacidad citotóxica y selectividad entre células sanas y tumorales. Además, se clasifican por la identidad de sus aminoácidos, según el sistema de nomenclatura de rango cuaternario, de acuerdo con el sistema utilizado por las proteínas *Cry* (Adang et al., 2014).

Se conocen 19 *PS* organizadas en 6 familias y se caracterizan por sus diferentes espectros de citotoxicidad y niveles de actividad *PS1*, *PS2*, *PS3*, *PS4*, *PS5* y *PS6* (ver Tabla 1). Además, estas diferencias residen en los dominios que conforman la proteína y su diferente mecanismo de acción (Ohba et al., 2009). Aunque las *PS* son heterogéneas tanto en el espectro citotóxico como en la actividad se caracteriza por ser una protoxina que al ser solubilizada con proteinasa K o tripsina adquiere citotoxicidad generando la muerte apoptótica o por formación de poros en la membrana figura 3 (A y B), (Hernández Guzmán., 2014) y (Ohba et al., 2009).

Tabla 1. Características de algunas *PS* (Ohba et al., 2009).

<i>PS</i>	Cepa	Tamaño del precursor (kDa)	Forma activa	Comentarios
PS1Aa1	A1190	81	15+56	Proteína <i>Cry</i> de tres dominios, activada por digestión N-terminal
PS2Aa1	A1547	37	30	Sin tres dominios, activada por digestión N y C-terminal.
PS3Aa1	A1462	88	64	Proteína <i>Cry</i> de tres dominios, activada por digestión N y C-terminal.
PS4Aa1	A1470	34	27	Sin tres dominios, activada por digestión C-terminal

Por otro lado, la *PS1Aa1* de la cepa A1190 ha demostrado tener actividad citotóxica solo cuando las proteasas la degradan a 40 y 60 kDa, demostrando fuerte actividad contra células T leucémicas (MOLT-4) y células cancerosas del cuello uterino humano (HeLa), y no en las células no cancerosas (Mizuki et al., 2000). Además, *PS2Aa1* proveniente de la cepa A1547 de 37kDa tiene efecto citotóxico en tejidos de cáncer de hígado y colon, provocando muerte por formación de poros. En cuanto a *PS3Aa1*, aislada de la cepa A1462 tiene la capacidad de actuar en líneas de leucemia mieloide HL60 y células de cáncer de hígado (HepG2) (Yamashita et al., 2005); finalmente *PS4Aa1* de la cepa A1470 exhibe toxicidad en las líneas de leucemia humana (Okumura et al., 2006).

Estos descubrimientos han incentivado la búsqueda *PS* con amplios espectros citotóxicos y que permitan mejorar la calidad de vida de los pacientes con cáncer.

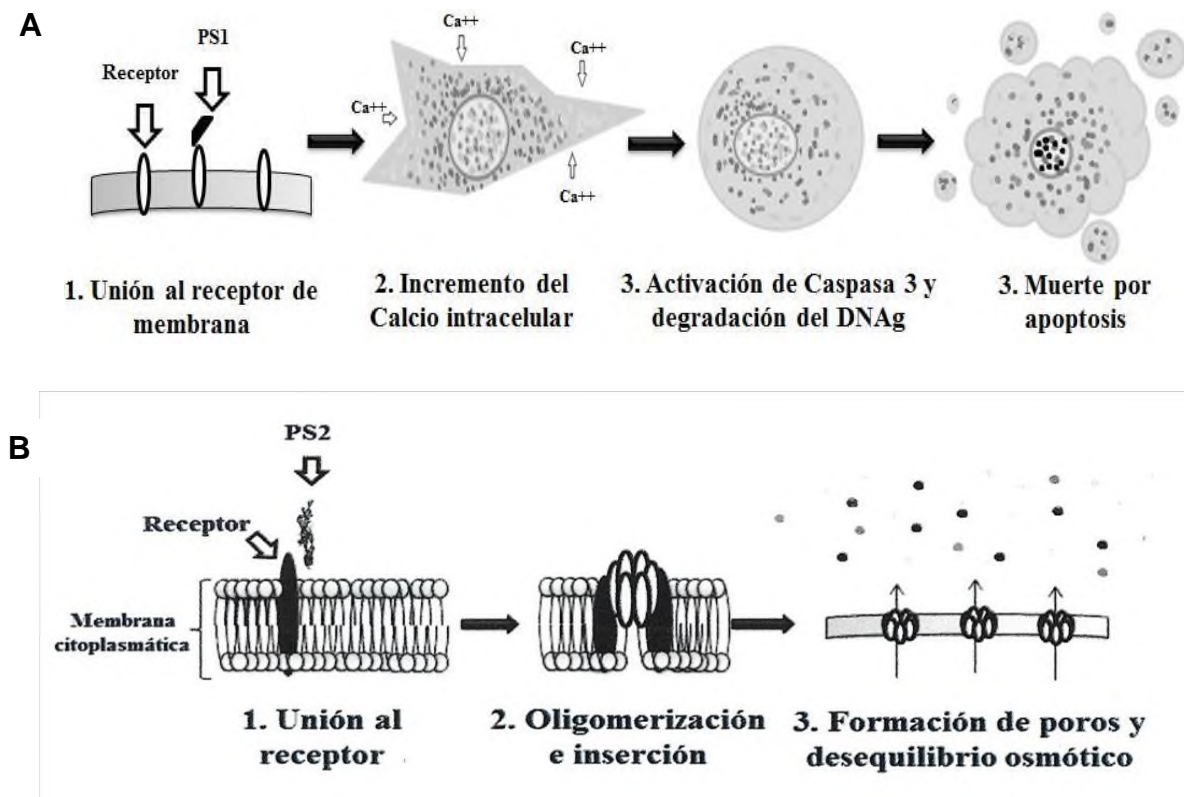


Figura 3. Representación de los mecanismos de muerte celular de las *PS*. Muerte celular por A) Apoptosis y B) Formación de poros. Imagen tomada y modificada de (Espino Vásquez., 2014).

#### 4.5 Cáncer

El cáncer es una enfermedad multifactorial, influenciada por factores genéticos y epigenéticos donde las células afectadas sufren descontrol en los genes que codifican proteínas que regulan funciones normales (Zabransky et al., 2022).

Esta enfermedad se genera por mutaciones que pueden ser adquiridas o heredadas: Inactivación de los genes de supresión tumoral y activación de oncogenes (genes que controlan la división celular). Estas mutaciones pueden ser clasificadas en tres grupos: físicos como radiaciones UV y rayos X; químicos: alimentos contaminados con aflatoxinas, hidrocarburos, nitratos, nitritos ó arsénico y biológicos: virus como VPH, bacterias y parásitos (Castrejón., 2020). Además, se constituye por más de 200 tipos de

enfermedades, y el riesgo de padecerlo se incrementa con la edad por la baja eficiencia de los mecanismos de reparación y las exposiciones con factores de riesgo (Reyes et al., 2020). Es una enfermedad con alta incidencia en el mundo, en México los casos se han incrementado desde el 2010 (Figura 4) y los estados con tasas más altas son México, Sonora, Chihuahua, Morelos, Veracruz y Colima. En contraste, los estados con menores tasas de defunción (Figura 5) son Quintana Roo, Guerrero, Querétaro, Yucatán, Durango, Guanajuato y Tlaxcala (INEGI., 2022).

En México las neoplasias de mayor incidencia corresponden al cáncer de mama, de cuello uterino, hígado, pulmón y linfomas (secretaria de salud., 2017). Constituyendo los primeros dos el 25 % de todas las defunciones además de incrementar la tasa de mortalidad en las mujeres (NIH., 2020).

Estudios recientes aseguran que el cáncer de mama ha llegado a ocupar el 10% de todas las incidencias en el mundo, siendo incluso 100 veces más común en mujeres que en hombres (INEGI., 2022). La mayor mortalidad registrada fue en el año 2020, donde el grupo de 60 años y más se vio altamente afectado, ocasionando la muerte de 7821 mujeres y 58 hombres.

Por estas razones, la OMS ha reconocido al cáncer de mama como el cáncer más común en el mundo, por arriba de los demás cánceres (Instituto Nacional del Cáncer., 2020).

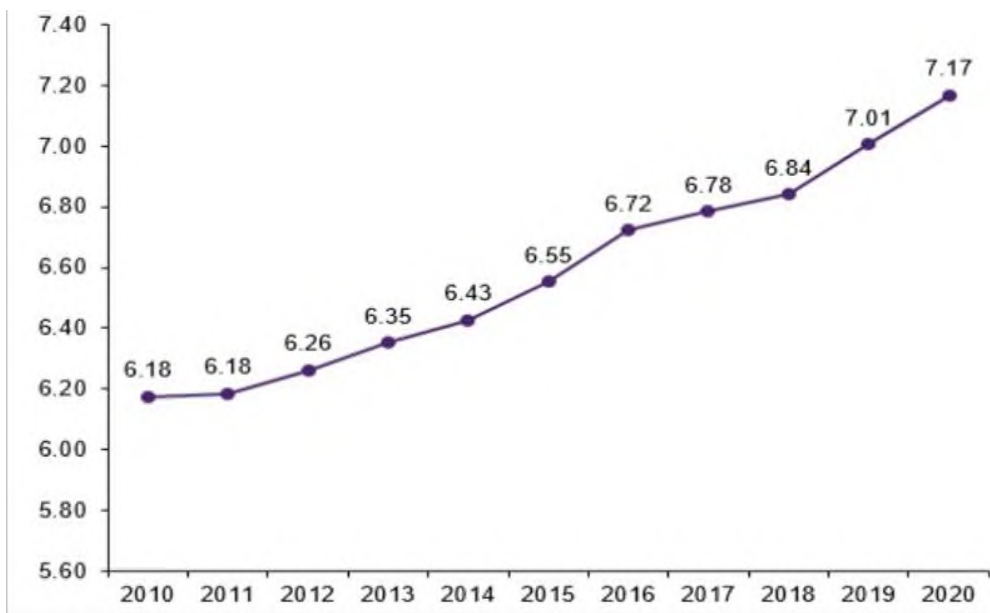


Figura 4. Tasa de defunciones por tumores malignos por año de registro en México (INEGI., 2022).

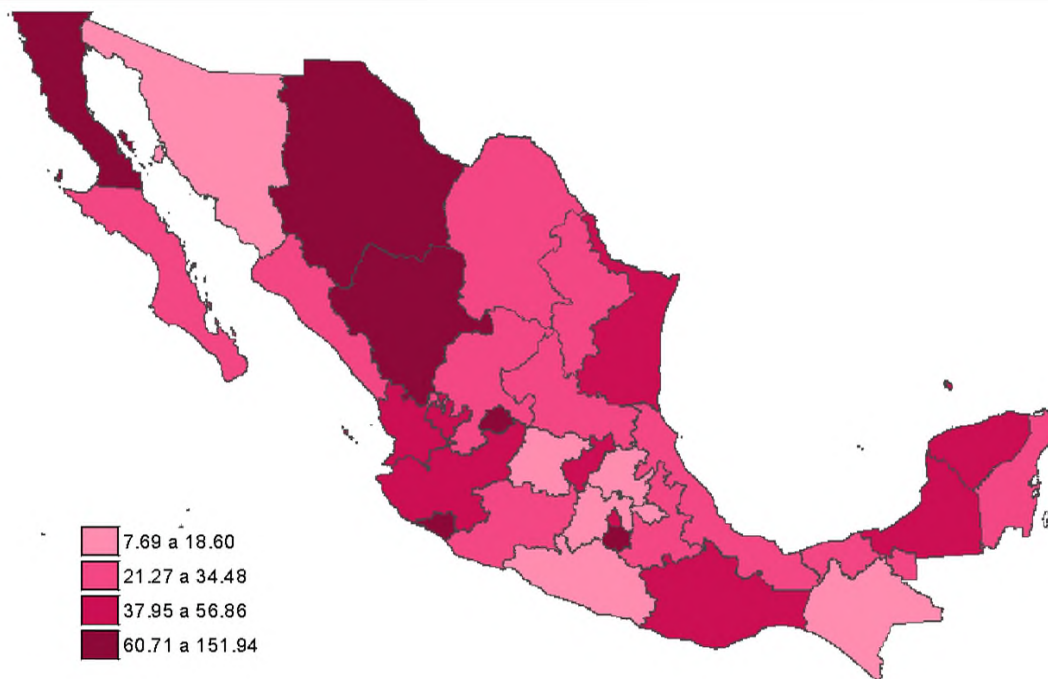


Figura 5. Incidencia de cáncer de mama en mujeres de 20 años o más por entidad federativa. INEGI., (2020).

#### 4.6 Cáncer de mama

De manera normal la mayoría de las células necesitan dividirse para cumplir sus funciones y transcurrido su tiempo de vida comienzan a morir para dar paso a un reemplazo de una nueva generación de células. Sin embargo, en el caso del cáncer, las células no presentan un control y tienden a generar acumulaciones celulares, llamadas tumores, que en algunos casos resultan ser malignos. Estas tumoraciones si no son atendidas comienzan a invadir otros tejidos, desencadenando diagnósticos poco favorables para los pacientes (Álvarez, H et al., 2014).

El cáncer de mama es una enfermedad que origina un descontrol en las células que constituyen la mama. Se clasifican en dos tipos de carcinomas más comunes dependiendo el tipo de células mamarias afectadas (Espinosa R., 2017). El carcinoma ductal infiltrante es el tipo de cáncer más común y comienza en el revestimiento de los ductos galactóforos (tubos delgados que llevan la leche desde los lobulillos de la mama hasta el pezón) (Figura 6A) y el carcinoma lobulillar infiltrante es un tipo de cáncer que se inicia en las glándulas de la mama que producen leche (lobulillos) y representa un porcentaje reducido de todos los tipos de cáncer de mama (Figura 6B). Cuando las células invaden otras partes del cuerpo a través de los vasos sanguíneos y linfáticos, se dice que ha hecho metástasis.

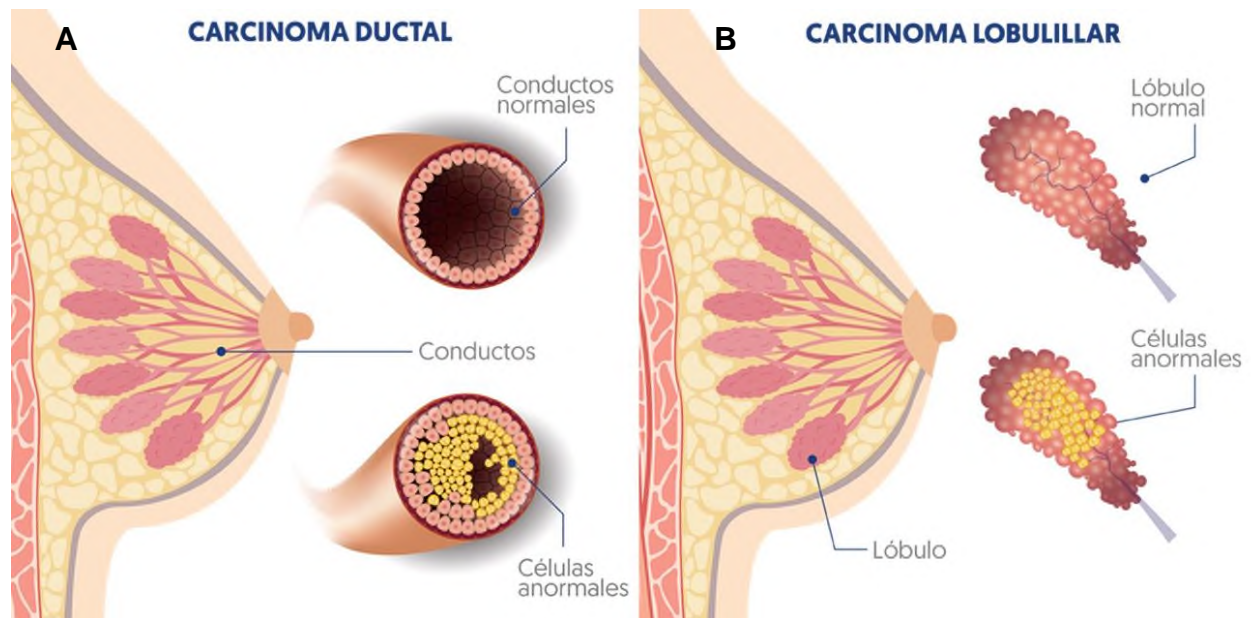


Figura 6. Representación gráfica de los tipos de carcinomas de mama más comunes; A) ductal y B) lobular. Imagen extraída y modificada de <https://www.ccdm.cl/>

El desarrollo de estos carcinomas se debe a mutaciones específicas en algunos genes como: BRCA1, BRCA2, P53, PTEN, CDH1, STK11, PALB2, ATM, CHEK2 y NF1 (González y Honrubia., 2018) que regulan funciones importantes dentro de la célula, como regulación, activación de la transcripción, reparación de lesiones del ADN, control en el ciclo, diferenciación ó proliferación celular (González y Honrubia., 2018).

En el caso de la proliferación se encuentra mediado por reguladores proteicos llamados ciclinas y cinasas (Cdk) dependientes de ciclinas. Tras la unión de estas dos proteínas (complejo APC/C) se comienzan cascadas de fosforilaciones que hacen continuar el ciclo celular y se cerciorarán que todo ocurra en el orden correcto (Diaz C et al., 1997).

Tras existir cambios de magnitud externa ó interna (daños en el DNA) en estos reguladores del ciclo celular, desarrollan padecimientos como ciliopatías, Alzheimer , Parkinson y el cáncer (Malumbres y Barbacid., 2009).

El cáncer se caracteriza por la inactivación de las vías de muerte celular, la elevada capacidad proliferativa y alta capacidad de supervivencia en las células tumorales.

Se clasifican en cuatro subtipos moleculares, de acuerdo a los receptores de membrana que presentan: Receptor de estrógenos (ER), receptor de progesterona (PR) y human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) que se subdivide en luminal A (ER+ /PR+ /HER2- ) susceptible a tratamiento hormonal, luminal B (ER+ /PR+ /HER2+ ) o (ER+ /PR+ /HER2- grado 3), HER2 sobreexpresado (ER- /PR- /HER2+ ), suelen responder a terapias dirigidas anti-HER2 y tumores triple negativos (TNBC, ER- /PR- /HER2- ), los más agresivos y no presentan un tratamiento estándar (Yu et al., 2017; Murawa et al., 2014)

#### 4.7 Etapas del cáncer

La estadificación del cáncer permite brindarnos información del avance del cáncer en el cuerpo y las estadísticas de supervivencia para brindar un tratamiento adecuado a las personas afectadas (Gospodarowic et al., 2007). Se emplea el sistema TNM del American Committee on Cancer (AJCC) basadas en tres piezas claves de información: El tamaño del tumor (T), la propagación a los ganglios o nódulos (N) y la metástasis (M) (American Cancer Society., 2018). Además, se asignan números del I al IV y letras después de las categorías (T, N, M). Entre mayor sea el número después de las letras, más avanzado se encuentra el cáncer (Tabla 2).

Tabla 2. Descripción de los estadios del cáncer

Estadio	Significado
0	Hay células anormales presentes, pero no se ha diseminado al tejido cercano. Se llama también carcinoma in situ, o CIS. El CIS no es cáncer, pero puede convertirse en cáncer.
I, II y III	Hay cáncer presente. En cuanto más grande es el número, mayor es el tumor y tanto más se ha extendido en los tejidos cercanos.
IV	El cáncer se ha diseminado a partes distantes del cuerpo

(Instituto Nacional del Cáncer., 2015)

El tratamiento o la combinación de tratamientos contra el cáncer tienen la capacidad de provocar la muerte de las células tratadas; y son dependientes de las condiciones del paciente y las particularidades del cáncer como el tamaño inicial del tumor, la multifocalidad, localización, la multicentricidad, la expresión de receptores hormonales, el factor de crecimiento epidérmico, diseminación a ganglios y la presencia o ausencia de metástasis, (Espinosa, R., 2017).

#### 4.8 Tratamientos contra el cáncer

En la actualidad existe una variedad de tratamientos aprobados contra el cáncer. Sin embargo, cada uno presenta sus propios alcances y limitaciones (Guzmán Aguillón., 2018). La cirugía curativa tiene un alcance exitoso al extraer por completo un tumor en etapas tempranas del cáncer, pero en las etapas avanzadas o el contacto del tumor con tejidos u órganos importantes genera limitaciones; en estos casos es importante combinarlo con otros tratamientos existentes. La quimioterapia y la radioterapia son tratamientos importantes, el primero consiste en el uso de medicamentos como: antraciclinas, taxanos, antimetabolitos, vinorelbina, ciclofosfamida entre otros (Tabla 3) por vía intravenosa, tópica, oral, inyectada bajo la piel, el musculo, el abdomen o la arteria NIH., (2015).

Se han descubierto alrededor de 100 fármacos diferentes que dañan las células y atacan diferentes objetivos celulares en distintos momentos durante el ciclo.

Por otro lado, la radioterapia es otro tratamiento contra el cáncer que emplea rayos X u otras partículas de alta potencia que dañan el ADN de las células, inhibiendo su crecimiento o destruyéndolas, empleándose solo o en combinación con otros tratamientos NIH., (2019).

Las afectaciones radio y quimioterapéuticas ocurren en la parte del cuerpo donde se aplica el tratamiento, afectando considerablemente a las células no cancerosas cercanas y produciendo efectos secundarios adversos que afectan la estabilidad del paciente llegando a afectar directamente en la calidad de vida de los pacientes (Tabla 4)

Tabla 3. Quimioterapéuticos más comunes usados en el tratamiento contra el cáncer de mama

Quimioterapéuticos	
<b>Antraciclinas</b>	Epirrubicina, Doxorubicina liposomal pegilgada
<b>Taxanos</b>	Paclitaxel, Docetaxel
<b>Antimetabolitos</b>	Capecitabina, Gemcitabina
<b>Otros inhibidores</b>	Vinorelvina
<b>Otros fármacos</b>	Ciclofosfamida, Mitoxantrona, Cisplatino, Fluoroacilo e Ixabepilon

(Secretaria de Salud., 2009).

La terapia hormonal/ endocrina es un tratamiento que bloquea la capacidad del cuerpo para producir hormonas ó interfiere en la forma en que las hormonas se comportan en el cuerpo. Su modo de empleo puede ser: oral (en forma de tabletas), inyecciones en el músculo del brazo, cadera, bajo la piel, o el vientre NIH., (2015). Además, se puede usar solo o en combinación. Los medicamentos que destacan se encuentran los inhibidores de la aromatasa, tamoxifenos y análogos-LHRH+IA (Gradishar et al., 2015). Los efectos secundarios de la terapia endocrina dependen de la respuesta de cada paciente al bloqueo o la interferencia hormonal inducida.

Tabla 4. Efectos secundarios de los tratamientos oncológicos más comunes

Efectos a largo plazo y tardíos del tratamiento del cáncer		
Tratamiento	Efectos adversos a largo plazo	Efectos adversos tardíos
<b>Quimioterapias</b>	Astenia Menopausia prematura Disfunción sexual Neuropatía Encefalopatía por quimioterapia Insuficiencia renal	Trastornos de la visión/ cataratas Esterilidad Problemas hepáticos Enfermedad pulmonar Osteoporosis Reducción de la capacidad pulmonar Segundos cánceres primarios
<b>Radioterapias</b>	Astenia Sensibilidad cutánea Linfedema	Cataratas Cavidades y caries dental Enfermedad cardiovascular Hipotiroidismo Esterilidad Enfermedad pulmonar Problemas intestinales Segundos cánceres primarios
<b>Cirugía</b>	Disfunción sexual Incontinencia Dolor	Trastorno de la imagen corporal Discapacidad funcional Esterilidad

(Koontz, B. F., 2018).

En la actualidad, la búsqueda de nuevos tratamientos ha abierto las puertas a la inmunoterapia, terapias moleculares y la nanotecnología. Incluso se han conocido casos exitosos de proteínas provenientes del género *Bacillus* con la capacidad de generar muerte celular y alta selectividad. El uso de microorganismos permite una alta tasa de producción de microorganismos en poco tiempo, haciéndola un método viable y eficaz.

Sabiá Junior., (2015) identificó parasporinas de la cepa S1338, con actividad citotóxica contra la línea celular HeLa, DU-145 y MCF-7 con un 40% de muerte celular para las primeras dos y un 60% de muerte para la última; siendo ésta la más exitosa de todas.

Nolasco, C., (2017) reportó dos parasporinas con actividad citotóxica, con una reducción de la viabilidad del 90% en las líneas celulares de cáncer MCF-7 y un 30% de citotoxicidad en promedio para MDA-MB 231, catalogando a estas proteínas como una excelente diana terapéutica contra el cáncer.

## 4.9 Producción y purificación de parasporinas

### 4.9.1 Producción de PS

En general *B. thuringensis* puede crecer en diferentes medios como agar nutritivo, leche peptonizada, GYS, fuentes diversas de carbono y nitrógeno, dextrosa, fructosa, glucosa, almidón, glicerol, maltosa, ribosa, suero de leche, remolacha, etc; pero no en todos se puede obtener cristales grandes, tóxicos y con la capacidad de conservar su actividad biológica, dado que un carbohidrato no metabolizable produce una esporulación defectuosa (Peña Villamil y Quinche, Flores., 2001).

Ergola et al.,(1985) reportó que las variables de operación de *B.thuringensis* como la concentración de fuentes de carbono, nitrógeno, pH y velocidad de aireación intervienen en la producción de cristales proteicos, por eso resulta importante conocer los requerimientos nutricionales de la cepa en estudio.

Hernández, Guzmán., (2014) cultivó una cepa de *B. thuringensis* aislada del noreste de México con diferentes requerimientos nutricionales; por un lado peptona, extracto de carne y extracto de levadura y por otro lado almidón y soya, ambas formulaciones suplementados con  $MgSO_4$ , KCl,  $MnCl_2$ ,  $CaCl_2$  y  $FeSO_4$ . Al evaluar los cultivos a las 12, 19 y 33 horas observó cristales de mayor tamaño para el cultivo constituido por almidón y soya. Concluyendo que al no ser la peptona una fuente de carbono primaria para *B. thuringensis*, libera compuestos nitrogenados que aumenta el pH del medio, caso contrario del almidón que aumenta gradualmente y en menor medida permitiendo una mayor producción de cristales proteicos.

Por otro lado, Pineda et al. (2019) evaluaron la cepa BMB171 de *B. thuringensis* en tres diferentes medios de cultivo: agar nutritivo, caldo Luria y caldo glucosilado y observaron una mayor producción de cristales proteicos para el cultivo glucosilado y menos eficiencia en los primeros dos medios de cultivo. La producción de proteína es baja en los primeros dos medios de cultivo; se debe posiblemente a una relación no adecuada entre carbono/nitrógeno y la ausencia de diversos minerales importantes para el desarrollo del microorganismo en la etapa de producción de la  $\delta$ -endotoxina.

Martinez Marcado.,(1990) evaluó un cultivo puro de *B. thuringensis* var Kurstaky en cultivos constituidos por melaza, harina de soya, pescado, levadura,  $\text{CaCO}_3$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{H}_3\text{PO}_4$  y  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ . Además, los comparó con medios hidrolizados con ácido fosfórico 0.7% vol/vol. Pudo observar que la hidrólisis aplicada no produce un crecimiento mayor de *B. thuringensis* al compararlo con medios sin hidrólisis. Sin embargo, este procedimiento induce a la bacteria a necesitar un periodo más largo de adaptación.

Conocer los medios de cultivos idóneos para las cepas de *B. thuringensis* resulta muy importante pero la purificación de estas proteínas también constituye un paso esencial porque al realizar ensayos en líneas celulares humanas de interés se asegura la fiabilidad y obtención de cristales puros biológicamente activos.

#### 4.9.2 Purificación de cristales proteicos

Han sido descritos muchos métodos de purificación de proteínas provenientes de *B. thuringensis* algunos presentan el inconveniente como ser repetidos muchas veces para obtener una pureza aceptable con rendimientos de purificación bajos como los métodos con solventes orgánicos (trifluorotricloroetano, tetrabromoetano, tetracloruro de carbono y cloroformo) (Nickerson & Ang, 1978), otros métodos obtienen buena pureza pero los reactivos esenciales resultan ser caros , con rendimientos de purificación bajos y no escalables.

Mendoza Gamboa, E. (1995) aplicó un método de centrifugación zonal en gradientes de densidad de bromuro de sodio para purificar cristales producidos por *B. thuringensis*. Obteniendo una sustancia blanquecina con cristales, donde el sobrenadante fue

descartado. Se lavó tres veces el precipitado con agua bidestilada y finalmente se dializó. Este procedimiento permitió obtener endotoxinas de *B. thuringensis* de 20 kDa con la capacidad de inhibir varias líneas celulares tumorales.

Además, Hernández, Guzmán., (2014) reportó un método eficiente para recuperar proteínas de *B. thuringensis* para ensayos de citotoxicidad en líneas celulares de cáncer. Una vez finalizado el cultivo se pasó el cultivo en filtros de nitrocelulosa y se concentró dos veces en filtros de amicon ultra, el último se realizó bajo condiciones estériles. Este procedimiento permitió obtener altas concentraciones de proteínas además de un efecto citotóxico en líneas celulares de cáncer de mama.

Finalmente reportó Reyes Puentes, J, A., (2016), un método de purificación de parasporinas el cual consistía en una pre- purificación con hexano para eliminar cualquier tipo de materia orgánica y posteriormente una cromatografía de intercambio iónico. Los resultados de este estudio indican que la purificación cumplió su función además de presentar efecto citotóxico con dos líneas celulares de origen tumoral. Sin embargo, se tiene como perspectiva utilizar más técnicas de purificación en este proyecto.

## 5. JUSTIFICACIÓN

El cáncer es una de las enfermedades de mayor incidencia en México y su diagnóstico en fase inicial es una condicionante para que los tratamientos tengan mayor probabilidad de éxito. Los tratamientos actuales no presentan especificidad celular provocando efectos secundarios no deseados en los pacientes. Lo que ha llevado a una búsqueda incesante de nuevas estrategias menos invasivas que permitan mejorar la calidad de vida de las personas afectadas. En este sentido, el grupo de trabajo de la universidad del Papalopan ha estudiado el potencial citotóxico de algunas PS obtenidas de diversas cepas de *B. thuringensis* aisladas de campos de cultivo de la región (HD73, HD1, AX, AC1, AC2, AC3, AC5, AC8, A5, A13, A24, A34 y A35); sin embargo, una condicionante durante la fase de evaluación de las PS es la baja concentración de proteína que se logra recuperar de los cultivos de *B. thuringensis*, lo que ha llevado a implementar una metodología capaz de incrementar la concentración de PS en cada cultivo.

Por lo tanto, este proyecto tuvo como objetivo evaluar las condiciones de producción y purificación de proteínas de AC8, además de seleccionar una parasporina con actividad anticancerígena contra la línea celular MCF-7 de cáncer de mama.

## 6. HIPÓTESIS

El uso agar nutritivo como sistema crecimiento de la cepa AC8 de *Bacillus thuringiensis* favorece una mayor producción de las proteínas de origen parasporal permitiendo un mejor rendimiento en el proceso de aislamiento de dichas proteínas.

## 7. OBJETIVOS

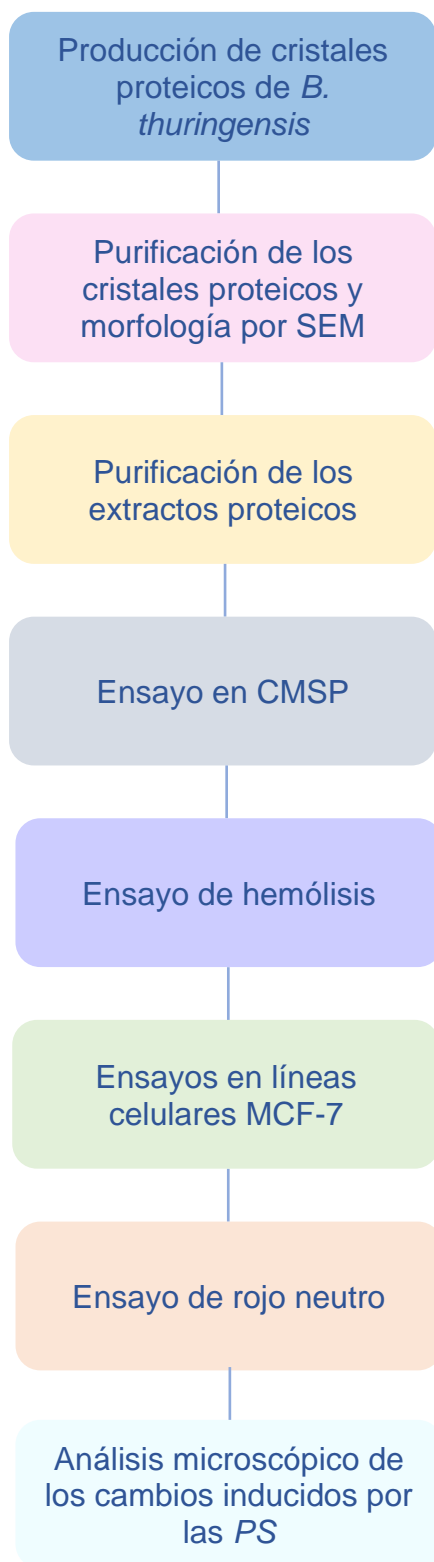
### 7.1 Objetivo general

Optimizar el método de aislamiento de proteínas paraesporales producidas por *Bacillus thuringensis*

### 7.2 Objetivos específicos

1. Determinar las condiciones de crecimiento óptimas (cultivo líquido y sólido) que permitan la mayor recuperación de cristales proteicos.
2. Aislar el cristal proteico de *Bacillus thuringensis* AC8 e identificar su morfología.
3. Obtener los extractos proteicos con pesos moleculares de entre 30 y 90 kDa y seleccionar un método de purificación que permitan una mayor concentración de proteínas.
4. Evaluar la actividad citotóxica de los extractos proteicos seleccionados en la línea celular MCF-7 de cáncer de mama y en células no cancerosas.

## 8. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



## 9. MATERIALES Y MÉTODOS

### 9.1 Producción de cristales proteicos de la cepa AC8 de *B. thuringensis*

#### 9.1.1 Medio líquido

El crecimiento en medio líquido de *B. thuringensis* se realizó de acuerdo a la metodología propuesta por (Bravo-D et al., 2015). Se preparó 330 mL de caldo nutritivo MCD Lab a pH 7, constituido por 5 g peptona de gelatina y 3 g de extracto de carne por litro. Después se esterilizó en autoclave durante 15 min, a 121°C y 14 lb. Finalmente se inoculó con un disco de esporas que contenía  $9.56 \times 10^6$  esporas/ disco de la cepa AC8 de *B. thuringensis*. Por último, el cultivo se dejó incubando por 8 días, 30 °C y 120 rpm.

#### 9.1.2 Medio sólido

Se preparó 150 mL de agar nutritivo MCD Lab a pH 7, constituido por 5 g de peptona de gelatina, 3 g de extracto de carne y 15 g de agar bacteriológico por cada 100 mL. Se esterilizó en autoclave durante 15 min, a 121°C y 14 lb. Se atemperó y depositó 15 mL de medio de cultivo en cajas Petri. Después de gelificarse, se inoculó mediante estriado un volumen de 10  $\mu$ L y  $5.9 \times 10^7$  esporas de AC8 de *B. thuringensis* procedente del medio líquido; por último, se incubó a 30°C durante tres días y fue almacenado a 4°C, por 48 horas.

### 9.2 Recuperación de los cristales proteicos

#### 9.2.1 Medio líquido

El pellet bacteriano del medio líquido se colectó mediante centrifugación a 5500 rpm, 4°C y 15 minutos por ciclo. El sobrenadante fue desechado, mientras que el precipitado se lavó dos veces con 5 mL de agua acidificada pH de 2.5, preparada con una solución de 2 M de HCl. Enseguida se realizó un lavado con 5 mL de agua destilada y por último dos lavados con 5 mL de una solución isotónica de NaCl al 0.85% (P/V).

### 9.2.2 Medio sólido

La recolección del pellet bacteriano se realizó mediante raspado en la superficie del agar nutritivo con 2 mL de agua destilada estéril y fue transferido a tubos limpios. Después, se centrifugó a 5500 rpm, 4°C y 15 minutos por ciclo y el sobrenadante fue desechado. El precipitado se lavó dos veces con 5 mL de agua acidificada pH de 2.5, preparada con una solución de 2 M de HCl. Enseguida se realizó un lavado con 5 mL de agua destilada y por último dos lavados con 5 mL de una solución isotónica de NaCl al 0.85% (P/V).

### 9.3 Determinación morfológica de los cristales proteicos mediante SEM

Después de recuperar los cristales proteicos, se purificaron siguiendo el protocolo de (Mounsef et al., 2014). La muestra que contenía 4 mL, se centrifugó a 5500 rpm por 10 min a 4°C. El sobrenadante se descartó y el precipitado obtenido se lavó dos veces con 1M de NaCl y tritón X-100 al 0.01%; luego se realizaron 2 lavados con NaCl 0.85% y 1 mL de hexano; la suspensión se sonicó a una potencia de 100 W y una frecuencia de 40 kHz durante 10 minutos entre cada lavado, para disipar la formación de grumos. Finalmente, el sedimento se lavó dos veces con agua destilada a una temperatura de 4°C.

Las muestras purificadas fueron analizadas siguiendo el protocolo de Chai et al., (2014). Las muestras se fijaron durante 2 días en la solución fijadora de Dowell y Trump preparada en 0,1 M tampón fosfato (pH 7,2). Se lavó con tampón fosfato 0,1 M dos veces y se fijó en 1,0% OsO<sub>4</sub> durante 1 h. Se realizó un proceso de deshidratación en serie con 50% etanol durante 10 min, 75% etanol durante 10 min, etanol al 95% durante 10 min, etanol al 100% durante 10 min dos veces y finalmente hexametildisilazano (HMDS) durante 10 min; por último se decantó el HMDS. La muestra fue montada con una cinta adhesiva de doble cara y finalmente se recubrió con oro y se observó con el microscopio electrónico de barrido marca Hitachi, Modelo SU8230 de emisión de campo de cátodo frío, a las condiciones de prueba de 10Kv, 8.5 mm y amplificaciones de 20, 10 y 5 µm,

Las micrografías resultantes permitieron conocer los tamaños, la superficie y forma de los cristales purificados.

#### 9.4 Aislamiento de los cristales proteicos mediante electroforesis SDS-PAGE

Los extractos purificados fueron solubilizados de acuerdo al método de Laemmli., (1970) para una separación electroforética en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 12%, durante 4 h a 100 V. Los geles resultantes se introdujeron en TCA al 12.5 % y después en etanol al 50 %, ambos por 20 minutos. Los geles fueron teñidos con azul de coomassie al 0.1 %, a 70 rpm por 4 horas. Se destiñó con una solución compuesta por 40 mL de metanol (99% de pureza) / 7mL de ácido acético (99% de pureza) / 53 mL de agua destilada por 20 minutos a 70 rpm.

Las bandas proteicas en el gel de poliacrilamida entre los 30 a 90 kDa corresponden a los pesos de las *PS* y esas bandas fueron recuperadas directamente de la matriz para los posteriores ensayos.

#### 9.5 Purificación de los extractos proteicos

Se evaluaron tres métodos de purificación, para establecer las mejores condiciones para aumentar el rendimiento de los cristales proteicos. El primer método (A) consistió en la electroelución+ diálisis. La electroelución es una técnica eficiente y rápida que permitió extraer la proteína contenida en el gel de poliacrilamida mediante un diferencial de potencial eléctrico a 200 min a 10 mA (Castrejón, A., 2020); y se complementó con la diálisis, utilizando una membrana Sigma-Aldrich MWCO de 12 000 Daltons por 5 días a 4°C. Finalmente se cuantificó la concentración de proteína con el método de Bradford.

El siguiente método (B), elución + concentración química permitió extraer la proteína del gel de poliacrilamida mediante solventes orgánicos. Para eso, las bandas de interés fueron finamente picadas y depositadas en un eppendorf con una solución de acetona, ácido acético y agua en una proporción 50: 49:1, luego fueron cubiertos con parafilm e incubados a 37°C por 24 horas sin agitación. El sobrenadante fue extraído con una pipeta pasteur y se concentró siguiendo el método propuesto por Niu et al., (2018) permitiendo eliminar sustancias que interfieren para la preparación de muestras de proteínas de alta calidad.

El último método (C), consistió en la electroelución y la ultrafiltración con las unidades filtración amicon ultra con 2 mL de capacidad y tamaño de poro de 10 kDa. Con este método las proteínas extraídas se introdujeron en los filtros y se centrifugaron para eliminar el remante de SDS e interferentes presente en la muestra.

## 9.6 Ensayos en la línea celular MCF-7

Se evaluó la citotoxicidad de las inclusiones proteicas en la línea celular MCF-7 de cáncer de mama, porque es la enfermedad de mayor incidencia en México además de ser considerado un cultivo estable. La línea celular fue obtenida de la casa comercial ATCC a través de donaciones del Laboratorio Nacional de Soluciones Biomiméticas para Diagnóstico y Terapia de la UNAM (LaNSBioDyT), el Instituto Nacional de Pediatría (INP) y del Instituto Nacional de Rehabilitación (INR). Fue cultivada y suplementada, siguiendo el protocolo de Castrejón, A., (2020), a una atmósfera de 5 %, CO<sub>2</sub> y humedad saturada (95 %) a 37 °C.

Los ensayos requirieron  $1.5 \times 10^5$  células (el número de células dependerá de la tasa de proliferación celular). Las células fueron tratadas con 84.225 µL de la proteína de 14 kDa y 77.775 µL de la proteína de 26 kDa. Finalmente se incubaron por 48 horas.

## 9.7 Ensayos de bioseguridad

Estos ensayos fueron aprobados por el comité de ética de la Universidad del Papalopan, para esto la sangre fue extraída directamente de un donante sano mediante venopunción utilizando 1 tubo con heparina tipo Vacutainer® con EDTA.

### 9.7.1 Células mononucleares de sangre periférica

Primero se colocó el histopaque en un tubo de 15 mL y manteniendo la relación 1:1 con la sangre extraída se agregó la sangre vertiendo lentamente por las paredes, este paso se realizó con precaución. Después se centrifugó el tubo por 30 minutos a 400 g a 24°C y se recuperó los monocitos con una pipeta pasteur de plástico. Se lavó el paquete celular con 10 mL de PBS 1X y se centrifugó a 100g por 10 minutos. Se descartó el sobrenadante y se agregó 1 mL de medio RPMI suplementado con FBS; se contaron las células en una cámara de neuvauer y se sembraron  $2.5 \times 10^5$  células/mL. Las condiciones de mantenimiento fueron a 1 atmósfera, 5 % de CO<sub>2</sub> y humedad saturada (95 %) a 37 °C y 48 h. Transcurrido el tiempo se añadió 90 µL de monocitos en una microplaca de 96 pozos estéril y se enfrentó con las proteínas a concentraciones de 6,12,24 y 33 µg/ mL.

### 9.7.2 Ensayo de hemólisis

El ensayo hemolítico se realizó siguiendo el protocolo de Chubicka et al., (2018), para esto se obtuvo 5 mL de sangre de un donante humano y se centrifugó a 500xg durante 5 min. Al observar la separación de fases se aspiró el plasma y se desechó en residuos biopeligrosos. Se agregó NaCl 150 Mm (hasta el nivel original del plasma) y se centrifugó a 500 xg por 5 min; al término se realizaron dos lavados con PBS y se añadió 190 µL de eritrocitos en tubos eppendorf y se trató con 10 uL de proteínas. Finalmente se incubó 1h a 37°C, se centrifugó a 1500 g por 10 min y se midió la absorbancia de 100 µL de sobrenadante a 570 nm.

## 9.8 Ensayos de citotoxicidad

### 9.8.1 Método del 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol

Para determinar la citotoxicidad de las inclusiones proteicas en la línea celular y los monocitos, se utilizó el ensayo de MTT (Mosmann.,1983), que consiste en la reducción metabólica del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol a formazán; brindándonos información del funcionamiento mitocondrial en las células tratadas; siendo proporcional la cantidad de células vivas, a la cantidad de formazán producido.

Las células fueron enfrentadas a diferentes concentraciones de proteínas e incubadas por 48 horas. Transcurrido el tiempo de incubación, se añadió 10 µL de MTT y se incubó por 48 horas a las condiciones de cultivo. Finalmente, se retiró el medio y se agregó 100 µL de isopropanol ácido o DMSO, para disolver los cristales de formazán creados. Finalmente se realizó una lectura de absorción a 595nm.

### 9.8.2 Ensayo de rojo neutro

Este ensayo permitió evaluar la citotoxicidad de las inclusiones proteicas midiendo la capacidad de células viables para incorporar y unirse al colorante supravital rojo neutro. Al ser débilmente catiónico penetra las membranas celulares por difusión pasiva no iónica y se concentra en los lisosomas donde se une mediante enlaces hidrófobos electrostáticos a grupos aniónicos y/o fosfato de la matriz lisosómica.

Los monocitos (CMSP) y la línea celular MCF-7 fueron retadas con diferentes concentraciones de proteínas e incubadas por 48 h. Enseguida se eliminó el medio de

cada pozo y se agregaron 100  $\mu$ L (40 mg/mL) de la solución de rojo neutro incubándose durante 4 horas. Transcurrido el tiempo se agregó la solución decolorante constituida por etanol al 96%, agua desionizada y ácido acético 1% en una proporción 50:49:1 Finalmente se cuantificó la absorbancia del colorante a 540 nm (Repetto et al., 2008).

## 10. ANALISIS ESTADÍSTICOS

Para el análisis estadístico se hizo una ANOVA de una vía y la prueba Tukey para evaluar la significancia estadística de los resultados empleando el software GraphPad Prism 8.0.

## 11.RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 11.1 Producción de cristales proteicos de *B. thuringensis*

La cepa AC8 de *B. thuringensis* forma parte de un banco de cepas del grupo de trabajo, esta cepa previamente fue evaluada por Castrejón, A., (2020) y reportada con bajas concentraciones de proteínas, mediante la cuantificación de Bradford. En dicho trabajo AC8 fue cultivada en caldo nutritivo (medio líquido) (Castrejón, A., 2020). En este trabajo se reprodujeron las condiciones usadas en medio líquido, (ver Figura 7a) y se comparó con el medio agar nutritivo, que es la propuesta de cultivo en este trabajo (Figura 7b); esto permitió comparar la producción de cristales proteicos en dos sistemas de cultivo diferentes. Los resultados obtenidos indicaron que el crecimiento en medio líquido presentó menor abundancia de cristales proteicos (Figura 7c), igual a lo reportado por Castrejón, A., (2020), mientras que se observó una mayor producción cristales en medio sólido (Figura 7d). *B. thuringensis* realiza un proceso llamado *quorum sensing* definido por Rutherford y Bassler, (2012) como el proceso de comunicación célula-célula que permite a las bacterias compartir información sobre la densidad celular y ajustar la expresión génica en consecuencia. En el cultivo líquido la constante difusión de oxígeno genera una alta concentración bacteriana (es decir condiciones adecuadas de crecimiento), además de moléculas de señalización que se unen a receptores específicos que activan cascadas de señalizaciones que detienen la esporulación y afectan notablemente el desarrollo de cristales parasporales (Rocha Estrada., 2014) y (Sierra-Martínez et al., 2004). Mientras que en el cultivo en medio sólido la difusión de oxígeno probablemente sea deficiente y por lo tanto el *quorum sensing* indica a las células que hay condiciones de estrés necesarias para producir el cristal. Finalmente, Sarrafzadeh y Navarro; (2006) confirman que *B. thuringiensis* aumenta la producción de proteínas al tener bajas condiciones de aireación, además de cristales más grandes. Concluyendo que el cultivo en medio sólido es el más apto para obtener una mejor producción proteica.

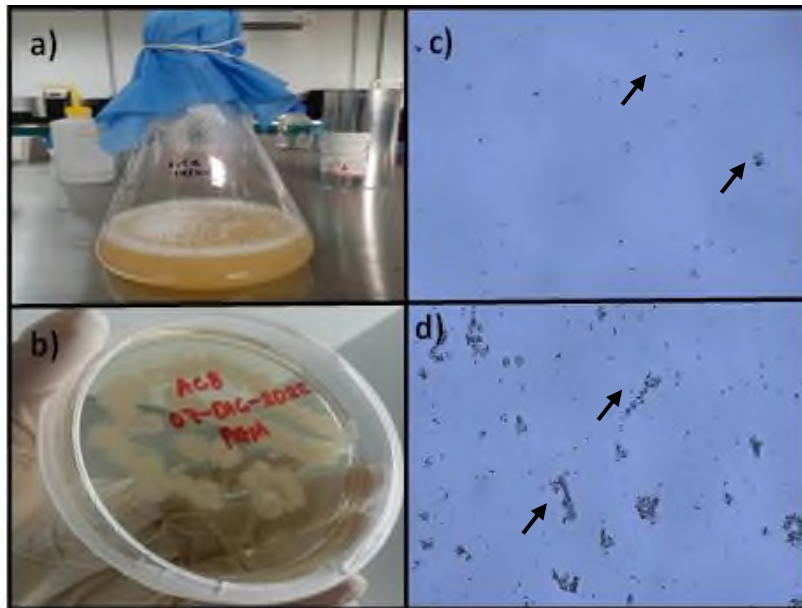


Figura 7. Medios de cultivo empleados en la evaluación de cristales proteicos. Medio a) líquido y b) sólido; cristales observados a las 12 horas de cultivo con la tinción de coomassie en el medio c) líquido y d) sólido; con un objetivo de 10 X. Las flechas señalan los cristales proteicos.

Para complementar el proceso se realizó un monitoreo microscópico el crecimiento bacteriano del cultivo en medio sólido durante 12 horas. Se observó que las fases de crecimiento coinciden con lo reportado por Berbert-Molina et al., (2008) y Zerda Méndez., (2004). La fase I o de crecimiento vegetativo a las 2 horas (Figura 8 a y b), fase II ó transición a esporulación a las 8 horas (Figura 8 c) y fase de esporulación o liberación de la exoespora a las 12 horas (Figura 8 d). Por otro lado, de acuerdo a lo que señalan Mizuki et al., (2000) y Hernández Guzmán., (2014) la formación y liberación del cristal coinciden con las fases II y III por lo que el cristal fue liberado en ese tiempo (Figura 9); este resultado se comprobó con una tinción de cristales a las 12 horas, confirmando finalmente la presencia del cristal esporulado.

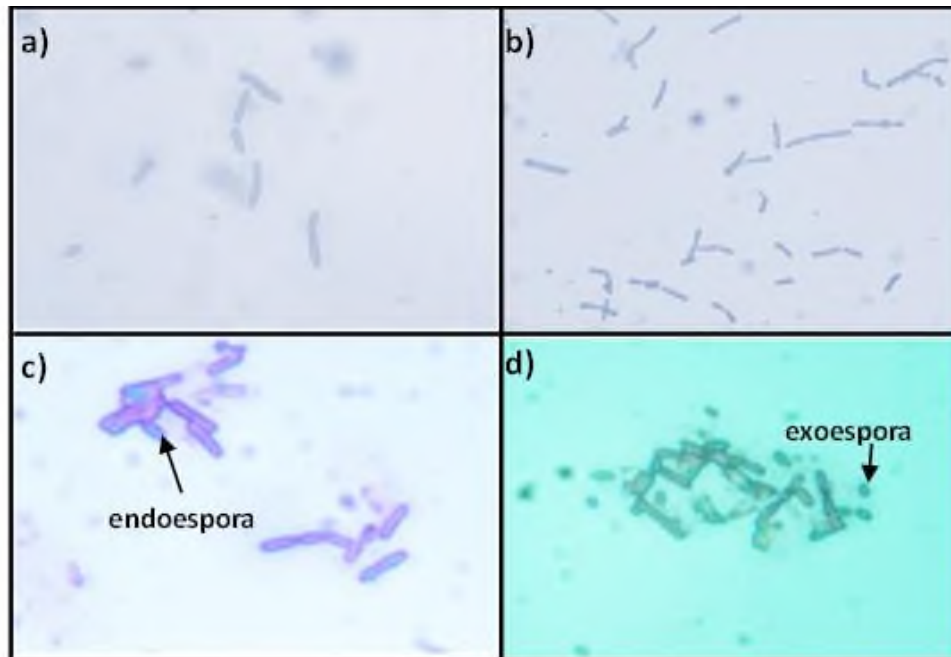


Figura 8. Monitoreo microscópico del crecimiento de *B. thuringiensis* en medio sólido; a y b) Fase I (60 minutos y 2 h); c) Fase II ó formación de la endospora (8 h); d) Fase III ó liberación de la exospora (12 h). Imágenes observadas con un objetivo de 40X en microscopio óptico. Las flechas muestran la endospora y la exospora.

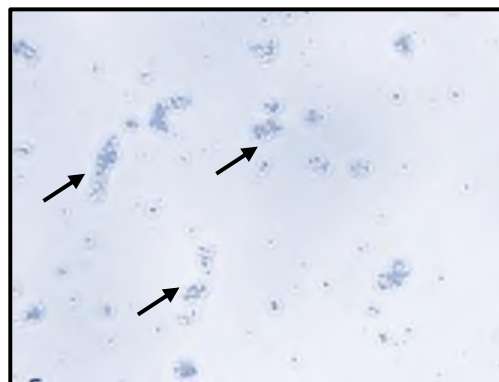


Figura 9. Cristales proteicos de *B. thuringiensis* observados a las 12 horas del cultivo en medio sólido, tras la tinción con azul de coomassie. Imágenes observadas con un objetivo de 10X con un microscopio óptico. Las flechas señalan los cristales proteicos.

## 11.2 Purificación de los cristales parasporales y morfología por SEM

Una de las características importantes en la clasificación de los cristales producidos por *B. thuringensis* es su morfología. Por lo que el siguiente paso fue purificar los cristales con NaCl, tritón X-100 y hexano; modificando el protocolo reportado por Mounsef et al., (2014), con la finalidad de reducir esporas y bacterias que impidieran la visualización de los cristales proteicos en la microscopia electrónica de barrido (SEM) (Hernández Guzmán., 2014).

Se realizó la tinción con verde malaquita; las esporas presentaron un color verdoso, por su cubierta más compleja e impermeable que la cubierta de las bacterias mientras que las células vegetativas se observaron rojas naranjas (Figura 10). Además, la tinción de cristales se realizó con azul de coomassie, confirmándose la presencia de cristales proteicos con un color azul intenso; este efecto es generado por las interacciones electrostáticas que se dan entre el compuesto azul brillante coomassie y los grupos amino y carboxilo de las proteínas (Georgiou et al., 2008), (Figura 11). Finalmente, con los dos lavados con hexano implementados en este tratamiento se pudo confirmar una reducción parcial de las esporas (Mounsef et al., 2014), visualizándose el cristal de AC8 con una forma redondeada (Figura 12).

Nair et al., (2018), reporta 4 subclases de proteínas esféricas y las clasifica de acuerdo a sus detalles intrínsecos en esférico (liso, con superficie ondulada, con forma de globo desinflado y cóncavo con borde puntiagudo). Siendo la más abundante la categoría de esférico con superficie ondulada en un 46.7% de los casos. Por lo tanto, los cristales producidos y aislados de la cepa AC8 y de acuerdo a la clasificación realizada por Nair et al., (2018), se puede clasificar como: cristal esférico con superficie ondulada. Además de las micrografías se pudo obtener una longitud (ancho y largo) de cristales de AC8 de 0.10  $\mu\text{m}$  por sus características esféricas; descartando la posibilidad de ser esporas ya que estas son más grandes con diámetros de 2.5  $\mu\text{m}$  (largo) y un radio de 0.7 a 1  $\mu\text{m}$  (ancho) Loutf H et al., (2020).

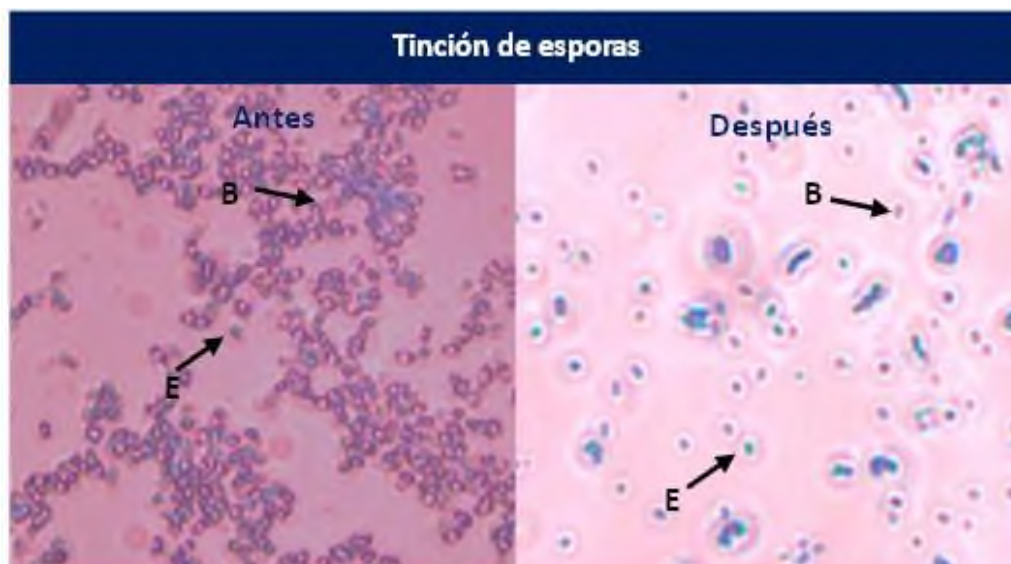


Figura 10. Tinción de esporas con verde malaquita. Antes y después de la purificación; las flechas mostradas indican B: bacterias (en rosa) y E: esporas (en verde). Visto con un microscopio óptico (10X).



Figura 11. Tinción de cristales con azul de coomassie. A) antes y B) después de la purificación. Las flechas indican c: cristales parasporales. Visto con un microscopio óptico (10X).

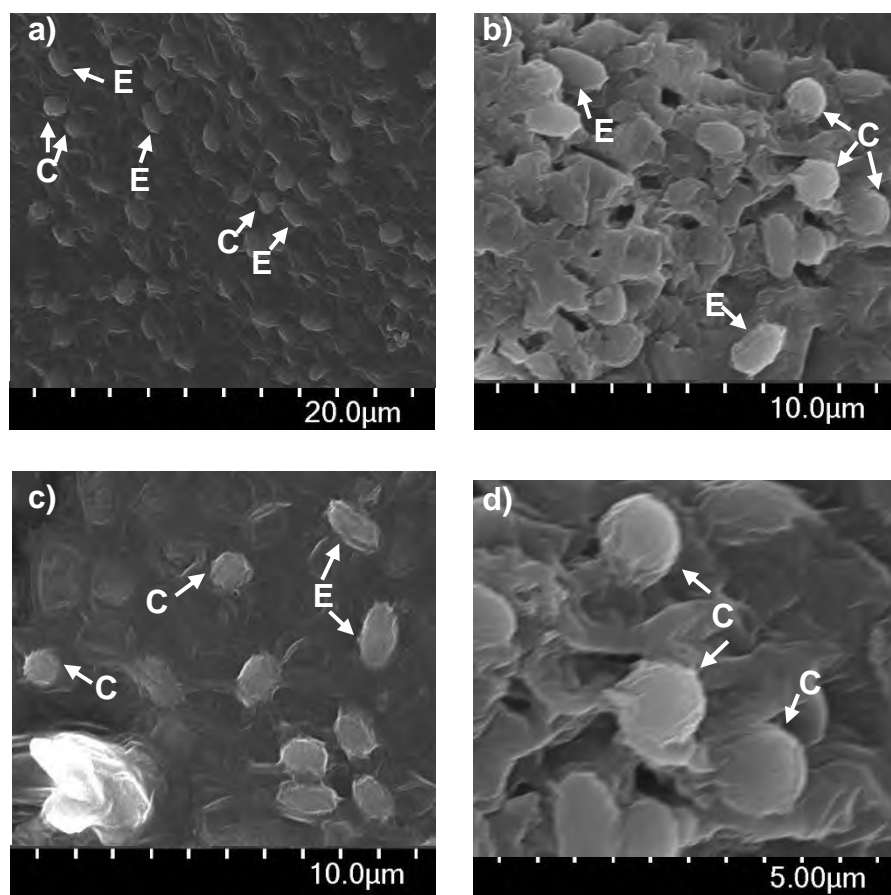


Figura 12. Micrografías de la proteína de AC8 de *B. thuringiensis* con microscopio electrónico de barrido marca Hitachi, Modelo SU8230 de emisión de campo de cátodo frío. Con condiciones de prueba de 10Kv, 8.5 mm y ampliaciones de a) 20, b) 10, c) 10 y d) 5 μm en la barra de escala. Las flechas indican C: Cristales parasporales; E: Esporas.

### 11.3 Perfil de separación de proteínas y selección de las bandas proteicas

Se analizó el perfil de separación de proteínas en geles de poliacrilamida al 12% para esto las proteínas provenientes del cultivo en medio sólido (Figura 13a) se comparó con el perfil del medio líquido (Figura 13b). Los resultados obtenidos indican que en cultivo en medio sólido se observan bandas definidas; semejante a lo observado cuando hay proteínas degradadas. Este suceso fue estudiado por Hernández Guzmán., (2014), quien evaluó el efecto de la aireación y el pH en el cultivo *B. thuringensis*; concluyendo que la alta concentración bacteriana genera que las bacterias compitan por la falta de nutrientes, llegando a desaminar aminoácidos produciendo  $\text{NH}_3$  ocasionando un aumento gradual en el pH que por tiempos prolongados generan la degradación de los cristales proteicos. Además, los valores de alcalinidad pueden oscilar hasta un pH de 10 durante las primeras horas, produciendo una solubilización tan potente como la tripsina o las soluciones de solubilizado (Hernández Guzmán., 2014) a su vez tan semejante como el efecto de solubilizado que presentan muchas proteínas Cry al ser ingeridas en el intestino de algunos insectos (López Pazos., 2010). Estudios afirman que a medida aumenta la alcalinidad del medio de cultivo, la acción de las proteasas es mejor (Reinoso Pozos, Y., 2016). De este modo también es importante apostar por una fuente de carbono que metabolice de manera lenta pero continua y que no se produzca elevadas concentraciones  $\text{NH}_3$  (Hernández Guzmán., 2014).

Por último, a partir los corrimientos electroforéticos se logró identificar 6 bandas definidas con pesos moleculares de 14, 26, 32, 40, 66 y 87 kDa recuperadas del crecimiento en medio sólido (Figura 13a). Estas proteínas fueron seleccionadas porque se encuentran en el intervalo que pudieran contener las parasporinas (Chengchen et al., 2014). Además, la cepa AC8 de *B. thuringensis* demostró tener capacidad de producir proteínas al cambiar la recuperación de las mismas a partir de su crecimiento en medio sólido mostrando también un mejor perfil de separación de proteínas.

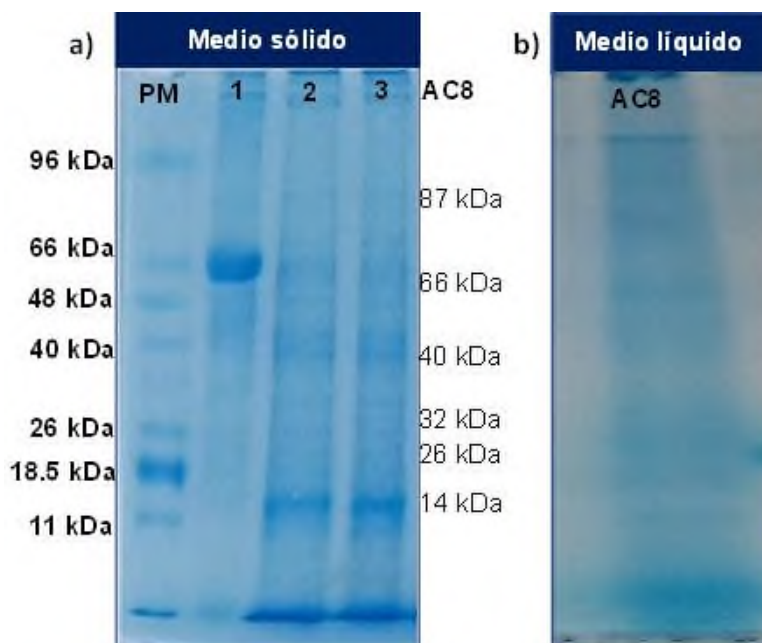
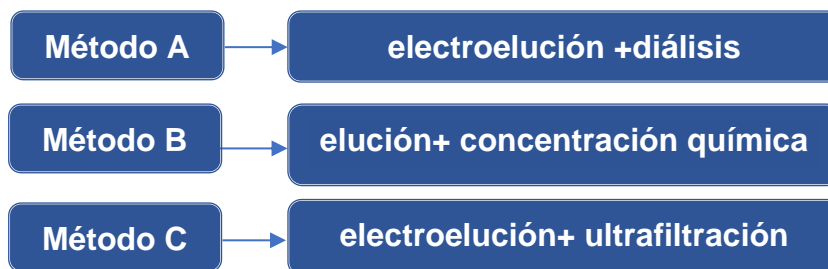


Figura 13. Perfil de separación de proteínas de AC8 en gel de poliacrilamida al 12% proveniente del medio a) sólido y b) líquido; PM= marcador de peso molecular; carril 1= BSA; carril 2 y 3: AC8

#### 11.4 Purificación de los extractos proteicos

Para evaluar la actividad citotóxica de las proteínas seleccionadas, se recuperaron las seis bandas proteínas seleccionadas de los geles de poliacrilamida y se evaluaron tres métodos de purificación proteica que facilitaron la recuperación de la mayor concentración de proteínas. Los métodos fueron:



Los métodos antes mencionados constan de dos fases importantes, la primera consiste en extraer la proteína retenida del gel de poliacrilamida mediante (electroelución ó elución) y la segunda fase en eliminar todo tipo de residuos que se encuentren con la proteína y concentrarla (diálisis, concentración química ó ultrafiltración). La electroelución

consistió en extraer la proteína del gel de poliacrilamida con ayuda de potencial eléctrico; mientras que la diálisis requirió una membrana semipermeable dentro de una solución amortiguadora de fosfatos. También se usaron solventes orgánicos en el método B, como isopropanol para la elución y acetona, agua, ácido acético en proporciones (50:49:1) para la precipitación (Ball et al., 1986).

La ultrafiltración se realizó con los filtros de amicon ultra (Johnsen et al., 2016). Estos filtros están constituidos por una membrana con tamaños de poro de 10 kDa que permiten el paso de sustancias exógenas y la concentración de las proteínas de por encima de los 10 kDa.

El método A por Bradford indicó concentraciones menores (1.47 a 87.796  $\mu\text{g/mL}$ ) al compararlo con Castrejón, A., (2020) quien reportó concentraciones desde 160 a 300  $\mu\text{g/mL}$  en las cepas A13 y A24 aisladas del mismo campo de cultivo. Estas diferencias de valores pudieron deberse a la falta de control del tiempo de diálisis y la naturaleza de las bolsas empleadas, la cantidad de proteína adicionada en cada bolsa y la baja selectividad de las proteínas en las bolsas de diálisis para permitir el flujo libre (McPhie., 1971). Por otro lado, el método B resultó más efectivo que el método A para las proteínas de 14, 32 y 40 kDa, incrementando 1.2, 2.4 y 30 veces la concentración proteica, respectivamente; pero el método B podría no ser el más adecuado al no recuperar todas las proteínas de interés y dejar trazas de residuos químicos que afectan la actividad biológica de las proteínas (Ball et al., 1986). Finalmente se empleó el método C que favoreció la concentración en todas las proteínas desde 489.756 a 575.121  $\mu\text{g/mL}$ , sin dejar residuos químicos e incrementando hasta 106 veces más la concentración con respecto a los métodos anteriores. Por último, se realizó un corrimiento electroforético en un gel SDS-PAGE al 12% (Figura 14) para verificar la presencia de las proteínas en el método C y se visualizaron perfectamente las proteínas de interés. Por tanto, se usará esta metodología para recuperar proteínas y realizar los bioensayos de seguridad farmacológica y en la línea celular MCF-7 de cáncer de mama (Tabla 5).

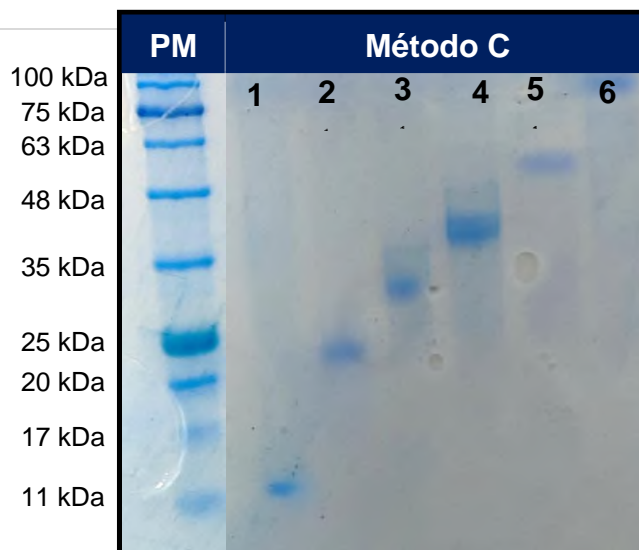


Figura 14. Perfil de separación de las proteínas de AC8 de *B. thuringensis* recuperadas del método C (electroelución+ ultrafiltración) en el gel de poliacrilamida al 12%, PM= marcador de peso molecular; carril 1= proteína de 14 kDa, carril 2= proteína de 26 kDa, carril 3= proteína de 32 kDa, carril 4= proteína de 40 kDa, carril 5= proteína de 60 kDa y carril 6= proteína de 87 kDa.

Tabla 5. Concentraciones proteicas y rendimientos. Proteínas cuantificadas en ( $\mu\text{g/mL}$ ) mediante diferentes métodos de purificación; A (electroelución+ diálisis); B (elución+ concentración química) y método C (electroelución+ ultrafiltración) con las proteínas de AC8 de *B. thuringensis*.

Proteínas de AC8	Métodos de purificación proteica			Rendimientos %		
	proteína ( $\mu\text{g/mL}$ )			A	B	C
	A	B	C	A	B	C
14 kDa	16.8 $\pm$ 3.1	21.3 $\pm$ 0.7	561.3 $\pm$ 2.3	5	26	187
26kDa	41.3 $\pm$ 2.7	32.5 $\pm$ 1.6	495.4 $\pm$ 1.5	27	26	344
32 kDa	4.7 $\pm$ 0.0	11.4 $\pm$ 0.0	504.3 $\pm$ 2.5	1	23	181
40 kDa	1.4 $\pm$ 0.3	44.1 $\pm$ 0.3	540.9 $\pm$ 1.5	0.34	21	166
66 kDa	87.7 $\pm$ 2.5	16.8 $\pm$ 1.5	489.7 $\pm$ 1.7	38	28	230
87 kDa	76.5 $\pm$ 0.2	20.8 $\pm$ 0.5	575.1 $\pm$ 3.2	24	25	182

### 11.5 Ensayo de citotoxicidad en células mononucleares de sangre periférica

Las células mononucleares de sangre periférica (CMSP), representan la primera línea de respuesta celular inmediata cuando el cuerpo se expone a agentes tóxicos, además de su fácil manejo, requerimientos mínimos para su extracción y la similitud en la respuesta que tendría en una aplicación *in vivo* un organismo completo (Martínez et al., 2007). Por eso se evaluó la citotoxicidad de los seis aislados proteicos en CMSP con cuatro concentraciones de proteína diferentes (6, 12, 24 y 33 µg/mL) y se determinó la viabilidad celular mediante el método de MTT.

Los resultados del bioensayo dosis-respuesta indican que las proteínas de mayor peso molecular 40, 66 y 89 kDa presentaron efecto de tipo proliferativo de hasta 150% de viabilidad celular. Además, la proteína de mayor peso molecular (89 kDa) presenta los valores más altos de viabilidad en todas las concentraciones evaluadas (6, 12, 24 y 33 µg/mL). Aunque se sabe que una pequeña porción de monocitos puede diferenciarse a osteoclastos, bajo condiciones *in vitro*, no se han reportado compuestos que puedan hacer proliferar las células. Sin embargo, es un campo de estudio que se encuentra en exploración (Lari et al., 2009).

En contraste las proteínas de (14, 26 y 32 kDa) disminuyeron su porcentaje de viabilidad en un 15% para la proteína de 14 kDa a 24 y 33 µg/mL, un 25% para las de 26 y 32 kDa a 33 µg/mL, sin embargo, la norma ISO 10993 que describe métodos de prueba para evaluar la toxicidad *in vitro* asociada a dispositivos médicos y cuya clasificación menciona que una viabilidad entre un 75 y 100% corresponde a un agente no tóxico (Hernández Ruiz., 2021). Finalmente podemos concluir que no existe un efecto citotóxico agudo asociado con las seis proteínas a las 4 concentraciones analizadas (Figura 15).

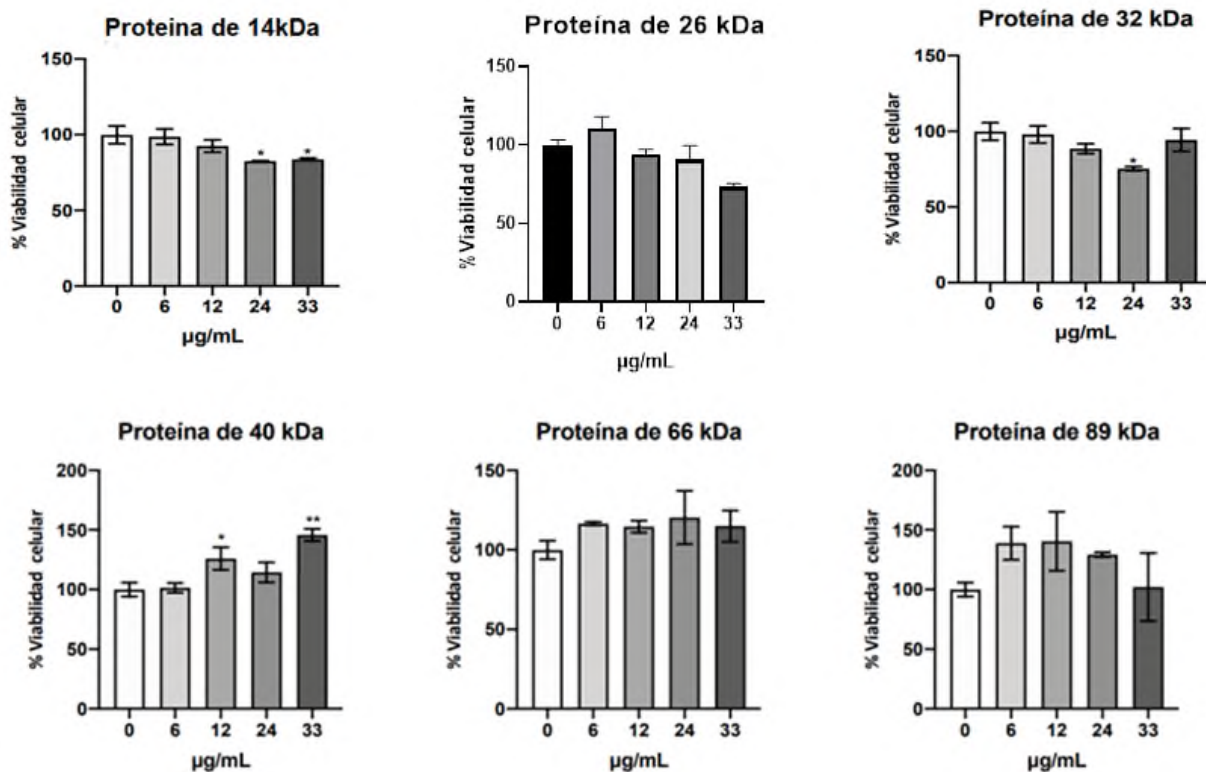


Figura 15. Curva dosis-respuesta con las proteínas de 14, 26, 33, 40, 66 y 89 kDa en CMSP, a concentraciones de 6, 12, 24 y 33 µg/mL a las 24 horas de incubación. Los resultados están expresados como porcentaje con respecto al control negativo (100%). Los datos se expresaron como media  $\pm$  y desviación estándar (DE). Los análisis estadísticos se realizaron mediante ANOVA de 1 vía seguido de la prueba de Dunnet. Los valores con  $p < 0.05$  se consideraron estadísticamente significativos. Siendo \*  $p < 0.001$

## 11.6 Ensayo de citotoxicidad en eritrocitos

Se realizó el ensayo de citotoxicidad en eritrocitos provenientes de un donante humano con las proteínas de 14, 26, 32, 40, 66 y 89 kDa (Figura 16), y se clasificaron las absorbancias de cada proteína de acuerdo a lo reportado por; donde reportan que la Absorbancia > 1.00, Alto (+ + +); 0.99 > 0.51, Moderado (+ +); 0.50 > 0.21, Bajo (+), (Mizuki et al 1999, Uemori et al 2007 & Chubicka et al 2018) (Tabla 6).

Las proteínas de 14, 26, 32 y 89 kDa no presentaron diferencia significativa entre ellas, con un porcentaje de hemólisis de 14.35, 13.67, 13.67 y 12.90% respectivamente. Además, la proteína de 66 kDa, aunque presenta un 38.29% de hemólisis está dentro del 40% permitido para considerar a una molécula farmacológicamente segura (Rangel et al.,1997) y (Rojas Torres., 2019).

Da Silva et al. (2022) realizó un ensayo de hemólisis donde enfrentó eritrocitos con aceite extraído de la planta *Butia catarinensis* y reportó que las concentraciones farmacológicamente seguras presentaban un 12% de hemólisis al compararlo con el control positivo de tritón x-100; estos valores son muy similares a las proteínas no hemolíticas obtenidas en este trabajo.

La proteína de 40 kDa provocó la lisis celular y la liberación de la hemoglobina con un 69.82%, resultado que se pudo verificar visualmente, y clasificarse en la categoría de baja, con absorbancias mayores a 0.20 y menores a 0.50; este valor es similar a lo reportado por (Alonso- Geli et al., 2015) donde obtuvo un efecto hemolítico del 72% al evaluar la fragilidad osmótica de eritrocitos con una solución de NaCl al 0.4% de NaCl.

Rojas Torres., (2019) Reportaron que además los genes *Cyt* que codifican proteínas hemolíticas, la presencia de genes *Cry* con actividad insecticida en lepidópteros, dípteros y coleópteros dañan la membrana de los eritrocitos tal como lo hace el detergente tritón X-100 que es considerado hemolítico.

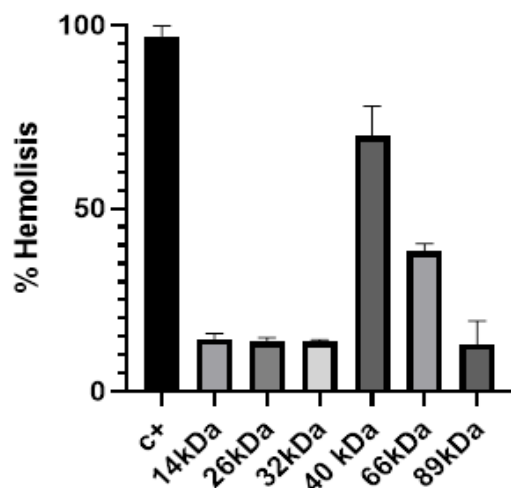


Figura 16. Gráfica de hemólisis de las proteínas de 12, 26,32, 40, 66 y 87 kDa al enfrentarlas con eritrocitos. Los resultados están expresados como porcentaje con respecto al control negativo (100%). Los datos se expresaron como media  $\pm$  y desviación estándar (DE). Los análisis estadísticos se realizaron mediante ANOVA de 1 vía seguido de la prueba de Dunnet. Los valores con  $p < 0.05$  se consideraron estadísticamente significativos.

Tabla 6. Actividad hemolítica producida por las proteínas producidas por AC8 de *B. thuringensis*

Proteína	Promedio de absorbancias	Actividad hemolítica
<b>14 kDa</b>	0.056	-
<b>26kDa</b>	0.053	-
<b>32 kDa</b>	0.053	-
<b>40kDa</b>	0.272	+
<b>66kDa</b>	0.150	-
<b>89kDa</b>	0.075	-

### 11.7 Ensayos de citotoxicidad con MTT y rojo neutro en células MCF-7

Después de evaluar las proteínas de 14 y 26 kDa con los criterios de bioseguridad, se realizaron ensayos en la línea celular de cáncer de mama MCF-7 a concentraciones de (0.08, 0.16, 0.32, 0.64, 1.30, 2.60, 5.20, 10.40 y 20.80  $\mu\text{g/mL}$ ). Los resultados del ensayo de MTT indican que la proteína de 14 kDa no muestra diferencia significativa entre la concentración de 0.08  $\mu\text{g/mL}$  y el control negativo (PBS); sin embargo, a partir de la

concentración de 0.16 µg/mL se presenta una reducción de la viabilidad celular de un 15% hasta un 22.2% para 10.40 µg/mL, siendo ésta última concentración la más citotóxica (Figura 17 A).

Además, la proteína de 26 kDa no presenta diferencia significativa entre las concentraciones de 0.08 hasta 5.20 µg/mL con respecto al control negativo (PBS) y las concentraciones de 10.40 y 20.80 µg/mL resultaron ser citotóxicas para esta línea celular con un 20 y 30% de reducción de la viabilidad respectivamente (Figura 17 B). Esto nos permite concluir que, aunque hay citotoxicidad constante en la proteína de 14 kDa a concentraciones menores, la proteína de 26 kDa presenta mayor efecto citotóxico a la concentración de 20.80 µg/mL; siendo ésta la más citotóxica para la línea MCF-7.

Melo y Kitada., (2020) evaluaron la proteína A14d2 proveniente de *B. thuringensis* aislada en Japón y observaron alta citotoxicidad en células MCF-7 al probar concentraciones de 25 y 50 µg/mL. Además, Corrêa et al., (2012) reportaron una disminución de la viabilidad del 22% en células MCF-7 al enfrentarla con la proteína *CytBa* de *B. thuringensis*, evaluando la concentración de 20 µg/mL; estos valores son muy semejantes a lo reportado en este trabajo.

En cambio, algunos autores han utilizado concentraciones altas de compuestos provenientes de otras fuentes al enfrentarlas con las células MCF-7; (Souza- Filho y col. 2014) evaluó concentraciones de 300, 500 y 900 µg/mL de extractos antioxidantes de una fruta amazónica al enfrentarlos en la línea celular MCF-7 de cáncer de mama, reportando una disminución considerable de la viabilidad. Además, (Rodríguez Rojas., 2021) utilizó nanocristales sintetizados a partir de moléculas orgánicas (puntos de carbono) con las líneas celulares MCF-7 a concentraciones de 25, 125, 250 y 500 µg/mL obteniendo una reducción de la viabilidad celular del 22%. Aunado a lo anterior, Galindo Veciana., (2014) reportó que la concentración de un compuesto bioactivo se considera viable hasta 100 µg/mL con un 74,6% de viabilidad en las células tratadas. Por último, las proteínas de 14 y 26 kDa se podrían considerar viables y dentro del rango de tóxicas con 10.40 y 20.80 µg/mL de acuerdo a lo reportado por PECET., (1992), donde clasificaron el grado de citotoxicidad para extractos y fracciones derivados de plantas y productos naturales. Y han concluido que el rango entre 10 y 100 µg/mL en células tratadas y con un 50% de muerte celular, se considera una molécula toxica.

Aunque ambas parasporinas no tuvieron un efecto citotóxico mayor al 50% en las concentraciones estudiadas, la tendencia de la proteína de 26 kDa sugiere que al ampliar el rango de concentraciones en futuros ensayos podría alcanzar el 50% de muerte celular. Además de que ambas proteínas (14 y 26 kDa) podrían ser usadas en terapia sinérgica; Es decir combinarlas con otras moléculas de interés farmacológico, para potenciar su efecto citotóxico, (Castrejón, A., 2020).

Finalmente, se realizó el ensayo de rojo neutro (Figura 17 C y D) y se comparó con los resultados obtenidos del ensayo de MTT. Esto permitió verificar que existe la misma tendencia y hubo en su mayor parte un acuerdo entre ambos ensayos. Pueden existir diferencias por el grado de sensibilidad de cada técnica.

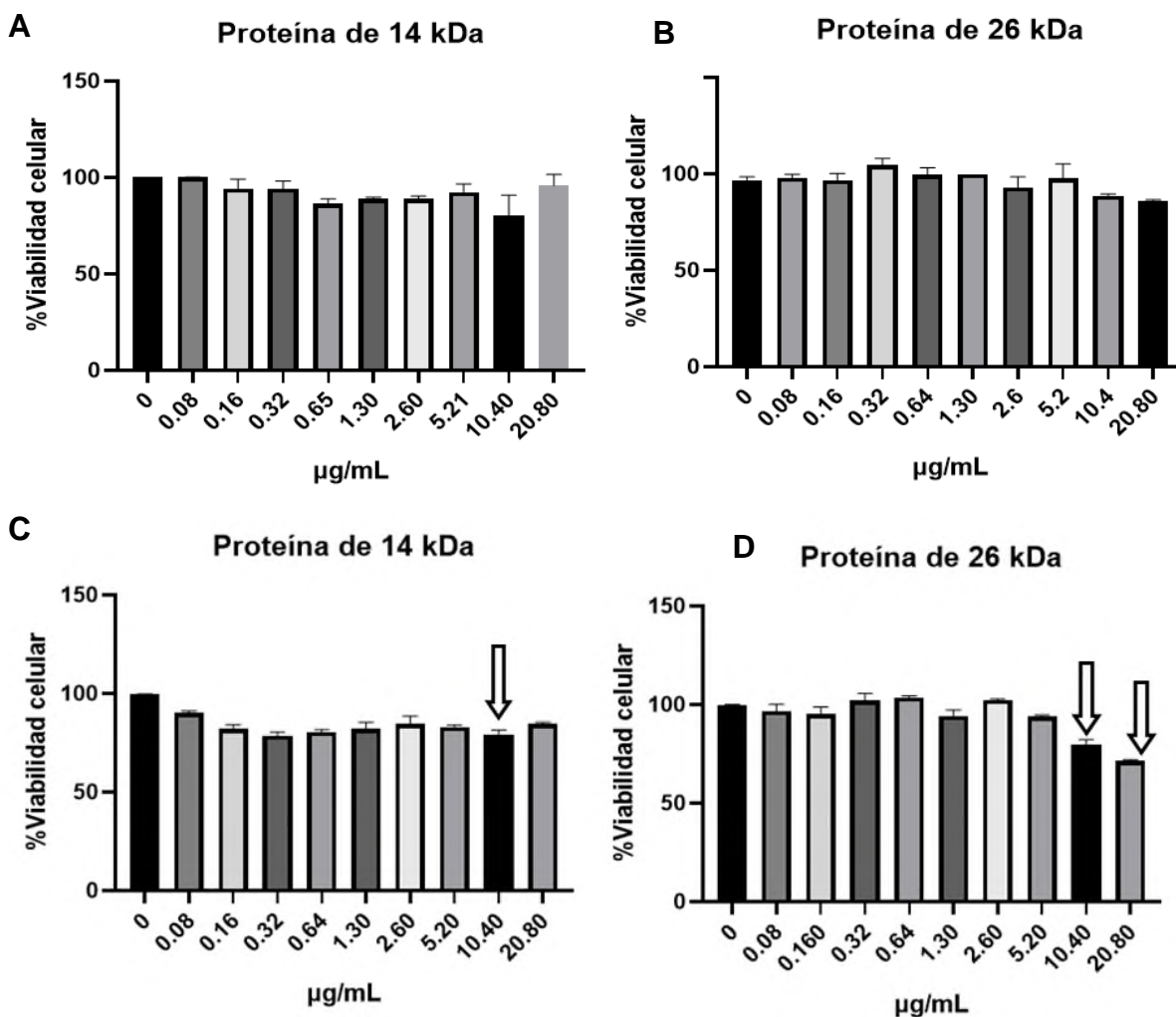


Figura 17. Gráfica de viabilidad celular con el ensayo de MTT con la proteína de A) 14 kDa y B) 26 kDa y el ensayo de rojo neutro C) 14 kDa y D) 26 kDa a las 48 h de incubación con la línea celular MCF-7 de cáncer de mama. Control negativo (PBS) y concentraciones de 0.08, 0.16, 0.32, 0.64, 1.30, 2.6, 5.2, 22.5 y 19.2 µg/mL respectivamente. Los resultados están expresados como porcentaje con respecto al control negativo (100%). Los datos se expresan como la media  $\pm$  error estándar. Los análisis estadísticos se realizaron mediante ANOVA de 1 vía seguido de la prueba Dunnet. Los valores con  $p < 0.05$  se consideraron estadísticamente significativos.

## 11.8 Cambios morfológicos inducidos por la proteína de 14 y 26 kDa en las células MCF-7

Después de aplicar tratamiento con las proteínas de 14 y 26 kDa a diferentes concentraciones sobre la línea MCF-7, se realizó un seguimiento morfológico a las 24 y 48 horas de incubación. Los controles fueron PBS (control negativo) y Doxorrubicina 4 Mm (control positivo). Las observaciones realizadas muestran cambios morfológicos que justifican la citotoxicidad de las proteínas de 14 y 26 kDa a las concentraciones de 10.40 y 20.80  $\mu\text{g/mL}$  en los ensayos de MTT y rojo neutro. Los cambios son transiciones de la forma poligonal que es propia de una morfología epitelial en monocapa, a redonda con superficies lisas con indicativo de daño celular (Borín et al., 2021). La pérdida de la morfología epitelial propia de las células redondas es indicativo de pérdida de contacto entre las células vecinas, cambios compatibles por el proceso de muerte celular (Jaimes et al., 2016).

Los resultados sugieren que las células con tratamiento presentan la morfología de una célula en apoptosis, donde presenta cambios moleculares como la ruptura de la doble hélice de ADN, asociados a la caspasa 3/7 y la condensación de la cromatina nuclear eventos que se observan incluso en ausencia del gen p53, el Bax o la caspasa 3 (35). Este hallazgo es prometedor, pues la mayoría de las células cancerígenas que son resistentes a la muerte celular se asocian con mutaciones en el p53, en la caspasa 3 o en miembros de la familia de las Bcl2 (Jaimes et al., 2016)

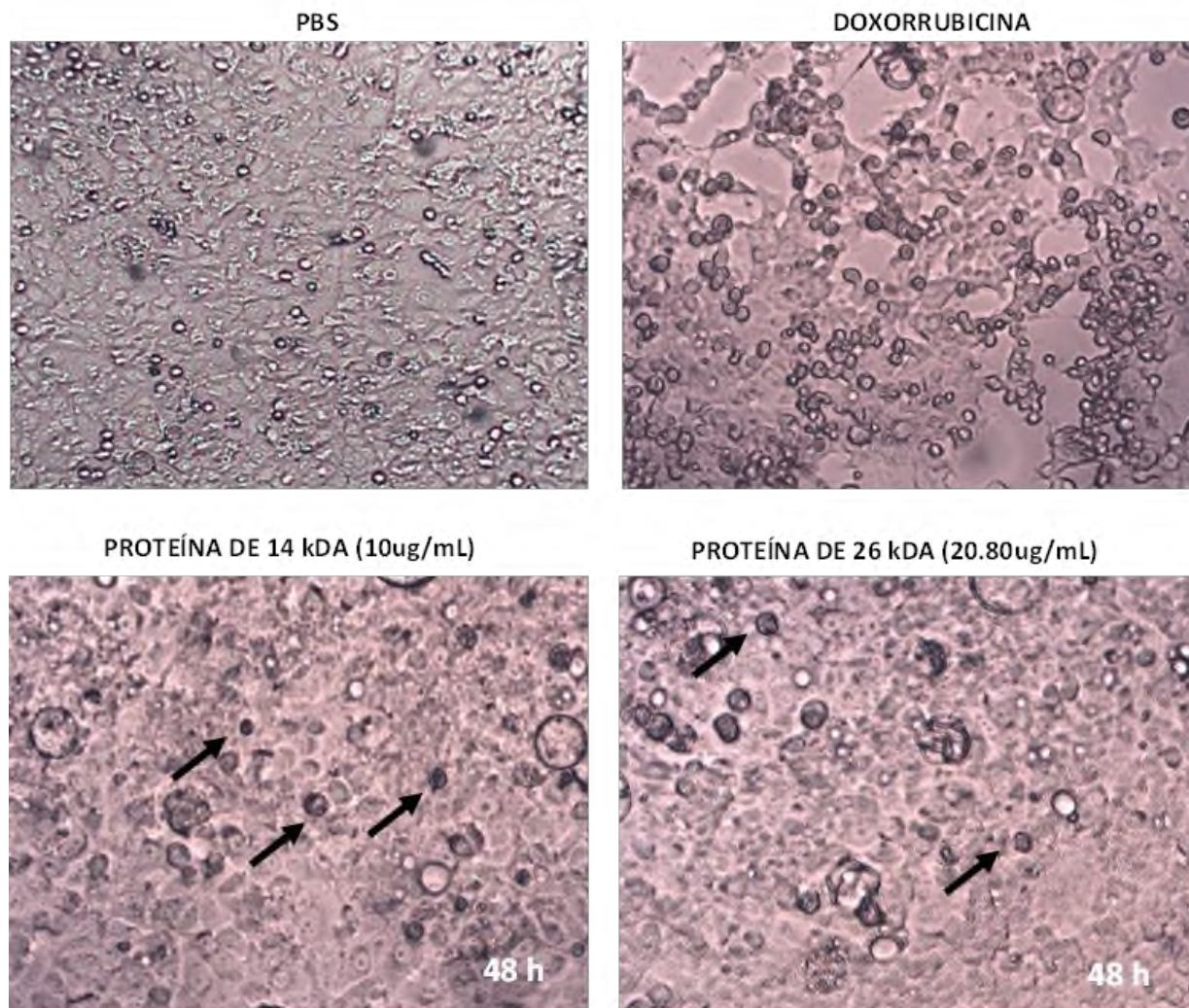
**CONTROL**

Figura 18. Cambios morfológicos inducidos por las proteínas de 14 y 26 kDa a las 48 horas de incubación Analizado por microscopia óptica con un objetivo de 20X. Las flechas señaladas muestran las células en estado apoptótico.

## 12.CONCLUSIONES

- 1.- El crecimiento de la cepa AC8 de *B. thuringensis* en medio sólido permitió observar una mayor producción de cristales proteicos que el crecimiento en medio líquido.
- 2.-Se identificaron seis proteínas con pesos moleculares de 14, 26, 32, 40, 66 y 87 kDa en la cepa AC8 de *B. thuringensis*
- 3.-El cristal parasporal de AC8 presentó una morfología esférica con superficie ondulada.
- 4.- El método de purificación en la que se obtuvo mayor concentración de proteína fue el método C (electroelución y ultrafiltración con los filtros amicon-ultra).
- 5.-Los ensayos de seguridad farmacológica demuestran que las proteínas de 14, 26, 32, 66 y 87 kDa no presentan efecto citotóxico en monocitos y eritrocitos.
- 6.- Las proteínas de 14 y 26 kDa son parasporinas con efecto citotóxico en la línea celular MCF-7 de cáncer de mama.

### 13. PERSPECTIVAS

De acuerdo a los resultados obtenidos, quedan como perspectivas del trabajo:

- 1.- Demostrar muerte por apoptosis de las proteínas de 14 y 26 kDa provenientes de la cepa AC8 de *B. thuringensis* mediante citometría de flujo.
- 2.- Realizar estudios de biología molecular en células MCF-7 para la expresión de caspasas que indican la vía de muerte celular (intrínseca o extrínseca).
- 3.- Realizar ensayos de citotoxicidad en otras líneas celulares de cáncer, con las proteínas obtenidas por la cepa AC8 de *B. thuringensis*.

## 14. BIBLIOGRAFÍA

Adang, M. J., Crickmore, N., & Jurat-Fuentes, J. L. (2014). Diversity of *Bacillus thuringiensis*. Crystal toxins and mechanism of action, 47. 39–87. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800197-4.00002-6>.

Alonso-Geli, Yamirka., Alonso-Moreno, Yamisleydi., Falcón-Diéguez, José E., Lucambio Miró, Liset., Castro-Piñol, Mariana. (2015). Caracterización de la fragilidad osmótica de eritrocitos humanos en la anemia drepanocítica. Revista Cubana de Química, 27(2), 110-118.

Álvarez Hernández, C., Vich Pérez, P., Brusint, B., Cuadrado Rouco, C., Díaz García, N., & Robles Díaz, L. (2014). Actualización del cáncer de mama en Atención Primaria (III/V). SEMERGEN- Medicina de Familia, 40(8), 460–472. <https://doi.org/10.1016/j.semerg.2014.04.006>

American Cancer Society. (2018). Detección temprana, diagnóstico y clasificación por etapas. Estados Unidos. Recuperado de <https://www.cancer.org/content/dam/CRC/PDF/Public/8969.00.pdf>

Ball, E. H. (1986). Quantitation of proteins by elution of Coomassie brilliant blue R from stained bands after sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. Analytical Biochemistry, 155(1), 23-27. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(86\)90218-6](https://doi.org/10.1016/0003-2697(86)90218-6).

Bechtel, D & Bulla, L.(1976) Electrón microscope study of sporulation and parasporal crystal formation in *Bacillus thuringiensis*. Journal of bacteriology, 127(3), 1472-8.

Berbert-Molina, M. A., Prata, A. M. R., Pessanha, L. G., & Silveira, M. M. (2008). Kinetics of *Bacillus thuringiensis* var. israelensis growth on high glucose concentrations. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 35(11), 1397-1404. <https://doi.org/10.1007/s10295-008-0439-1>

Borin, D. B., Castrejón-Arroyo, K., Cruz-Nolasco, A., Peña-Rico, M. Á., Sagrillo, M. R., Santos, R. C., De Baco, L. S., Pérez-Picaso, L., Camacho, L., & Navarro-Mtz, A. K. (2021). Parasporin A13-2 of *Bacillus thuringiensis* isolates from the Papaloapan region (Mexico) induce a cytotoxic effect by late apoptosis against breast cancer cells. *Toxins*, 13(7), 476. <https://doi.org/10.3390/toxins13070476>.

Bravo-D, H., Cruz-Nolasco, A., Gutiérrez-Lucas, L. & Navarro-Mtz, A. K. (2015). Bioinformatics Analysis of NprR-NprX Quorum-Sensing System of *Bacillus thuringiensis* Isolates from the Papaloapan Region, Oaxaca-Mexico. *Adv in Biol Chem*, 5(7), 293-304.

Bulla, L., Kramer, K. & Davidson L. (1977) Characterization of the entomocidal parasporal crystal of *Bacillus thuringiensis*. *Journal of bacteriology*, 130(1), 375-383.

Catrejón A, K. (2020). Evaluación de la seguridad farmacológica y efecto antiproliferativo de parasporinas libres, de *Bacillus thuringiensis*, sobre células de cáncer de mama, mediante Gatabolismo oxidativo. [Tesis de maestría]. Universidad del Papalopan, Tuxtepec, Oaxaca.

Chai, P. F., Rathinam, X., Solayappan, M., Ghazali, A. H. A., & Subramaniam, S. (2014). Microscopic analysis of a native *Bacillus thuringiensis* strain from Malaysia that produces exosporium-enclosed parasporal inclusion. *Microscopy*, 63(5), 371-375. <https://doi.org/10.1093/jmicro/dfu022>

Chengchen, X., Bi-cheng, W & Ming, S. (2014). Structural Insights into *Bacillus thuringiensis* Cry, Cyt and Parasporin Toxins. *Toxins*, 6(9), 2732-2770.

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

Corrêa, R. F. T., Ardisson-Araújo, D. M. P., Monnerat, R. G., & Ribeiro, B. M. (2012). Cytotoxicity analysis of three *Bacillus thuringiensis* subsp. *Israelensis*  $\delta$ -endotoxins towards insect and mammalian cells. *PloS one*, 7(9).

Da Silva, N. F., Da Silva, G. N. B., Santos, E. B., Santos, J. P. C. L. D., Espindola, M. T. A., De Siqueira Correia, S. D., Castanha, E. R., Da Silva, M. V., Falcão, R. E. A., & Correia, M. T. (2022). Effects of the fixed oil of *Butia catarinensis* Noblick & Lorenzi on the erythrocyte membrane and bacterial strains. *Research, Society and Development*, 11(15). <https://doi.org/10.33448/rsd-v11i15.36720>

Díaz, Cinthya E., Madrid, Vicente., Peralta, Oscar & Bahena, Margarita. (1997). Regulación del ciclo celular y desarrollo de cáncer: perspectivas terapéuticas. *Salud Pública de México*, 39 (5), 451-462.

Ergola, R. (1985). Producción de insecticidas de *Bt*. Centro de investigación y desarrollo de fermentaciones industriales, facultad de ciencias exactas. Universidad Nacional de la Plata, Argentina.

Espino Vásquez, A.N. (2014). Caracterización biológica de parasporinas en cepas nativas de *Bacillus thuringiensis*. [Tesis de maestría]. Universidad autónoma de nuevo León.

Espinosa Ramírez, M. (2017). Cáncer de mama. *Revista Medica Sinergia*, 2(1), 8-12. Recuperado a partir de <https://revistamedicasinergia.com/index.php/rms/article/view/58>

Galindo, C. V., Cortés-Castell, E., Montell, L. T., Segura, E. S., Baeza, M. M. R., & Gil-Guillén, V. F. (2014). Assessment of cytotoxicity and biosafety of polyphenolic extracts from olive pits. *Nutrición hospitalaria*, 29(6), 1388-1393. <https://doi.org/10.3305/nh.2014.29.6.7141>

Georgiou, C. D., Grintzalis, K., Zervoudakis, G., & Papapostolou, I. (2008). Mechanism of Coomassie Brilliant Blue G-250 binding to proteins: a hydrophobic assay for nanogram

quantities of proteins. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 391(1), 391-403. <https://doi.org/10.1007/s00216-008-1996-x>

González, I. C., & Honrubia, V. G. (2018). Cáncer de mama hereditario más allá de BRCA1/BRCA2. *Genética Médica y Genómica* (2).

Gradishar, W. J., Anderson, B. O., Balassanian, R., Blair, S. L., Burstein, H. J., Cyr, A., & Goetz, M. (2015). Breast cáncer, version 1.2016. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*, 13(12), 1475-1485.

Guzmán Aguillón, O. L. (2018). Estudio de la muerte celular inducida por el Immunepotent CRP® en líneas celulares de cáncer de mama y su efecto en combinación con ciclofosfamida o epirubicina. [Tesis doctoral]. Universidad Autónoma de Nuevo León.

Hernández Guzmán, C. (2014). Optimización de las condiciones de cultivo para mejorar el rendimiento de producción y purificación de las proteínas Cry en *Bacillus thuringiensis*. [Tesis de maestría]. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada Baja California, México.

Hernandez, Ruiz, E.I. (2021). [Tesis de maestría]. Evaluación de la actividad citotóxica en sangre periférica humana de nanopolímeros inteligentes para el transporte de fármacos. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California, México.

INEGI. (2020). Estadísticas a propósito del día mundial de la lucha contra el cáncer de mama. México: INEGI. Recuperado de <https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2020/Cancermama20.pdf>

INEGI. (2022). Estadísticas a propósito del día mundial de la lucha contra el cáncer de mama. México: INEGI. Recuperado de <https://www.inegi.org.mx/default.html>

Instituto Nacional del Cáncer. (2015). Estadificación del cáncer. Estados Unidos

NIH. Recuperado de <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/diagnostico-estadificacion/estadificacion>.

Instituto Nacional del Cáncer. (2020). Estadísticas sobre el cáncer: cáncer de mama femenino. Estados Unidos: NIH. Recuperado de <https://www.cancer.gov/espanol>.

Jaimes, N., Salmen, S., Colmenares, M., Burgos, A. E., Tamayo, L. V., Mendoza, R. V., & Cantor, A. (2016). Cytotoxic effect of palladium (II) inclusion compounds in beta-cyclodextrin. *Biomedica*, 36(4). <https://doi.org/10.7705/biomedica.v36i4.2880>

Johnsen, E., Brandtzaeg, O. K., Vehus, T., Røberg-Larsen, H., Bogoeva, V., Ademi, O., Hildahl, J., Lundanes, E., & Wilson, S. R. (2016). A critical evaluation of Amicon ultra centrifugal filters for separating proteins, drugs and nanoparticles in biosamples. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 120, 106-111. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2015.12.010>

Koontz, B. F. (2018). Efectos del tratamiento de radioterapia: Guía de manejo de la toxicidad basada en la evidencia. España: Elsevier España, S.L.U..

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680–685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>

Lari, R., Kitchener, P., & Hamilton, J. A. (2009). The proliferative human monocyte subpopulation contains osteoclast precursors. *Arthritis Research & Therapy*, 11(1). <https://doi.org/10.1186/ar2616>

Lereclus, D., Agaisse, H., Grandvalet, C., Salamitou, S., & Gominet, M. (2000). Regulation of toxin and virulence gene transcription in *Bacillus thuringiensis*. *International Journal of*

Medical Microbiology, 290(4-5), 295-299. [https://doi.org/10.1016/s1438-4221\(00\)80024-7](https://doi.org/10.1016/s1438-4221(00)80024-7)

López Pazos, S.A., Cerón Jairo., (2010). Proteínas *Cry* de *B. thuringensis* y su interacción con coleópteros. Publicación científica en ciencias médicas, 8(14), 183-194.

Loutfi, H., Fayad, N., Pellen, F., Le Jeune, B., Chakroun, M., Benfarhat, D., Lteif, R., Kallassy, M & Le Brun, G., Abboud, M. (2021). Morphological Study of *Bacillus thuringiensis* crystals and spores. Appl. Sci, 2021 (11), 155. <https://doi.org/10.3390/app11010155>.

Malumbres, M., & Barbacid, M. (2009). Cell cycle, CDKs and cáncer: a changing paradigm. Nature Reviews Cáncer, 9(3), 153–166. <https://doi.org/10.1038/nrc2602>

Martin, P. A. E., y R. S. Travers. (1989). Worldwide abundance and distribution of *Bacillus thuringiensis*. Appl. Environ. Microbiol, (55), 2437-2442.

Martínez Mercado, M., 1990. Evaluación de medios de cultivo para la producción de esporas y cristales de *B. thuringensis* Var. *Kurstaki*. [Trabajo de diploma]. Instituto Nacional de Ciencias Agropecuarias, Managua.

Martínez, A., Reyes, I., & Reyes, N. (2007). Citotoxicidad del glifosato en células mononucleares de sangre periférica humana. Biomédica, 27(4), 594-604.

McPhie, P. (1971). Dialysis. Journals & Books, 22(1971), 23-32.. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(71\)22006-1](https://doi.org/10.1016/0076-6879(71)22006-1).

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 cáncer cells. Breast disease, 39(1). <https://doi.org/10.3233/bd-190405>

Mendoza Gamboa, E., 1995. Purificación y caracterización de una proteína antitumoral a partir de *Bacillus thuringensis* var. *thuringensis*. [Tesis de maestría]. Universidad Autónoma de Nuevo León, México.

Mizuki, E., Ohba, M., Akao, T., Yamashita, S., Saitoh, H., & Park, Y. W. (1999). Unique activity associated with non-insecticidal *Bacillus thuringiensis* parasporal inclusions: in vitro cell-killing action on human cancer cells. *Journal of Applied Microbiology*, 86(3), 477-486. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1999.00692.x>

Mizuki, E., Park, Y. R., 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. <https://doi.org/10.1128/cdli.7.4.625-634.2000>

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

Mounsef, J. R., Salameh, D., Awad, M. kallassy, Chamy, L., Brandam, C., & Lteif, R. (2014). A simple method for the separation of *Bacillus thuringiensis* spores and crystals. *Journal of Microbiological Methods*, 107, 147–149. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2014.10.003>

Murawa, P., Murawa, D., Adamczyk, B., & Połom, K. (2014). Breast cancer: Actual methods of treatment and future trends. *Reports of Practical Oncology & Radiotherapy*, 19(3), 165-172.

Nair, K., Al-Thani, R., Al-Thani, D., Al-Yafei, F., Ahmed, T., & Jaoua, S. (2018). Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains from Qatar as shown by crystal morphology,  $\Delta$ -Endotoxins and cry gene content. *Frontiers in Microbiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00708>

Nickerson, K. & Ang, B. (1978) Purification of the protein crystal from *Bacillus thuringiensis* by zonal gradient centrifugation. *Applied and environmental microbiology*, 36 (4), 625-626.

NIH. (2015). Quimioterapia para tratar el cáncer. Estados Unidos: NIH. Recuperado de <https://www.cancer.gov/espanol>.

NIH. (2015). Terapia hormonal para tratar el cáncer. Estados Unidos: NIH. Recuperado de <https://www.cancer.gov/espanol>.

NIH. (2019). Radioterapia para tratar el cáncer. Estados Unidos: NIH. Recuperado de <https://www.cancer.gov/espanol>.

Niu, L., Zhang, H., Wu, Z., Wang, Y., Liu, H., Wu, X., & Wang, W. (2018). Modified TCA/acetone precipitation of plant proteins for proteomic analysis. *PLOS ONE*, 13(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0202238>.

Nolasco Cruz, A., (2017). Síntesis de nanoliposomas que contienen parasporinas de *Bacillus thuringiensis* con actividad antiproliferativa. [Tesis de maestría]. Universidad del Papaloapan, Tuxtepec, Oaxaca.

Ohba, M., Mizuki, E., & Uemori, A. (2009). Parasporin, a new anticancer protein group from *Bacillus thuringiensis*. *PubMed*, 29(1), 427-433. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19331182>.

Okumura, S., Saitoh, H., Wasano, N., Katayama, H., Higuchi, K., Mizuki, E., & Inouye, K. (2006). Efficient solubilization, activation, and purification of recombinant Cry45Aa of *Bacillus thuringiensis* expressed as inclusion bodies in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*, 47(1), 144–151. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2005.10.011>

Palma, L., Muñoz, D., Berry, C., Murillo, J., & Caballero, P. (2014). *Bacillus thuringiensis* Toxins: An Overview of Their Biocidal Activity. *Toxins*, 6(12), 3296-3325. <https://doi.org/10.3390/toxins6123296>

Peña Villamil, IA., Quinche, Flores S,L.(2001). Diseño de un medio de cultivo para la producción de d-endotoxinas de *B. thuringiensis*. [Tesis de licenciatura]. Facultad de ciencias básicas, Pontificia universidad Javeriana; Bogotá.

Petruzzello, M. (2019). Espora. Estados Unidos: Enciclopedia Britannica. <https://www.britannica.com/science/spore-biology>.

Pineda, D. F. H., Villamizar, S. M. A., Forero, N. J. R., Reyes, E. H. P., & Barrera, M. O. S. (2019). Formulación de un medio de cultivo para la producción de  $\Delta$ -endotoxinas de *Bacillus thuringiensis*. *Ustasalud*. <https://doi.org/10.15332/us.v17i0.2185>

Rangel, M., Malpezzi, E. L., Susini, S. M., & Freitas, J. C. (1997). Hemolytic activity in extracts of the diatom *Nitzschia*. *Toxicón*, 35 (2): 305-309

Repetto, G., del Peso, A., & Zurita, J. L. (2008). Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nature Protocols*, 3(7), 1125–1131. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.75>

Reyes Puentes, J.A., (2016). Obtención de parasporinas de *B.thuringiensis* cepas cl9-1, cl9-3 y cl9-21 con actividad citotóxica para células de origen neoplásico. [Tesis de maestría]. Facultad de ciencias químicas, Universidad Autónoma de Nuevo León.

Reyes, S. J., González, K. B., Rodríguez, C., Navarrete-Muñoz, C., Salazar, A. P., Villagra, A., Caglevic, C., & Hepp, M. I. (2020). Actualización general de inmunoterapia en cáncer. *Revista Médica de Chile*, 148(7), 970–982. <https://doi.org/10.4067/S0034-98872020000700970>

Reynoso Pozos, Y. (2016). Caracterización de la cepa *Bacillus thuringiensis* LBIT-1200 y estudio de los factores de virulencia relacionados con su toxicidad. [Tesis doctoral]. Centro de investigaciones y de estudios Avanzados del Instituto Politecnico Nacional, Unidad Irapuato, Guanajuato.

Rocha Estrada J.G., (2014). Evolución y bifuncionalidad del receptor de quorum sensing NpRr de *Bacillus thuringiensis*. [Tesis doctoral]. Centro de investigación en alimentación y desarrollo, Hermosillo , Sonora.

Rodriguez Rojas, Y, C., (2021). Evaluación de la citotoxicidad de puntos de carbono (cd) en las líneas celulares tumorales u-87 y MCF-7. Trabajo dirigido. Unversidad del Rosario. Bogotá, Colombia.

Rojas Torres, D,S., (2019). Identificación de proteínas de *Bacillus thuringiensis* con potencial citotóxico. [Tesis de maestría]. Universidad Nacional de Colombia , Bogotá, Colombia.

Rutherford, S. T., & Bassler, B. L. (2012). Bacterial *quorum sensing*: its role in virulence and possibilities for its control. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(11), <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a012427>

Sabiá Júnior, E. F. (2015). Detecção e caracterização de proteínas parasporinas em *Bacillus thuringiensis*. [Tesis de maestría]. Universidad de Brasília, Brasília).

Sarrafzadeh, M. & Navarro, J. (2006). The effect of oxygen on the sporulation, dendotoxin synthesis and toxicity of *Bacillus thuringiensis* H14. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 22, 305–310. doi: 10.1007/s11274-005-9037-9

Sauka, Diego H. y Benintende, Graciela B.(2008). *Bacillus thuringiensis*: generalidades: un acercamiento a su empleo en el biocontrol de insectos lepidópteros que son plagas agrícolas. *Rev. Argent. Microbiol*, 20(40), 2, 124-140.

Secretaria de Salud (2009). Diagnóstico y Tratamiento del Cáncer de Mama en Segundo y Tercer nivel de Atención GUÍA DE PRÁCTICA CLÍNICA gpc. CENETEC, IMSS-232-09, p.103. Recuperado de <http://www.cenetec.salud.gob.mx>

Secretaria de salud (2017). ¿Cómo estamos en materia de cáncer? México: SS. Recuperado de <https://www.gob.mx/salud/articulos/como-estamos-en-materia-de-cancer?idiom=es>

Sierra-Martínez, P., Ibarra, J. E., De La Torre, M., & Olmedo, G. (2004). Endospore degradation in an oligosporogenic, crystalliferous mutant of *Bacillus thuringiensis*. *Current Microbiology*, 42 (8). <https://doi.org/10.1007/s00284-003-4148-8>

Souza Filho, O. C. D, Sagrillo, M. R., Garcia, L. F. M., Machado, A. K., Cadoná, F., Ribeiro, E. E., & da Cruz, I. B. M. (2013). The in vitro genotoxic effect of Tucuma (*Astrocaryum aculeatum*), an Amazonian fruit rich in carotenoids. *Journal of medicinal food*, 16(11), 1013-1021.

Uemori, A., Maeda, M., Yasutake, K., Ohgushi, A., Kagoshima, K., Mizuki, E., & Ohba, M. (2007). Ubiquity of parasporin-1 producers in *Bacillus thuringiensis* natural populations of Japan. *Naturwissenschaften*, 94(1), 34-38.

Velásquez, C., Rojas, T., Danithza, S., Cerón, S., & Jairo, A. (2018). Proteínas de *Bacillus thuringiensis* con actividad citotóxica: Parasporinas. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 20(2), 89-100.

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 Cytocidal Activity on Limited Human Cancer Cells. *The Journal of Biochemistry*, 138(6), 663–672. <https://doi.org/10.1093/jb/mvi177>

Yu, L. Y., Tang, J., Zhang, C. M., Zeng, W. J., Yan, H., Li, M. P., & Chen, X. P. (2017). New immunotherapy strategies in breast cancer. *International journal of environmental research and public health*, 14(1), 68.

Zabransky, D. J., Jaffee, E. M., & Weeraratna, A. T. (2022). Shared genetic and epigenetic changes link aging and cancer. *Trends in Cell Biology*, 32(4), 338-350. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2022.01.004>

Zerda Mendez, C.A., (2004). Análisis y validación de un modelo matemático para el crecimiento microbial del *Bacillus thuringensis* subespecie. *Kurstaki* por el metodo de fermentacion fed-bach continuo. [Tesis de licenciatura]. Universidad de los Andes, facultad de ingenieria, Bogotá, Colombia.

## 14. ANEXOS

- 1.- Buffer tris a 1.5 M pH 8.8: 18.2 g de tris, ajustar el pH y aforar con agua destilada a 100 mL.
- 2.- Buffer tris a 0.5 M pH 6.8: 6.5 g de tris, ajustar el pH y aforar con agua destilada a 100 mL.
- 3.- LAEMMLI al 2X para la solubilización de las proteínas en un volumen total de 11 mL

	mL
<b>Tris-HCl 0.5 M pH 6.8</b>	5
<b>SDS al 20 %</b>	2
<b>Glicerol</b>	2
<b>2 mercaptoetanol</b>	1
<b>Azul de bromofenol al 0.02 %</b>	1

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

- 4.-Buffer para corrimiento electroforético (1L).

Componente	Cantidad (g)
<b>Tris base</b>	3.04
<b>Glicina</b>	15
<b>SDS</b>	1

Preparación de reactivos para teñir y desteñir geles

Preparación de reactivos para teñir y desteñir geles		
<b>TCA 12.5 %</b>	12.5 g de ácido tricloroacético y aforar a 100 mL con agua destilada	
<b>Etanol al 50%</b>	50 mL de etanol y aforar a 100 mL con agua destilada	
<b>Azul de coomassie al 0.1 %</b>	0.1 g de azul de coomassie	Disolver en metanol, ácido acético y H <sub>2</sub> O, (40 mL de metanol + 7 mL de ácido acético + 53 mL de H <sub>2</sub> O).
<b>Et/Ac/Agua</b>	Para 100 mL	30 mL de etanol + 7 mL de ácido acético + 63 mL de agua

<b>Met/Ac/Agua</b>	Para 100 mL	25 mL de etanol + 10 mL de ácido acético + 65 mL de agua
--------------------	-------------	--

#### Procedimiento para teñir y desteñir los geles

1. TCA al 12.5 % (20 minutos)
2. Etanol al 50 % (20 minutos)
3. Tinción con azul de coomassie al 0.1 % (4 horas en agitación)
4. Desteñido con etanol/acido acético/agua (2 horas en agitación)
5. Desteñido con metanol/acido acético/agua (2 horas en agitación a 70 rpm)
6. Desteñido con agua destilada hasta que se vean las bandas.

#### Preparación del gel al 10%

##### Separador

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

##### Concentrador

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

#### Preparación de 1 L de PBS al 1X

Esta solución se prepara con el reactivo de la marca SIGMA-ALDRICH DPBS, el cual viene con un método de preparación de 9.55 g/L.

Buffer para elución de proteínas aforado a 1 L.

Se deja en refrigeración a 4°C.

Componente	Cantidad (g)
<b>Tris base</b>	3.0
<b>Glicina</b>	14.4
<b>SDS</b>	1.0

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

- Disolver el MTT en PBS 1X estéril a una concentración de 5 mg/mL