



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN
CAMPUS TUXTEPEC

INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

**ACTIVIDAD CITOTÓXICA Y PROAPOPTÓTICA DE LA INCLUSIÓN PROTEICA A34-2
DEL *Bacillus thuringiensis* SOBRE LA LÍNEA CELULAR MCF-7**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

Ingeniera en Biotecnología

PRESENTA:

LUISA SARAÍ SEVILLA NICOLÁS

Directora: Dra. Ana Karin Navarro Martínez

Codirectora: Dra. Luz del Carmen Camacho Castillo

SAN JUAN BAUTISTA TUXTEPEC, OAXACA

2024



UNIVERSIDAD DEL PAPAŁOAPAN

CAMPUS TUXTEPEC

INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la ciudad de San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, el día 22 de enero de 2024 a las 18:15 h, los miembros de la comisión revisora de tesis designada por la Jefatura de Carrera de la Ingeniería en Biotecnología se reunieron en la sala de juntas del Instituto de Biotecnología de la Universidad del Papaloapan, con la finalidad de examinar la tesis titulada "Actividad citotóxica y proapoptótica de la inclusión proteica A34-2 de *Bacillus thuringiensis* sobre la línea celular MCF-7" presentada por la alumna Luisa Saraf Sevilla Nicolás, con número de matrícula 16090247, aspirante al título de Licenciatura.

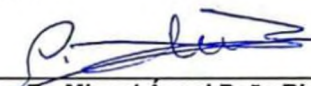
Después de intercambiar opiniones, los miembros de la comisión manifestaron que la tesis **satisface** los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes, otorgando su **aprobación** para que la aspirante pueda proceder con el proceso de titulación.

Tuxtepec, Oaxaca, a 22 de enero de 2024.


ATENTAMENTE
LA COMISIÓN REVISORA



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



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



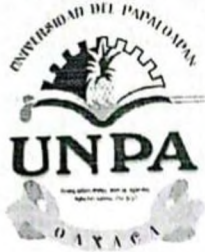
Dra. Karla Viridiana Castro Cerritos
Profesor Investigador Asociado "B"
Universidad del Papaloapan
Revisor de Tesis



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



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



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN
CAMPUS TUXTEPEC

INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

Tuxtepec, Oaxaca, a 31 de enero de 2024
Oficio No. JCIB/007/01/2024

M.E. Yesenia Barrientos Arenal
Jefa de Servicios Escolares
Universidad del Papaloapan

Con base en el dictamen de la comisión revisora, se autoriza la impresión del trabajo de tesis de la alumna Luisa Saraí Sevilla Nicolás, con número de matrícula 16090247, con título definitivo "Actividad citotóxica y proapoptótica de la inclusión proteica A34-2 de *Bacillus thuringiensis* sobre la línea celular MCF-7" para ser presentado como trabajo de tesis para obtener el título de Licenciado en Ingeniería en Biotecnología, toda vez que cumple satisfactoriamente con la reglamentación establecida para tal fin.

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

Dr. Miguel Ángel Peña Rico (Presidente, Universidad del Papaloapan)
Dr. Paul Mauricio Sánchez Ocampo (Secretario, Universidad del Papaloapan)
Dra. Karla Viridiana Castro Cerritos (Vocal, Universidad del Papaloapan)
Dr. Óscar Abelardo Ramírez Marroquín (Primer Suplente, Universidad del Papaloapan)
Dra. Ariana Arlene Huerta Heredia (Segundo Suplente, Universidad del Papaloapan)

Sin más por el momento le envío un cordial saludo.



JEFATURA DE INGENIERÍA
EN BIOTECNOLOGÍA
CAMPUS TUXTEPEC

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

Atentamente

Terra uberrima, mens aperta
Bou Lo-tama, chí ji jú



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

c.c.p. Dra. Ana Karin Navarro Martínez. Directora de tesis. Para su conocimiento
c.c.p. Luisa Saraí Sevilla Nicolás, Alumno, Para su conocimiento
c.c.p. Archivo

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

www.unpa.edu.mx

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

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

Agradecimientos

A la Dra. Ana Karin Navarro Martínez como mi directora de tesis por su compromiso, dedicación, confianza y los conocimientos proporcionados para llevar a cabo esta investigación.

A la Dra. Luz del Carmen Camacho Castillo como mi codirectora por brindarme conocimientos, observaciones, consejos, confianza y permitirme realizar algunos experimentos en el laboratorio de Nutrición del Instituto Nacional de Pediatría de la Ciudad de México.

Al Dr. Miguel Ángel Peña Rico por los conocimientos proporcionados y por todo el apoyo durante el desarrollo de este trabajo.

Al Dr. Miguel Ángel Peña Rico, Dra. Karla Viridiana Castro Cerritos, Dr. Paul Mauricio Sánchez Ocampo, Dra. Luz del Carmen Camacho Castillo, Dr. Oscar Abelardo Ramírez Marroquín, como miembros de mi comité revisor por el tiempo, conocimientos y consejos para la culminación de este trabajo.

A todos los profesores por su dedicación, compromiso, conocimiento, orientación y sabiduría, que han compartido a lo largo de mi trayectoria académica.

A la Universidad del Papaloapan por brindarme una excelente educación y espacio para el desarrollo de la ciencia y conocimiento.

Dedicatoria

Dedico este trabajo a mi familia quienes han sido el pilar fundamental en cada paso de mi vida, en especial a mi madre, que me ha enseñado el valor del esfuerzo, la perseverancia, el compromiso con mis metas, cuyo apoyo y amor incondicional ha sido la fuente de mi fortaleza y determinación, a mis hermanos mis compañeros de vida por estar siempre a mi lado y por el apoyo incondicional.

A mis amigos y compañeros de la carrera Paola, Abiezer, David, Nayelli, Eduardo, Adonai, que estuvieron y compartieron los momentos felices y difíciles de nuestra carrera. Ortela y Sibel además de amigos, mis compañeros de laboratorio y equipo, por todo el apoyo en la realización de este trabajo. Así como a mis amigas Estephania, Isabel y Angela que han sido parte de mi trayectoria académica.

I. Índice

Resumen	11
Abstract	12
1. Introducción	13
2. Antecedentes	14
2.1. <i>Bacillus thuringiensis</i>	14
2.2. Parasporinas.....	14
2.3. Cáncer	15
2.3.1. Proceso tumoral.....	16
2.3.2. Tipos de cáncer	17
2.3.3. Cáncer de mama	18
2.4. Tratamientos contra el cáncer	19
2.4.1. Tratamientos contra el cáncer de mama.....	19
2.4.2. Parasporinas como posible tratamiento en el cáncer de mama	20
2.5. Mecanismos de muerte celular	21
2.5.1. Necrosis.....	21
2.5.2. Necroptosis	21
2.5.3. Piroptosis	22
2.5.4. Apoptosis	22
2.5.4.1. Vía extrínseca de la apoptosis.....	23
2.5.4.2. Vía intrínseca de la apoptosis.....	24
2.6. Métodos para medir apoptosis	24
2.6.1. Análisis de fragmentación de ADN mediante electroforesis en gel de agarosa .	25
2.6.2. Técnica por citometría de flujo.....	26
2.6.3. Ensayo de anexina V/ PI.....	27
2.6.4. Método TUNEL.....	28
3. Justificación	29

4. Hipótesis.....	30
5. Objetivos	30
5.1. Objetivo general.....	30
5.2. Objetivos específicos	30
6. Diagrama experimental.....	31
7. Materiales y métodos	32
7.1. Producción de las parasporinas del <i>B. thuringiensis</i>	32
7.2. Purificación y selección de banda de la proteína A34-2.....	33
7.3. Bioensayo dosis respuesta en la línea celular MCF-7	34
7.3.1. Manejo de la línea celular de cáncer mama MCF-7.....	34
7.3.2. Actividad citotóxica de la proteína A34-2 en la línea celular MCF-7	35
7.4. Viabilidad de células no tumorales tratadas con la proteína A34-2.....	35
7.4.1. Extracción de células mononucleares de sangre periférica.....	35
7.4.2. Ensayo MTT en células mononucleares de sangre periférica	36
7.4.3. Extracción y preparación de eritrocitos para el ensayo de hemólisis	36
7.5. Determinación del mecanismo de muerte por fragmentación del ADN.....	37
7.6. Análisis estadístico	38
8. Resultados y discusión	38
8.1. Producción y purificación de la parasporina A34-2	38
8.2. Bioensayo dosis respuesta de la parasporina A34-2 en la línea celular MCF-7	40
8.2.1. Cambios morfológicos en la línea celular MCF-7	42
8.3. Viabilidad de las células no tumorales tratadas con proteína A34-2	45
8.3.1. Ensayo MTT en células mononucleares de sangre periférica	45
8.3.2. Ensayo de hemólisis	46
8.4. Fragmentación del DNA como aproximación para determinación el mecanismo de muerte celular.....	48
9. Conclusión	53
10. Bibliografía	54
Anexos	63

A-1. Bandas seleccionadas para CN.....	63
A-2. Bandas seleccionadas para PS.....	63
A-3. Bandas seleccionadas para CP Y MP.	63
A-4. Bandas seleccionadas para CN.....	64
A-5. Bandas seleccionadas para PS, CP Y MP.	64
A-6. Bandas seleccionadas para CN.....	64
A-7. Bandas seleccionadas para PS, CP Y MP.	64

II. Índice de figuras

Figura 1. Interacciones célula- ambiente en la carcinogénesis.....	16
Figura 2. Tejido mamario normal	18
Figura 3. Escalera del ADN como indicador de apoptosis	25
Figura 4. Representación de datos de citometría de flujo	27
Figura 5. Diagrama experimental de la actividad citotóxica y el tipo de muerte que genera la parasporina A34-2 sobre células MCF-7.....	31
Figura 6. Electroforesis SDS-PAGE al 10 % de la cepa A34 del <i>B. thuringiensis</i>	38
Figura 7. Electroforesis SDS-PAGE al 10 % del producto electroeluido de la cepa A34 del <i>B. thuringiensis</i>	39
Figura 8. Ensayo MTT en células MCF-7 con 24 h de tratamiento con la parasporina A34-2	40
Figura 9. Cambios morfológicos de células MCF-7 en tratamiento con la parasporina A34-2 en objetivo 4X.....	44
Figura 10. Ensayo MTT en células mononucleares de sangre periférica con 24 horas de tratamiento con la parasporina A34-2	45
Figura 11. Ensayo de hemólisis en tratamiento con la parasporina A34-2.....	47
Figura 12. Gel de agarosa 1.5X análisis de fragmentación de ADN, gel 1.....	49
Figura 13. Gel de agarosa 1.5X análisis de fragmentación de ADN, gel 2.....	51
Figura 14. Gel de agarosa 1.5X análisis de fragmentación de ADN, gel 3.....	52

III. Índice de tabla

Tabla 1. Concentración del producto dializado cuantificado mediante Bradford.	40
Tabla 2. Parasporinas como tratamiento en diferentes líneas celulares.	42

IV. Abreviaturas y siglas

ADN: Ácido Desoxirribonucleico.

CMSP: Células Mononucleares de Sangre Periférica.

CO₂: Dióxido de carbono.

DMEM: Dulbecco Modified Eagle Medium.

DMSO: Dimetilsulfóxido.

ER: Receptores de estrógenos.

FBS: Suero Fetal Bovino.

HEPES: 2-[4-(2-Hydroxyethyl) piperazin-1-yl] ethanesulfonic acid.

MCF-7: Michigan Cancer Foundation-7.

MTT: 3-(4,5) dimetiltiazolil -2,5 difeniltetrazólio.

NaCl: cloruro de sodio.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

PBS: Buffer de Fosfatos Salinos.

PR: Receptores de Progesterona.

P/S: Penicilina/Estreptomicina.

PS: Parasporina.

RPMI 1640: Roswell Park Memorial.

rpm: revoluciones por minuto.

SDS: Dodecil Sulfato de Sodio.

SDS-PAGE: Dodecil Sulfato de Sodio Gel de Electroforesis de Poliacrilamida.

TAE: buffer Tris-Acetate-EDTA.

TES: buffer Tris-EDTA-SDS.

TNFSF: Superfamilias del factor de necrosis tumoral.

Resumen

El estudio de los metabolitos bacterianos ha tomado gran importancia al ser empleado como una alternativa en el tratamiento contra el cáncer por su actividad específica. Además, con el fin de evitar o reducir la resistencia a los medicamentos e intoxicaciones sistémicas que generan efectos secundarios. *Bacillus thuringiensis* una bacteria que durante su proceso de esporulación produce unas proteínas llamadas parasporinas. Estas proteínas se interesan recientemente porque han mostrado efecto citotóxico específico contra células cancerígenas sin comprometer a células sanas. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue emplear la parasporina A34-2 de ≈ 55 kDa contra células de cáncer de mama MCF-7. Así como, verificar la toxicidad en no cancerosas como las células mononucleares de sangre periférica (CMSP). Los resultados indican que la parasporina de ≈ 55 kDa de la cepa A34-2 tuvo una IC_{50} de ≈ 15.04 $\mu\text{g}/\text{mL}$ contra MCF-7 y que el tipo de muerte sugiere ser apoptosis. Esto debido a que mostró un patrón de bandeo de escalera en el análisis de fragmentación del ADN en gel de agarosa. La viabilidad de las células no tumorales fue de entre 74-89% en células mononucleares de sangre periférica a la misma concentración. De igual manera en el ensayo de hemólisis se observó solamente el 27.93% de hemólisis a una concentración de 15.04 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Comprender los mecanismos de acción y los perfiles de seguridad de metabolitos bacterianos como las parasporinas puede contribuir al desarrollo de tratamientos contra el cáncer más efectivos y menos tóxicos. Por lo que, los resultados obtenidos sugieren a la parasporina de ≈ 55 kDa de la cepa A34-2, como un candidato prometedor para la terapia dirigida contra el cáncer con un impacto mínimo en las células sanas.

Abstract

The study of bacterial metabolites has gained significant importance as they are employed as an alternative in cancer treatment because of their specific activity. Additionally, this approach aims to prevent or reduce drug resistance and systemic intoxications that generate side effects. *Bacillus thuringiensis* is a bacterium that produces proteins called parasporins during its sporulation process. These proteins have recently garnered great interest as they have shown specific cytotoxic effects against cancer cells without affecting healthy cells. Therefore, the objective of this study was to use the ≈ 55 kDa parasporin A34-2 against MCF-7 breast cancer cells. The mechanism of cell death associated with this cytotoxic activity was determined to involve apoptosis. In addition, its biological safety against peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) was assessed. It was observed that the ≈ 55 kDa parasporin from the A34-2 strain had an IC_{50} of ≈ 15.04 $\mu\text{g/mL}$ against MCF-7, and the type of cell death suggested is apoptosis. This was evident from the ladder-like DNA fragmentation pattern observed using agarose gel electrophoresis. The biological safety ranged from 74-89% against peripheral blood mononuclear cells. Similarly, in the hemolysis assay, 27.93% hemolysis was observed at a concentration of 15.04 $\mu\text{g/mL}$. Understanding the mechanisms of action and safety profiles of bacterial metabolites such as parasporins can contribute to the development of more effective and less toxic cancer treatments. Therefore, the results obtained suggest that the ≈ 55 kDa parasporin from the A34-2 strain is a promising candidate for targeted cancer therapy with minimal impact on healthy cells.

1. Introducción

El cáncer de mama es una enfermedad con alta incidencia y mortalidad en mujeres, según la OMS. Aunque existen estudios sobre tratamientos y prevención, en etapas avanzadas no hay cura efectiva. La cirugía es la opción principal, pero no es efectiva en fases finales, la radioterapia y quimioterapia tienen efectos secundarios que afectan la calidad de vida del paciente (Ontario Health (Quality), 2020). Se estima que en los próximos años el número de pacientes con cáncer se incrementa (Howell *et al.*, 2014).

Debido que no existen tratamientos específicos contra el cáncer, un gran número de investigaciones se han centrado en la búsqueda de nuevos medicamentos específicos y menos agresivos contra esta enfermedad. Atacando directamente a las células cancerosas sin comprometer las que no lo son. Esto se traduce en una disminución de los riesgos y de los efectos secundarios negativos que comprometan la calidad de vida. Dentro de estos nuevos medicamentos se encuentran diversos metabolitos bacterianos, entre ellos las parasporinas (PS) producidas por *Bacillus thuringiensis*.

Bacillus thuringiensis (*B. thuringiensis*) es una bacteria Gram positiva que produce inclusiones cristalinas durante la esporulación y se les llaman Cry, Cyt y PS. Las Cry y Cyt tienen actividad insecticida contra diversos insectos, mientras que las PS tienen actividad citotóxica contra líneas celulares cancerígenas (Mizuki *et al.*, 1999). Hasta el momento se han reportado 19 PS's con nomenclatura oficial (Suárez-Barrera *et al.*, 2021) que se han dividido en seis familias (PS1-PS6). Las cuales distinguen y destruyen células cancerosas a través de diferentes mecanismos (Aldeewan *et al.*, 2014). Debido a lo anterior las parasporinas han ganado importancia en biomedicina. Cruz Nolasco (2014, 2017) aisló e identificó diferentes cepas de *B. thuringiensis* productoras inclusiones cristalinas, obtenidas de diferentes suelos de la cuenca del Papaloapan. Dentro de la colección se encontraron dos cepas *B. thuringiensis* AX y *B. thuringiensis* A34 que producen parasporinas con actividad citotóxica contra líneas celulares MDA y MCF-7. Sin embargo, no se sabe a qué tipo de muerte lleva a su actividad citotóxica sobre la línea celular MCF-7. Por lo tanto, en el presente trabajo se determinó el mecanismo de muerte asociado a esta actividad citotóxica contra las células de cáncer de mama MCF-7. Además de verificar su toxicidad contra células no tumorales como las mononucleares de sangre periférica (CMSP).

2. Antecedentes

2.1. *Bacillus thuringiensis*

B. thuringiensis es un bacilo anaerobio facultativo, Gram positivo, de flagelación peritrica que mide aproximadamente de 3-5 μm de largo, de 1-1.2 μm de ancho y su característica principal es la producción de inclusiones cristalinas durante su proceso de esporulación (Sauka & Benintende, 2008). Fue aislado por primera vez en Japón por Ishiwata en 1901 y lo obtuvo del gusano de seda *Bombyx mori* como patógeno de la enfermedad sotto. Posteriormente en Alemania Berliner en 1915 aisló una bacteria Gram positiva a partir de larvas enfermas de polillas *Ephestia kuehniella* y la llamo como *B. thuringiensis* nomenclatura que se mantiene actualmente (Sauka, 2017). Esta bacteria se puede encontrar en el suelo, cadáveres de insectos, agua, filoplano y granos almacenados. Además, produce diversas proteínas toxicas para diferentes objetivos biológicos (insectos, nematodos, ácaros, protozoos y células de mamíferos). La mayoría de dichas toxinas identifican su objetivo particular a través del reconocimiento de receptores de membrana celular específicos (Mendoza-Almanza *et al.*, 2020).

B. thuringiensis pertenece al grupo *B. cereus* (Xu *et al.*, 2014) y durante la fase de esporulación es capaz de producir inclusiones cristalinas (Cry, Cyt y PS). La actividad de las toxinas Cry es altamente específica a insectos y nemátodos, y es inducida por la unión específica al receptor de membrana plasmática de la célula epitelial del intestino medio de los insectos susceptibles (Bravo *et al.*, 2005). Las toxinas Cyt son proteínas cristalinas con actividad citolíticas y hemolíticas (Crickmore *et al.*, 1998). Por último un subconjunto de proteínas Cry son denominadas parasporinas, proteínas con actividad citotóxica en líneas celulares de cáncer (Suárez-Barrera *et al.*, 2021). Las PS están asociadas con la actividad citocida contra células cancerosas humanas y con poca o nula actividad citotóxica en células no tumorales (Mizuki *et al.*, 1999).

2.2. Parasporinas

En 1999 Mizuki *et al.*, realizaron un estudio de 1744 cepas de *B. thuringiensis* para determinar la actividad citotóxica de estas inclusiones parasporales sobre células T de leucemias humana y actividad citolítica de eritrocitos de oveja. Reportando así, por primera vez que ciertas inclusiones proteicas del *B. thuringiensis* no insecticidas ni hemolíticas, tienen actividad citocida *in vitro* para células humanas, incluyendo algunas células cancerosas (Mizuki *et al.*, 1999). Posteriormente en el 2000, Mizuki *et al.* demostraron de la cepa A1190 funcionan como proteína Cry anticancerígena

en células leucémicas humanas, lo que condujo a una nueva categoría de proteína a la cual llamaron parasporina.

Las PS son proteínas citotóxicas producidas por el *B. thuringiensis* en su etapa de esporulación y, además, se han aplicado exitosamente contra diferentes líneas celulares de cáncer (Hernandez-Salas *et al.*, 2019). Hasta el momento se han reportado 19 PS's con nomenclatura oficial (Suárez-Barrera *et al.*, 2021) y se han clasificado en seis familias (PS1-PS6). Las PS con mayor masa molecular son PS1, PS3 Y PS6 de aproximadamente 80 kDa y procesan moléculas activas de 60 kDa. Mientras que las de menor peso son PS2, PS4 Y PS5, que tienen precursores de 33-37 kDa, se procesan por escisión proteolítica en moléculas de 30 kDa. Todos los miembros de la familia PS1-PS6 se caracterizan por una estructura conservada que consta de tres dominios: dominio I relacionado con la unión a la membrana, dominio II son regiones de inserción de la membrana y el dominio III formación de poros (Suárez-Barrera *et al.*, 2021).

Las parasporinas son heterogéneas respecto al espectro de toxicidad ya que algunas son activas en células humanas y otras matan unas pocas células específicas (Kitada *et al.*, 2006). Las parasporinas al igual que las proteínas Cry comparten características funcionales y estructurales. Por ejemplo, las toxinas formadoras de poros (PFT) de las cuales se relaciona su actividad citotóxica a la formación de poros en la membrana celular (Kitada *et al.*, 2006). Aunque recientemente ha surgido a las PS como una alternativa para el tratamiento del cáncer, aun no se ha establecido bien el mecanismo de acción citotóxico y como son los receptores moleculares que permiten la unión de las PS a las células (Suárez-Barrera *et al.*, 2021).

2.3. Cáncer

El termino cáncer es genérico y designa un amplio grupo de enfermedades que pueden afectar cualquier parte del organismo. La Organización Mundial de la Salud (OMS) define al cáncer como un proceso de multiplicación rápida de células anormales que se extienden más allá de sus límites habituales y pueden invadir partes adyacentes del cuerpo o propagarse a otros órganos (metástasis), siendo el proceso de metástasis la principal causa de muerte por cáncer (OMS, 2022). El desarrollo de esta enfermedad es un proceso complejo de muchos pasos en los que diversos factores influyen en la probabilidad de desarrollar un cáncer. Se ha descrito que agentes como la radiación, predisposición genética, productos químicos y virus, actúan dañando el ADN

generando mutaciones (agentes iniciadores) o estimulando la proliferación celular (promotores de tumores) (Cooper, 2000).

En México, la tasa de mortalidad por tumores malignos a nivel nacional en el 2019 es de 70 defunciones por cada 100 mil habitantes y las entidades federativa con mayor tasa de defunciones por tumores malignos son: Ciudad de México, Sonora, Chihuahua, Veracruz, Nuevo León, Sinaloa y Nayarit (INEGI, 2021a).

2.3.1. Proceso tumoral

La activación de oncogenes y/ o la desactivación de genes supresores de tumores, en la mayoría de los casos, conducen a la progresión descontrolada del ciclo celular e inactiva los mecanismos apoptóticos (Sarkar *et al.*, 2013). Las seis capacidades diferentes que conducen al desarrollo y progresión de la mayoría de los cánceres son: autosuficiencia en señales de crecimiento, insensibilidad a las señales inhibitoras del crecimiento, evasión de la muerte celular programada, potencial replicativo ilimitado, angiogénesis sostenida e invasión de tejidos y metástasis (Hanahan & Weinberg, 2000). Al haber una alteración en el equilibrio celular y generar un crecimiento descontrolado, las células cancerosas pueden cambiar el microambiente y a la vez puede afectar la forma en que el cáncer crece y se propaga (como se describe en la Figura 1), evitando la detección o ataque del sistema inmunológico (NCI, 2021).

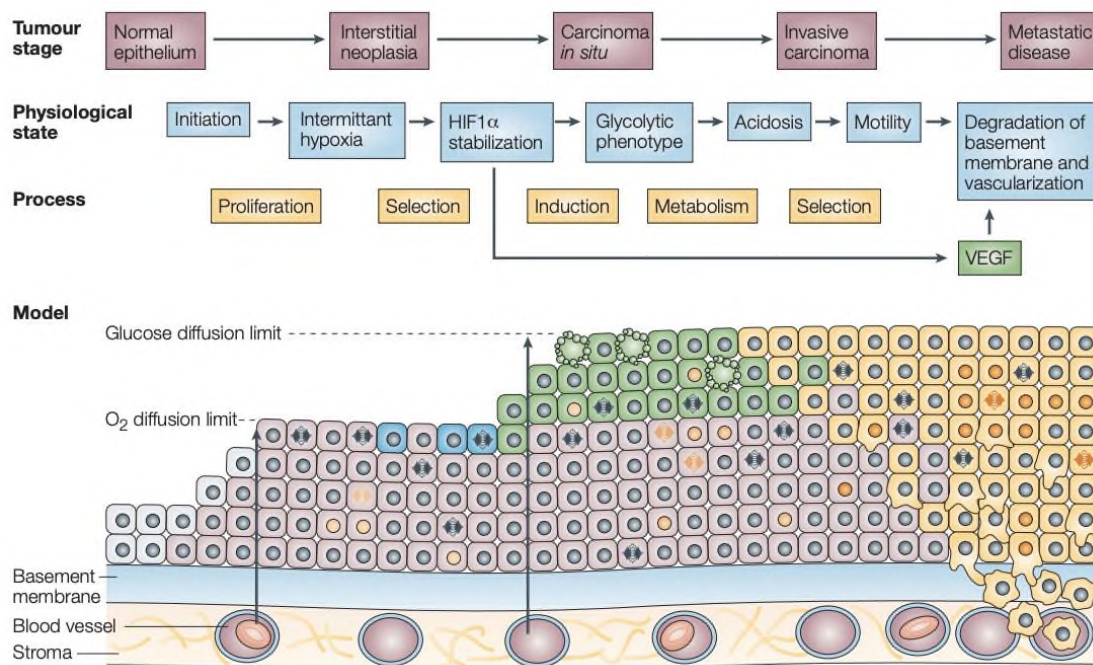


Figura 1. Interacciones célula- ambiente en la carcinogénesis (Gatenby & Gillies, 2004).

2.3.2. Tipos de cáncer

Todos los cánceres tienen características clave tal como: el sitio del tumor, perfil del tumor (morfología, características moleculares y genéticas) y la extensión anatómica o el estadio del tumor. Todos ellos importantes para el diagnóstico y para el pronóstico del paciente (Brierley *et al.*, 2016). Existen más de 100 tipos de cáncer y generalmente reciben el nombre del órgano, tejido de origen o célula involucrada (NCI, 2021). Algunas categorías de cáncer que comienzan en tipos específicos de células son:

Carcinomas: son el tipo más común de los cánceres humanos ya que representan aproximadamente el 90 % de neoplasias malignas de las células epiteliales (Cooper, 2000). Los carcinomas tienen nombres específicos, por ejemplo, si comienzan en diferentes tipos de células epiteliales como los adenocarcinomas (se forma en células epiteliales que producen fluidos o mucosidad), carcinoma de células basales (inician en la parte inferior o basal de la epidermis), carcinoma de células escamosas (se forma en células escamosas que se encuentra justo debajo de la superficie externa de la piel) y carcinomas de células de transición (NCI, 2021).

Sarcomas: son raros en humanos (Cooper, 2000) y son tumores que se forman en los huesos, tejidos blandos (músculos, la grasa, vasos sanguíneos y vasos linfáticos) y tejido fibroso como los tendones y ligamentos (NCI, 2021).

Leucemias: son el tipo de cáncer que se originan en el tejido de formación de sangre (médula ósea) y no forman tumores sólidos ya que acumula cantidades grandes de glóbulos blancos anormales en la sangre y médula ósea, desplazando a las células sanguíneas normales (NCI, 2021).

Linfoma: comienzan en los linfocitos (células T o células B), encargados de combatir enfermedades y formar parte del sistema inmunitario, en este tipo de cáncer se acumulan linfocitos anormales en los ganglios linfáticos, vasos linfáticos (NCI, 2021).

Dentro de los tipos de cáncer el de mayor prevalencia son los carcinomas (mama, pulmón, colon y recto, próstata, de piel y gástrico) (OMS, 2022).

En este trabajo nos centraremos en el cáncer de mama ya que a nivel mundial se ha convertido en uno de los más comunes y causante de un gran número de fallecimientos entre las mujeres, sobrepasando al de pulmón que durante muchos años fue el más mortal y extendido (OMS, 2022).

2.3.3. Cáncer de mama

Es el tipo de cáncer que se forma en tejidos del seno cuando las células de la mama empiezan a crecer descontroladamente (Figura 2). Los tipos de cáncer de mama varían de acuerdo al origen, los que inician en las regiones que producen la leche (carcinoma lobular) hasta el pezón de la mama (carcinoma ductal) (American Cancer Society, 2019a). El carcinoma ductal es un tipo común de cáncer que comienza en los conductos mamarios, se clasifican en carcinoma ductal in situ (DCIS) y carcinoma ductal invasivo (IDC). El DCIS es una etapa temprana del carcinoma en el que las células epiteliales han proliferado dentro de los conductos mamarios, pero aún no han invadido los tejidos circundantes. Mientras que el IDC es una etapa posterior del carcinoma ductal en el que las células del carcinoma han atravesado la pared del conducto mamario y empiezan a invadir tejidos del seno e incluso diseminarse en ganglios linfáticos u otras partes del cuerpo (Dong *et al.*, 2020; Millikan *et al.*, 1995). El carcinoma lobular *in situ* (LCIS) crece en el revestimiento de las glándulas productoras de leche (lobulillos) pero no atraviesan la pared de los lobulillos y no se considera un cáncer, pero si aumenta el riesgo de padecer cáncer de seno invasivo (American Cancer Society, 2019b). El carcinoma lobular invasivo (ILC) surge en los lobulillos y tienen el potencial de alejarse del lóbulo donde se originaron propagándose hacia los ganglios linfáticos y otras áreas del cuerpo (American Cancer Society, 2019a).

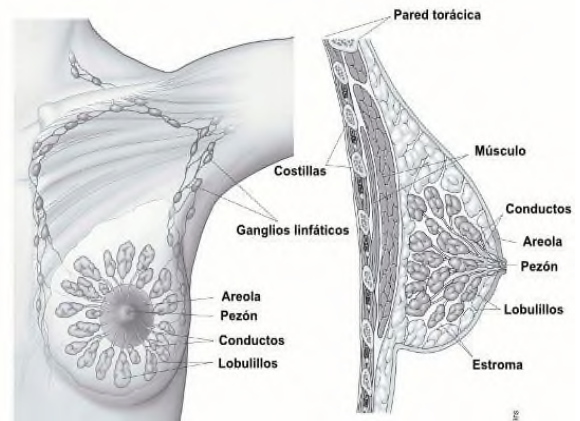


Figura 2. Tejido mamario normal, obtenido de (American Cancer Society, 2019a).

El DCIS es una etapa temprana del carcinoma en el que las células epiteliales han proliferado dentro de los conductos mamarios, pero aún no han invadido los tejidos circundantes. Mientras que el IDC es una etapa posterior del carcinoma ductal en el que las células del carcinoma han atravesado la pared del conducto mamario y empiezan a invadir tejidos del seno e incluso diseminarse en ganglios linfáticos u otras partes del cuerpo (Dong *et al.*, 2020; Millikan *et al.*, 1995). El carcinoma lobular *in situ* (LCIS) crece en el revestimiento de las glándulas productoras de leche (lobulillos) pero no atraviesan la pared de los lobulillos y no se considera un cáncer, pero si aumenta el riesgo de padecer cáncer de seno invasivo (American Cancer Society, 2019b). El carcinoma lobular invasivo (ILC) surge en los lobulillos y tienen el potencial de alejarse del lóbulo donde se originaron propagándose hacia los ganglios linfáticos y otras áreas del cuerpo (American Cancer Society, 2019a).

El cáncer de mama se clasifica molecularmente de acuerdo a la expresión de receptores hormonales como: luminal A (ER+/PR+/HER2-), luminal B (ER+/PR+/HER2+), HER2 enriquecido (ER-/PR-/HER2+), triple negativo o tipo basal (TNBC, ER-/PR-/HER2-) y cáncer de mama de tipo normal (Dobrolecki *et al.*, 2016; Zubair *et al.*, 2020).

A nivel mundial el cáncer es la principal causa de muerte, siendo en 2020 el más común, el cáncer de mama con 2.26 millones de casos y el quinto en casos de fallecimiento con 685,000 defunciones (Organización Mundial de la Salud, 2022). De acuerdo a los datos reportados por el INEGI en 2020 fallecieron 97,323 personas por tumores malignos y de esto el 8% (7,880 personas)

fueron por tumores malignos de mama, mostrando mayor incidencia en mujeres (7,821 defunciones) que en hombres (58 defunciones). La incidencia y defunciones en mujeres es mayor conforme se incrementa la edad, siendo 45 años la edad con mayor incidencia (INEGI, 2021b). La tasa de mortalidad se puede reducir si se detecta y se atiende a tiempo, reduciendo los factores de riesgo y aplicando los tratamientos adecuados para los pacientes (OMS, 2022).

2.4. Tratamientos contra el cáncer

El diagnóstico correcto es fundamental para un tratamiento adecuado y eficaz, ya que cada tipo de cáncer requiere de un tratamiento concreto, estos pueden ser: radioterapia, intervenciones quirúrgicas y terapias sistémicas como la quimioterapia, tratamientos hormonales y tratamientos biológicos dirigidos (Organizacion Mundial de la Salud, 2022).

En 1960 la cirugía y la radioterapia fueron base para el tratamiento de tumores sólidos (Arruebo *et al.*, 2011). Actualmente existen muchos tratamientos y procedimientos que se aplican en relación con el tipo de tumor, los objetivos de dichos tratamientos es mejorar la calidad de vida del paciente (Organizacion Mundial de la Salud, 2022).

2.4.1. Tratamientos contra el cáncer de mama

Las probabilidades de supervivencia en el cáncer de mama son muy altas cuando se detecta y se trata a tiempo, (Ginsburg *et al.*, 2020) aunque, también depende del tratamiento, del tipo de cáncer y del grado de diseminación (Organizacion Mundial de la Salud, 2022).

Dado que el tratamiento para el cáncer de mama es heterogéneo, la mayoría de mujeres con este tipo de cáncer en etapas tempranas son candidatas para cirugía conservadora de mama con radioterapia o mastectomía (Moo *et al.*, 2018).

- **Tratamientos locales:** significa que el tumor se trata sin afectar al resto del cuerpo, donde dependiendo el tipo y lo avanzado que este el cáncer se somete al paciente a cirugía o radioterapia y puede que antes o después de la cirugía necesite de otro tipo de tratamiento (American Cancer Society, 2019a).
- **Tratamientos sistémicos:** este tipo de tratamiento se puede suministrar por vía oral o directamente en el torrente sanguíneo, dependiendo del tipo de cáncer de seno que sea será el medicamento a suministrar (American Cancer Society, 2019a).

- **Quimioterapia:** se puede administrar antes (neoadyuvante) o después de la cirugía (adyuvante) y en la mayoría de los casos muestra ser más efectivo al utilizar combinaciones de medicamentos. Medicamentos adyuvantes y neoadyuvantes son: antraciclinas (doxorrubicina y la epirrubicina), taxanos (paclitaxel y el docetaxel), capecitabina, ciclofosfamida y carboplatino (American Cancer Society, 2019a).
- **Terapia hormonal:** algunos tipos de cáncer de mama son afectados por hormonas como el estrógeno y la progesterona, pero este tratamiento no ayuda a mujeres cuyos tumores no tienen receptores hormonales. Las células de cáncer de mama tienen receptores específicos que se adhieren al estrógeno y progesterona y al no tener estos receptores no se cumplirá con el objetivo del tratamiento, que es impedir que estas hormonas se adhieran a los receptores. Este tipo de tratamiento a menudo se utiliza después de la cirugía para reducir el riesgo de que regrese el cáncer. Además, este tratamiento puede alcanzar a otras células cancerosas en cualquier otra parte del cuerpo y no solo en el seno (American Cancer Society, 2019a).
- **Terapia dirigida:** estos medicamentos al igual que la quimioterapia entran al torrente sanguíneo alcanzando todas las áreas del cuerpo. Son útiles para cánceres que se han diseminado o donde la quimioterapia no ha sido eficaz y también pueden ayudar a otros medicamentos a ser más eficaces (American Cancer Society, 2019a).

2.4.2. Parasporinas como posible tratamiento en el cáncer de mama

En (2015) Sabiá Júnior demostró que la proteína PS1 de la cepa S1338 muestra toxicidad específica contra células de cáncer de mama MCF-7. Observó que, la toxina activa cambia la morfología de MCF-7 después de 24 horas de tratamiento y sugiere que el tipo de muerte celular es por apoptosis. El autor concluye que, con estudios posteriores sobre el mecanismo de acción de la toxina y del posible receptor en células susceptibles, permitiría utilizar a la parasporina como terapia alternativa contra el cáncer (Sabiá Júnior, 2015).

Cruz-Nolasco reporta en (2017) a las proteínas A34-1, A34-2, AX-1 y AX-2 con actividad antiproliferativa contra líneas celulares de cáncer MDA MB-231 y MCF-7, observando que la proliferación celular decrecía conforme incrementaba la concentración proteica.

En 2021 Borin *et al.*, reportan que la proteína A13-2 tiene efecto citotóxico por apoptosis tardía contra células de cáncer de mama MCF-7 y no presenta toxicidad para las células mononucleares de sangre periférica.

2.5. Mecanismos de muerte celular

Dividirse, especializarse o morir son opciones a las que se enfrentan las células individuales, por lo que el equilibrio entre estos asegura una regulación precisa del número de células dentro de los organismos (Melino, 2001).

Los tipos de muerte celular pueden ser por muerte celular accidental o una muerte celular regulada. La muerte celular accidental es un proceso no controlado y la muerte celular regulada implica cascadas de señalización estructuradas y molecularmente se determinan mecanismos efectores (Tang *et al.*, 2019). El Comité de Nomenclatura sobre Muerte Celular propone criterios para el uso de la terminología con la muerte celular y de sus diferentes morfologías, permitiendo así, describir nuevas modalidades de muerte celular (Kroemer *et al.*, 2009).

2.5.1. Necrosis

La muerte celular por necrosis no presenta signos de apoptosis o de autofagia. Morfológicamente la necrosis se caracteriza por el aumento del volumen celular, hinchazón de orgánulos, ruptura de la membrana plasmática y en consecuencia pérdida del contenido intracelular, siendo así una muerte celular accidental no controlada (Kroemer *et al.*, 2005, 2009). Carece de marcadores específicos, considerándose dañina porque pueden generar inflamación local que puede estimular el crecimiento tumoral (Galluzzi *et al.*, 2007).

2.5.2. Necroptosis

Tipo de muerte celular programada con características morfológicas similares a necrosis (Pasparakis & Vandenabeele, 2015). Se observó por primera vez en 1996, en células renales de cerdo infectadas con el virus de la viruela bovina por la expresión del gen *crmA*, inhibidor de CASP1 y CASP8 (Ray & Pickup, 1996). La investigación de la necroptosis molecular se impulsó con el descubrimiento de la serina/treonina quinasa 1 (RIPK1), que interactúa con el receptor de

quinasa RIP como regulador de la necroptosis inducida por el ligando Fas y por el factor de necrosis tumoral α en las células Jurkat (Holler *et al.*, 2000).

2.5.3. Piroptosis

Es una forma de muerte celular regulada, descrita por primera vez en 1992. Se observó que un patógeno bacteriano invasivo ocasionaba una forma lítica de muerte celular en macrófagos infectados por *Shigella flexneri* (Zychlinsky *et al.*, 1992). Sugiriendo que la piroptosis juega un papel importante en la defensa contra infecciones microbianas. Esto mediante la eliminación del nicho de replicación del patógeno intracelular, dejándolo susceptible a fagocitosis y asesinado por un fagocito secundario (Jorgensen & Miao, 2015).

En 2001 se denominó piroptosis ('Pyro' relacionado con fuego o fiebre y 'ptosis' para denotar caída) a la muerte celular programada proinflamatoria dependiente de caspasa-1 (Zychlinsky *et al.*, 1992).

2.5.4. Apoptosis

El termino apoptosis lo acuño por primera vez Kerr *et al.*, (1972), como la primera forma de muerte celular programada. La apoptosis es iniciada o inhibida por estímulos ambientales, tanto fisiológicos como patológico. Implica la eliminación de células genéticamente determinadas y normalmente ocurre como mecanismo homeostático para mantener un nivel celular adecuado en los tejidos, recambio celular, desarrollo embrionario y como mecanismo de defensa (Elmore, 2007).

En algunos casos, la apoptosis y la necrosis podrían confundirse, ya que estos dos procesos pueden ocurrir simultáneamente, secuencialmente o de forma independiente, razón por la que en algunos casos el tipo o nivel de estímulo determina el tipo de muerte celular (Elmore, 2007). Morfológicamente, la apoptosis se caracteriza por la contracción citoplasmática seguida de la condensación de la cromatina. Mientras que, en el lado extracelular se expone a la membrana la fosfatidilserina, la célula se desintegra en cuerpos apoptóticos. Los cuales pueden ser atrapados y digeridos por otras células a través de una vía lisosomal (Häcker, 2000; Saraste & Pulkki, 2000).

Para el reconocimiento de células marcadas para apoptosis se desencadena una cascada de vías de señalización y de receptores. Por ejemplo, la exposición de la fosfatidilserina en las capas externas de la membrana plasmática, la cual es un marcador muy específico de apoptosis

(Hengartner, 2001), y como consecuencia la activación de caspasas (Ferraro-Peyret *et al.*, 2002). Son dos vías principales las que median la apoptosis: la vía intrínseca y la vía extrínseca, una tercera vía está basada en células T citotóxicas, aunque toda la vía convergen en las proteasas iniciadoras centrales que son las caspasas (Kist & Vucic, 2021).

La apoptosis es un tipo de muerte programado y coordinado que una desregulación o alteración en la maquinaria (Pistritto *et al.*, 2016), puede ser responsable del desarrollo de muchas patologías humanas, como la progresión del cáncer y resistencia a los tratamientos, enfermedades neurodegenerativas, trastornos autoinmunes y daño isquémico (Elmore, 2007).

2.5.4.1. Vía extrínseca de la apoptosis

Este tipo de apoptosis se induce por superfamilias del factor de necrosis tumoral (TNFSF), que se une a sus receptores en la superficie celular activando una cascada de señalización conocida como apoptosis extrínseca (Kist & Vucic, 2021). Los receptores de muerte pertenecen a los miembros de las superfamilias de receptores del factor de necrosis tumoral, y se caracteriza por una región citoplasmática conocida como dominio de muerte (DD). Este dominio permite iniciar una cascada inductora de apoptosis que inicia con el reclutamiento y la posterior activación de caspasas iniciadoras (Guicciardi & Gores, 2009).

Los receptores de muerte como sistema de señalización más ampliamente estudiados son: TNFR1 (p55/ CD120a)- TNF α , FAS (CD95, APO-1)- FasL, TRAILR1 (DR4)-TRAIL, TRAILR2 (DR5/ APO-2/ -KILLER)- TRAIL (Guicciardi & Gores, 2009; Pistritto *et al.*, 2016). Al interactuar los receptores con sus respectivos ligandos de la familia TNF, se reclutan proteínas adaptadoras como FADD para formar el complejo de señalización inductor de muerte (DISC), que es activado por la asociación FADD con la procaspasa iniciadora (caspasas 8 y 10) (Carneiro & El-Deiry, 2021). Una vez activadas las caspasas iniciadoras, se desencadena la fase de ejecución mediada por caspasas efectoras (caspasa-3, -6, -7), generando escisión de sustratos que son esenciales en la viabilidad celular, y en consecuencia se induce muerte celular (Degterev *et al.*, 2003). Este tipo de muerte mediado por el receptor de muerte como FAS y TNF puede ser bloqueado por la proteína inhibidora de FLICE celular (c-FLIP), este se une a FADD y caspasa-8 inhibiendo así la activación de caspasa iniciadoras y no se lleva a cabo la apoptosis (Kataoka *et al.*, 1998; Scaffidi *et al.*, 1999).

2.5.4.2. Vía intrínseca de la apoptosis

Esta vía se inicia por estímulos que producen señales intracelulares que pueden tener una participación negativa en la ausencia de ciertos factores de crecimiento, hormonas y citoquinas. La ausencia de estos conduce a la pérdida de supresión apoptótica y en consecuencia la activación de apoptosis (Elmore, 2007). Los estímulos que tienen participación positiva hacia la apoptosis son radiación, toxinas, hipoxia, radicales libres, infecciones virales (Elmore, 2007). Estas señales intracelulares hacen que se activen los miembros proapoptóticos BH3 de la superfamilia de las Bcl-2 (BAX, BAK), neutralizan las proteínas antiapoptóticas Bcl-2, Bcl-xL- Mcl-1. Como consecuencia se interrumpe la permeabilidad de la membrana externa mitocondrial (MOMP) (Pistritto *et al.*, 2016), y la liberación de proteínas del espacio intermembrana (IMS) al citosol. Estas proteínas incluyen a los factores apoptogénicos como el citocromo c (Danial & Korsmeyer, 2004). Cuando las proteínas IMS están en el citosol, estas pueden seguir diferentes rutas. En la primera, el citocromo c (Cyt c) promueve la formación del complejo multiproteico llamado apoptosoma al unirse al factor activador de la proteasa de la apoptosis (APAF-1) y ATP/dATP, que a su vez recluta al iniciador procaspasa-9 para activar Casp-9 y se cataliza la activación proteolítica de las caspasas efectoras contribuyendo a las características morfológicas de apoptosis (fragmentación de ADN y condensación de cromatina) (Kroemer *et al.*, 2007; Pistritto *et al.*, 2016). En la segunda, el factor inductor de apoptosis (AIF) y la endonucleasa G (EndoG), ambos efectores de muerte independientes de caspasas, pasan del citosol al compartimento nuclear favoreciendo la fragmentación del ADN y condensación de cromatina, aunque los integrantes de la familia de proteínas de choque térmico (HSP) como la HSP70 pueden evitar la importación nuclear del AIF inhibiendo así su actividad proapoptótica (Kroemer *et al.*, 2007). En la tercera, la familia de proteínas (XIAP) son inhibidores de apoptosis al evitar la activación de caspasas 9 y 3, aunque esta actividad de los IAP (que a menudo se sobreexpresan en el cáncer) pueden suprimirse por proteínas como Omi/HtrA2 y Smac/DIABLO que se unen al dominio BIR y promoviendo la activación de caspasas iniciadoras (Pistritto *et al.*, 2016; Salvesen & Duckett, 2002).

2.6. Métodos para medir apoptosis

La muerte celular puede ocurrir por diferentes vías e incluso compartir algunas características entre ellas, por lo que son los diferentes marcadores de apoptosis los que pueden confirmar el mecanismo de muerte que se está llevando en el sistema experimental (Muppidi *et al.*, 2004). Por

lo que, para seleccionar el método de detección, se pueden considerar los criterios morfológico o marcas distinguibles de vías apoptóticas, entre ellas la fragmentación de ADN, citotoxicidad y proliferación celular, detección inmunológica, daño mitocondrial, alteraciones de membrana y ensayos basados en mecanismos (Banfalvi, 2017).

2.6.1. Análisis de fragmentación de ADN mediante electroforesis en gel de agarosa

Anteriormente, la separación de ADN se realizaba por centrifugación en gradientes de densidad de sacarosa, pero solo proporcionaba un aproximado del tamaño. La electroforesis en gel de agarosa revolucionó la separación del ADN ya que permite una separación más precisa por carga eléctrica (Lee *et al.*, 2012).

Uno de los primeros métodos para determinar apoptosis fue por la degradación del ADN. Esto mediante la detección de fragmentos de ADN celular por electroforesis en gel de agarosa. La degradación de ADN genera fragmentos muy grandes durante la ruptura inicial (McCarthy & Evan, 1997), y se pueden observar bandas en un patrón de escaleras en el gel de agarosa como en la Figura 3 carril 1. Este patrón se debe a que después de la ruptura inicial, la fragmentación se puede observar en un barrido sin distinguir bandas claras y confundir con un proceso necrótico.

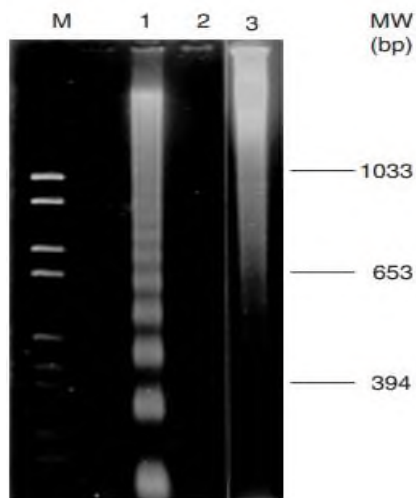


Figura 3. Escalera del ADN como indicador de apoptosis: M) marcador, 1) ADN de células apoptóticas, 2) no tratadas y 3) células necróticas (Zhivotosky & Orrenius, 2001).

2.6.2. Técnica por citometría de flujo

La citometría de flujo (cito: célula y metría: medición) (Cossarizza *et al.*, 2019), es una técnica utilizada para el análisis de múltiples parámetros celulares individuales en solución de poblaciones heterogéneas. En esta técnica las células pasan una a una a través de los rayos láser para el análisis individual (Picot *et al.*, 2012).

Los citómetros de flujo constan de tres sistemas: fluídica, óptica y electrónica (Cossarizza *et al.*, 2019). El sistema fluídico consiste en ser un fluido envolvente (generalmente una solución salina tamponada), donde la suspensión de la muestra primero se presuriza para entregar y enfocar la muestra en el punto de intercepción del láser donde se analiza la muestra (McKinnon, 2018). El sistema óptico genera las señales de luz visible y fluorescente que se utilizan para analizar las muestras y consta de óptica de excitación (láseres) y ópticas de recolección (tubos fotomultiplicadores o PMT y fotodiodos) (McKinnon, 2018). La célula al pasar a través de la fuente de excitación, el rayo láser se refracta en todas las direcciones y la magnitud de luz frontal se correlaciona con el tamaño relativo de las células (Picot *et al.*, 2012). En el sistema electrónico se convierten las señales de los detectores en señales digitales para ser leídas por una computadora (McKinnon, 2018).

La citometría de flujo es un método muy utilizado para la detección y cuantificación de apoptosis. Esto porque es un método multiparamétrico que analiza la compleja progresión de la muerte celular por apoptosis. La citometría puede combinar varias características apoptóticas, cuantificar (tamaño celular, viabilidad celular y contenido de ADN) y observar múltiples etapas (apoptosis temprana, intermedia y tardía) simultáneamente (Telford, 2018).

Dentro de los resultados que se pueden obtener es la progresión de las células viables a muerte celular por apoptosis y con posible avance a necrosis como se muestra en la figura 4.

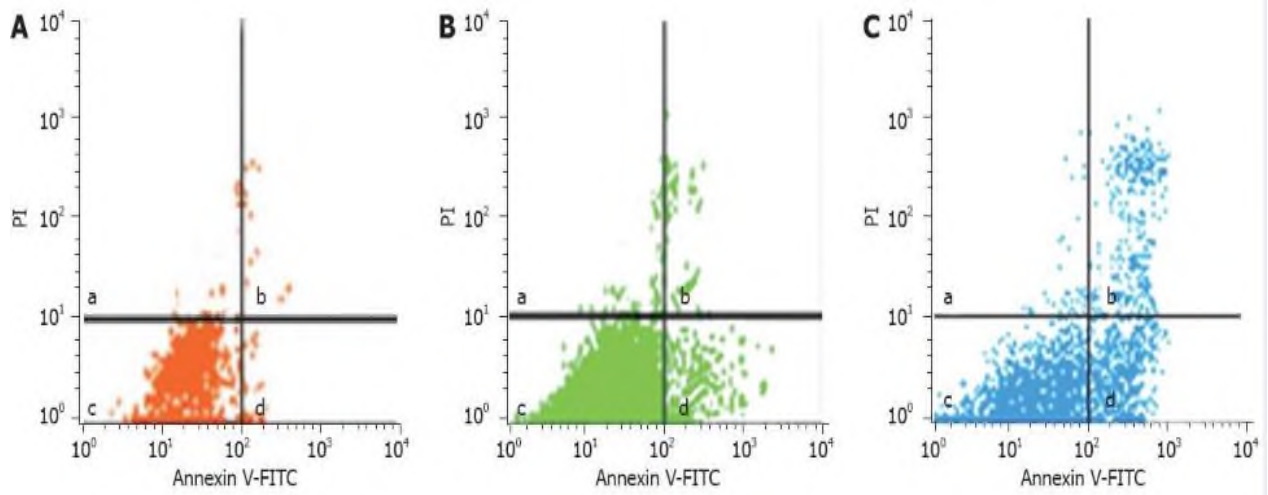


Figura 4. Representación de datos de citometría de flujo. Gráficos A-C) muestra los resultados de células DEF (fibroblastos de embrión de pato) a las 48, 96 y 144 h después de la infección por el virus NGVE (enteritis viral del anasarón). Cuadrante c) Células no apoptóticas (anexina V⁻/IP⁻), cuadrante d) células apoptóticas tempranas (anexina V⁺/IP⁻), cuadrante b) células apoptóticas tardías (anexina V⁺/IP⁺) y cuadrante a) células necróticas (anexina V⁻/IP⁺) (Chen *et al.*, 2008).

2.6.3. Ensayo de anexina V/ PI

La anexina V pertenece a las proteínas de unión a fosfolípidos dependientes de calcio y con unión mayoritaria específica a la fosfatidilserina (Banfalvi, 2017). La pérdida de asimetría de la membrana plasmática es un evento temprano de la apoptosis que es independiente del tipo de célula. Esto deja expuestas a la fosfatidilserina en el exterior de la membrana plasmática que interactúan con la anexina V. Este ensayo puede analizarse por citometría de flujo, microscopía óptica o fluorescencia (Engeland *et al.*, 1998). Su uso se limita a cultivos celulares y no es específico para apoptosis ya que se pueden teñir con anexina la membrana interna de células rotas (Banfalvi, 2017). Por lo que el ensayo anexina V debe combinarse con marcadores que son impermeables a la membrana y así poder distinguir de células viva/ muertas, estos marcadores pueden ser yoduro de propidio (PI), azul de tripano o la 7-amino-actinomicina (7-ADD) (Banfalvi, 2017; Muppidi *et al.*, 2004). El yoduro de propidio es un colorante de unión al ADN intercalante, se excita a 488 nm y emite en el rango de 570-630 nm (Telford, 2018). Los marcadores también permiten diferenciar a las células necróticas ya que estas dan directamente un doble positivo de anexina V/PI. Las células apoptóticas primero son positivas para anexina V y negativas para PI (apoptosis temprana), posteriormente son positivas para PI ya en apoptosis tardía (Engeland *et*

al., 1998). La tinción de anexina V en combinación con 7-ADD o PI son utilizadas para identificar las etapas apoptóticas preferentemente por citometría de flujo (Banfalvi, 2017).

2.6.4. Método TUNEL

Aprovecha la fragmentación de ADN como sello distintivo de apoptosis mediante el ensayo etiquetado terminal de dUTP mediado por desoxinucleotidil transferasa (TUNEL) (Darzynkiewicz *et al.*, 2008). De la fragmentación de ADN se aprovechan los extremos 3'-OH (McCarthy & Evan, 1997) para adicionarles trifosfatos de desoxinucleotidos (comúnmente análogos de dUTP), aprovechando la capacidad única de la ADN polimerasa atípica que es la desoxinucleotidil transferasa terminal (TdT) para catalizar dicha adición (Mirzayans & Murray, 2020). En este tipo de tinción los nucleótidos unidos por TdT se etiquetan fluorescentemente o químicamente con etiquetas indirecta vinculada a etiquetas fluorescentes o enzimas (Darzynkiewicz *et al.*, 2008).

3. Justificación

Actualmente, a nivel mundial la principal causa de muerte es el cáncer y en mujeres el de mama representa el cáncer de mayor incidencia, el cual ocupa el quinto lugar como causa de fallecimientos. Los tratamientos contra esta enfermedad no aseguran su efectividad, no son específicos, son invasivos y además comprometen la calidad de vida de los pacientes. Esto ha llevado a la constante búsqueda de nuevos tratamientos que aseguren la cura y que no generen efectos secundarios.

Por otro lado, el gran interés biotecnológico de la bacteria *B. thuringiensis*, por su actividad bioinsecticida, actualmente ha cobrado mayor importancia debido a la actividad citotóxica de algunas de sus proteínas parasporales denominadas parasporinas. Además, de que las parasporinas pueden actuar selectivamente contra algunos tipos de cáncer e inducir mecanismos de muerte por apoptosis y necrosis. Lo anterior hace a las parasporinas un potencial fármaco en el tratamiento contra el cáncer sin comprometer células sanas. El grupo de investigación de la Universidad del Papaloapan ha encontrado un grupo de parasporinas que tienen actividad citotóxica sobre las líneas MCF-7 y MDA MB 231. Sin embargo, aún se desconoce los mecanismos de muerte asociado a dicha actividad. Por lo tanto, el objetivo de nuestro trabajo es determinar si el mecanismo de muerte inducido por la parasporina A34-2 es por apoptosis sobre la línea celular de cáncer de mama MCF-7.

4. Hipótesis

El tipo de muerte asociado a la actividad citotóxica de la parasporina A34-2 sobre la línea celular de cáncer de mama MCF-7 es la apoptosis.

5. Objetivos

5.1. Objetivo general

Determinar el tipo de muerte que genera la parasporina A34-2 con actividad citotóxica sobre la línea celular de cáncer de mama MCF-7.

5.2. Objetivos específicos

- Determinar el efecto antiproliferativo de la parasporina A34-2 sobre la línea celular MCF-7.
- Evaluar la toxicidad en células no tumorales.
- Determinar la fragmentación de ADN mediante electroforesis en gel de agarosa en células de cáncer de mama MCF-7 tratadas con la parasporina A34-2.

6. Diagrama experimental

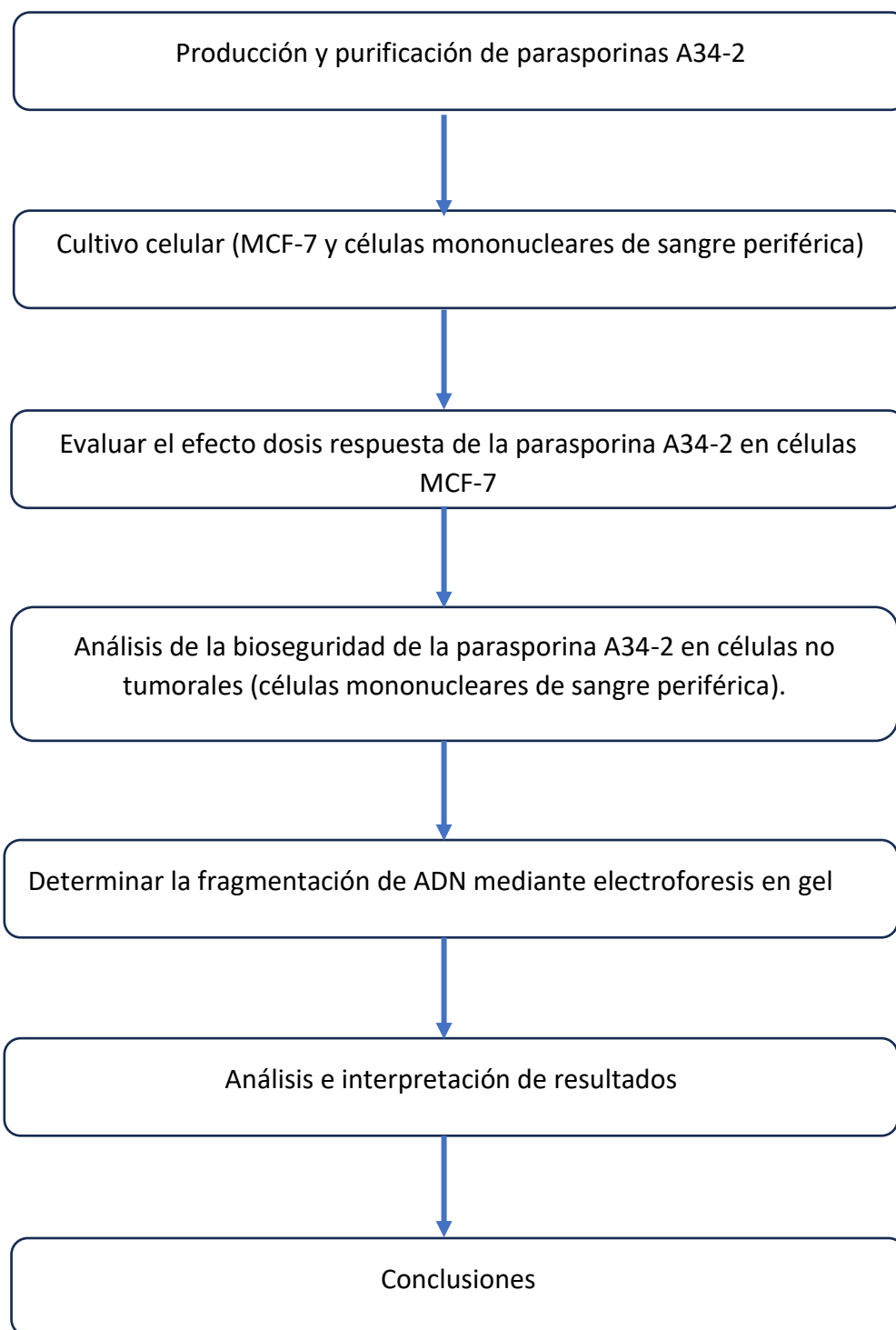


Figura 5. Diagrama experimental de la actividad citotóxica y el tipo de muerte que genera la parasporina A34-2 sobre células MCF-7.

7. Materiales y métodos

7.1. Producción de las parasporinas del *B. thuringiensis*

El grupo de trabajo de la Universidad del Papaloapan Campus Tuxtepec cuenta con una colección de cepas de *B. thuringiensis* aislados de los suelos de la Cuenca del Papaloapan (Bravo-D *et al.*, 2015). Esta colección de cepas se conserva en discos de esporas y por los antecedentes se eligió la cepa A34 para este estudio.

La cepa seleccionada se sembró en 50 cajas Petri con agar nutritivo (Peptona de gelatina/ Extracto de carne/Agar bacteriológico) preparado de acuerdo con las especificaciones del fabricante y ajustando el pH a 7.4. El medio se esterilizó durante 15 minutos, a 121 °C y 1.02 kg/cm². Se inoculó una caja con un disco de esporas para que fuera el cultivo inicial (se incubó por 24 h a 30°C) y a partir de esta se inocularon las cajas restantes. Después de inocular las cajas con el cultivo inicial se incubaron a 30 °C hasta observar un aproximado del 90% de esporas libres en el medio, aproximadamente 7 días en una incubadora EI60-AID NOVATECH. Para esto se utilizó la tinción de esporas de Schaeffer-Fulton como comprobación. Además, a las 6 horas de incubación se tomó una muestra para realizar la tinción de Gram para verificar que los bacilos fueran Gram positivas, descartar contaminación por bacilos Gram negativos y al mismo tiempo visualizar el crecimiento exponencial. Ambas tinciones se observaron a 40x (400 ampliaciones) en un microscopio DM 3000 Leica Microsystems.

Pasando los 7 días de cultivo se realizó el raspado (con asa bacteriológica y agua destilada) de todas las cajas para recolectar en un solo tubo todo el crecimiento, tanto esporas como bacilos. Posteriormente se centrifugó el tubo cónico a 747 Xg (5500 rpm) y 5 °C durante 30 minutos en una centrífuga Megafuge 16R Thermo Fisher Scientific™, para posteriormente retirar el sobrenadante. La pastilla obtenida se lavó con agua destilada, enseguida se realizaron 2 lavados de agua isotónica (NaCl 0.85% p/v), 1 lavado con agua destilada, 2 lavados de agua acidulada (pH 2), y por último un lavado con agua destilada. En esta sucesión de lavados por cada paso se resuspendió la pastilla con 5 mL de la solución correspondiente usando un agitador vortex (MX-S Science MED). Las condiciones de centrifugado en cada paso de lavado fueron a 747 Xg (5500 rpm), 5 °C por 20 minutos. Después del último lavado, la pastilla obtenida se guardó en refrigeración a 4 °C.

7.2. Purificación y selección de banda de la proteína A34-2

La pastilla conservado se resuspendió en 2 mL de agua destilada y se procedió a solubilizar con el reactivo de Laemmli (Laemmli, 1970). Se tomaron 400 μ L de la muestra resuspendida más 100 μ L de agua y se le agregó 500 μ L del reactivo de Laemmli 2X, por último, la muestra se calentó en agua a ebullición durante 5 minutos.

Las muestras de las proteínas solubilizadas se corrieron por electroforesis en geles desnaturizantes de poliacrilamida (SDS- PAGE) al 10%, de 1.5 mm de ancho. Se utilizó un peine de dos pozos, uno corto para marcador de peso molecular y otro largo para la proteína, para así separar la mayor cantidad de proteína de acuerdo con su peso molecular. Se utilizó una cámara de electroforesis Mini-PROTEAN® Tetra Cell (Bio-Rad) y las condiciones de la electroforesis fueron: amortiguador de Tris-Glicina-SDS al 1X y 100 V por 180 minutos. Los geles se cargaron con 450 μ L de muestra, 2.5 μ L de marcador de peso molecular (NZYColor Protein Marker II). Finalmente se cortó la banda de \sim 55 kDa de cada gel para posteriormente extraerla de la matriz polimérica por electroelución.

Se pusieron las bandas cortadas en los pozos del electroelutor 422 Bio-Rad y se agregó amortiguador de elución Tris-Glicina-SDS al 1X. La electroelución se realizó a 10 mA constantes por 240 minutos. Esto se repitió para todas las bandas cortadas. Después de este proceso se obtuvo la proteína disuelta en amortiguador de elución contenido en el adaptador de silicona del tubo de vidrio, donde la membrana que esta moldeada al adaptador, retuvo a la proteína.

Debido a que el SDS es tóxico para las líneas celulares cancerígenas, a los productos de la electroelución se les realizó una diálisis para retirarlo. Para esto se emplearon membranas de diálisis (Spectra/Por Membrane MWCO: 6-8000). Los lavados se hicieron con amortiguador de fosfatos (PBS) por 24 horas en frío y en agitación constante. El amortiguador se cambió cada 2 horas por uno nuevo. Las proteínas se concentraron dentro de la membrana. Finalmente, la proteína obtenida se filtró con una membrana de 0.22 μ m y se cuantificó por el método de Bradford en una dilución 1:20.

7.2.1 Cuantificación de proteína por Bradford

La cuantificación de proteína se realizó mediante el método de Bradford (Thermo SCIENTIFIC). De acuerdo con las especificaciones del fabricante, la albumina sérica bovina (BSA) se utilizó como

proteína estándar a las concentraciones de 25, 20, 15, 10, 5 y 2.5 µg/mL partiendo de una solución madre a 1 mg/mL. Como diluyente se utilizó PBS para diluir tanto la proteína dializada-filtrada (1:20) como el estándar. La lectura de absorbancia se realizó en un lector de microplacas Mark Microplate Reader (Bio-Rad®), a una longitud de onda de 595 nm.

A partir de la ecuación de la recta que se obtuvo con la proteína estándar, se realizó el cálculo para la proteína A34-2 dializada-filtrada obteniendo una concentración de 124 µg/mL.

7.3. Bioensayo dosis respuesta en la línea celular MCF-7

7.3.1. Manejo de la línea celular de cáncer mama MCF-7

La línea celular MCF-7 (ATCC, HTB-22) se obtuvo del laboratorio de Nutrición del Instituto Nacional de Pediatría de la Ciudad de México. Para establecer el cultivo celular, primero se descongelaron las células que estaban en una solución de crioconservación, se centrifugó a 1300 rpm (307.3 Xg) por 3 minutos y se eliminó el sobrenadante. Después se agregó 5 mL de medio RPMI suplementado (10% suero fetal bovino, 1% de antibiótico penicilina/estreptomicina) y se volvió a centrifugar en las mismas condiciones. El paquete celular obtenido se resuspendió en 3 mL de medio RPMI suplementado con 10% de SFB y se agregó a una caja Petri para cultivo celular con 5 mL del medio, se incubó a 37 °C, 95% de humedad y 5% CO₂, en una incubadora BJPX-C80 BIOBASE. Se monitoreó la adherencia, proliferación y morfología celular del cultivo al microscopio invertido a aumento 4X (AE31E MotiC™). Además, para corroborar que el cultivo no estuviera contaminado ni que hubiera muerte y así la proliferación fuera exitosa para los siguientes subcultivos.

Para disgregar las células, primero se le retiró al cultivo, el medio suplementado y se agregó 5 mL de PBS para lavar y evitar que el suero interfiriera con la actividad de proteasa de la tripsina. Se desechó el PBS (Fosfato de sodio/Cloruro de sodio/Fosfato de potasio), se agregó 1 mL de tripsina y se dejó incubando por 1 minuto a 37 °C y 5% de CO₂. Pasado este tiempo, se verificó al microscopio que las células estuvieran levantadas y en suspensión. Para detener la actividad de la tripsina se agregó 5 mL de medio suplementado con 10% SFB y se transfirió a un tubo cónico de 15 mL. Posteriormente, se centrifugó a 1200 rpm (163 Xg) por 5 minutos a 20 °C, se eliminó el sobrenadante y la pastilla obtenida se resuspendió en 1 mL de medio suplementado. Se contó las células usando cámara de Neubauer con una dilución 1:20 (50 µL de células y 950 µL de medio), y se calculó el volumen necesario para tener el número de células para los bioensayos.

7.3.2. Actividad citotóxica de la proteína A34-2 en la línea celular MCF-7

La actividad citotóxica y el efecto dosis respuesta se realizó mediante el método colorimétrico MTT (Mosmann, 1983). Este método consiste en la reducción metabólica de células activas que mediante enzimas deshidrogenasas mitocondriales que reducen el Bromuro 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol a 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-1,3-difenilformazán. Dicha sal de formazán reacciona con el disolvente DMSO (dimetilsulfóxido) dando un compuesto color violeta.

Las células se cultivaron en microplacas de 96 pozos en una cantidad de 2×10^4 células en un volumen final e 150 μL por pozo y se incubaron a 37 °C, 5% de CO_2 por 24 horas. Posteriormente, se agregó a cada pozo y por triplicado un volumen de 50 μL (proteína más medio RPMI suplementado), diferentes concentraciones (4.9, 6.9, 9, 11, 12, 13, 14, 15, 19.1, 21.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Como control negativo se utilizaron células sin tratamiento, y como control positivo se usó doxorubicina a 4 μM , un compuesto químico que es ampliamente utilizado como agente antineoplásico en cáncer de mama, y que genera muerte por apoptosis. Las células MCF-7 se incubaron por 24 horas a 37 °C y 5% CO_2 . Pasando este tiempo, se retiró todo el medio a cada pozo y se le agregó 50 μL de MTT a una concentración de 5 mg/mL disuelto en medio basal (RPMI sin suplementar) y se dejó incubando por 4 horas a 37 °C y 5% CO_2 . Posteriormente, se le retiró todo el MTT a cada pozo, los cristales de formazán se disolvieron agregando 50 μL de dimetilsulfóxido (DMSO). Por último, la lectura de absorción se realizó en un lector de microplacas Mark Microplate Reader (Bio-Rad®) a una longitud de onda de 595 nm.

7.4. Viabilidad de células no tumorales tratadas con la proteína A34-2.

Para evaluar la toxicidad de las parasporinas en células sanas, los ensayos se realizaron en Células Mononucleadas de Sangre Periférica (CMSP) y eritrocitos para la prueba de hemólisis. Los cuales se obtuvieron de un voluntario sano, con previa firma de consentimiento escrito en el laboratorio de cultivo de células animales CIC, Universidad del Papaloapan.

7.4.1. Extracción de células mononucleares de sangre periférica

Se realizó la toma de muestra de personas diferentes, mediante punción venosa utilizando tubos con heparina (Tubos BD Vacutainer®).

Para la separación de los componentes celulares de la sangre se utilizó el protocolo modificado de Pongsavee (2009). En un tubo Falcon de 15 mL se agregó 5 ml de Lymphosep y 5 mL de sangre

por las paredes del tubo cuidando no mezclar los dos componentes, se centrifugó a 400 Xg (2944 rpm) por 30 minutos. Se observaron las fases en la separación por gradiente de densidades y se recuperó las células mononucleares por medio de una pipeta Pasteur. Se agregó 10 mL de PBS 1X para el lavado y se centrifugó a 100 Xg (736 rpm) por 10 minutos. Se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en medio RPMI suplementado (FBS 10% y P/S 1%). Se realizó el conteo celular en cámara de Neubauer en una dilución 1:20 y así realizar los cálculos para el volumen necesario para una concentración de 5×10^4 células por cada pozo.

7.4.2. Ensayo MTT en células mononucleares de sangre periférica

Para el cultivo celular se utilizó una microplaca de 96 pozos en el que se sembraron 5×10^4 células en un volumen final de 100 μ L por cada pozo y por triplicado. Se aplicaron dos concentraciones de la proteína A34-2 (15 y 14.88 μ g/mL), como control negativo se utilizó solo células con medio suplementado y dos como control positivo, doxorrubicina 4 μ M y SDS 20%. Después de aplicar los respectivos tratamientos, se dejó incubando por 24 horas a 37 °C y 5% de CO₂. Posteriormente a cada pozo se le agregó 10 μ L de MTT a 5 mg/mL disuelto en PBS y se incubó por 4 horas a 37 °C y 5% de CO₂. Pasado este tiempo se solubilizaron los cristales con 100 μ L de DMSO y se leyó la absorción en un lector de microplacas Mark Microplate Reader, Bio-Rad® a una longitud de onda de 595 nm.

7.4.3. Extracción y preparación de eritrocitos para el ensayo de hemólisis

La toma de muestra fue igual al de los monocitos. Se utilizó el protocolo modificado de Evans *et al.* (2013) para extraer 5 mL de sangre. Se centrifugó a 500 Xg (3680 rpm) durante 5 minutos en tubo Falcon marcando con un plumón los niveles de hematocrito (rojo, capa inferior) y plasma (amarillento, capa superior). Para el lavado, se aspiró el plasma y se desechó en los residuos biopeligrosos, se agregó NaCl 150 mM hasta el nivel original del plasma, se invirtió suavemente el tubo y se centrifugó a 500 Xg (3680 rpm) por 5 minutos. Se realizaron dos lavados. Después del segundo lavado se aspiró el sobrenadante, se reemplazó por PBS pH 7.4 y se invirtió el tubo para mezclar y se centrifugó a 500 Xg (3680 rpm) por 5 minutos. Por último, se desechó el sobrenadante, se agregó 12 mL de PBS por cada 3 mL de suspensión de eritrocitos.

Partiendo de los eritrocitos resuspendidos en PBS se realizó el cálculo para agregar 15 μ g/mL de la proteína A34-2 para un volumen final de 200 μ L (eritrocitos más proteína) para cada tubo Eppendorf de 1.5 mL. Como control negativo se utilizó solo eritrocitos en PBS y como control

positivo se agregó SDS al 20%. Después de aplicar los respectivos tratamientos, se dejó incubando por 1 hora a 37 °C y 5% de CO₂. Pasado el tiempo, se centrifugaron los tubos Eppendorf a 500 Xg (2115 rpm) por 5 minutos y cuidando de no romper el sedimento celular se tomó 100 µL del sobrenadante de cada tubo para agregar en una microplaca y medir la absorbancia a 590 nm.

7.5. Determinación del mecanismo de muerte por fragmentación del ADN

Del cultivo establecido de las células MCF-7, se realizaron los cálculos para un volumen con una concentración deseada de células. En una caja de 6 pocillos se sembraron 3X10⁵ células por cada pozo en un volumen final de 1.5 mL de medio DMEM suplementado (15% FBS, 1% P/S, 1% glutamina y HEPES 0.25 mM). Se dejó incubando durante 48 horas a 37 °C, 5% de CO₂ y después se agregó una concentración de proteína (14.88 µg/mL). Como control negativo se utilizó solo medio con células y como control positivo doxorubicina 4 µM, todos los tratamientos se realizaron por duplicado. Se dejó incubando por 24 horas a 37 °C y 5% CO₂.

Para la extracción del ADN se utilizó el protocolo modificado de Kasibhatla *et al.* (2006). Como primer paso se realizó el raspado de cada pozo para recuperar el medio con células tratadas y agregarlas a microtubos de 1.5 mL, se centrifugó a 4 °C por 5 minutos a 2000 rpm (472.8 Xg), se eliminó el sobrenadante y se agregó 40 µL de amortiguador de lisis TES 1X (Tris/EDTA/SDS) y se mezcló lentamente. Entre cada mezcla, las puntas de micropipeta se cortaron para hacerlas de un calibre más ancho y evitar la ruptura del ADN. Finalmente, se agregó 15 µL de proteinasa K, se mezcló y se dejó incubando a 50 °C durante 150 minutos.

Para observar la degradación de ADN se preparó el gel de agarosa al 0.45% y 0.6% en 30 mL de amortiguador TAE 1X. Por cada pozo del gel de agarosa se agregó 15 µL de muestra (15 µL de ADN más 2 µL de buffer de carga al 10X), como amortiguador de corrida se utilizó TAE 1X y el marcador de peso fue NZYDNA Ladder VI. Se repitieron 3 veces los experimentos y por duplicado cada uno.

Las condiciones de corrida para cada gel fueron a 100 V durante 66 minutos y como solución teñidora del gel se utilizó GreenSafe Premium- NZYTech durante 20 minutos. Por último, se visualizaron las bandas de ADN por medio de un fotodocumentador VILBER.

7.6. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó mediante el software Graphpad Prism, utilizando un ANOVA (Análisis de Varianza) de una sola vía, seguido de la prueba post hoc de Tukey para comparar entre cada tratamiento aplicado, con significancia estadística de $p < 0.05$.

8. Resultados y discusión

8.1. Producción y purificación de la parasporina A34-2

Se cultivó la cepa A34 del *Bacillus thuringiensis* en agar nutritivo hasta que alcanzó un 90% de esporulación libre en el medio. Los cristales se solubilizaron, el extracto proteico resultante se separó por corrimiento electroforético en geles de acrilamida/bis- acrilamida al 10% (Figura 6).



Figura 6. Análisis por SDS-PAGE al 10 % del cristal parasporal solubilizado de la cepa A34 del *B. thuringiensis*. Las bandas dentro de las líneas punteadas de color rojo fueron las seleccionadas para purificarlas. La banda de ≈ 55 kDa corresponde a la parasporina identificada como A34-2.

El patrón de bandeo observado fue similar a lo reportado por Castrejón-Arroyo (2020) y por Cruz Nolasco (2017), aunque en agar nutritivo se observó una mejor definición de bandeo a diferencia del medio Gerry-Rowe. Igualmente, se visualiza que en esta cepa A34, al menos para las bandas

≈55, ≈48 y ≈27 kDa se aprecia con claridad sin distinción de medio y condiciones de cultivo comparando con lo reportado por Cruz Nolasco (2017).

Aunque se cortaron todas las bandas señaladas en la figura 6, solo la banda de ≈55 kDa que contiene a la parasporina de interés fue la que se purificó, el resto se guardaron para futuros análisis. La figura 7 muestra gel de SDS-PAGE al 10% después de la electroelución, este procedimiento se realizó para verificar que la proteína de interés no hubiera sufrido degradación o se perdiera durante el proceso de aislamiento. Como se esperaba, la banda tuvo el mismo peso de ≈55 kDa, evidencia de no degradación.

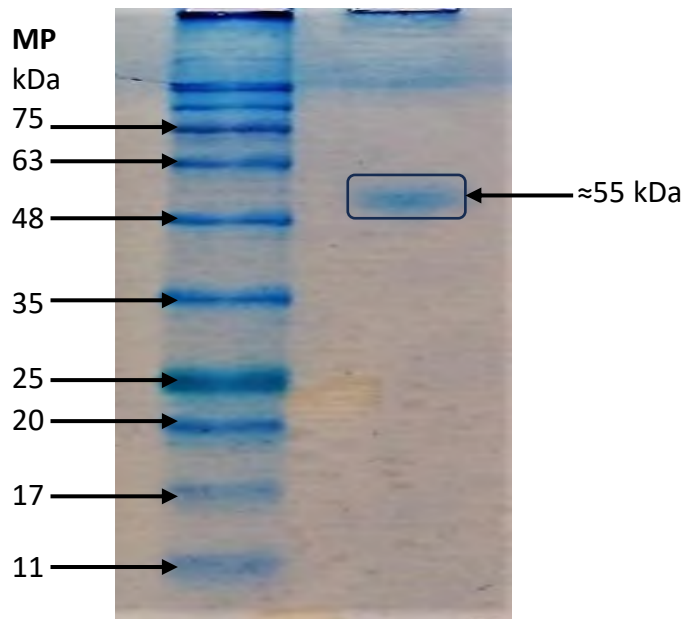


Figura 7. Análisis por SDS-PAGE al 10 % del producto electroeluido de la cepa A34 del *B. thuringiensis*.

La concentración obtenida de proteína después de la diálisis se muestra en la Tabla 1. Se obtuvo una menor concentración según lo reportado por Cruz Nolasco (2017). Esto debido probablemente a que las condiciones de cultivo fueron diferentes y el método de cuantificación. Las condiciones de cultivo reportado por Cruz Nolasco (2017) fue 300 mL de medio nutritivo, agitación 120 rpm, temperatura 30 °C, durante 7 días hasta alcanzar al menos el 90% de esporas libres y cuantificó por Nanodrop.

Tabla 1. Concentración del producto dializado cuantificado mediante Bradford.

Parasporina	Peso molecular (kDa)	Proteína stock	
		Concentración de proteína (µg/mL)	Volumen (mL)
A34-2	≈55 kDa	124	10

8.2. Bioensayo dosis respuesta de la parasporina A34-2 en la línea celular MCF-7

En la figura 8 se muestran los resultados de las curvas dosis respuesta de proteína utilizadas para evaluar el efecto citotóxico de la parasporina de ≈55 kDa sobre la línea celular MCF-7.

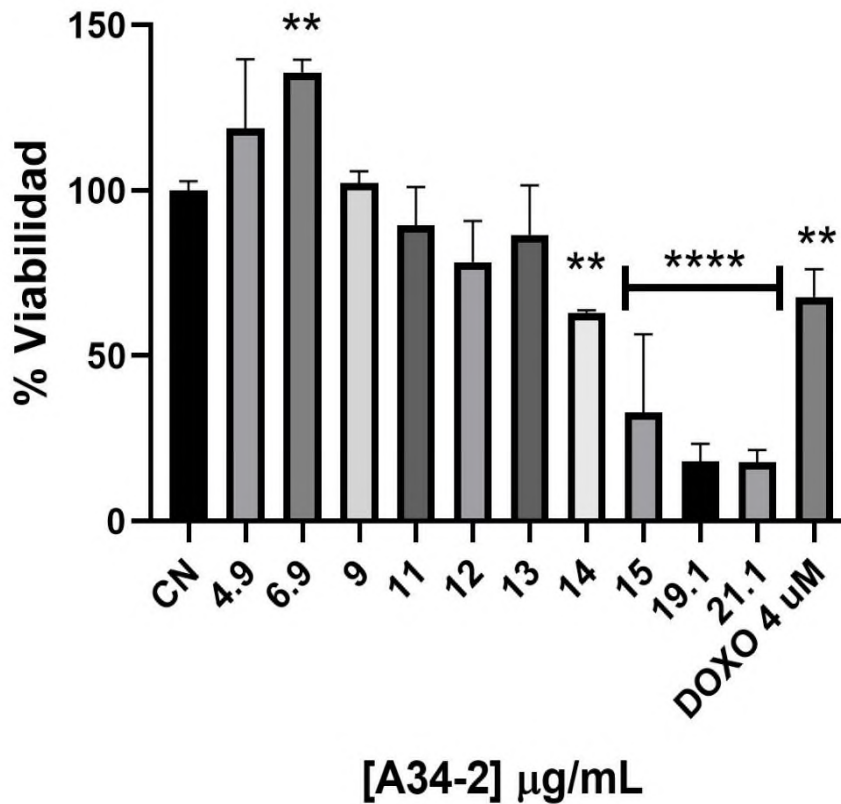


Figura 8. Curva dosis respuesta de la proteína A34-2 evaluada en células MCF-7 a las 24 h de tratamiento. Los resultados se expresan como porcentaje respecto al control negativo (100%). Los datos están expresados como la media ± desviación estándar (SD). Mediante una ANOVA de una vía y la prueba post hoc de Dunnet se evaluó la significancia estadística y n=37. Se consideraron estadísticamente significativos cuando *P< 0.05, **P< 0.01, ***P< 0.001 y ****P< 0.0001.

Los resultados mostraron que la concentración de 6.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$ no tuvo efecto citotóxico si no que promovió el crecimiento celular al observarse porcentajes de viabilidad mayor al 100% en base a nuestro control negativo (Figura 8). Lo que sugiere que en esa concentración las parasporinas no tienen efecto en las células y continúan proliferando con su actividad metabólica activa. A partir de la concentración 11 $\mu\text{g}/\text{mL}$ se empieza a observar efecto citotóxico al disminuir el porcentaje de viabilidad (10.57%). Mientras que a 15 a 21.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ la viabilidad cae un 67.2 y 82.1% respectivamente (Figura 8). Los datos correlacionan con lo observado por Castrejón-Arroyo (2020) en células MCF-7, en dicho trabajo se demuestra que la cepa A24-6 las concentraciones de 4, 6, 8 y 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ se incrementaba la viabilidad celular respecto al control negativo (100%) y en las concentraciones de 12 y 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ la viabilidad celular estaba por debajo del 50%, en un tiempo de 48 h de incubación de las células con proteínas A24-6.

En este trabajo y con el ensayo dosis respuesta, encontramos que para la parasporina A34-2 de ≈ 55 kDa, la IC_{50} es de ≈ 15.04 $\mu\text{g}/\text{mL}$ siendo esta una concentración muy cercana a lo reportado por Sabiá Júnior (2015) siendo diferente cepa y una concentración menor a las reportadas por Cruz Nolasco (2017). Esto demuestra que, aunque las proteínas son producidas por la misma cepa de *B. thuringiensis* pueden tener un diferente efecto en las líneas celulares como se observa en la Tabla 2. Por lo que la actividad biológica de las proteínas puede variar dependiendo de la línea celular en la que se estudien, incluso si dos cepas producen proteínas del mismo tamaño y peso molecular, puede que estas tengan efectos distintos por las diferencias en las cepas y en cómo actúan las proteínas como tratamiento. Sin embargo, la IC_{50} obtenida está dentro de lo previamente reportado (Tabla 2).

Lo antes mencionado también se demostró con el control positivo utilizado, doxorrubicina 4 μM . De acuerdo a lo reportado por Pilco-Ferreto & Calaf (2016) la IC_{50} de doxorrubicina en MCF-7 es de 4 μM en un tiempo de 24 horas como tratamiento y en este trabajo se utilizó la misma concentración en el mismo periodo de tiempo, obteniendo un porcentaje de viabilidad de un 67.75%. Observando así, aunque sean una misma línea celular el comportamiento y respuesta a los estímulos, serán diferentes.

Tabla 2. Parasporinas como tratamiento en diferentes líneas celulares.

Parasporina	Peso molecular (~kDa)	Concentración (µg/mL)	Cepa	Línea celular	Tiempo incubación (h)	Referencias
A13-2	26	6 ⁺	A13	MCF-7	48	(Borin <i>et al.</i> , 2021)
A13-5	30	8 ⁺	A13	MCF-7	48	(Borin <i>et al.</i> , 2021)
A13-2	26	4 [°]	A13	MDA-MB 468	48	(Borin <i>et al.</i> , 2021)
A13-5	30	1.3- 4 [°]	A13	MDA-MB 468	48	(Borin <i>et al.</i> , 2021)
A24-6	20-25	10*	A24	MCF-7	48	(Castrejón-Arroyo, 2020)
A34-1	75	85*	A34	MCF-7	20	(Cruz Nolasco, 2017)
A34-2	65	23*	A34	MCF-7	20	(Cruz Nolasco, 2017)
S1338	81-88	14.75*	PS1	MCF-7	24	(Sabiá Júnior, 2015)
PS-2Aa1	37	3-20*	A1547	HepG2, MCF-7, KLE, Hec-1A, MDA-MB231 y PC-3	24	(Brasseur <i>et al.</i> , 2015)
A1190	81	> 10*	PS-1	Células T normales, Jurkat, A549, CACO-2 y Sawano	20	(Katayama <i>et al.</i> , 2005)
A1190	81	0.12*	PS-1	Hela	20	(Katayama <i>et al.</i> , 2005)
A1190	81	0.32*	PS-1	HL60	20	(Katayama <i>et al.</i> , 2005)
A1190	81	2.2*	PS-1	MOLT-4	20	(Katayama <i>et al.</i> , 2005)
A1190	81	3*	PS-1	HepG2	20	(Katayama <i>et al.</i> , 2005)
PS1Aa1	81	36.6*	84-HS-1-11	MOLT-4	24	(Mizuki <i>et al.</i> , 2000)
PS1Aa1	81	8.7*	84-HS-1-11	HeLa	24	(Mizuki <i>et al.</i> , 2000)

* valores reportados para IC50

+ menos del 50 % de viabilidad celular

° más del 50 % de viabilidad celular

8.2.1. Cambios morfológicos en la línea celular MCF-7

El cultivo de las células MCF-7 se monitoreó al microscopio a diferentes tiempos (0, 9 y 24 horas) para dar un seguimiento a los posibles cambios morfológicos que se pudieran observar al aplicar como tratamiento la parasporina A34-2 (14.88 µg/mL), el control positivo (doxorubicina 4 µM) y el control negativo (Figura 9). En el control negativo se observó un crecimiento normal con respecto a lo reportado para MCF-7, pero a las 24 horas de incubación, las células proliferaron tan rápido que incluso empezaron a formar una bicapa, alcanzando una confluencia mayor del

90% (Figura 9c). Los pozos con las de células MCF-7 tratadas con la parasporina A34-2, mostraron que a partir de las 9 horas de incubación la morfología de algunas células cambio, observándose células ovaladas y oscuras (Figura 9b). A las 24 horas ya había células en suspensión y las adheridas a la caja de cultivo era aproximadamente el 50% de células, con una morfología más redondas y oscuras (Figura 9c). En el control positivo, a partir de las 9 horas de tratamiento las células se veían puntos negros y la proliferación celular decreció (50%) (Figura 9b), a las 24 horas las células se mantenían los puntos oscuros y se observó una gran cantidad de células en suspensión (Figura 9c).

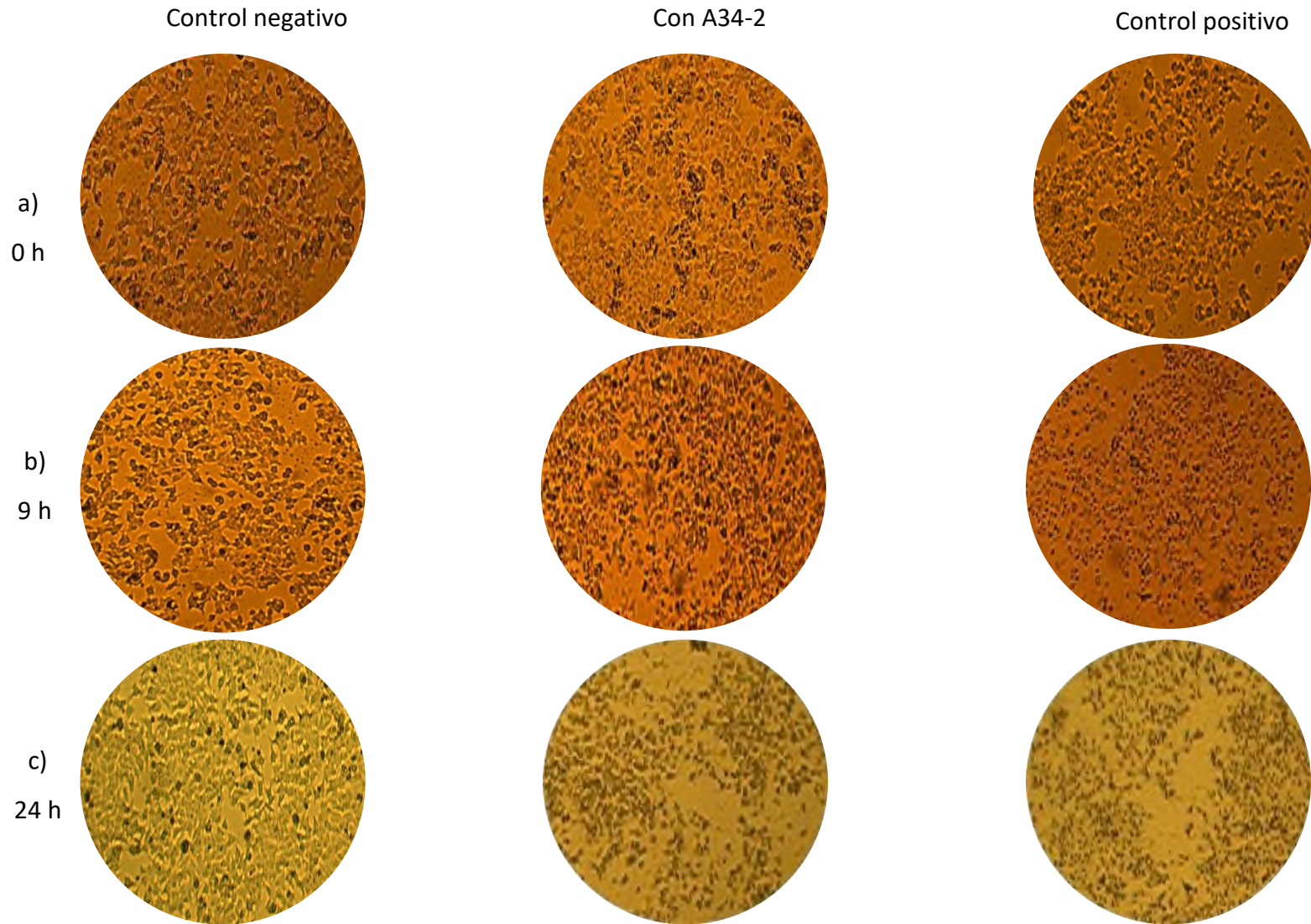


Figura 9. Cambios morfológicos de células MCF-7 después del tratamiento con la parasporina A34-2. a) 0 horas de tratamiento, b) 9 horas de tratamiento, c) 24 de tratamiento. La primer columna control negativo (células sin tratamiento), columna con A34-2 (células MCF-7 con proteína A34-2) y columna control positivo (células con doxorrubicina 4 μ M como tratamiento). Las células se observaron con el objetivo de 4x (ampliación de 40).

8.3. Viabilidad de las células no tumorales tratadas con proteína A34-2

Para demostrar la inocuidad de la parasporina A34-2 se realizaron bioensayos en los componentes celulares de la sangre, eritrocitos y Células Mononucleares de Sangre Periférica (CMSP). Realizar estas pruebas son de gran importancia, ya que la sangre representa el primer contacto de respuesta y transporte para los tratamientos que se aplican por vía intravenosa. De lo anterior, dependen los efectos secundarios o de riesgo que puedan tener el paciente expuesto a este tipo de tratamiento. Por otro lado, debido a su fácil obtención y manipulación, las CMSP y los eritrocitos se convierten en un modelo adecuado para el análisis *in vitro*.

8.3.1. Ensayo MTT en células mononucleares de sangre periférica

Los ensayos de MTT en CMSP se realizó a 24 horas de incubación con la parasporina A34-2 a dos concentraciones diferentes (14.88 y 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$), el control positivo fue SDS al 20% y doxorubicina 4 μM , por último, como control negativo se utilizó medio RPMI suplementado. La figura 10 muestra los resultados del ensayo de viabilidad de las células CMPS.

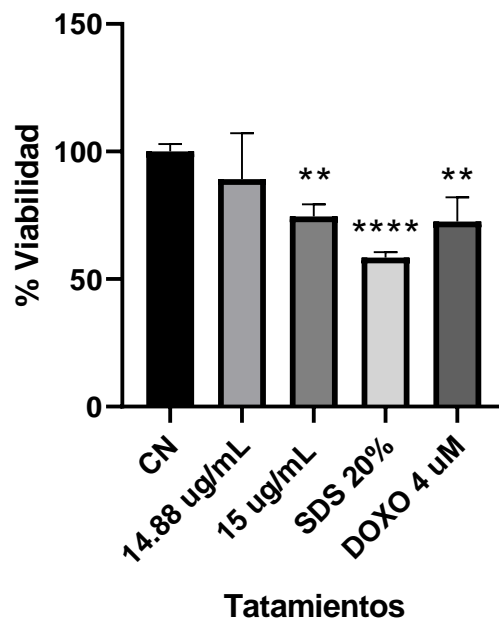


Figura 10. Actividad citotóxica de la proteína A34-2 en CMSP con 24 horas de tratamiento con la parasporina A34-2. Los datos están expresados como la media \pm SD. Mediante una ANOVA de una vía y la prueba post hoc de Dunnett se evaluó la significancia estadística con $n=24$. Se consideraron estadísticamente significativos cuando * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ y **** $P < 0.0001$.

El ensayo MTT no muestra efecto significativo para la concentración de 14.88 µg/mL, pero sí para la concentración cercana a la IC₅₀ en células MCF-7 de 15 µg/mL con un porcentaje de viabilidad del 74.56%, un valor cercano al control positivo (Doxo 4 µM) con 72.62% de viabilidad (Figura 10). Lo que sugiere que se debe probar con más concentraciones como referencia donde se asegure un mayor porcentaje de viabilidad en CMSP y con efecto significativo citotóxico en células MCF-7.

La parasporina A34-2 redujo la viabilidad de las células CMSP (10.87- 41.53%) a diferencia de la parasporinas A13-2, A13-5 Y A24-6 reportadas por Castrejón-Arroyo (2020). Dichas parasporinas no presentaron diferencias significativas en la reducción de la viabilidad respecto al control negativo. Sin embargo, al incrementar la concentración de parasporina si se observaron diferencias significativas al estimular la proliferación. El autor propone que posiblemente las PS generan una respuesta inflamatoria que estimula la proliferación celular.

Katayama *et al.* (2005) reportaron para parasporina-1 una IC₅₀ > 10 µg/mL en células T normales de sangre periférica, células Jurkat, células A549, CACO-2 y células Sawano. Mientras que obtuvieron una IC₅₀ menor de 10 para células HeLa (0.12 µg/mL), HL60 (0.32 µg/mL), MOLT-4 (2.2 µg/mL) y células HepG2 (3 µg/mL). Lo que sugiere que la parasporina puede ser citotóxica a ciertos tipos de células cancerosas y que hay concentraciones donde no sea significativo el efecto en CMSP. Y que además es un receptor específico responsable que confiere dicha citotoxicidad de la proteína sobre las células.

Aunque la parasporina A34-2 haya tenido efecto citotóxico en CMSP (41.53% en 15 µg/mL) es menor que el efecto que tuvo sobre las células MCF-7 (67.19% en 15 µg/mL). Por lo que no se descarta que pueda evaluarse como posible fármaco. Conocido el mecanismo de acción de A34-2, se podría realizar modificaciones en su estructura-función para aprovechar la citotoxicidad en células MCF-7 y disminuir efectos secundarios no deseados. Por otro lado, se puede probar contra otras líneas celulares sanas y cancerígenas.

8.3.2. Ensayo de hemólisis

Para que la proteína sea considerada como parasporina, una de las condiciones es que no sea hemolítica. Katayama *et al.* (2005) define el termino parasporina como "proteínas parasporales

bacterianas relacionadas con *Bacillus thuringiensis* que no son hemolíticas, pero son capaces de matar preferentemente células cancerosas".

Para este ensayo se utilizó como tratamiento a la parasporina A34-2 a una concentración (15 $\mu\text{g}/\text{mL}$) muy cercana a la IC_{50} que obtuvimos en células MCF-7 (15.04 $\mu\text{g}/\text{mL}$), como control positivo se usó SDS 20% y el control negativo fueron eritrocitos sin ningún tratamiento (Figura 11).

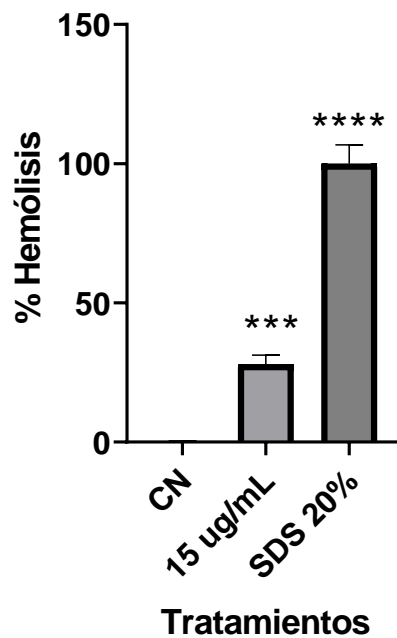


Figura 11. Ensayo de hemólisis en tratamiento con la parasporina A34-2. Los datos están expresados como media \pm DS. Mediante una ANOVA de una vía y la prueba post hoc de Dunnett se evaluó la significancia estadística con $n=10$. Se consideraron estadísticamente significativos, siendo $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$ y $****P < 0.0001$.

En este ensayo se observó que el efecto de hemólisis ocasionado por la parasporina A34-2 sobre los eritrocitos de individuos sanos, fue del 27.93% a una concentración de 15.04 $\mu\text{g}/\text{mL}$ comparado con el control negativo con un 0.1474% de hemólisis (Figura 11). El porcentaje de hemólisis fue muy cercano al de citotoxicidad en CMSP (células muertas 25.44%). Sin embargo, el porcentaje de hemólisis de A34-2 es menor que el porcentaje de células muertas de A34-2 contra MCF-7. Por lo que se puede concluir que A34-2 capaz de matar preferentemente células cancerosas sobre células sanas.

8.4. Fragmentación del DNA como aproximación para determinación el mecanismo de muerte celular

La apoptosis es un tipo de muerte celular programada, fundamental para la homeostasis, crecimiento normal y recambio de las células (Pilco-Ferreto & Calaf, 2016). Los cambios estructurales ocurren en dos etapas distintas: en la primera etapa, la célula se comprime y fragmenta en múltiples fragmentos unidos por la membrana plasmática conservada. En la segunda etapa, estos fragmentos se separan, dentro de otras células sufren cambios similares a la autólisis, y son degradados por enzimas lisosomales (Kerr *et al.*, 1972). Esto antes de producir una fuga del contenido celular y evitar así una inducción de respuesta inflamatoria (Jacobson *et al.*, 1997).

La apoptosis es un proceso celular esencial que elimina células no necesarias o dañinas mediante un programa genéticamente codificado. La disfunción en este proceso puede resultar en problemas como anomalías en el desarrollo, cáncer y enfermedades autoinmunes (Kawamoto *et al.*, 2016). Por lo tanto, la apoptosis juega un papel crucial en el desarrollo del cáncer, pero también se puede emplear la apoptosis como una estrategia específica en el tratamiento del cáncer.

Para evaluar la apoptosis como mecanismo de muerte se usó el análisis de degradación de ADN en la línea celular MCF-7, después de la inducción citotóxica de la parasporina A34-2. Se preparó el gel de agarosa al 0.45% en 30 mL de amortiguador TAE 1X para visualizar bandas distintivas de apoptosis. Estas bandas muestran que el ADN se divide en fragmentos de oligonucleosomas. Por lo que la aparición de una escalera de ADN corresponde a la apoptosis, mientras que la banda difuminada de ADN indicará necrosis (Zhivotosky & Orrenius, 2001). Se utilizó doxorubicina (4 μ M) como control positivo ya que se ha reportado como un potente fármaco antitumoral, debido a que induce apoptosis al aumentar la expresión de BAX, caspasa 8 y caspasa 3 induciendo el procesamiento proteolítico de la familia de las proteínas Bcl-2 (proteínas antiapoptóticas) en células MCF-7 y MDA-MB-231 (Pilco-Ferreto & Calaf, 2016). Lo que lo hace uno de los fármacos más activos como tratamiento en el cáncer de mama.

El experimento de fragmentación de ADN se realizó por triplicado (Figuras 12-14). Se seleccionaron las bandas de interés de acuerdo a los geles del anexo A-1, A-2 y A-3 y se muestra en la Figura 12 el bandeo del ADN del control negativo se observa único y muy por arriba (banda

de mayor tamaño) del bandeo del control positivo. Esto indica que el ADN permanece integro en el control negativo y degradado en el positivo. Mientras que en los carriles con tratamiento de la proteína A34-2 en MCF-7 se observa que existe una banda de tamaño molecular grande, pero también existen bandas más pequeñas que se han fragmentado entre 650 pb, 350 pb y 200 pb aproximadamente. Debido a que los dos carriles del control positivo (doxorubicina 4 μ M) muestra un patrón similar a los tratamientos con parasporina, se repitió el experimento para corroborar los resultados en un segundo (gel 2) y tercer experimento (gel3).

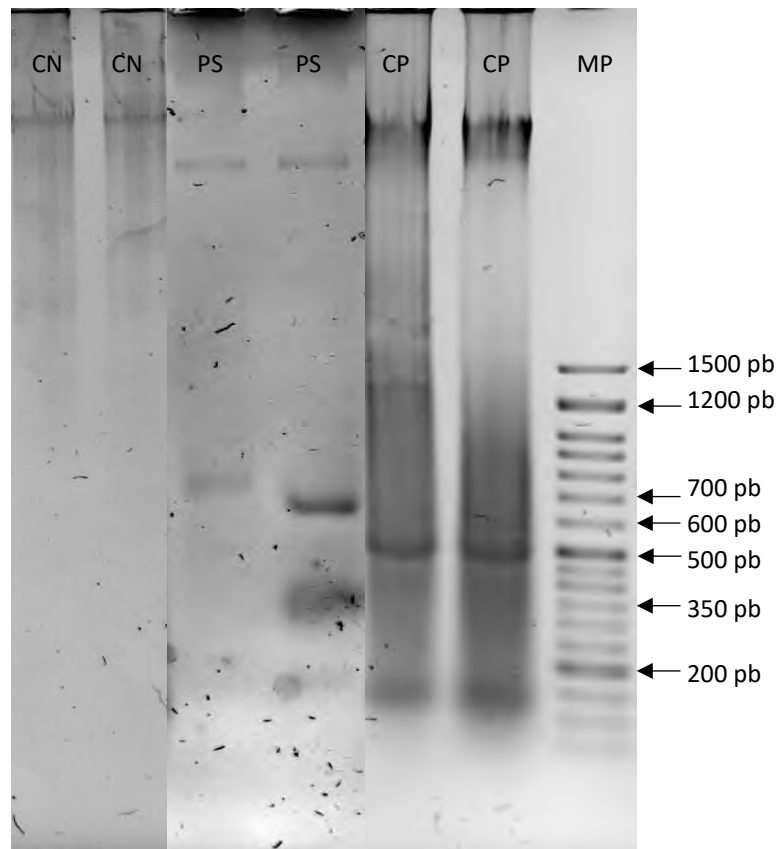


Figura 12. Análisis de fragmentación de ADN gel 1. CN) ADN de células MCF-7 sin tratamiento (control negativo), PS) ADN de células MCF-7 con tratamiento A34-2 (14.88 μ g/mL), CP) ADN de células MCF-7 en tratamiento con doxorubicina 4 μ M (controles positivos) y MP) corresponde al marcador de peso en pb. 100 V durante 66 minutos.

Se seleccionaron las bandas de interés de acuerdo a los geles del anexo A-4 y A-5, y se muestra en la Figura 13. En el segundo experimento el patrón de bandeo fue más claro para los carriles con los tratamientos de A34-2, haciéndose notar bandas entre 1200 y 1500 pb (se observa muy tenue al ser poca muestra), entre 650 pb, 350 pb y 200 pb aproximadamente. Se mantiene el mismo patrón para el control positivo y negativo. El patrón de bandeo en forma de escalera del ADN se observa algo similar a lo reportado por Phonnok *et al.* (2010). Los autores probaron cuatro de extractos crudos de metabolitos microbianos (*Candida tropicalis*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Bacillus sp.*) que extrajeron de diversas fuentes, y provocaron escisiones en la cadena de ADN en todas las líneas celulares tratadas (entre ellas MCF-7), al no tener efecto de inhibición en el crecimiento celular ni de apoptosis en células Vero y CMSP, determinaron estos extractos crudos con efecto específico para células cancerosas y los valores de IC₅₀ estuvieron entre 21–79 µg/mL.

Por otro lado, Borin *et al.* (2021) demostraron que la parasporina A13-2 es citotóxica contra la línea celular MCF-7 a una concentración de 6 µg/mL donde la viabilidad celular se reducía hasta un 87% en un periodo de 48 h de tratamiento. Lo anterior sugiere un daño específico en la membrana celular inducido por la parasporina, probablemente debido a la apoptosis tardía y a las células necróticas sin activación de mecanismos de supervivencia. Posiblemente la formación de poros podría estar relacionada (Akiba *et al.*, 2009) ya que mediante el ensayo Picogreen midieron el ADN en el medio celular (MCF-7) después del tratamiento, y se relacionaba con el incremento del ADN bicatenario (ADNbc) en el medio, lo cual depende de la concentración de proteína usada.

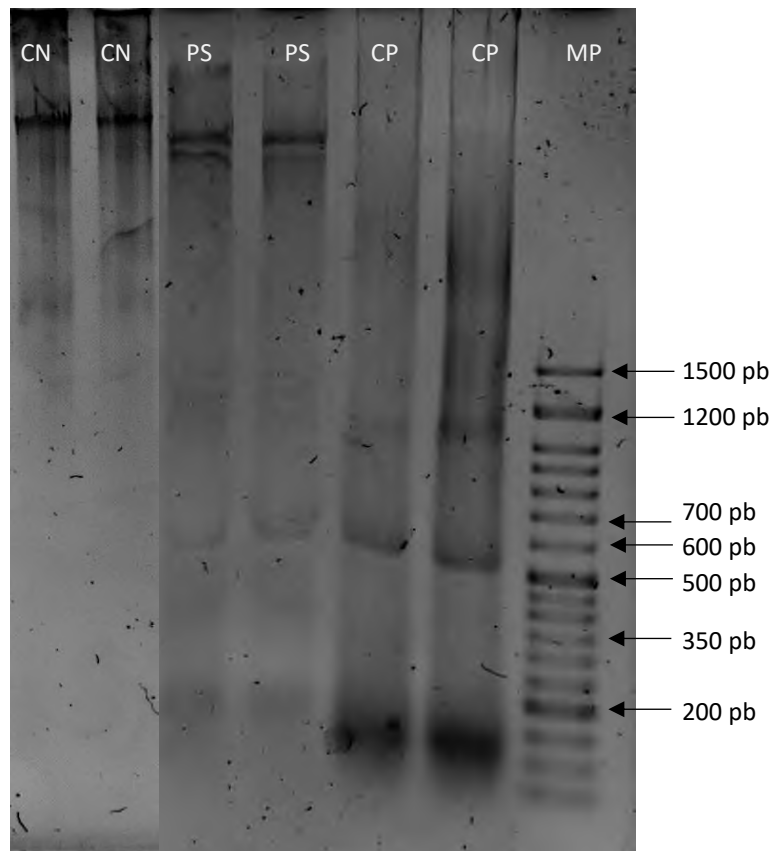


Figura 13. Gel de agarosa 0.45% análisis de fragmentación de ADN, gel 2. CN) ADN de células MCF-7 sin tratamiento (control negativo), PS) ADN de células MCF-7 con tratamiento A34-2 (14.88 $\mu\text{g}/\text{mL}$), CP) ADN de células MCF-7 en tratamiento con doxorubicina 4 μM (controles positivos) y MP) corresponde al marcador de peso en pb. 100 V durante 66 minutos.

En el tercer experimento se seleccionaron las bandas de interés de acuerdo a los geles del anexo A-6 y A-7, mostrándose en la Figura 14 y se observa el mismo patrón de escisión del ADN como en los dos experimentos anteriores (Figura 12 y 13). Debido al patrón de bandeo en forma de escalera se concluye el efecto citotóxico de la parasporina A34-2 contra las células MCF-7 se da por apoptosis en un tiempo de incubación de 24 h. Además, debido a que no se observa un barrido del ADN en el gel de agarosa con el tratamiento proteico, se concluye que no fue muerte celular por necrosis.

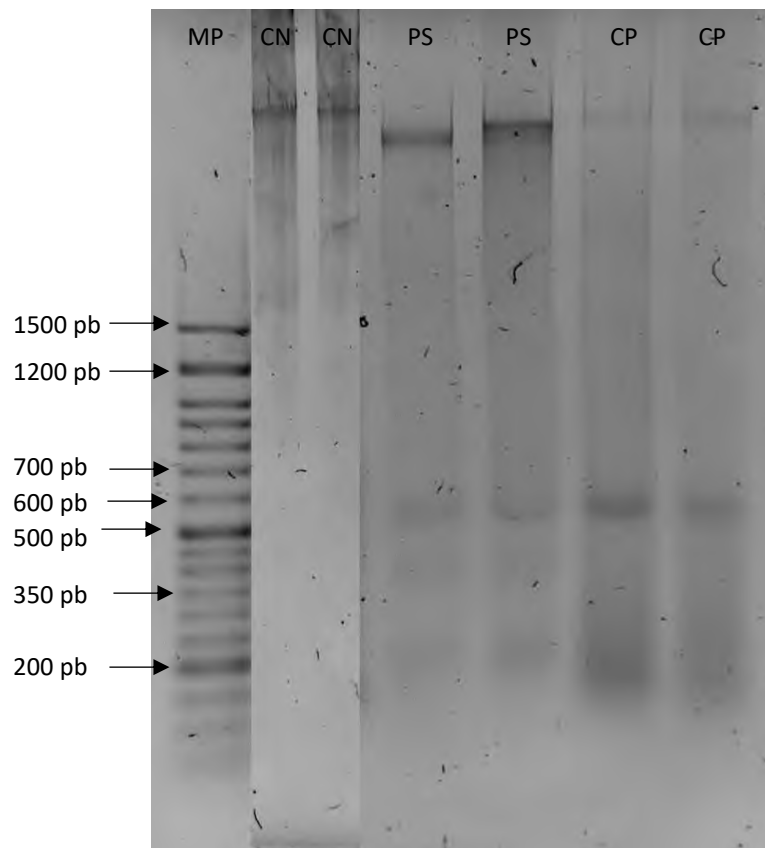


Figura 14. Gel de agarosa 0.45% análisis de fragmentación de ADN, gel 3. CN) ADN de células MCF-7 sin tratamiento (control negativo), PS) ADN de células MCF-7 con tratamiento A34-2 (14.88 $\mu\text{g}/\text{mL}$), CP) son ADN de células MCF-7 en tratamiento con doxorubicina 4 μM (controles positivos) y MP) corresponde al marcador de peso en pb. 100 V durante 66 minutos.

9. Conclusión

En este trabajo mediante la electroforesis se separaron parasporinas de diferente peso molecular de la cepa A34 producidas por el *Bacillus thuringiensis*, siendo la proteína A34-2 de ≈ 55 kDa que luego a la etapa de purificación/aplicación como tratamiento y mostró tener efecto antiproliferativo y efecto citotóxico al emplearse como tratamiento en células MCF-7, que al analizarse a través de la fragmentación de ADN en gel de agarosa sugiere muerte por apoptosis.

La proteína A34-2 de ≈ 55 kDa producida por la cepa de *B. thuringiensis* A34 es una parasporina que tiene efecto preferentemente sobre células cancerígenas, al permitir una viabilidad entre un 74-89% en células mononucleares de sangre periférica (CMSP) y un 72% de viabilidad en eritrocitos, empleándose la concentración de la IC_{50} de ≈ 15.04 $\mu\text{g/mL}$ sobre células tumorales.

El efecto morfológico de las células MCF-7 con el tratamiento A34-2 fue de características normales reportadas para MCF-7 a un cambio característico de apoptosis (células en suspensión, redondas y oscuras e inhibición del crecimiento celular). Se sugiere que el efecto citotóxico que genera la parasporina A34-2 en células MCF-7 es una muerte por apoptosis.

10. Bibliografía

1. Akiba, T., Abe, Y., Kitada, S., Kusaka, Y., Ito, A., Ichimatsu, T., Katayama, H., Akao, T., Higuchi, K., Mizuki, E., Ohba, M., Kanai, R., & Harata, K. (2009). Crystal Structure of the Parasporin-2 *Bacillus thuringiensis* Toxin That Recognizes Cancer Cells. *Journal of Molecular Biology*, 386(1), 121–133. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.12.002>
2. Aldeewan, A. B., Zhang, Y., & Su, L. (2014). *Bacillus thuringiensis* Parasporins Functions on Cancer Cells. *International Journal of Pure & Applied Bioscience*, 2(4), 67–74. https://www.researchgate.net/publication/311766270_Bacillus_thuringiensis_Parasporins_Functions_on_Cancer_Cells
3. American Cancer Society. (2019a). *Acerca del cáncer de seno*. <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-seno/acerca/que-es-el-cancer-de-seno.html>
4. American Cancer Society. (2019b). *Carcinoma lobulillar in situ (LCIS)*. <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-seno/afecciones-no-cancerosas-de-los-senos/carcinoma-lobulillar-in-situ.html>
5. Arruebo, M., Vilaboa, N., Sáez-Gutierrez, B., Lambea, J., Tres, A., Valladares, M., & González-Fernández, Á. (2011). Assessment of the Evolution of Cancer Treatment Therapies. *Cancers (Basel)*, 3(3), 3279–3330. <https://doi.org/10.3390/cancers3033279>
6. Banfalvi, G. (2017). Methods to detect apoptotic cell death. *Apoptosis*, 22(2), 306–323. <https://doi.org/10.1007/s10495-016-1333-3>
7. Borin, D. B., Castrejón-Arroyo, K., Cruz-Nolasco, A., Peña-Rico, M., Rorato, M. S., Santos, R. C. V., Silva de Baco, L., 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/S1>
8. Brasseur, K., Auger, P., Asselin, E., Parent, S., Côté, J.-C., & Sirois, M. (2015). Parasporin-2 from a New *Bacillus thuringiensis* 4R2 Strain Induces Caspases Activation and Apoptosis in Human Cancer Cells. *PLoS ONE*, 10(8), e0135106. <https://doi.org/https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135106>
9. Bravo-D, H. R., Cruz-Nolasco, A., Gutiérrez-Lucas, L. R., & Navarro-Mtz, A. K. (2015).

- Bioinformatics Analysis of NprR-NprX Quorum-Sensing System of *Bacillus thuringiensis* Isolates from the Papaloapan Region, Oaxaca-Mexico. *Advances in Biological Chemistry*, 5(7), 293–304. <https://doi.org/10.4236/abc.2015.57027>
10. Bravo, A., Soberón, M., & Gill, S. S. (2005). *Bacillus thuringiensis*: Mechanisms and Use. *Comprehensive Molecular Insect Science*, 6, 175–205. <https://doi.org/10.1016/B0-44-451924-6/00081-8>
 11. Brierley, J., Gospodarowicz, M., & O'Sullivan, B. (2016). The principles of cancer staging. *Ecancermedicalscience*, 10. <https://doi.org/10.3332/ecancer.2016.ed61>
 12. Carneiro, B. A., & El-Deiry, W. S. (2021). Targeting apoptosis in cancer therapy. *Nat Rev Clin Oncol.*, 17(7), 395–417. <https://doi.org/10.1038/s41571-020-0341-y>
 13. Castrejón-Arroyo, K. de J. (2020). *Evaluación de la seguridad farmacológica y efecto antiproliferativo de parasporinas libres, de Bacillus thuringiensis, sobre células de cáncer de mama, mediante metabolismo oxidativo*. [Tesis de maestría, Universidad del Papaloapan].
 14. Chen, S., Cheng, A. C., Wang, M.-S., & Peng, X. (2008). Detection of apoptosis induced by new type gosling viral enteritis virus in vitro through fluorescein annexin V-FITC/PI double labeling. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, 14(14), 2174–2178. <https://doi.org/10.3748/WJG.14.2174>
 15. Cooper, G. M. (2000). The Development and Causes of Cancer. In *The Cell: A Molecular Approach* (2nd ed.). Sinauer Associates. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9839/>
 16. Cossarizza, A., Chang, H.-D., Radbruch, A., Acs, A., Adam, D., Adam-Klages, S., Agace, W. W., Aghaepour, N., Akdis, M., Allez, M., Almeida, L. N., Alvisi, G., Anderson, G., Andrä, I., Annunziato, F., Anselmo, A., Bacher, P., Baldari, C. T., Bari, S., ... Zychlinsky, A. (2019). Guidelines for the use of flow cytometry and cell sorting in immunological studies (second edition). *European Journal of Immunology*, 49(10), 1457–1973. <https://doi.org/10.1002/eji.201970107>
 17. Crickmore, N., Zeigler, D. R., Feitelson, J., Schnepf, E., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., & Dean, D. H. (1998). Revision of the Nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* Pesticidal Crystal Proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 62(3), 807–813. <https://doi.org/10.1128/MMBR.62.3.807-813.1998>
 18. Cruz Nolasco, A. (2014). *Aislamiento e identificación de cepas de Bacillus thuringiensis*

- productoras de proteína Cry*. [Tesis de licenciatura, Universidad del Papaloapan].
19. Cruz Nolasco, A. (2017). *Síntesis de nanoliposomas que contienen parasporinas de Bacillus thuringiensis con actividad antiproliferativa*. [Tesis de maestría,] Universidad del Papaloapan.
 20. Danial, N. N., & Korsmeyer, S. J. (2004). Cell Death: Critical Control Points. *Cell*, *116*(2), 205–219. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(04\)00046-7](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(04)00046-7)
 21. Darzynkiewicz, Z., Galkowski, D., & Zhao, H. (2008). Analysis of apoptosis by cytometry using TUNEL assay. *Methods*, *44*(3), 250–254. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2007.11.008>
 22. Degterev, A., Boyce, M., & Yuan, J. (2003). A decade of caspases. *Oncogene*, *22*, 8543–8567. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207107>
 23. Dobrolecki, L. E., Airhart, S. D., Alferez, D. G., Aparicio, S., Behbod, F., Bentires-Alj, M., Brisken, C., Bult, C. J., Cai, S., Clarke, R. B., Dowst, H., Ellis, M. J., Gonzalez-Suarez, E., Iggo, R. D., Kabos, P., Li, S., Lindeman, G. J., Marangoni, E., McCoy, A., ... Lewis, M. T. (2016). Patient-derived Xenograft (PDX) Models In Basic and Translational Breast Cancer Research. *Cancer Metastasis Rev*, *35*(4), 547–573. <https://doi.org/10.1007/s10555-016-9653-x>
 24. Dong, Y., Liu, S., Shen, Y., He, H., & Ma, H. (2020). Probing variations of fibrous structures during the development of breast ductal carcinoma tissues via Mueller matrix imaging. *Biomedical Optics Express*, *11*(9), 4960–4975. <https://doi.org/10.1364/BOE.397441>
 25. Elmore, S. (2007). Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol*, *35*(4), 495–516. <https://doi.org/10.1080/01926230701320337>
 26. Engeland, M. van, Nieland, L. J., Ramaekers, F. C., Schutte, B., & Reutelingsperger, C. P. (1998). Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. *Cytometry*, *31*(1), 1–9. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0320\(19980101\)31:1<1::aid-cyto1>3.0.co;2-r](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0320(19980101)31:1<1::aid-cyto1>3.0.co;2-r)
 27. Evans, B. C., Nelson, C. E., Yu, S. S., Beavers, K. R., Kim, A. J., Li, H., Nelson, H. M., Giorgio, T. D., & Duvall, C. L. (2013). Ex vivo red blood cell hemolysis assay for the evaluation of pH-responsive endosomolytic agents for cytosolic delivery of biomacromolecular drugs. *Journal of Visualized Experiments*, *73*, e50166. <https://doi.org/10.3791/50166>
 28. Ferraro-Peyret, C., Quemeneur, L., Flacher, M., Revillard, J.-P., & Genestier, L. (2002).

- Caspase-independent phosphatidylserine exposure during apoptosis of primary T lymphocytes. *J Immunol*, 169(9), 4805–4810. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.169.9.4805>
29. Galluzzi, L., Maiuri, M. C., Vitale, I., Zischka, H., Castedo, M., Zitvogel, L., & Kroemer, G. (2007). Cell death modalities: classification and pathophysiological implications. *Cell Death & Differentiation* Volume, 14, 1237–1243. <https://www.nature.com/articles/4402148#citeas>
30. Gatenby, R. A., & Gillies, R. J. (2004). Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nature Reviews Cancer*, 4(11), 891–899. <https://doi.org/10.1038/nrc1478>
31. Ginsburg, O., Yip, C.-H., Brooks, A., Cabanes, A., Caleffi, M., Dunstan Yataco, J. A., Gyawali, B., McCormack, V., McLaughlin de Anderson, M., Mehrotra, R., Mohar, A., Murillo, R., Pace, L. E., Paskett, E. D., Romanoff, A., Rositch, A. F., Scheel, J. R., Schneidman, M., Unger-Saldaña, K., ... Anderson, B. O. (2020). Breast cancer early detection: a phased approach to implementation. *Cancer*, 2379–2393. <https://doi.org/10.1002/cncr.32887>
32. Guicciardi, M. E., & Gores, G. J. (2009). Life and death by death receptors. *FASEB J.*, 23(6), 1625–1637. <https://doi.org/10.1096/fj.08-111005>
33. Häcker, G. (2000). The morphology of apoptosis. *Cell and Tissue Research*, 301, 5–17. <https://doi.org/10.1007/s004410000193>
34. Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The Hallmarks of Cancer. *Cell*, 100(1), 57–70. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81683-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81683-9)
35. Hengartner, M. O. (2001). Apoptosis Corraling the Corpses. *Cell*, 104(3), 325–328. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00219-7](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00219-7)
36. Hernandez-Salas, Y., Hernandez-Teran, F., Balaguramy, N., & De La Fuente-Salcido, N. (2019). Alternativa biotecnológica contra el cáncer: Parasporinas de *Bacillus thuringiensis*. *Revista de Ingeniería Biomédica y Biotecnología*, 3(7), 8–17. <https://doi.org/10.35429/JBEB.2019.7.3.8.17>
37. Holler, N., Zaru, R., Micheau, O., Thome, M., Attinger, A., Valitutti, S., Bodmer, J.-L., Schneider, P., Seed, B., & Tschopp, J. (2000). Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule. *Nature Immunology*, 1(6), 489–495. <https://doi.org/10.1038/82732>
38. Howell, A., Anderson, A. S., Clarke, R. B., Duffy, S. W., Evans, D. G., Garcia-Closas, M.,

- Gescher, A. J., Key, T. J., Saxton, J. M., & Harvie¹, M. N. (2014). Risk determination and prevention of breast cancer. *Breast Cancer Research: BCR*, 16(5), 446. <https://doi.org/10.1186/s13058-014-0446-2>
39. INEGI. (2021a). *ESTADÍSTICAS A PROPÓSITO DEL DÍA MUNDIAL CONTRA EL CÁNCER (4 DE FEBRERO)*. https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2021/cancer2021_Nal.pdf
40. INEGI. (2021b). *ESTADÍSTICAS A PROPÓSITO DEL DÍA MUNDIAL DE LA LUCHA CONTRA EL CÁNCER DE MAMA (19 DE OCTUBRE)*. <https://news.un.org/es/story/2021/02/1487492>
41. Jacobson, M. D., Weil, M., & Raff, M. C. (1997). Programmed Cell Death in Animal Development. *Cell*, 88(3), 347–354. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81873-5](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81873-5)
42. Jorgensen, I., & Miao, E. A. (2015). Pyroptotic cell death defends against intracellular pathogens. *Immunological Reviews*, 265(1), 130–142. <https://doi.org/10.1111/imr.12287>
43. Kasibhatla, S., Amarante-Mendes, G. P., Finucane, D., Brunner, T., Bossy-Wetzler, E., & Green, D. R. (2006). Analysis of DNA fragmentation using agarose gel electrophoresis. *CSH Protocols*, 1, pdb.prot4429. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot4429>
44. Kataoka, T., Schröter, M., Hahne, M., Schneider, P., Irmeler, M., Thome, M., Froelich, C. J., & Tschopp, J. (1998). FLIP Prevents Apoptosis Induced by Death Receptors But Not by Perforin/Granzyme B, Chemotherapeutic Drugs, and Gamma Irradiation. *J Immunol*, 161(8), 3936–3942. <https://www.jimmunol.org/content/161/8/3936.short>
45. Katayama, H., Yokota, H., Akao, T., Nakamura, O., Ohba, M., Mekada, E., & Mizuki, E. (2005). Parasporin-1, a Novel Cytotoxic Protein to Human Cells from Non-Insecticidal Parasporal Inclusions of *Bacillus thuringiensis*. *The Journal of Biochemistry*, 137(1), 17–25. <https://doi.org/10.1093/jb/mvi003>
46. Kawamoto, Y., Nakajima, Y., & Kuranaga, E. (2016). Apoptosis in Cellular Society: Communication between Apoptotic Cells and Their Neighbors. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(12), 2144. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/ijms17122144>
47. Kerr, J. F. R., Wyllie, A. H., & Currie, A. R. (1972). Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wide-ranging Implications in Tissue Kinetics. *Br J Cancer*, 26(4), 239–257. <https://doi.org/10.1038/bjc.1972.33>

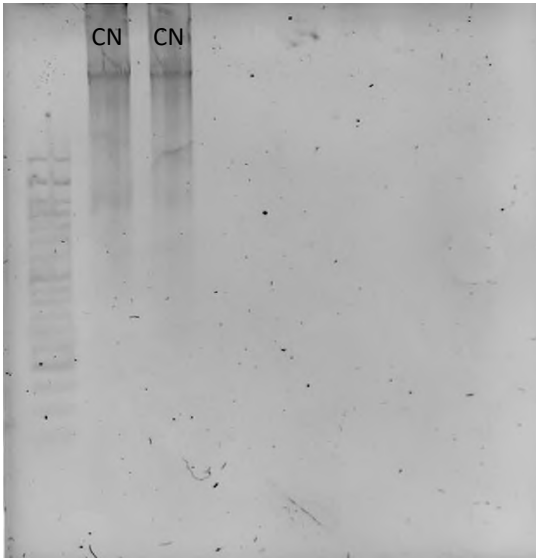
48. Kist, M., & Vucic, D. (2021). Cell death pathways: intricate connections and disease implications. *EMBO J.*, *40*(5). <https://doi.org/10.15252/emboj.2020106700>
49. Kitada, S., Abe, Y., Shimada, H., Kusaka, Y., Matsuo, Y., Katayama, H., Okumura, S., Akao, T., Mizuki, E., Kuge, O., Sasaguri, Y., Ohba, M., & Ito, A. (2006). Cytocidal Actions of Parasporin-2, an Anti-tumor Crystal Toxin from *Bacillus thuringiensis*. *The Journal of Biological Chemistry*, *281*(36), 26350–26360. <https://doi.org/10.1074/jbc.M602589200>
50. Kroemer, G., El-Deiry, W. S., Golstein, P., Pedro, M. E., Vaux, D., Vandenabeele, P., Zhivotovsky, B., Blagosklonny, M. V., Malorni, W., Caballero, R. U., Piacentini, M., Nagata, S., & Melino, G. (2005). Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell Death & Differentiation*, *12*, 1463–1467. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401724>
51. Kroemer, G., Galluzzi, L., & Brenner, C. (2007). Mitochondrial Membrane Permeabilization in Cell Death. *Physiol Rev*, *87*(1), 99–163. <https://doi.org/10.1152/physrev.00013.2006>
52. Kroemer, G., Galluzzi, L., Vandenabeele, P., Abrams, J., Alnemri, E. S., Baehrecke, E. H., Blagosklonny, M. V, El-Deiry, W. S., Golstein, P., Green, D. R., Hengartner, M., Knight, R. A., Kumar, S., Lipton, S. A., Malorni, W., Nuñez, G., Peter, M. E., Tschopp, J., Yuan, J., ... Melino, G. (2009). Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ*, *16*(1), 3–11. <https://doi.org/10.1038/cdd.2008.150>
53. Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, *227*, 680–685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
54. Lee, P. Y., Costumbrado, J., Hsu, C.-Y., & Kim, Y. H. (2012). Agarose Gel Electrophoresis for the Separation of DNA Fragments. *J Vis Exp.*, *62*, 3923. <https://doi.org/10.3791/3923>
55. McCarthy, N. J., & Evan, G. I. (1997). Methods for Detecting and Quantifying Apoptosis. In *Current Topics in Developmental Biology* (Vol. 36, pp. 259–278). [https://doi.org/10.1016/S0070-2153\(08\)60507-4](https://doi.org/10.1016/S0070-2153(08)60507-4)
56. McKinnon, K. M. (2018). Flow Cytometry: An Overview. *Current Protocols in Immunology*, *120*(1), 5.1.1-5.1.11. <https://doi.org/10.1002/cpim.40>
57. Melino, G. (2001). The Sirens' song. *Nature*, *412*, 23. <https://doi.org/10.1038/35083653>
58. Mendoza-Almanza, G., Esparza-Ibarra, E. L., Ayala-Luján, J. L., Mercado-Reyes, M., Godina-González, S., Hernández-Barrales, M., & Olmos-Soto, J. (2020). The Cytocidal Spectrum of

- Bacillus thuringiensis* Toxins: From Insects to Human Cancer Cells. *Toxins (Basel)*, 12(5), 301. <https://doi.org/10.3390/toxins12050301>
59. Millikan, R., Dressler, L., Geradts, J., & Graham, M. (1995). The need for epidemiologic studies of in-situ carcinoma of the breast. *Breast Cancer Research and Treatment*, 35(1), 65–77. <https://doi.org/10.1007/BF00694747>
60. Mirzayans, R., & Murray, D. (2020). Do TUNEL and Other Apoptosis Assays Detect Cell Death in Preclinical Studies? *International Journal of Molecular Sciences*, 21(23), 9090. <https://doi.org/10.3390/ijms21239090>
61. Mizuki, E., Ohba, M., Akao, T., Yamashita, S., Saitoh, H., & Park, Y. S. (1999). Unique activity associated with non-insecticidal *Bacillus thuringiensis* parasporal inclusions: in vitro cell-killing action on human cancer cells. *Journal of Applied Microbiology*, 86(3), 477–486. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1999.00692.x>
62. Mizuki, E., Park, Y. S., Saitoh, H., Yamashita, S., Akao, T., Higuchi, K., & Ohba, M. (2000). Parasporin, a human leukemic cell-recognizing parasporal protein of *Bacillus thuringiensis*. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 7(4), 625–634. <https://doi.org/10.1128/CDLI.7.4.625-634.2000>
63. Moo, T.-A., Sanford, R., Dang, C., & Morrow, M. (2018). Overview of Breast Cancer Therapy. *PET Clin*, 13(3), 339–354. <https://doi.org/10.1016/j.cpet.2018.02.006>
64. 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)
65. Muppidi, J., Porter, M., & Siegel, R. M. (2004). Measurement of apoptosis and other forms of cell death. *Current Protocols in Immunology*. <https://doi.org/10.1002/0471142735.im0317s59>
66. NCI. (2021). *What Is Cancer?* <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>
67. Ontario Health (Quality). (2020). Gene Expression Profiling Tests for Early-Stage Invasive Breast Cancer: A Health Technology Assessment. *A Health Technology Assessment*, 20(10), 1–234.
68. Organización Mundial de la Salud. (2022). *Cáncer*. Nota Descriptiva. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>

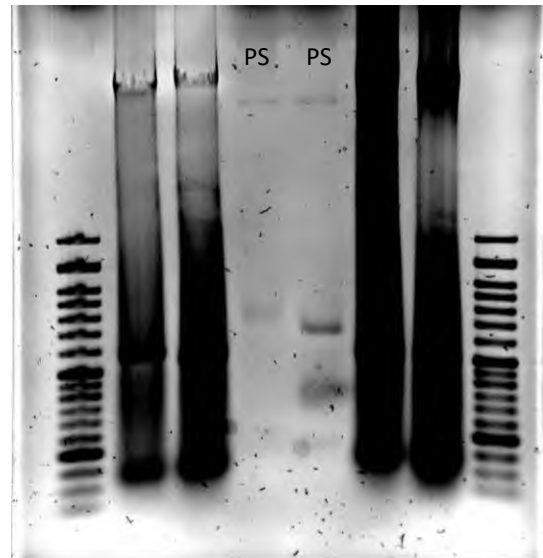
69. Pasparakis, M., & Vandenabeele, P. (2015). Necroptosis and its role in inflammation. *Nature*, *517*, 311–320. <https://doi.org/10.1038/nature14191>
70. Phonnok, S., Uthaisang-Tanechpongamb, W., & Wongsatayanon, B. T. (2010). Anticancer and apoptosis-inducing activities of microbial metabolites. *Electronic Journal of Biotechnology*, *13*(5). <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.2225/vol13-issue5-fulltext-7>
71. Picot, J., Guerin, C. L., Le Van Kim, C., & Boulanger, C. M. (2012). Flow cytometry: retrospective, fundamentals and recent instrumentation. *Cytotechnology*, *64*(2), 109–130. <https://doi.org/10.1007/s10616-011-9415-0>
72. Pilco-Ferreto, N., & Calaf, G. M. (2016). Influence of doxorubicin on apoptosis and oxidative stress in breast cancer cell lines. *International Journal of Oncology*, *49*(2), 753–762. <https://doi.org/10.3892/ijo.2016.3558>
73. Pistritto, G., Trisciuglio, D., Ceci, C., Garufi, A., & D’Orazi, G. (2016). Apoptosis as anticancer mechanism: function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies. *Aging (Albany NY)*, *8*(4), 603–619. <https://doi.org/10.18632/aging.100934>
74. Pongsavee, M. (2009). Effect of borax on immune cell proliferation and sister chromatid exchange in human chromosomes. *J Occup Med Toxicol*, *4*, 27. <https://doi.org/10.1186/1745-6673-4-27>
75. Ray, C. A., & Pickup, D. J. (1996). The mode of death of pig kidney cells infected with cowpox virus is governed by the expression of the crmA gene. *Virology*, *217*(1), 384–391. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0042682296901282>
76. Sabiá Júnior, E. F. (2015). Detecção e Caracterização de Proteínas Parasporinas em *Bacillus thuringiensis*. Universidad de Brasília, Brasília.
77. Salvesen, G. S., & Duckett, C. S. (2002). IAP proteins: blocking the road to death’s door. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *3*(6), 401–410. <https://doi.org/10.1038/nrm830>
78. Saraste, A., & Pulkki, K. (2000). Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovascular Research*, *45*(3), 528–537. [https://doi.org/10.1016/S0008-6363\(99\)00384-3](https://doi.org/10.1016/S0008-6363(99)00384-3)
79. Sarkar, S., Horn, G., Moulton, K., Oza, A., Byler, S., Kokolus, S., & Longacre, M. (2013). Cancer Development, Progression, and Therapy: An Epigenetic Overview. *Int J Mol Sci*, *14*(10), 21087–21113. <https://doi.org/10.3390/ijms141021087>

80. Sauka, D. H. (2017). *Bacillus thuringiensis*: ¿nuevas aplicaciones para un viejo conocido? *Revista Argentina de Microbiología*, 49(2), 123–124. <https://doi.org/10.1016/J.RAM.2017.05.001>
81. Sauka, D. H., & Benintende, G. B. (2008). *Bacillus thuringiensis*: generalidades. Un acercamiento a su empleo en el biocontrol de insectos lepidópteros que son plagas agrícolas. *Revista Argentina de Microbiología*, 40(2), 124–140. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=213016787013>
82. Scaffidi, C., Schmitz, I., Krammer, P. H., & Peter, M. E. (1999). The Role of c-FLIP in Modulation of CD95-induced Apoptosis. *J Biol Chem*, 274(3), 1541–1548. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.3.1541>
83. Suárez-Barrera, M. O., Visser, L., Rondón-Villarreal, P., Herrera-Pineda, D. F., Alarcón-Aldana, J. S., Van den Berg, A., Orozco, J., Pinzón-Reyes, E. H., Moreno, E., & Rueda-Forero, N. J. (2021). Genetic Modification Approaches for Parasporins *Bacillus thuringiensis* Proteins with Anticancer Activity. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 26(24), 7476. <https://doi.org/10.3390/molecules26247476>
84. Tang, D., Kang, R., Berghe, T. Vanden, Vandenabeele, P., & Kroemer, G. (2019). The molecular machinery of regulated cell death. *Cell Res*, 29(5), 347–364. <https://doi.org/10.1038/s41422-019-0164-5>
85. Telford, W. G. (2018). Multiparametric Analysis of Apoptosis by Flow Cytometry. *Methods in Molecular Biology*, 1678, 167–202. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7346-0_10
86. Xu, C., Wang, B.-C., Yu, Z., & Sun, M. (2014). Structural Insights into *Bacillus thuringiensis* Cry, Cyt and Parasporin Toxins. *Toxins (Basel)*, 6(9), 2737–2770. <https://doi.org/10.3390/toxins6092732>
87. Zhivotosky, B., & Orrenius, S. (2001). Assessment of Apoptosis and Necrosis by DNA Fragmentation and Morphological Criteria. *Current Protocols in Cell Biology*, 12, 18.3.1–18.3.23. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/0471143030.cb1803s12>
88. Zubair, M., Wang, S., & Ali, N. (2020). Advanced Approaches to Breast Cancer Classification and Diagnosis. *Frontiers in Pharmacology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.632079>
89. Zychlinsky, A., Prevost, M. C., & Sansonetti, P. J. (1992). *Shigella flexneri* induces apoptosis in infected macrophages. *Nature*, 358, 167–169. <https://doi.org/10.1038/358167a0>

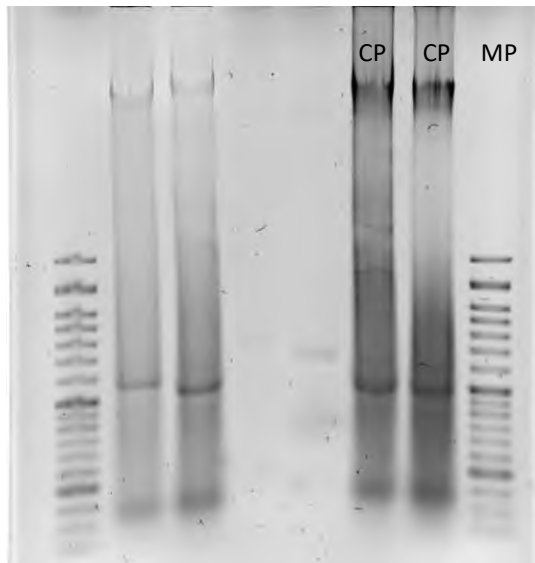
Anexos



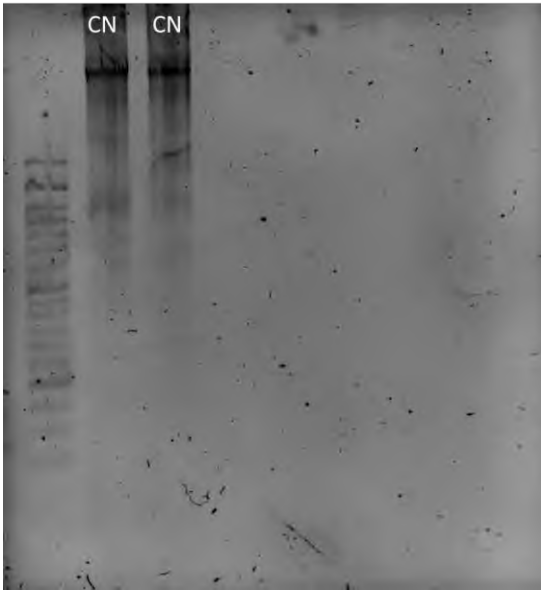
A-1. Bandas seleccionadas para CN.



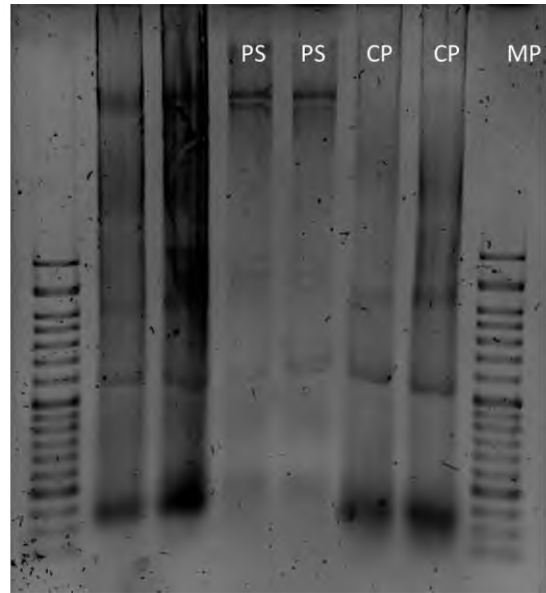
A-2. Bandas seleccionadas para PS.



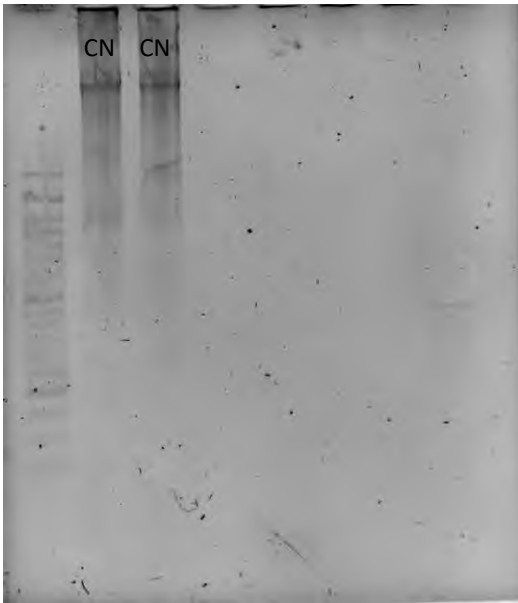
A-3. Bandas seleccionadas para CP Y MP.



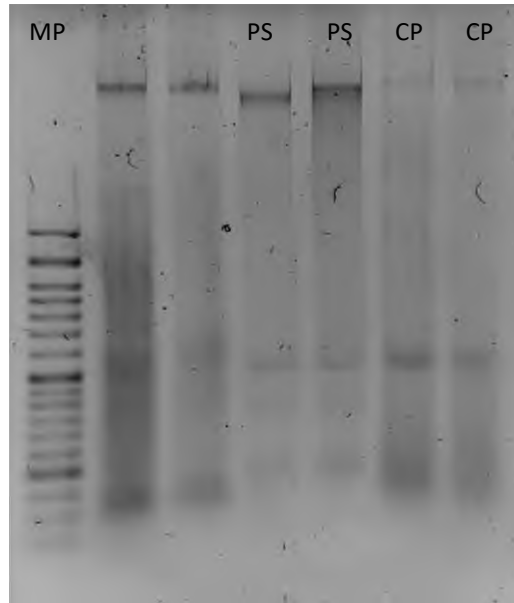
A-4. Bandas seleccionadas para CN.



A-5. Bandas seleccionadas para PS, CP Y MP.



A-6. Bandas seleccionadas para CN.



A-7. Bandas seleccionadas para PS, CP Y MP.