



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN
CAMPUS TUXTEPEC

INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

Efecto de la parasporina A24-2 aislada de *Bacillus thuringiensis* sobre la capacidad formadora de tumor en la línea celular MCF-7

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA**

PRESENTA:

C. Danilo Cruz García

Director: Dr. Miguel Ángel Peña Rico

Co-Director: Dr. Genaro Vázquez Victorio

San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, México, 2024.



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN CAMPUS TUXTEPEC

INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la ciudad de San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, el día 06 de marzo de 2024 a las 16:00 h, los miembros de la comisión revisora de tesis designada por la Jefatura de Carrera de la Ingeniería en Biotecnología se reunieron en la sala de juntas del Instituto de Biotecnología de la Universidad del Papaloapan, con la finalidad de examinar la tesis titulada "Efecto de la parasporina A24-2 aislada de *Bacillus thuringiensis* sobre la capacidad formadora de tumor en la línea celular MCF-7" presentada por el alumno Danilo Cruz García, con número de matrícula 17090463, 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 el aspirante pueda proceder con el proceso de titulación.

Tuxtepec, Oaxaca, a 06 de marzo de 2024.

ATENTAMENTE
LA COMISIÓN REVISORA

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

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

Dra. Angelica Sofia Martinez Ramirez
Profesor Investigador Asociado "C"
Universidad del Papaloapan
Revisor de Tesis

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

Dr. Oscar Abelardo Ramirez Marroquin
Profesor Investigador Titular "A"
Universidad del Papaloapan
Revisor de Tesis

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



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN
CAMPUS TUXTEPEC

INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

Tuxtepec, Oaxaca, a 19 de marzo de 2024
Oficio No. JCIB/007/03/202024

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

Con base en el dictamen de la comisión revisora, se autoriza la impresión del trabajo de tesis del alumno **Danilo Cruz García**, con número de matrícula 17090463, con título definitivo **"Efecto de la parasporina A24-2 aislada de *Bacillus thuringiensis* sobre la capacidad formadora de tumor en 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:

Dra. Ana Karin Navarro Martínez (Presidente, Universidad del Papaloapan)
Dra. Angelica Sofia Martínez Ramírez (Secretario, Universidad del Papaloapan)
Dra. Karla Viridiana Castro Cerritos (Vocal, Universidad del Papaloapan)
Dr. Oscar 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.

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



JEFATURA DE INGENIERIA
EN BIOTECNOLOGIA
CAMPUS TUXTEPEC

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

c.c.p. Dr. Miguel Ángel Peña Rico. Director de tesis. Para su conocimiento
c.c.p. Danilo Cruz García. Alumno. Para su conocimiento
c.c.p. Archivo



**VICE-RECTORIA
ACADEMICA**

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

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

www.unpa.edu.mx

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

HOJA DE ORIGINALIDAD

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

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad del Papaloapan Campus Tuxtepec.

A mi asesor de tesis, el Dr. Miguel Angel Peña Rico.

Al grupo de trabajo del Laboratorio de Cultivo de células animales y del Laboratorio de Biorreactores.

A la Dra. Ana Karin Navarro Martínez por su asesoramiento.

Al proyecto de CONAHCyT con número 321009.

DEDICATORIA

A mis padres María y Celerino, por ser mi inspiración constante y por su amor incondicional que me ha guiado en cada paso de este camino académico.

A mis hermanas, Osiris, Thelma, Karla, Julissa por su cariño, apoyo y por ser mi fuente de alegría y motivación.

A mis amigos, Alejandra, Natahaniel, Yoselin, Sofia, Kevin Ahmed, Fabiola, María del Carmen, Heriberto, Ingrid Coral, Beatriz del Carmen, Mitzi del Carmen, Ever, por su apoyo inquebrantable y por estar siempre ahí, celebrando mis triunfos y ayudándome a superar los desafíos.

A mis compañeros de generación, por compartir conmigo este trayecto lleno de aprendizajes y experiencias inolvidables.

A todos aquellos que han sido parte de este viaje, ¡gracias por ser mi motivación y mi razón para seguir adelante!.

I. ÍNDICE GENERAL.

Contenido	Página
I. ÍNDICE GENERAL.....	7
II. ÍNDICE DE TABLA.....	9
III. ÍNDICE DE FIGURAS.....	10
IV. ABREVIATURAS.....	11
V. RESUMEN.....	12
VI. ABSTRACT.....	13
1. INTRODUCCIÓN.....	14
2. MARCO TEÓRICO.....	16
2.1 <i>Bacillus thuringiensis</i>	16
2.2 Parasporinas.....	17
2.2 Familias de PS.....	18
2.3.1 Familia PS1.....	18
2.3.2 Familia PS2.....	18
2.3.3 Familia PS3.....	19
2.3.4 Familia PS4.....	20
2.3.5 Familia PS5.....	20
2.3.6 Familia PS6.....	20
2.4 Mecanismo de acción de la PS.....	21
2.5 Cáncer.....	22
2.5.1 Cáncer de mama en México y el resto del mundo.....	23
2.5.2 La metástasis.....	25
2.5.3 Eventos moleculares de la formación de tumor.....	26
2.6 Potencial terapéutico de las PS en la terapia del cáncer.....	28
2.7 Ensayo de formación de colonias.....	28
2.8 Antecedentes del grupo de trabajo.....	29
3. JUSTIFICACIÓN.....	30
4. HIPÓTESIS.....	31
5. OBJETIVOS.....	31
5.1 Objetivo general.....	31
5.2 Objetivos específicos.....	31
6. PLAN EXPERIMENTAL.....	32
7. METODOLOGÍA.....	33

7.1 Producción, selección y purificación del cristal proteico A24-2.	33
7.1.1 Elaboracion de discos de esporas de la cepa A24 de <i>Bacillus thuringiensis</i>	33
7.1.2 Producción de inclusiones proteicas con medio Gerry-Rowe en medio líquido.....	33
7.2 Ensayo de hemólisis.....	35
7.3 Cultivo celular.	36
7.4 Ensayo MTT (Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol).....	36
7.4.1 Protocolo de extracción de células mononucleares de sangre periférica.....	37
7.5 Ensayo MTT de citotoxicidad de la proteína A24-2.....	38
7.6 Estandarización del ensayo de formación de colonias en agar noble.....	38
7.7 Estandarización del ensayo de formación de colonias en agarosa al 5%.....	41
8. RESULTADOS.....	42
8.1 Perfil electroforético de la inclusión proteica aislada de la cepa A24 de <i>Bacillus thuringiensis</i> . ..	42
8.2 Ensayo de hemólisis	43
8.3 Ensayo de citotoxicidad de A24-2 en PBMC.....	44
8.4 Ensayo de citotoxicidad en la línea celular MCF-7.....	45
8.5 Estandarización y seguimiento del crecimiento de la formación de colonias en agar noble.	46
8.6 Estandarización de la formación de colonias en agarosa.	51
8.7 Ensayo de formación de colonias en agarosa al 5% en MCF-7 con la parasporina A24-2.	51
8.7.1 Análisis estadístico del ensayo de formación de colonias en agarosa al 5% de células MCF-7 tratadas con PS A24-2.	53
9. DISCUSIÓN.	54
10. CONCLUSIONES	59
11. PERSPECTIVAS.....	60
12. REFERENCIAS.....	61
13. ANEXOS.	74

II. ÍNDICE DE TABLA.

Tabla 1. Preparación de LAEMMLI al 2X.	75
Tabla 2. Buffer para corrimiento electroforetico para 1L.	76
Tabla 3. Preparación de reactivos para teñir y desteñir geles.	76
Tabla 4. Preparación del gel al 10% separador.	77
Tabla 5. Preparación del gel concentrador.	77
Tabla 6. Buffer para elución de proteínas aforado a un litro.	77
Tabla 7. Curva de calibración y cuantificación por el método de Lowry..	79

III. ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura 1. Micrografía de <i>Bacillus thuringiensis</i>	16
Figura 2. Estructura de la forma activada de la parasporina-2.....	17
Figura 3. Mecanismo de acción de la parasporina-2.....	21
Figura 4. Micrometástasis	22
Figura 5. Incidencia estandarizada por edad estimada en el Mundo en el 2020.	23
Figura 6. Número de casos estimados de cáncer en el mundo en el 2020.	24
Figura 7. Número de casos de cáncer de mama estimados en el 2020.	25
Figura 8. Cascada metastásica como un proceso de múltiples pasos.	26
Figura 9. MTT (sal de tetrazolio), formazan del MTT.....	36
Figura 10. Perfil de corrimiento del cristal proteico de la cepa A24 de <i>Bacillus thuringiensis</i>	42
Figura 11. Actividad hemolítica de la inclusión proteica A24-2	43
Figura 12. Actividad citotóxica sobre las CMSP.	45
Figura 13. Ensayo de citotoxicidad de la parasporina A24-2 en MCF-7.	46
Figura 14. Seguimiento del crecimiento y formación de colonias en agar noble en MCF-7.	47
Figura 15. Seguimiento del crecimiento y formación de colonias en agar noble en MCF-7	49
Figura 16. Colonia formada al día 21 en agar noble.....	50
Figura 17. Seguimiento de la formación de colonias en agarosa al 5% en la linea celular MCF-7..	51
Figura 18. Seguimiento, desarrollo y formación de colonias en agarosa al 5% en MCF-7..	52
Figura 19. Crecimiento y formación de colonias de células en agarosa con MCF-7.....	53

IV. ABREVIATURAS

- ***B. thuringiensis*** (*Bacillus thuringiensis*)
- **CO₂** (Dióxido de Carbono)
- **CSC** (célula troncal cancerosa)
- **DMEM** (Dulbecco's Modified Eagle Medium)
- **MCF-7** (Línea celular de cáncer de mama, Michigan Cancer Foundation-7)
- **MTT** (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol)
- **OMS** (Organización Mundial de la Salud)
- **PBMC** (Célula mononuclear de sangre periférica)
- **PDB** (Protein data bank)
- **PS** (Parasporina)
- **RPM** (Revoluciones por minuto)
- **SDS-PAGE** (del acrónimo en inglés electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico)
- **SFB** (Suero Fetal Bovino)

V. RESUMEN.

Las parasporinas (PS) son proteínas que se han encontrado dentro del cristal proteico producido por *Bacillus thuringiensis*. Algunas PS, han demostrado tener actividad citotóxica sobre líneas de cáncer, como MCF-7, MDA MB 231, SiHa etc. Algunas de estas células, tienen la capacidad de formar colonias en condiciones *in vitro*, que se asemejan a los tumores *in vivo*. La línea celular MCF-7 tienen la capacidad de formar colonias, con base a esta característica se usó este tipo de células para el ensayo de formación de colonias en agar noble, para probar si compuestos específicos, como las parasporinas u otro farmacos, tienen actividad citotóxica sobre células neoplásicas. El recuento y el tamaño de las colonias, son lecturas cuantitativas del ensayo, que pueden compararse entre los grupos de control y de tratamiento, para evaluar las diferencias en la capacidad de formación de tumor. En este trabajo se observó que la formación de colonias está inversamente relacionada con la muerte de las células tumorales, la proteína A24-2, es capaz de evitar la proliferación y creación de un tumor. En este trabajo se ocupó la cepa A24 de *Bacillus thuringiensis*, aislada la proteína que corresponde a la parasporina A24-2 cuyo peso molecular se encuentra entre los 25 a 30 kDa, se realizó la estandarización del ensayo de formación de colonias en agar noble y agarosa, utilizando la línea celular MCF-7. Posterior a la estandarización se aplicaron tratamientos con la PS A24-2 en un lapso de 21 días para evaluar el efecto sobre la capacidad de formación de tumor, encontrando una disminución del número de colonias con respecto al control negativo en medio DMEM.

VI. ABSTRACT.

Parasporins (PS) are proteins that have been found within the protein crystal produced by *Bacillus thuringiensis*. Some PS have been shown to have cytotoxic activity on cancer lines, such as MCF-7, MDA MB 231, SiHa, etc. Some of these cells have the ability to form colonies under in vitro conditions, which resemble tumors in vivo. The MCF-7 cell line has the ability to form colonies, based on this characteristic, this cell type was used for the soft agar colony formation assay to test whether specific compounds, such as parasporins or other drugs, which have been shown to have cytotoxic activity on neoplastic cells. Colony count and colony size are quantitative readings from the assay that can be compared between the control and treatment groups to assess differences in tumor-forming ability. In this work it was observed that colony formation is inversely related to tumor cell death, the A24-2 protein is able to prevent proliferation and tumor creation. In this work, strain A24 of *Bacillus thuringiensis* was used, protein two was isolated, which corresponds to parasporin A24-2 whose molecular weight is between 25 and 30 kDa, and the standardization of the colony formation assay was performed in soft agar and agarose, using the MCF-7 cell line. Following standardization, treatments with PS A24-2 were applied for 21 days to evaluate the effect on the capacity of tumor formation, finding a tendency of decrease in the number of colonies with respect to the negative control.

1. INTRODUCCIÓN.

Las parasporinas (PS) son proteínas genealógicamente heterogéneas y sintetizadas por *Bacillus thuringiensis*. Este microorganismo produce un cristal proteico, o también conocidas como inclusiones proteicas (Ohba *et al.*, 2009). El cristal está constituido por una gran diversidad de proteínas, dentro de las cuales se destacan 2, las endotoxinas conocidas como Cry y las PS (Akiba *et al.*, 2009; Schinepf *et al.*, 1998), ambas de importancia biotecnológica, la primera por su actividad como bioinsecticida y la segunda por su actividad anticancerígena (Bravo *et al.*, 2005; Kotze *et al.*, 2005). Las PS tienen dos características primordiales: **a)** no muestran actividad insecticida ni hemolítica, y **b)** tiene una actividad citotóxica selectiva sobre las células de origen canceroso, sin afectar a las células no cancerosas (Ammons *et al.*, 2016; Ohba *et al.*, 2009). Los estudios muestran que las PS pueden poseer actividad citotóxica o anti proliferativa, sobre diferentes tipos de cáncer (Brasseur *et al.*, 2015). Por lo tanto, las PS han surgido como una nueva alternativa y potencial herramienta terapéutica contra el cáncer. Sin embargo, es necesario conocer a detalle los mecanismos acción de estas proteínas. En la actualidad, no hay estudios sobre el efecto que pueden tener las PS sobre los mecanismos asociados con los procesos de invasión, migración, adhesión celular y proliferación, que en su conjunto están directamente relacionados con el grado de agresividad de un cáncer.

El cáncer puede definirse, según la Organización Mundial de la Salud (OMS), como una alteración celular, que la lleva a que las células proliferen de forma descontrolada, adquirir la capacidad de formar tumores malignos, y diseminarse a otros tejidos provocando metástasis (OMS, 2015).

La metástasis es fase final del cáncer y la principal causa de muerte por cáncer. La metástasis es un proceso en el que están implicados múltiples e intrincados pasos, necesarios para la invasión de las células tumorales, destacando: **1)** la célula cancerosa se desprende del tumor primario; **2)** entra a los vasos sanguíneos (intravasación); **3)** sobrevive en la circulación (supervivencia y crecimiento independientes del anclaje); **4)** sale del sistema circulatorio en los sitios metastásicos (extravasación); y por último coloniza y prolifera en el nuevo entorno para formar un nuevo tumor metastásico (Riggio *et al.*, 2021; Gao *et al.*, 2017). La migración de las células tumorales es un mecanismo importante en la metástasis. Por ello, diferentes estudios se han centrado en disectar la fase de la migración y las funciones celulares que envuelven a este proceso (Karakus *et al.*, 2018). La formación de colonias parece ser el paso clave en el proceso de metástasis. En el caso

del cáncer de mama, la recaída metastásica puede producirse meses o décadas después del diagnóstico y del tratamiento inicial (Riggio *et al.*, 2021).

Desafortunadamente, la mayoría de las ocasiones cuando el paciente recae con cáncer, la recurrencia vendrá acompañada con un proceso metastático, el cual se manifiesta después del tratamiento definitivo (Seltzer *et al.*, 2020). La metástasis en la recurrencia es un problema importante en las pacientes con cáncer de mama, siendo la segunda causa de muerte relacionada con el cáncer entre las mujeres de todo el mundo (OMS, 2020).

Actualmente, es difícil predecir qué probabilidades tiene una persona de recurrencias, sin embargo, cuando sucede, el proceso neoplásico es más difícil de tratar, ya que las células proliferan más rápido, son resistentes a los tratamientos y se propaga amplia y rápidamente (Riggio *et al.*, 2021). Es por ello que es indispensable evaluar si los nuevos tratamientos tienen la capacidad de eliminar en su totalidad las células cancerosas, o bien, que las células de origen canceroso pierdan la capacidad de proliferar y generar un nuevo tumor.

2. MARCO TEÓRICO.

2.1 *Bacillus thuringiensis*.

Bacillus thuringiensis es una bacteria formadora de esporas, aerobia, Gram +, perteneciente al mismo grupo que *Bacillus cereus*. Este organismo produce inclusiones proteicas en su fase de muerte, que se liberan al medio durante su esporulación (**Figura 1**). Estas inclusiones proteicas, contienen entre otras proteínas, endotoxinas conocidas como proteínas Cry por su naturaleza cristalina. Estas proteínas Cry son tóxicas para una gran variedad de plagas de insectos. *Bacillus thuringiensis* es una bacteria cosmopolita, es decir; se ha aislado de diferentes ambientes naturales, como el suelo, filoplanos de diversos granos y productos almacenados (Martin y Travers, 1989).

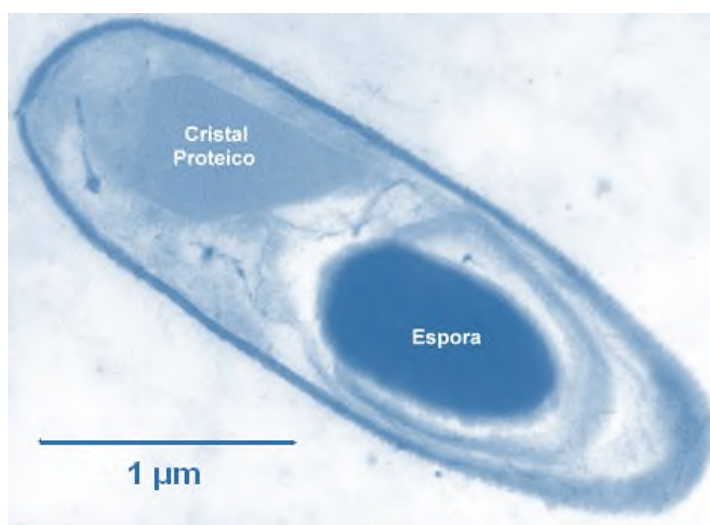


Figura 1. Micrografía de transmisión electrónica barrido de *Bacillus thuringiensis*. Se muestra la espora y el cristal proteico (Sanchis, 2010).

Bacillus thuringiensis presenta dos fases principales durante su ciclo de vida: un crecimiento exponencial en el cual la bacteria se multiplica por fisión binaria, y una fase de esporulación que consiste en la formación de esporas de resistencia (Sanchis, 2010).

Durante la fase de esporulación, *Bacillus thuringiensis* libera un cristal proteico que contiene, proteínas de diferentes tipos y actividades, entre ellas Cry y Cyt (citolíticos) (Schinepf *et al.*, 1998). Las proteínas Cry y Cyt, recibieron su nomenclatura actual después de la creación del comité de Nomenclatura de Toxinas de *Bacillus thuringiensis*. Además, se han reportado que algunas

proteínas Cry y Cyt no presentan toxicidad contra insectos y son altamente tóxicas para diferentes tipos de células cancerosas (Ito *et al.*, 2004). A estas proteínas se les conoce como Parasporinas (PS) y han sido estudiadas debido a su selectividad citotóxica por células tumorales (Katayama *et al.*, 2007).

2.2 Parasporinas

Las PS están dentro de un conjunto de proteínas Cry, que son genealógicamente heterogéneas y son producidas única y exclusivamente por *Bacillus thuringiensis*. Una de las características que están relacionadas a las PS, es la fuerte actividad citocida sobre las células cancerosas humanas de diferentes orígenes (Ohba *et al.*, 2009). La estructura química general de las PS (**Figura 2**), está conformada por **a)** representación en cinta del monómero de PS-2 con estructuras secundarias que están etiquetadas como H1-H4 para las α -hélices y S1-S14 para las hebras β . Las flechas verticales etiquetadas a la izquierda indican las regiones de los dominios 1-3. La cadena polipeptídica se muestra en una rampa de arcoíris desde el azul en el N-terminal hasta el rojo en el C-terminal. **b)** Diagrama topológico del monómero. Las α -hélices y las β -hélices se representan como rectángulos azul oscuro y flechas magenta, respectivamente, con números de serie (**Figura 2**) (Akiba *et al.*, 2009).

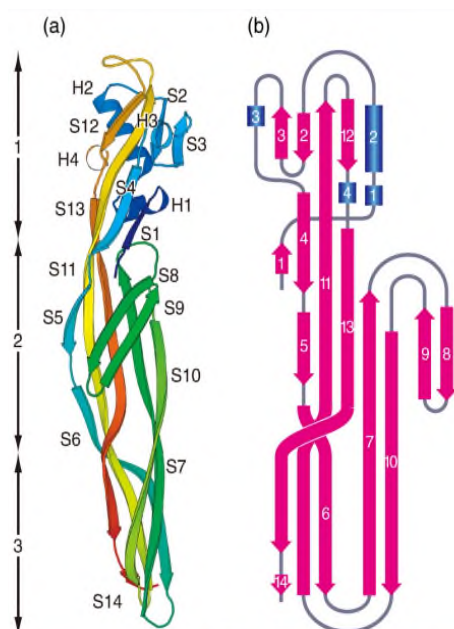


Figura 2. Estructura de la forma activada de la PS-2. (Akiba *et al.*, 2009). Recuperado del protein data bank (PDB) 2D42.

Las PS tienen menos del 25% de homología en la secuencia de aminoácidos con las toxinas Cry (**Figura 2**) (Ohba *et al.*, 2019). Las PS no inducen actividad hemolítica pero pueden o no tener actividad insecticida, no obstante, muestran una citotoxicidad preferente por las células cancerosas en ensayos *in vitro* (Akiba y Okamura, 2016).

2.2 Familias de PS.

Las PS son clasificadas en 6 familias, a continuación se describen brevemente cada una de ellas. Incluyendo mecanismos de acción propuestos, se cree que al igual que las proteínas Cry, las PS reconocen receptores de membrana específicos en las células cancerosas para desencadenar la muerte celular (**Figura 3**) (Kotze *et al.*, 2005).

2.3.1 Familia PS1.

La familia PS1 tiene efectos citotóxicos contra ciertas líneas celulares de cáncer como HeLa (cáncer de cuello uterino) (Mitzuki *et al.*, 2000) HL60 (leucemia) (Okamura *et al.*, 2005), Jurkat (leucemia) y HepG2 (cáncer de hígado) (Jung *et al.*, 2007). Los hallazgos sugieren que entre las toxinas PS1, 10 de 22 reconocen un receptor común en estas líneas celulares, identificado como beclin-1 (Katayama *et al.*, 1999). En las células sanas, la proteína de beclin-1 es intracelular y está implicada en los procesos de autofagia y apoptosis, sin embargo, en las células susceptibles, la beclina-1 es extracelular y actúa como receptor de PS1 (Kitada *et al.*, 2006). La familia PS1 incluye a las siguientes parasporinas, PS1Aa1 (Cry31Aa1), PS1Aa2 (Cry31Aa2), PS1Aa3 (Cry31Aa3), PS1Aa4 (Cry31Aa4), PS1Aa5 (Cry31Aa5), PS1Aa6 (Cry31Aa6), PS1Ab1 (Cry31Ab1), PS1Ab2 (Cry1Ab2), PS1Ac1 (Cry31Ac1), PS1Ac2 (Cry31Ac2) (Okamura *et al.*, 2010).

2.3.2 Familia PS2.

Las proteínas PS2Aa1 (Cry46Aa1), PS2Aa2 (Cry46Aa2) y PS2Ab2 (Cry46Ab1) constituyen la familia PS2 (Okamura *et al.*, 2010). Se ha informado de que la cepa Bt A1547 produce PS2Aa1 y PS2Aa2 (Mitsuki *et al.*, 1999). Las PS de esta familia son pequeñas toxinas de alrededor de 30 kDa que son citotóxicas para líneas celulares de cáncer como HepG2 (cáncer de hígado), Sawano (cáncer de endometrio), HL60, Caco-2 (cáncer de colon), Jurkat (leucemia) y MOLT-4 (Kitada *et al.*, 2006 y

Akiba *et al.*, 2009). Una característica de las toxinas de la familia PS2 es que su estructura tridimensional es similar a la de PFT-aerolisina, que está formada principalmente por láminas alargadas (Kitada *et al.*, 2006; Akiba *et al.*, 2009). En 2009, Akiba *et al.*, (2009) propusieron que las toxinas PS2 son capaces de producir oligómeros que inducen poros de membrana y muerte celular al unirse a las balsas lipídicas (**Figura 3**). En 2017, Abe *et al.* (2017) informaron de que la GPI era un correceptor esencial para la actividad tóxica de las parasporinas PS2. El mecanismo de acción de los miembros de la familia PS2 activa la apoptosis en su mayoría de casos, que se asocia a un aumento de la expresión del gen supresor de tumores PAR-4 y a través de la inhibición de la vía PI3K/AKT (Brasseur *et al.*, 2015).

Sin embargo se ha visto que la PS2 es citotóxica en líneas celulares de hepatocarcinoma (HepG2) y de leucemia humana de células T (MOLT-4), sin embargo, las evidencias indican que es poco probable que genere apoptosis en esta línea celular (Ito *et al.*, 2004). Se ha visto que estas toxinas se anclan a la membrana de las células cancerosas, al igual que las cadherinas, las cuales son responsables de la adhesión célula-célula (Kitada *et al.*, 2006).

2.3.3 Familia PS3.

PS3Aa1 (Cry41Aa1) es el único miembro de esta familia (Okamura *et al.*, 2010). Esta parasporina es la única con un dominio de ricina que juega un papel en la estabilización de la interacción entre las toxinas y los residuos de carbohidratos de la membrana (Hazes B, 1996). En 2018, un grupo de investigación dirigido por Crickmore, estudió la proteína PS3 y observó que está estructuralmente relacionada con las toxinas insecticidas, excepto por el dominio de la ricina. Utilizando mutagénesis sitio dirigido, concluyeron que el dominio de la ricina, no está asociado con la actividad citotóxica selectiva de PS3 contra la línea celular de cáncer HepG2 (Krishnan *et al.*, 2017). En contraste, al igual que el mecanismo de acción utilizado por PS2, propusieron que PS3 induce la muerte celular por necrosis, a través de la formación de un poro en las membranas de las células cancerosas, lo que se evidenció por un aumento en la liberación de lactato deshidrogenasa (LDH), principalmente en las líneas celulares de cáncer HL60 y HepG2 (Krishnan *et al.*, 2017).

2.3.4 Familia PS4.

La familia PS4 incluye al PS4Aa1 (Cry45Aa1) como único miembro (Okamura *et al.*, 2010). La PS4 es similar en tamaño y estructura a los miembros de la familia PS2, su forma activa es de alrededor de 27 kDa, y presenta una citotoxicidad selectiva contra las líneas celulares de cáncer MOLT-4, CaCo-2, HL60, U937, HepG2, Sawano, DE-4 (leucemia), TS (cáncer de útero) y TCS (cáncer de cuello de útero) (Inouye *et al.*, 2008; Okamura *et al.*, 2008). La toxina PS4, es que puede activarse tanto en pH alcalino como ácido (González *et al.*, 2011), mientras que la mayoría de las parasporinas se solubilizan en pH alcalino. De hecho, el pH ácido aumenta su efecto citotóxico en varias líneas celulares de cáncer (Okamura *et al.*, 2008).

En cuanto al mecanismo de acción de las PS4, las evidencias sugieren que la muerte celular se produce por necrosis, estas evidencias incluyen la unión no específica a la membrana, la liberación de LDH y la entrada en la célula de dextranos con diferentes pesos moleculares, sugieren que la muerte celular se produce por necrosis (Inouye *et al.*, 2008; Okamura *et al.*, 2008; Okamura *et al.*, 2011).

2.3.5 Familia PS5.

PS5Aa1 (Cry64Aa1) es el único miembro de la familia PS5; esta proteína se ha aislado de la cepa *Bacillus thuringiensis tohokuensis* A1100 (Okamura *et al.*, 2010). La forma activa de la PS5Aa1 tiene un tamaño aproximado de 30 kDa (Ekino *et al.*, 2014). La PS5 muestra una mayor similitud con la aerolisina PFT que con las otras parasporinas (Ekino *et al.*, 2014; Moniatte *et al.*, 1996). Se ha informado de que la PS5, es tóxica para las líneas celulares de cáncer MOLT-4, Jurkat, HL-60, HepG2, HeLa, Sawano, TCS, CaCo-2 y K562 (Ekino *et al.*, 2014). Sin embargo, todavía no hay pruebas sobre su mecanismo de acción (Almanza *et al.*, 2020).

2.3.6 Familia PS6.

La PS6, está estrechamente relacionada con la PS1, compartiendo una secuencia conservada de cincuenta aminoácidos. La PS6 es tóxica específicamente para HepG2 y HeLa (Nagamatsu *et al.*, 2010), pero su mecanismo de acción es aún desconocido. La familia PS6 incluye sólo el PS6Aa1 (Cry63Aa1), que ha sido aislado del *Bacillus thuringiensis* M019 (Okamura *et al.*, 2010 y Nagamatsu *et al.*, 2010).

2.4 Mecanismo de acción de la PS.

La actividad citopática por las PS, ha sido estudiada desde su descubrimiento en diferentes células cancerosas como se ha descrito previamente, por ejemplo; HeLa (cáncer cervical uterino), HepG2 (carcinoma hepatocelular) y Molt-4 (leucemia linfoblástica aguda) (Kitada *et al.*, 2009). Observándose que las células HeLa, fueron vulnerables a la aplicación de PS1, HepG2 mostró daño citopático cuando se expuso a PS2 y la toxicidad Molt4 fue causada por PS4. Jurkat (células T leucémicas), Sawano (carcinoma de endometrio) y Caco-2 (carcinoma colorrectal), también fueron susceptibles al tratamiento con diferentes toxinas de *Bacillus thuringiensis*, lo que demuestra, la eficacia de la PS contra diferentes tipos de células cancerosas (Akiba y Okumura, 2017).

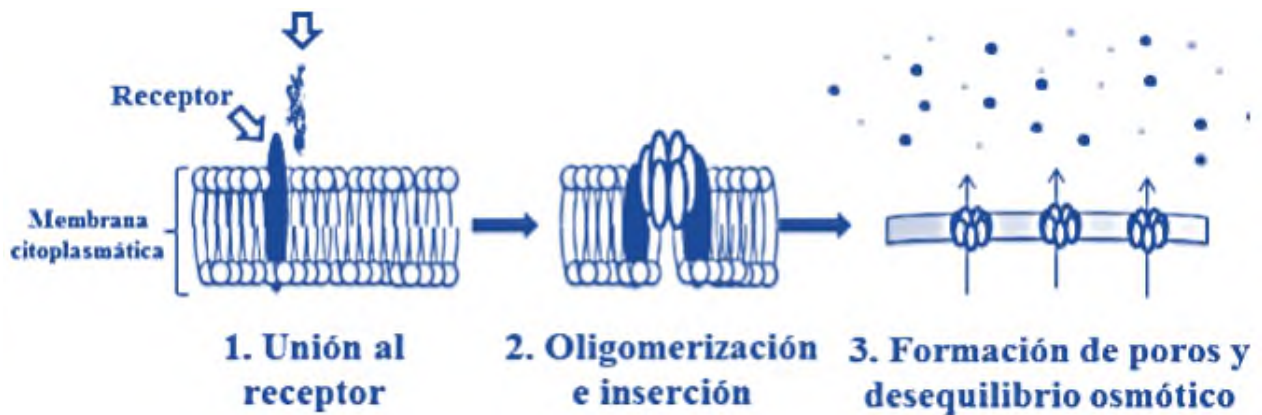


Figura 3. Mecanismo de acción de la PS2. (Modificada de Espino, 2014).

El mecanismo de acción de las PS contra las células cancerosa es poco conocido, sin embargo, la información disponible ha demostrado que las parasporinas presentan mecanismos de selección específicos para las células cancerosas. Sabe que estas proteínas actúan de forma similar a las toxinas Cry, ya que son altamente específicas para un tipo de celular, además, la especificidad de las toxinas Cry depende del reconocimiento de receptores de membrana celular, como las cadherinas, aminopeptidasa-N y fosfatasa alcalina, entre otros. La interacción de la PS con los receptores de la membrana celular sigue siendo objeto de investigación, y se han publicado y patentado varias moléculas que actúan como posibles receptores para las parasporinas en las células cancerosas (Almanza *et al.*, 2020).

2.5 Cáncer

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), el cáncer se define como una alteración celular, cuya característica primordial es la falta de control de la proliferación de las células cancerosas, volviéndose capaces de formar tumores malignos, y diseminarse a través de los tejidos provocando metástasis (**Figura 4**) (OMS, 2015). El cáncer es una patología multifactorial, se origina debido a cambios genéticos (mutaciones), que pueden ser adquiridos o heredados. Estas mutaciones provocan fallas como la inactivación de genes supresores de tumores (por ejemplo p53) y la activación de oncogenes (genes que controlan la división celular). Por lo anterior, las células cancerosas se diferencian de las células normales por su proliferación descontrolada, la pérdida de la capacidad de diferenciación, y se tornan invasivas generando metástasis (Dale y Rang, 2008).

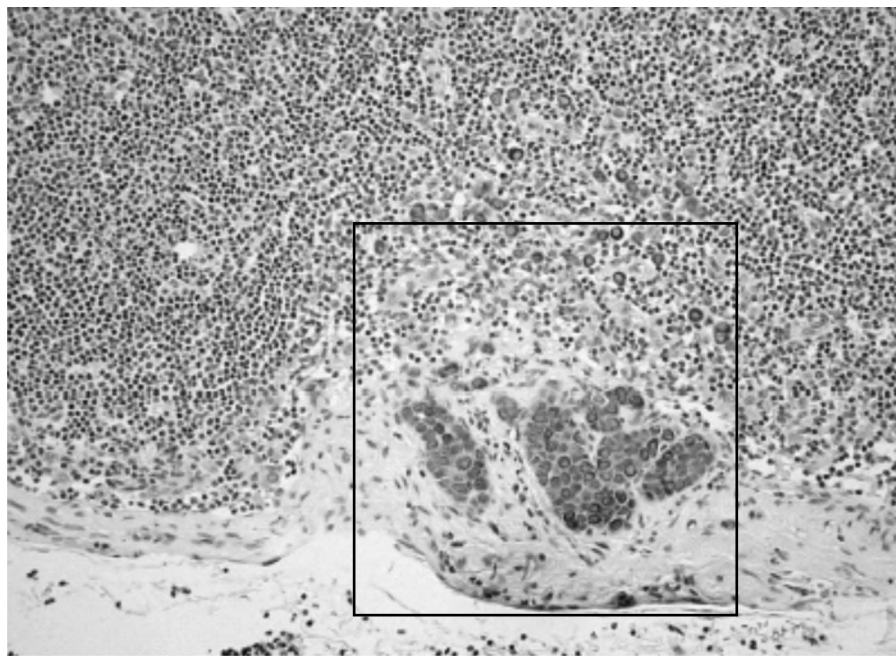


Figura 4. Micrometástasis. Inmunotinción con queratina AE1 y AE3 a 400X (Córdoba *et al.*, 2004).

El cáncer es la segunda causa de muerte en todo el mundo (Salaverry, 2013). Tan sólo en el 2018, ocasionó cerca de 9.6 millones de defunciones a nivel mundial, estimándose que, una de cada seis personas diagnosticadas con alguna neoplasia mueren (OMS, 2020).

Existen más de 100 tipos de cáncer, por lo general, el nombre que reciben se debe a los tejidos u órganos en donde se forman, o según el tipo de célula que los forma (NCI, 2018). Entre los que

los más comunes se encuentran: cáncer pulmonar, colorrectal, de próstata, de piel y gástrico. (OMS, 2020).

2.5.1 Cáncer de mama en México y el resto del mundo

En México el cáncer de mama constituye la principal causa de morbilidad hospitalaria por tumores malignos entre la población de 20 años y más, con 24 muertes de cada 100 egresos hospitalarios para este grupo de edad; en las mujeres, estos tumores malignos representan 37 de cada 100 egresos y en los hombres, 1 de cada 100 egresos (DGIS, 2020). Mientras que la tasa de incidencia por edad estimada en el mundo refleja una diferencia entre cada país, los colores mas intensos hacen referencia en un aumento de la incidencia y conforme disminuye la incidencia es baja (Figura 5).

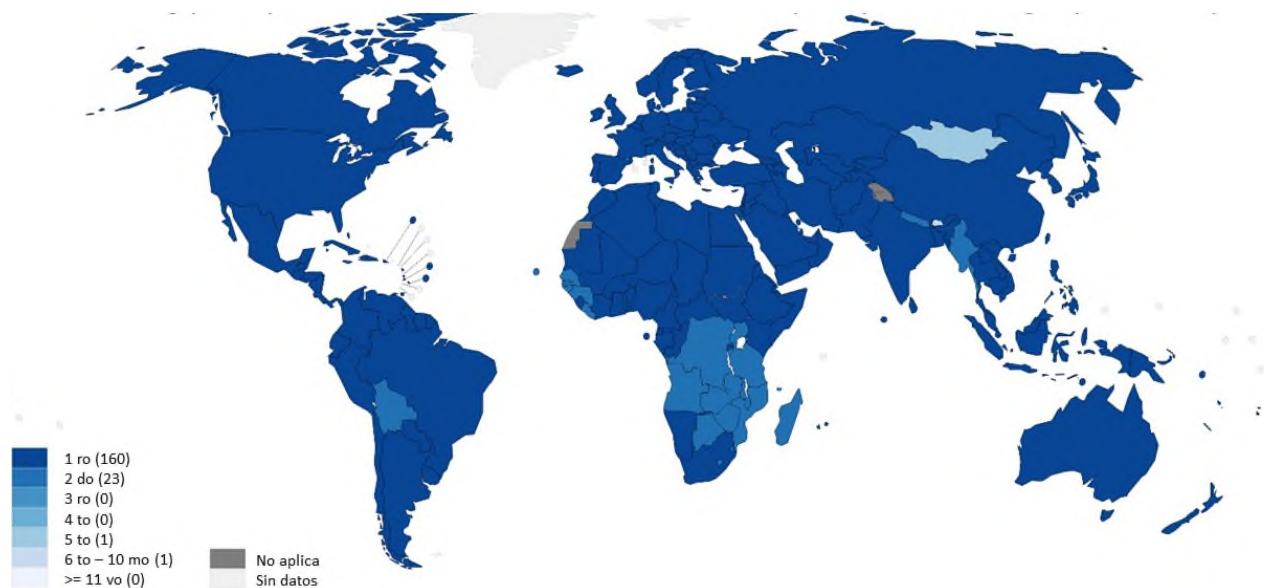


Figura 5. Incidencia estandarizada por edad estimada en el Mundo en el 2020. Los colores en tonos más fuertes indican una mayor incidencia de cáncer por edad en el mundo. Modificada de Globocan, 2020.

El cáncer de mama es una enfermedad heterogénea, con diferencias morfológicas, fisiológicas y una evolución clínica distinta. Aproximadamente el 85% de los casos de cáncer de mama reciben la influencia directa de hormonas esteroideas (estrógeno, progesterona), que estimulan la proliferación de las células neoplásicas mamarias y el 15% restante no reciben influencia

hormonal, lo que ocasiona que los tratamientos endocrinos no resulten efectivos (Cleator *et al.*, 2007).

De un total de 19,292,798 nuevos casos de cáncer, de los cuales el 11.7% están asociados al cáncer de mama (IARC, 2021). El cáncer sigue siendo un importante problema de salud pública en todo el mundo (**Figura 6 y Figura 7**) (Siegel *et al.*, 2020).

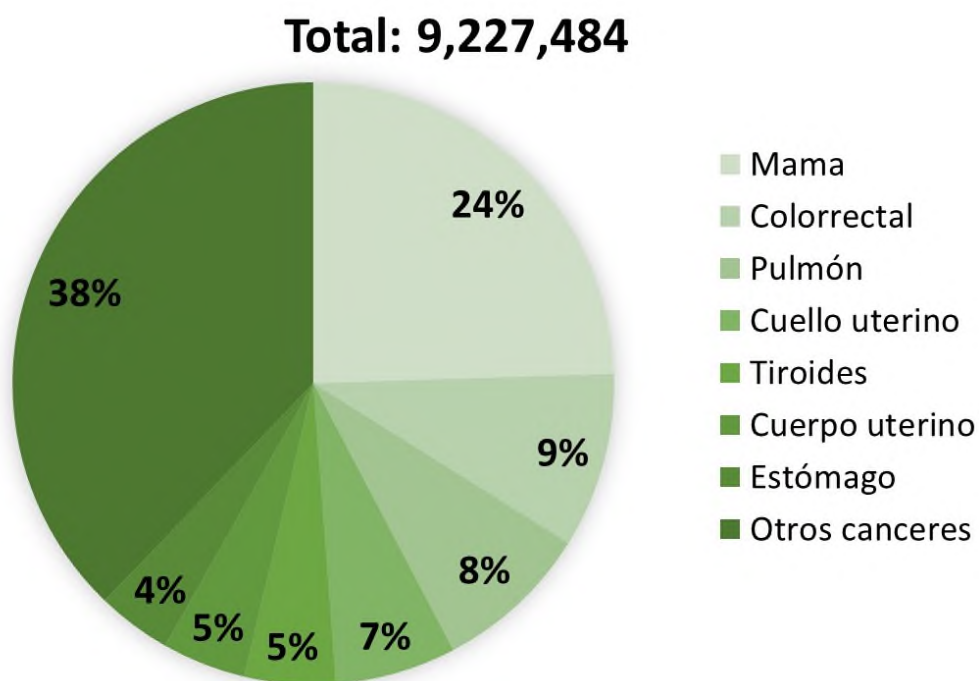


Figura 6. Número de casos estimados de cáncer en el mundo en el 2020. Ambos sexos y en todas las edades (Modificada de Globocan, 2020).

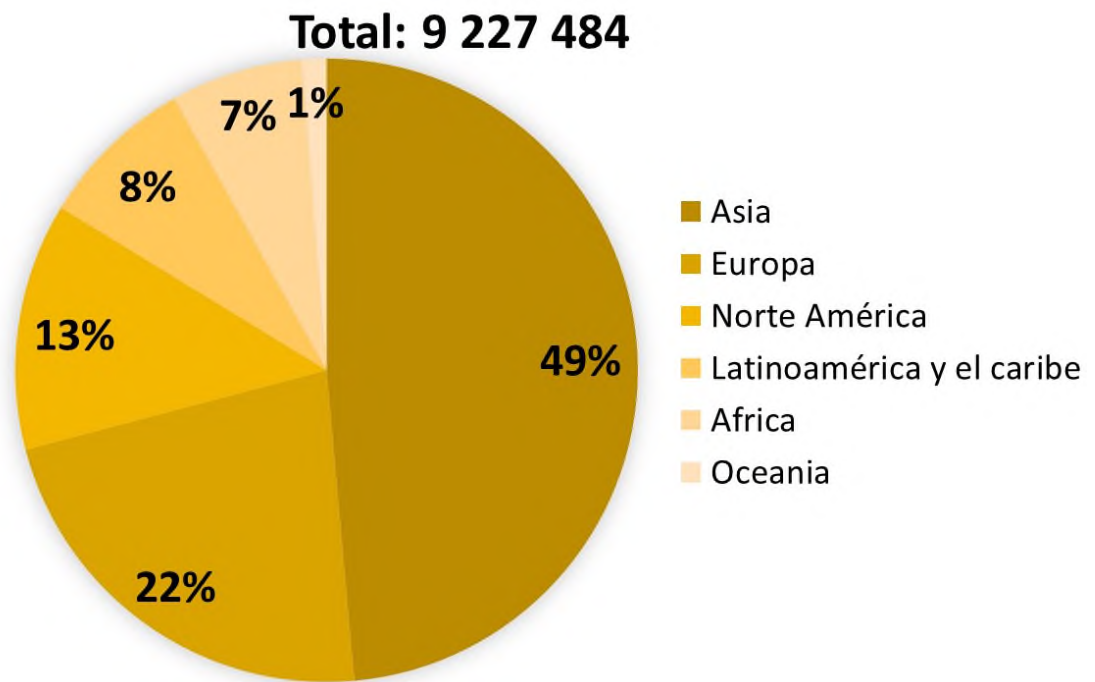


Figura 7. Número de casos de cáncer de mama estimados en el 2020. Ambos sexos y en todas las edades, Modificada de Globocan, 2020.

2.5.2 La metástasis.

Diferentes mecanismos contribuyen a la formación de metástasis como la alteración de los sistemas celulares de adhesión, la síntesis de enzimas proteolíticas, la motilidad celular, la modificación de señales inducidas por factores de crecimiento y/o los sustratos de adhesión ambientales y la ausencia de reconocimiento inmunitario por el sistema inmunológico (Arvelo y Poupon, 2001). La metástasis se define como la diseminación de células tumorales, a partir de la neoplasia primaria hacia lugares secundarios, es un proceso en el que ocurren una serie de procesos secuenciales: escape del tumor primario e invasión local, intravasación, supervivencia en la circulación, extravasación y la siembra metastásica (**Figura 8**) (Pantel y Brakenhoff, 2004; Valastyan y Weinberg, 2011). La cascada metastásica está involucrada en estos eventos secuenciales y está dada principalmente por tres procesos: **a)** migración **b)** adhesión y **c)** la formación de tumor secundario. En donde, una célula tumoral se desprende del tumor inicial por medio de enzimas proteolíticas, tales como las metaloproteasas (MMP), e invade los tejidos locales cercanos, para poder migrar a otros tejidos mediante factores como el de necrosis tumoral (TNF), el cual actúa como factor de motilidad de las células tumorales y por intravasación, entra

al torrente sanguíneo. Para la célula cancerosa esto es un reto ya que debe sobrevivir al recorrido. El proceso de extravasación en la circulación le permite a la célula tumoral llegar a lugares distantes, para finalmente adherirse a un tejido u órgano nuevo y colonizar formando un nuevo tumor (Riggio *et al.*, 2021; Arvelo y Poupon, 2001).

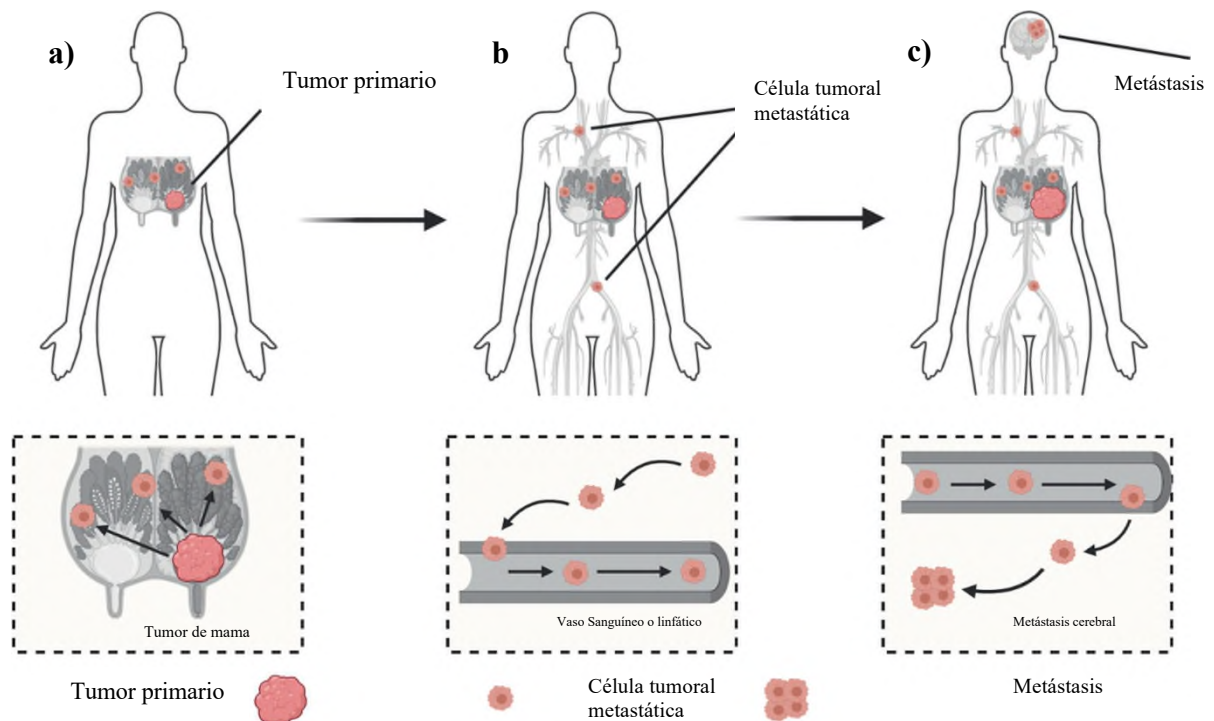


Figura 8. Cascada metastásica como un proceso de múltiples pasos. a) Escape del tumor primario e invasión local. **b)** Intravasación y supervivencia en la circulación. **c)** Extravasación y siembra metastásica. Modificada de Riggio *et al.*, (2021).

2.5.3 Eventos moleculares de la formación de tumor.

Las células circulantes que se extravasan en el lugar de destino se enfrentan a condiciones adversas que dificultan su supervivencia (Valastyan y Weinberg, 2011). Varios factores secretados, derivados del tumor y células de la médula ósea, señalan la formación de los nichos premetastásicos, en los que las células tumorales colonizan y crecen (Ye y Weinberg, 2015). Además de los factores derivados del tumor, los exosomas desempeñan un papel importante. Las interacciones célula cancerosa-célula hospedera también son importantes para una colonización adecuada. El establecimiento de una red vascular es crucial para una colonización metastásica adecuada. El mimetismo vascular impulsa la capacidad de algunas células de cáncer de mama

para contribuir a las metástasis a distancia mediante la sobreexpresión de SERPINE2 y SLPI. Estos dos genes se sobreexpresan preferentemente en pacientes humanos con metástasis pulmonares de cáncer de mama, lo que sugiere su potencial para la progresión metastásica (Wagenblast *et al.*, 2015).

Las células cancerosas colonizadoras también son capaces de utilizar las vías de señalización neuronal para su crecimiento y adaptación. La proximidad de las células de cáncer de mama a las sinapsis neuronales permite a las células cancerosas secuestrar la señalización del receptor de N-metil-D-aspartato (NMDA) para promover la metástasis cerebral (Zeng *et al.*, 2019). La protocadherina 7 es una proteína que promueve el ensamblaje de las uniones gap compuestas por anexina 43 entre la célula cancerosa y los astrocitos. Las células cancerosas metastásicas utilizan las uniones gap para transferir al segundo mensajero cGAMP a los astrocitos, activando la vía del estimulador de genes interferón y produciendo citocinas inflamatorias como el IFN α y el factor de necrosis tumoral. A su vez, estos factores activan las vías STAT1 y NF- κ B en las células metastásicas cerebrales, lo que promueve el crecimiento tumoral y la quimiorresistencia (Cheng *et al.*, 2016).

El proceso metastásico es responsable de más del 90% de las muertes relacionadas con la patología, debido al deterioro de la función de órganos vitales (Chaffer y Weinberg, 2011; Gupta y Massague, 2006). La enfermedad metastásica puede producirse de *novo*, esto significa que la metástasis ya está presente en el momento del primer diagnóstico, el cáncer se ha extendido antes de su detección. Sin embargo, la mayoría de las veces es el resultado de una recaída (recurrencia), en la que las metástasis se manifiestan tras el tratamiento (Seltzer *et al.*, 2020). La recaída metastásica puede producirse meses o años después del diagnóstico y tratamiento inicial (Crowley *et al.*, 2017).

Los cambios fenotípicos que sufre una célula en el proceso de transformación maligna, son un reflejo de la adquisición secuencial de alteraciones genéticas. La mutación de genes críticos, incluidos los genes supresores, los oncogenes y los genes implicados en la reparación del ADN, conducen a la inestabilidad genética y a la pérdida progresiva de diferenciación, lo que promueve el inicio, la expansión y la progresión de los tumores malignos (Ajani *et al.*, 2015; Visvader, 2011). Un evento clave en el proceso de metástasis es la capacidad de las células tumorales para formar colonias. Una célula troncal cancerosa (CSC) puede expandirse y formar un tumor. También

pueden estar presentes múltiples grupos de CSC, cada uno de los cuales tiene el potencial de convertirse en tumores independientes. La activación de las CSC potencialmente inactivas durante años, puede dar lugar a la reaparición del cáncer en un momento posterior. También puede surgir una CSC secundaria distinta, posiblemente debido a una mutación o a una modificación epigenética, que puede formar un nuevo tumor (Visvader y Lindeman, 2012).

2.6 Potencial terapéutico de las PS en la terapia del cáncer.

Las PS puede tener un papel relevante en la terapia del cáncer de mama debido a las características de este tipo de cáncer y de su importancia epidemiológica (Tao *et al.*, 2015). Sin una estrategia terapéutica no invasiva definida, el tratamiento contra esta neoplasia utiliza fármacos quimioterapéuticos no específicos como los taxanos y las antraciclinas, que son ampliamente utilizados en el tratamiento del cáncer de próstata y la leucemia respectivamente, entre otros (De Leeuw *et al.*, 2015; Roboz, 2012). Frecuentemente las células tumorales desarrollan resistencia a los fármacos quimioterapéuticos.

Basándose en que la línea celular MCF-7 de cáncer de mama está bien caracterizada y ampliamente utilizada en la investigación científica. Facilita la evaluación de la eficacia de las parasporinas como tratamiento contra el cáncer de mama, ya que se dispone de modelos experimentales establecidos para llevar a cabo estudios preclínicos (Zhang *et al.*, 2019).

Aunque MCF-7 es una línea celular establecida, también muestra cierta heterogeneidad celular, lo que refleja la diversidad de las células cancerosas presentes en los tumores de mama en pacientes. Esta heterogeneidad puede proporcionar información sobre cómo diferentes subpoblaciones celulares responden a las parasporinas, lo que podría ser relevante para el diseño de estrategias terapéuticas más efectivas (Eeckhoutte *et al.*, 2006).

2.7 Ensayo de formación de colonias.

Las líneas celulares de cáncer de mama, como MCF-7, se utilizan como modelos in vitro que representan las características biológicas y genéticas del cáncer de mama en pacientes. Estudiar la formación de colonias en estas líneas celulares proporciona información sobre la capacidad de las células cancerosas para crecer y proliferar, lo cual es fundamental para comprender la progresión tumoral (Zhang *et al.*, 2019). La formación de colonias es un ensayo comúnmente

utilizado para evaluar la capacidad proliferativa de las células troncales cancerosas de una población de proliferar e iniciar la formación de un tumor. La capacidad de las células MCF-7 para formar colonias *in vitro* se correlaciona con su capacidad para formar tumores *in vivo*, lo que sugiere que este ensayo es relevante para comprender la agresividad tumoral y la respuesta al tratamiento (Dai *et al.*, 2017).

Un procedimiento habitual para evaluar la supervivencia clonogénica en células adherentes comprende tres fases específicas: 1) la fijación de una monocapa de agar/ agarosa en las placas de cultivo, 2) la preparación de suspensiones unicelulares y la distribución de una cantidad apropiada de células en las placas como segunda capa, y 3) la fijación y coloración de las colonias tras un período de incubación pertinente, el cual puede variar entre 1 y 3 semanas (Rafehi *et al.*, 2011). Por último la medición de la muerte celular con colorantes o fluorimétricos como el azul tripano y el yoduro de propidio que puede proporcionar una medida del número de células no viables en una población en un momento determinado (Crowley *et al.*, 2017).

2.8 Antecedentes del grupo de trabajo.

Cruz-Nolasco en el (2014), aisló 22 cepas de *Bacillus*, de las cuales se han estudiado 8 de ellas. Encontrándose 4 parasporinas pertenecientes a dos cepas distintas (*Bacillus thuringiensis tolworthi* y *Bacillus thuringiensis spp*) estas parasporinas tuvieron un efecto antiproliferativo sobre líneas celulares de cáncer de mama MCF-7, MDA MB 231 y además hepatocarcinoma (HepG2). Castrejon-Arroyo en el (2019), evaluó la seguridad farmacológica de tres de las parasporinas (A13-5, A13-2 y A24-2) y encontró que estas proteínas solo tienen actividad sobre las líneas de origen canceroso (MCF-7, MDA MB 231, MDA MB 468) y no sobre las células normales. Y que dicha actividad no estaba relacionada con daño al ADN o con la producción de especies reactivas de oxígeno.

Recientemente, se demostró que la parasporina A13-2 que se obtuvo de una cepa de *Bacillus thuringiensis*, aislada de la región de la cuenca del Papaloapan (Oaxaca, México), tiene actividad citotóxica preferentemente contra MCF-7 y no sobre células no cancerosas HEK 293 y células polimorfo nucleares, lo que representa una alternativa prometedora para el tratamiento del cáncer de mama (Borin *et al.*, 2021). Sin embargo, aún es necesario investigar los mecanismos celulares por los que las parasporinas tienen actividad en células neoplásicas.

3. JUSTIFICACIÓN.

El cáncer representa unas de las enfermedades con mayor incidencia en México y en el mundo. En particular, el cáncer de mama figura como una de las neoplasias con mayor prevalencia y elevada mortalidad en mujeres en México. Su detección en etapas iniciales es indispensable para que el tratamiento tengan mayor probabilidad de éxito. Por otro lado, es bien conocido que muchos de los pacientes que reciben el alta médica presentan una fase de remisión de la enfermedad, sin embargo, meses o años después se presenta una recaída. Esto sucede, como consecuencia de la capacidad que tiene una célula tumoral de escapar del tumor primario, invadir, proliferar de forma aislada en los tejidos adyacentes y sobretodo resistir la terapia. Por lo tanto, es importante encontrar tratamientos que no solo tengan actividad citotóxica sobre las células neoplásicas, sino que además puedan inhibir o eliminar la capacidad de proliferar, migrar y de formar un nuevo tumor. En este contexto, los estudios *in vitro* han demostrado que las parasporinas representan una buena alternativa como posible biomoléculas terapéuticas contra el cáncer, debido a su alta selectividad por las células de origen canceroso. Sin embargo, no existen estudios que evalúen si las parasporinas pueden inhibir la capacidad formadora de tumores de una célula neoplásica. Por lo que, en este proyecto se planteó el objetivo de analizar experimentalmente, si la proteína A24-2 es capaz de inhibir la formación de colonias de las células MCF-7.

4. HIPÓTESIS.

- La proteína A24-2 tiene la propiedad de inhibir la capacidad formadora de tumor de las células de cáncer de mama MCF-7.

5. OBJETIVOS.

5.1 Objetivo general.

- Evaluar el efecto de la proteína A24-2 sobre la capacidad formadora de tumor de la línea celular MCF-7.

5.2 Objetivos específicos.

- Estandarizar la técnica de formación de colonias empleando como modelo la línea celular de cáncer de mama MCF-7.
- Determinar si la proteína A24-2 tiene la capacidad de inhibir la formación de tumor en la línea celular de MCF-7.
- Determinar el porcentaje de inhibición de la capacidad formadora de tumor.

6. PLAN EXPERIMENTAL.

El siguiente diagrama muestra de forma general las actividades realizadas para cumplir con los objetivos propuestos.



7. METODOLOGÍA.

7.1 Producción, selección y purificación del cristal proteico A24-2.

7.1.1 Elaboración de discos de esporas de la cepa A24 de *Bacillus thuringiensis*.

La Universidad del Papaloapan campus Tuxtepec, dentro del Laboratorio de Biorreactores tiene una colección de cepas de *Bacillus thuringiensis* aisladas de campos de siembra de caña ubicados en la Cuenca del Papaloapan en el estado de Oaxaca (Bravo D., *et al.*, 2015). Para tener un mejor manejo y conservación de las cepas, se elaboraron discos con papel filtro en los que se colocó una suspensión de esporas. Para lo cual se sembraron las cepas en cajas de Petri con agar nutritivo. Posteriormente, se recuperó el crecimiento bacteriano de las cajas de Petri y se inocularon en matraces de 1 L con 350 mL de caldo nutritivo durante 18 h a 30°C y 180 rpm de agitación. Posteriormente, se tomaron 200 µL de cada matraz y se esparcieron con un asa acodada en cajas de Petri con agar nutritivo y se mantuvieron en incubación a 30°C hasta alcanzar la esporulación. Después, se recuperó toda la biomasa de las cajas Petri por arrastre y se resuspendió en 5 mL de NaCl al 0.85% estéril. Con esta solución se impregnaron los discos de papel filtro con 20 µL, se secaron en la incubadora a 30 °C por dos días, por último se recolectaron, se guardaron en microtubos que se sellaron con parafilm, y se mantuvieron en congelación hasta su próximo uso.

7.1.2 Producción de inclusiones proteicas con medio Gerry-Rowe en medio líquido.

Se realizó un cultivo de la cepa A24 de *Bacillus thuringiensis* en 9 matraces de 1 L de medio Gerry-Rowe. Cada matraz contenía un volumen de 330 mL aproximadamente, el medio Gerry-Rowe se esterilizó para enseguida ser inoculado con un disco de spora de la cepa A24 de *Bacillus thuringiensis*, productora de la parasporina A24-2. El cultivo se dejó como máximo 8 días en condiciones de incubación y agitación de 30 °C, 120 rpm.

Transcurrido el tiempo de incubación, se centrifugó para recuperar el material insoluble, donde se encontraba la inclusión parasporal que contiene a la proteína A24-2, seguido de los lavados de proteína descrito por el protocolo de Bravo *et al.*, (2015).

También se realizaron cultivos de la cepa A24 en agar sólido en cajas petri, medio LB broth y caldo nutritivo. En el cuál solamente en medio Gerry-Rowe se obtuvieron los patrones de las bandas esperados para la proteína A24-2 en los geles de acrilamida.

- **Solubilización de las inclusiones proteicas**

Para la solubilización de las inclusiones proteicas, se siguió el procedimiento descrito por Navarro K, en (2001) y Laemmli en (1970). Las proteínas fueron solubilizadas en una relación 2:1 con reactivo de Laemmli, que contenía tris-base 0.5 M, SDS al 10%, 2-mercaptoetanol, glicerol y azul de bromofenol para desnaturalizar a las proteínas, y que se separó por tamaños en el gel de acrilamida/bis acrilamida.

- **Purificación de las inclusiones proteicas**

Se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS- PAGE) para separar la proteína de interés de acuerdo a su peso molecular.

Se identificó por tamaño de 25- 30 KDa la banda que contiene la proteína A24-2, la cual se cortó y se realizó una electroelución a 10 mA por 200 minutos aproximadamente.

Después se realizó nuevamente una electroforesis SDS-PAGE de la muestra previamente tratada, esto para confirmar que la proteína purificada haya sido del tamaño adecuado a la proteína de interés A24-2.

Se seleccionó la proteína A24-2 de interés con tamaño aproximado de 27 KDa (**Figura 11**). Se seleccionó una banda por debajo de 35 KDa del marcador de peso molecular para ser recuperada mediante una electroelución.

La electroelución se llevó a cabo de acuerdo al protocolo ya descrito en el manual del equipo del Electroelutor modelo 422 de Bio Rad durante 6 horas ocupando las 6 rejillas, a condiciones de operación de 10 mA con amperaje constante.

Se realizó una diálisis para eliminar el excedente de SDS que podría contener la muestra de proteína. La diálisis se realizó con un amortiguador de Tris-base y glicina, las proteínas se colocaron dentro de la membrana Ultrafree-MC para volúmenes inferiores a 0,5 mL con un tamaño de poro de 6.000 Da, una vez sellada la bolsa de diálisis, esta se colocó dentro de la solución amortiguadora por 24 h cambiándolo cada 2 h y se mantuvo en refrigeración.

La proteína se concentró utilizando columnas de filtración de (Sigma aldrich) para remover el SDS que podría afectar los ensayos posteriores.

Se realizó la cuantificación de concentración de la proteína A24-2 con el método de Bradford, seguido por una cuantificación por el método de Lowry para confirmar el resultado, se filtró para su uso próximo mediante jeringas de filtración de 1 mL de BD, con filtro millipore de 0.22 μ M.

7.2 Ensayo de hemólisis.

El ensayo de hemólisis con eritrocitos se realizó de acuerdo al protocolo publicado por Evans *et al.*, (2013), con algunas modificaciones como se describe:

- **Preparación de eritrocitos**

Se obtuvieron 5 mL de sangre de un individuo sano humano, extraído directamente en un tubo Vacutainer recubierto con K₂-EDTA para evitar la coagulación. La sangre se centrifugó a 1646 rpm durante 5 minutos y se marcaron los niveles de hematocrito (rojo, capa inferior) y plasma (amarillento, capa superior) en el tubo. Se aspiró el plasma y se desechó en el bote de residuos biopeligrosos. Se llenó el tubo de hematocrito hasta el nivel original de la sangre completa con solución de NaCl 150 mM. Se homogenizó la mezcla con movimientos suaves y se centrifugó a 1646 rpm durante 5 minutos. Se repitió el paso de lavado, se aspiró el sobrenadante y se reemplazó con PBS a pH de 7.4. Se invirtió para mezclar y se centrifugaron a 1646 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se aspiró el sobrenadante y se agregaron 12 mL de PBS a 3 mL de suspensión de eritrocitos. Se invirtió varias veces para mezclar. Se prepararon diluciones seriadas de SDS para lograr la mejor concentración deseada en un volumen de 2000 µL. Se colocaron en microtubos de 1.5 mL los 190 µL de sangre roja diluida + 10 µL de los siguientes compuestos como tratamientos (SDS al 10%, 5%, 2.5%, 1.25%, 0.6%, 0.3%, 0.15%, la proteína A24-2 en tres concentraciones de 9, 12, 15 µg/mL y el PBS a pH 7.4.) Las muestras se cargaron por triplicado para cada tratamiento. Se utilizó PBS como control negativo y SDS como control positivo de hemólisis. Estas muestras se cargaron en microtubos de capacidad de 1.5 mL y se incubaron a 37° durante 1 hora. Los tubos se centrifugaron durante 5 minutos a 2115 rpm para sedimentar los eritrocitos intactos, en este paso se retiran las muestras de la centrifuga con mucho cuidado de no agitarlas para no romper el sedimento celular al transportarlas para el siguiente paso. Se transfirieron 100 µL del sobrenadante de cada tubo a una placa de 96 pozos de fondo plano. Se midió la absorbancia de los sobrenadantes con un lector de microplacas de la marca Bio-Rad a 541 nm.

7.3 Cultivo celular.

La línea celular de cáncer de mama MCF-7 fue obtenida del banco de células del laboratorio de Biomedicina de la Universidad del Papaloapan.

La línea celular MCF-7 fue cultivada con medio DMEM suplementado con L-glutamina 1 %, suero fetal bovino 10 % y antibiótico penicilina/estreptomicina al 1 %. Las células fueron mantenidas a una atmósfera de 5 %, CO₂ y 95% de humedad a 37 °C para su uso posterior.

7.4 Ensayo MTT (Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol).

El monitoreo de la actividad mitocondrial se puede detectar con el uso de MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) que es un colorante de tetrazolio de color amarillo que se reduce a color azul por la acción de la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa (Boncler *et al.*, 2014).

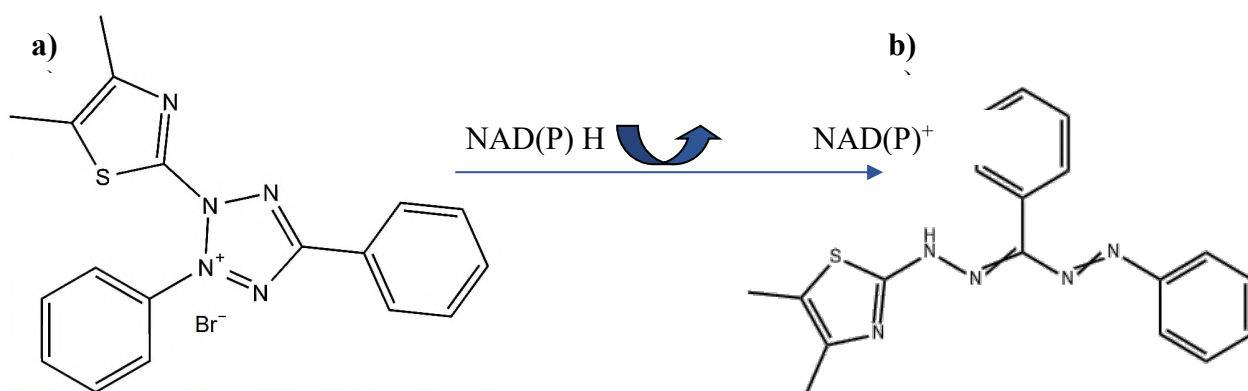


Figura 9. a) MTT (sal de tetrazolio), **b)** formazan. Modificada de Biomodel, s.f.).

Sólo las células con mitocondrias viables son capaces de reducir el MTT a formazán y esto constituye un indicador del grado de viabilidad de las células, éste es un método indirecto para detectar la toxicidad del compuesto químico evaluado. Este método de viabilidad se realizó de acuerdo con el reportado previamente (Riss *et al.*, 2016). El sustrato MTT se preparó en una solución fisiológicamente equilibrada, y se agregó a las células en cultivo, en una concentración de 0.5 mg/mL. Las células se incubaron de 2 a 4 horas a 37 °C. Los cristales de formazán, se

solubilizaron agregando dimetilsulfóxido (DMSO). La cantidad de formazán es directamente proporcional al número de células viables, se midió registrando la densidad óptica (DO) a una absorbancia de 570 nm, usando un espectrofotómetro de lectura de placas de 96 pozos de la marca Sigma Aldrich.

7.4.1 Protocolo de extracción de células mononucleares de sangre periférica.

La extracción de células mononucleares de sangre periférica se realizó de acuerdo al protocolo modificado de Moshage *et al.*, (1995), que se describe a continuación.

Las muestras de sangre periférica fueron recolectadas de personas que voluntariamente accedieron a donar y que se encontraban en un perfecto estado de salud, en el laboratorio de Cultivo de Células Animales, del Centro de Investigaciones Científicas de la UNPA, bajo la aprobación del Comité de Ética de Seres Humanos de la Institución (CAAE: 31211214.4.0000.5306). Las muestras se obtuvieron mediante punción venosa utilizando tubos con anticoagulante K₂-EDTA tipo Vacutainer®, para separar las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y realizar los tratamientos posteriores y cultivos celulares. Las muestras se colocaron en tubos cónicos de 15 mL y se colocaron 5 mL de Histopaque 1077 (Sigma-Aldrich). Lentamente se virió por las paredes 5 mL de sangre periférica. Los tubos cónicos se centrifugaron durante 30 minutos a 1473 rpm y el paquete leucocitario se pasó a un tubo cónico nuevo, el cual se lavó con 10 mL de PBS esteril y se centrifugó a 736 rpm por 10 minutos. Después se resuspendieron las células, donde se descartó el sobrenadante obtenido de la centrifugación y se agregó 1 mL de medio RPMI (Biowest) suplementado con suero fetal bovino (FBS) (rmbio). Se contaron las células mononucleares con la cámara de Neubauer de una dilución 1:20 del paquete celular y se le agregó un volumen de azul de tripano, de tal forma la relación final de fuera 1:1. Seguido se plaqueó las células mononucleares en cajas de 96 pozos con una concentración de 100, 000 células por pozo. Se aplicaron tres tratamientos: **1)** la proteína A24-2 (12 µg/mL) en un volumen de 10 µL, **2)** Control negativo (medio RPMI suplementado con 10% de FBS) y **3)** control el positivo (SDS al 10%). Una vez tratadas las PBMC se incubaron a 24 hrs a 37 °C, 5 % de CO₂.

7.5 Ensayo MTT de citotoxicidad de la proteína A24-2.

El ensayo MTT para las células MCF-7 fue realizado conforme al protocolo descrito en el apartado de anterior, después de la incubación con los tratamientos con la proteína A24-2, se agregaron 10 µL de MTT y se incubó a 37 °C por 4 horas. Después de la incubación, se agregaron 100 µL de DMSO para solubilizar los cristales y se leyó en el lector de microplacas a 595 nm. Los datos se expresaron como porcentaje de viabilidad celular con respecto al control de medio con PBS.

7.6 Estandarización del ensayo de formación de colonias en agar noble.

El ensayo de formación de colonias también conocido ensayo clonogénico, es una técnica comúnmente utilizada para evaluar la supervivencia y proliferación de las células en condiciones *in vitro* (Menyhart et al., 2016). El ensayo clonogénico se utilizó para estimar la muerte reproductiva de las células antes o después del tratamiento, como la radioterapia o los fármacos citotóxicos (Rafehi et al., 2011).

Inicialmente se etiquetó cada pocillo de una placa de 12 pozos para este ensayo. Seguido se preparó el medio de cultivo celular DMEM al 2X disolviendo 1 g de medio en polvo y 0.2 g de bicarbonato sódico en agua desionizada hasta un volumen final de 50 mL. El medio se pasó por un filtro de botella con capacidad de 500 mL de 0.2 µm (TRP rapid) para esterilizarlo. Seguido se añadieron los componentes adicionales necesarios para el cultivo normal de la línea celular de interés. En el caso de este trabajo, para la línea celular MCF-7 su medio habitual es DMEM alto glucosa, suplementado con 15% de FBS y 1% de solución de penicilina/estreptomicina, glutamina al 1% y HEPES 25 mM.

Se preparó medio DMEM AL 1X en un volumen final de 100 mL, se suplementó con 30 mL de FBS, 2 mL de glutamina a 2mM, 5 mL de HEPES a 25 mM y 2 mL de penicilina/ estreptomicina a (100 U/mL, 100 µg/mL) y el resto con medio DMEM alto en glucosa (GIBCO™).

Se preparó también medio DMEM suplementado a 2X, duplicando las concentraciones mencionadas anteriormente en un volumen final de 100 mL.

Seguido se preparó el agar noble al 1%, añadiendo 1 g de agar noble a 100 mL de agua desionizada, a la par se preparó agar noble al 0.6% añadiendo 0.6 g de agar noble a 100 mL de agua desionizada y se esterizaron.

Se preparó una solución madre de cloruro de nitroazul de tetrazolio de 1 mg/mL en 1x PBS (8 g de NaCl, 0.2 g de KCl, 1.44 g de Na_2HPO_4 , y 0.24 g de KH_2PO_4 en H_2O hasta un volumen final de 1,000 mL). Esto se utilizó al final del experimento para teñir las colonias.

- **Colocación de la capa inferior de agar**

Se aflojó el tapón del frasco de agar noble al 1% y se calentó en el microondas durante 60 segundos en tres tiempos de 20 segundos cada uno.

Se colocó la solución de agar derretida y el medio de cultivo 2X precalentado en una cubitera llena de agua caliente del grifo (42 °C). Se colocó también un tubo cónico de 50 mL en un soporte para tubos en la cubitera con agua caliente. Se transfirió el tubo a la campana de cultivo celular para los pasos siguientes.

Para la capa inferior de agar, se usó para 2 pozos de una placa de 12 pozos, 800 μL por pozo, que contenía 400 μL de Medio DMEM al 2X, y 400 μL de Agar al 1%, esto se puede realizar con una pipeta serológica o con una micropipeta. Se comenzó añadiendo 1 mL de medio de cultivo al tubo cónico de 50 mL y seguidamente 1 mL de la solución de agar noble al 1%. Se invirtió el tubo para homogenizar. Se extrajo aproximadamente 800 μL de mezcla en una micropipeta de 1 mL. Se dejó que las burbujas de aire subieran a la parte superior de la columna de la pipeta antes de depositar 800 μL de esta mezcla en cada pocillo. Se cubrió las placas y se dejó que la mezcla de agar se solidificara a temperatura ambiente, en la campana de cultivo celular, durante 20 min.

- **Colocación de la capa superior de agar con células**

Una vez que la capa inferior de agar solidificó, se comenzó con la preparación de la capa superior. Previamente se recolectaron las células por tripsinización y se diluyó 1:20 en medio de cultivo DMEM. Se contaron las células en la cámara de Neubauer y se calculó el número de células necesarias por pocillo para preparar una suspensión celular final. Se utilizó 800 células/pocillo como punto de partida. Para este número de células, se preparó una suspensión celular de 8,000,000 células/mL, la primera dilución se hizo de 1:100, tomando 10 μL de muestra del stock

para tener una concentración celular de 80,000 células/mL, después se volvió a hacer otra dilución 1:1000 donde se tomó una concentración de 80 células/ μ L.

Dado al primer planteamiento de plaquear 800 células por pozo, se tomó 12.5 μ L para llevar 1000 células por pozo. Esta se llevó a un volumen final de 1000 μ L en un tubo eppendorf.

Se derretió la solución de agar al 0.6% en un microondas como se indicó anteriormente y se colocó en una cubitera que contenía agua caliente junto con un tubo cónico de 50 mL en un soporte para tubos y la suspensión celular final del tercer paso. Se transfirió la cubitera con agar fundido al 0.6% a la campana de cultivo celular para los pasos siguientes. Se mezcló agar al 0.6% y suspensión celular en proporción 1:1. Se necesitó 800 μ L por pocillo. Se pipeteó 1 mL de suspensión celular en el tubo cónico de 50 mL. Seguido, se añadió 1 mL de agar al 0.6% al tubo.

La mezcla fue homogeneizada rápidamente para asegurar una distribución uniforme de las células, y luego se extrajeron 800 μ L de la mezcla. Se permitió que las burbujas de aire ascendieran hacia la parte superior de la columna de la pipeta antes de depositar 800 μ L de la mezcla en cada pocillo de la placa, asegurándose de evitar la introducción de burbujas de aire. Se dejó que la mezcla de células y agar se solidificara a temperatura ambiente en una campana de cultivo celular durante 30 minutos antes de transferirla a un incubador de cultivo celular humidificado a 37 °C. Se añadió medio DMEM 1X con precaución sobre las paredes en forma circular para evitar la desecación del medio y, por ende, del agar. Finalmente, se permitió un tiempo adecuado para la formación de colonias, que varía según la línea celular y suele ser aproximadamente de 21 días.

- **Tinción con cristal violeta y recuento de las colonias**

Se retiró el medio de cultivo. Se fijó con glutaraldehído al 0.5% en PBS al 0.4% durante 10 minutos. (se utilizaron de 200 a 400 μ L por pozo). Se quitó el glutaraldehído y se lavó una vez con PBS al 1X. Se quitó el PBS y se tiñó con 400 μ L de cristal violeta al 0.025%, se esparció y con una punta, seguido se levantó la segunda capa de cultivo para teñir durante 1 a 2 horas. Los siguientes pasos fueron de lavados con PBS al 0.4%. En el primer lavado se eliminó el cristal violeta del pozo y se dejó destiñiendo toda la noche. Al día siguiente se hicieron varios lavados con PBS hasta que se obtuvo una imagen clara y visual de las colonias teñidas.

7.7 Estandarización del ensayo de formación de colonias en agarosa al 5%.

Previamente se preparó agarosa al 5% diluida en agua desionizada y se esterilizó. Se precalentó el medio completo a 45° C (30 mL) (DMEM+FBS 5%+ penicilina/estreptomicina). Después se derritió la agarosa al 5% usando el microondas. Seguido, se preparó la base de la capa A de la siguiente manera. Se mezcló 13.5 mL de medio precalentado a 46°C con 1.5 mL de agarosa al 5% derretido y se mezcló bien. Se añadió a cada placa de 12 pocillos, 600 µL de la base de la capa (A), y con 4 réplicas para cada muestra y tratamiento con la PS A24-2. Se dejó solidificar por 30 minutos.

Las células MCF-7 se contaron dos veces con la cámara de Neubauer y se preparó una solución de 2×10^5 células/5mL. Posterior se preparó la capa superior B mezclando 5 mL de A con 3 mL de la solución con células ya preparadas anteriormente (2×10^5 células/5mL). Se homogenizó bien y se añadieron 600 µL de la solución B en cada pozo. Seguido se dejó enfriar la placa por 30 minutos dentro de la campana, se añadieron 200 µL de medio completo en cada pozo, y se agregó la concentración correspondiente de tratamiento de PS A24-2 con la muestra. Por último, se dejó incubando la placa a 37°C / 5% de CO₂, durante 2 semanas y media, cambiando el medio en tres tiempos durante la semana.

Al término del ensayo se retiró el medio con cuidado, seguido se fijó con 400 µL de glutaraldehído al 0.5% por 10 minutos y se dejó a 4°C en refrigeración, se aspiró después del periodo de tiempo y se fijó con 400 µL cristal violeta al 0.1% (PBS/metanol al 20%) y se dejó en refrigeración por 2 horas, por último se aspiró y se realizaron lavados con PBS hasta obtener una imagen clara de las colonias.

8. RESULTADOS.

8.1 Perfil electroforético de la inclusión proteica aislada de la cepa A24 de *Bacillus thuringiensis*.

Para seleccionar y recuperar la banda A24-2 de 28-30 kDa, las proteínas que constituyen al cristal proteico producido por la cepa A24 de *Bacillus thuringiensis* se separaron por electroforesis. En la **Figura 10**, se muestra el perfil de bandeo de las proteínas separadas por SDS-PAGE al 10%, en la que se resalta la banda la proteína A24-2 de 28-30 KDa.

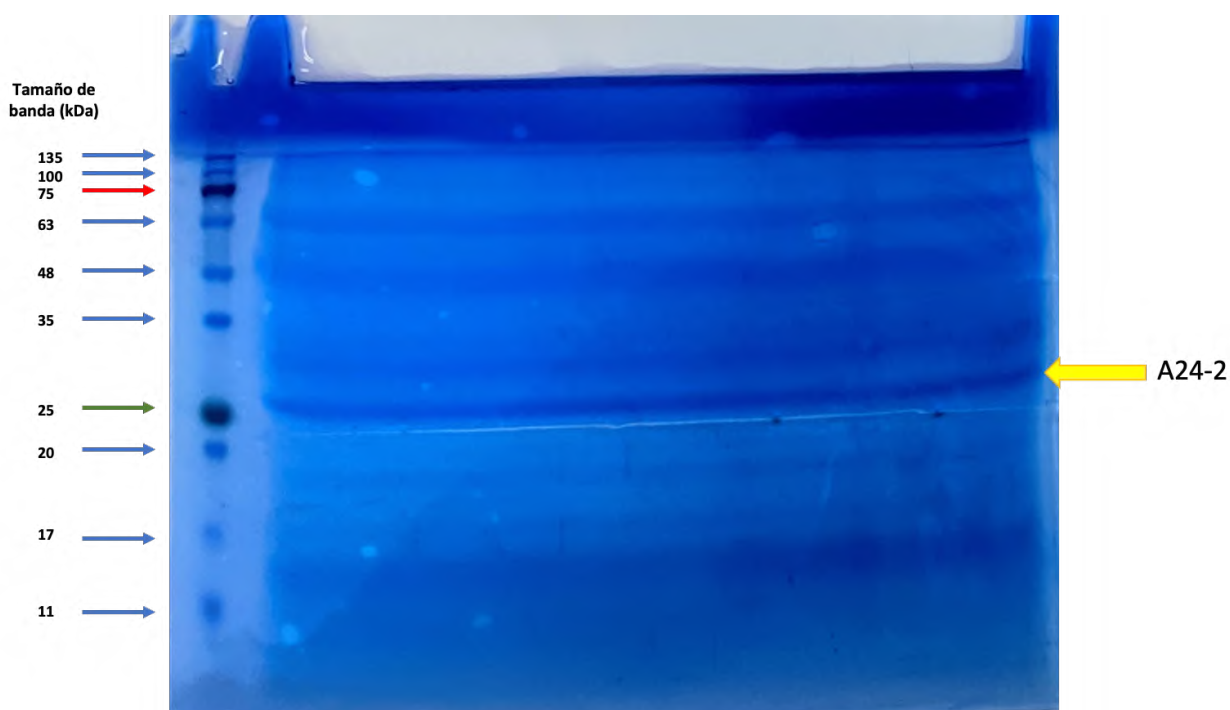


Figura 10. Perfil electroforético del cristal proteico de la cepa A24 de *Bacillus thuringiensis*. SDS-PAGE al 10%, la flecha amarilla muestra la banda de la proteína de interés contenida en el cristal de la cepa A24 y al costado izquierdo el marcador de peso molecular.

8.2 Ensayo de hemólisis

Para demostrar que la proteína A24-2 cumple con los criterios que establece el Comité de Clasificación y Nomenclatura de Parasporinas, y ser reconocida como una parasporina, se realizó la prueba de hemólisis (Aberkane *et al.*, 2019). Además, la actividad hemolítica de un compuesto, permite valorar aspectos de una molécula de interés terapéutico. Es por ello que se evaluó la capacidad hemolítica de la proteína A24-2 mediante la prueba de hemólisis utilizando glóbulos rojos humanos (HRBC) de sangre periférica.

La razón por la que la mayoría de investigaciones se llevan a cabo pruebas con eritrocitos de humanos, es porque son de las primeras células que tienen contacto con una sustancia al ser administrada vía intravenosa (Chubicka *et al.*, 2018). Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente gráfica (**Figura 11**).

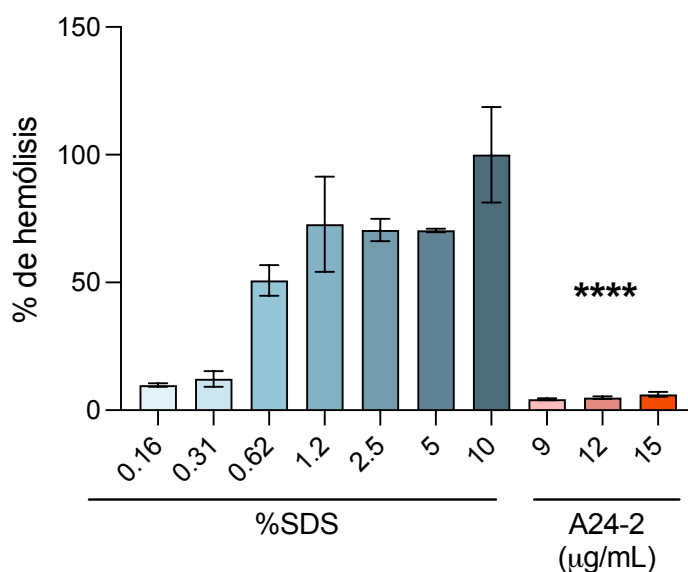


Figura 11. Actividad hemolítica de la inclusión proteica A24-2. Los resultados están expresados como el promedio del porcentaje de hemólisis $\pm$ DS, respecto al control positivo (SDS). Para la significancia estadística, se realizó una ANOVA de una vía y una prueba de Tukey. Los datos se expresaron como media $\pm$ DS. **** $p < 0.00001$ vs cualquier % SDS.

Los tratamientos para el ensayo de hemólisis fueron: **1)** la incubación con diferentes concentraciones de SDS como control positivo (0.16, 0.31, 0.62, 1.2, 2.5, 5, y 10%), que llevaron a un incremento de la hemólisis que presentó comportamiento dosis dependiente. Y **2)** tratamiento con las concentraciones 9, 12, 15 $\mu\text{g/mL}$ de la proteína A24-2, una por debajo de la IC_{50} (12 $\mu\text{g/mL}$) y otra encima de la misma. Ninguna de las concentraciones elegidas de la PS A24-2 causó lisis de los eritrocitos (**Figura 11**).

8.3 Ensayo de citotoxicidad de A24-2 en PBMC.

Se ha demostrado, que las parasporinas tienen efecto citotóxico específico sobre líneas celulares de origen canceroso, y no afecta a las células normales. Para comprobar que el nuevo lote de la proteína A24-2 producida y aislada, no tiene actividad citotóxica contra células normales, tal y como fue reportada por Castrejon, en (2020). Se realizó un ensayo de citotoxicidad en PBMC. Después de 24 horas de incubación con la proteína A24-2, el ensayo de MTT mostró que no hay reducción significativa de la viabilidad celular, respecto al control negativo, a diferencia de lo que se encontró con el control positivo SDS, en el que se ve una disminución significativa de la viabilidad celular. Por lo que, se concluye que la proteína A24-2 no muestra efecto citotóxico sobre líneas celulares no cancerosas (**Figura 12**).

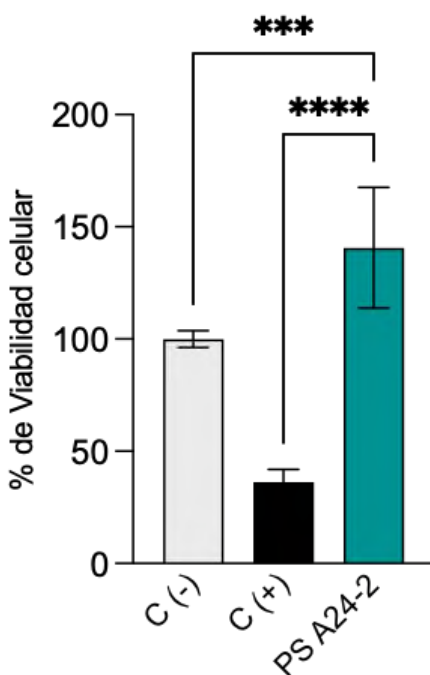


Figura 12. Actividad citotóxica sobre las CMSP. Los resultados son presentados como el porcentaje de la viabilidad $\pm$ DS para los controles y el tratamiento de PS a 12 $\mu\text{g/mL}$. Para la significancia estadística se realizó una ANOVA de una vía y una prueba de Tukey. *** $p < 0.0005$ vs control negativo (-) vs PS A24-2, **** $p < 0.00001$ vs control positivo (+) vs PS A24-2.

8.4 Ensayo de citotoxicidad en la línea celular MCF-7.

Anteriormente la IC_{50} reportada por Castrejon, en el (2020), se probó y verificó en este ensayo. Los resultados de citotoxicidad de la parasporina A24-2 (**Figura 13**), demostraron que esta sí tiene un efecto citotóxico sobre la línea celular de cáncer de mama MCF-7 (**Figura 13**). El porcentaje de inhibición de la viabilidad alcanzado fue del $43.79\% \pm 5.043\%$, con respecto al control negativo (medio DMEM), un resultado esperado dado que se usó la concentración media inhibitoria reportada por Castrejon-Arroyo (2020).

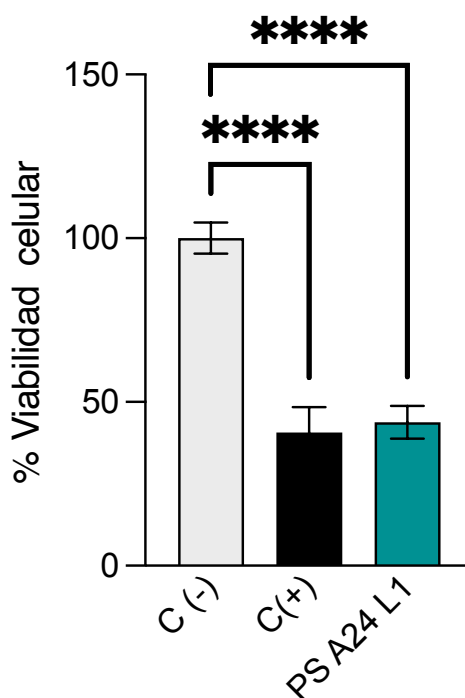


Figura 13. Ensayo de citotoxicidad de la parasporina A24-2 en MCF-7. Los resultados se presentan como porcentaje de viabilidad, expresados como media $\pm$ y desviación estándar (SD) para el tratamiento con PS A24-2 a 12 $\mu\text{g/mL}$ y controles. Para la significancia estadística se realizó una ANOVA de una vía y una prueba de Tukey, **** $p < 0.00001$ vs control negativo DMEM(-) vs PS A24-2 y control negativo vs control positivo SDS al 10% (+).

8.5 Estandarización y seguimiento del crecimiento de la formación de colonias en agar noble.

Una de las características de la línea celular MCF-7, es la capacidad de formación de colonias a partir de una sola célula (Comşa *et al.*, 2015), por lo tanto, el ensayo de formación de colonias es útil para determinar la capacidad de un compuesto de inhibir la formación de un nuevo tumor. Sin embargo, es necesario estandarizar las condiciones de cultivo en cada laboratorio. Las condiciones mas importantes son el tipo de andamio celular que se usará, así como el número de células a trabajar (sembrar). Las observaciones de crecimiento, proliferación y formación de

colonias también requieren ser estandarizadas. En la primera imagen día 1 de cultivo (**Figura 14a**), se observa la dispersión de las células sobre agar noble (**Figura 14a**). Cuatro días después, no se ven cambios en el número de células (**Figura 14b**). En la **Figura 14c** el recuadro al centro de la micrografía, se muestra una colonia al día 14 post siembra. En tanto que, en la **Figura 14d** se observan las colonias amplificadas 10 veces a los 14 días de incubación.

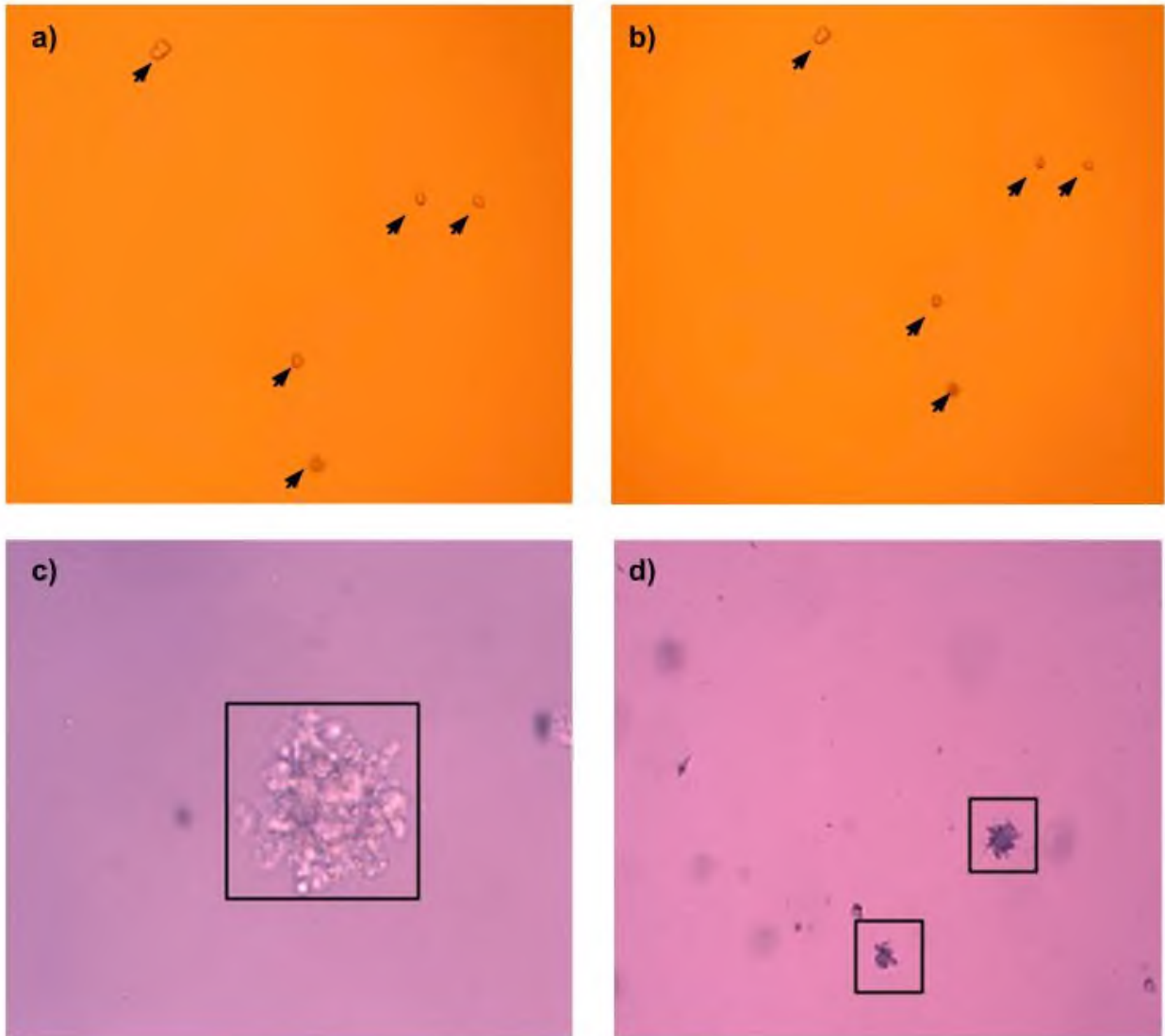


Figura 14. Seguimiento del crecimiento y formación de colonias en agar noble en MCF-7. a) Día 1. b) Día 4. c) Día 10. d) Día 14. Fotografías tomadas bajo microscopio invertido a 4X, 4X, 20X y 10X respectivamente.

El agar noble como sistema de andamiaje, permitió que la técnica se desarrollara adecuadamente para el crecimiento de las colonias. El desarrollo de las colonias fue muy similar a lo observado con la agarosa. Las colonias se observaron bien definidas e incluso se logró ver algunas células migrando fuera de la colonia (**Figura 15a**). Sin embargo, los tiempos de formación de la colonia fueron más prolongados a los obtenidos con la agarosa; al ser mas suave el polímero requirió mayor cuidado. En cuanto al desarrollo de la colonia, su crecimiento fue de forma centrada, su progeso de la célula inicial fue creciendo y formando racimos (**Figura 15b**). El diámetro de la colonia en promedio fué de 12564.26 μm y 7183622.26 μm^2 de área (**Figura 15c**). Se muestra la colonia ya teñida con cristal violeta junto con la medición del perímetro (2967.84 μm), área (62444.05 μm^2) y diámetro (913.05 μm y 738.07 μm) en forma vertical y horizontal respectivamente (**Figura 15d**) utilizando el programa Motic Images Plus 2.0, enfocando una colonia por una, con las herramientas del programa se ajustaron los parámetros de enfoque y saturación de imagen, para determinar horizontal y verticalmente el perímetro y por ende el área correspondiente delimitando el contorno (**Figura 15d**).

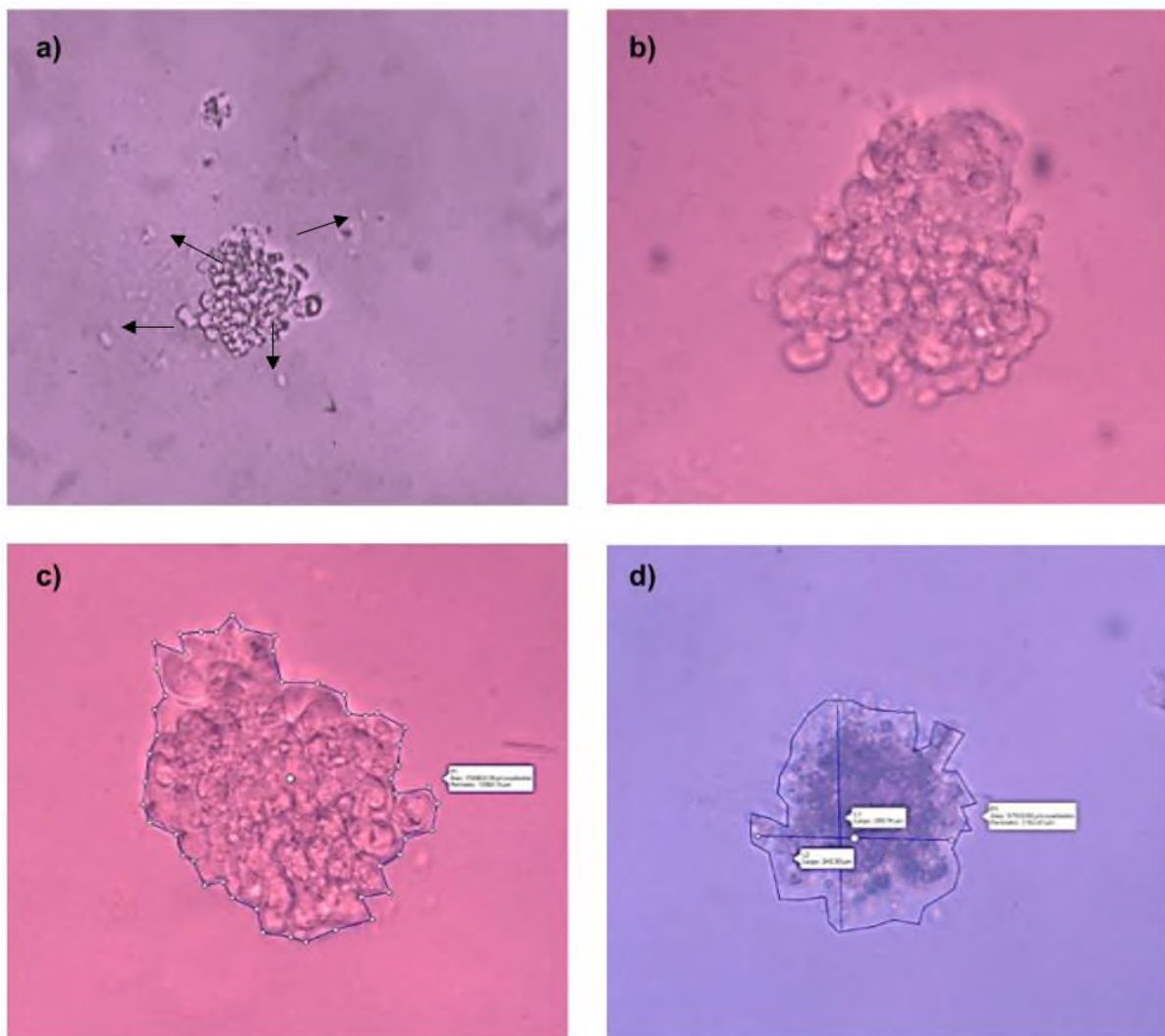


Figura 15. Seguimiento de la formación de colonias en agar noble en la línea celular MCF-7. a) Día 15. **b)** Día 17. **c)** Día 21. **d)** Día 21. Fotografías tomadas bajo microscopio invertido a 20X.

La siguiente fotografía fue tomada bajo el microscopio invertido a 20X, se muestra la colonia ya teñida con cristal violeta y la medición del perímetro (2967.84 μm), área (62444.05 μm^2) y diámetro (913.05 μm , 738.07 μm) en forma vertical como horizontal respectivamente (**Figura 16**).

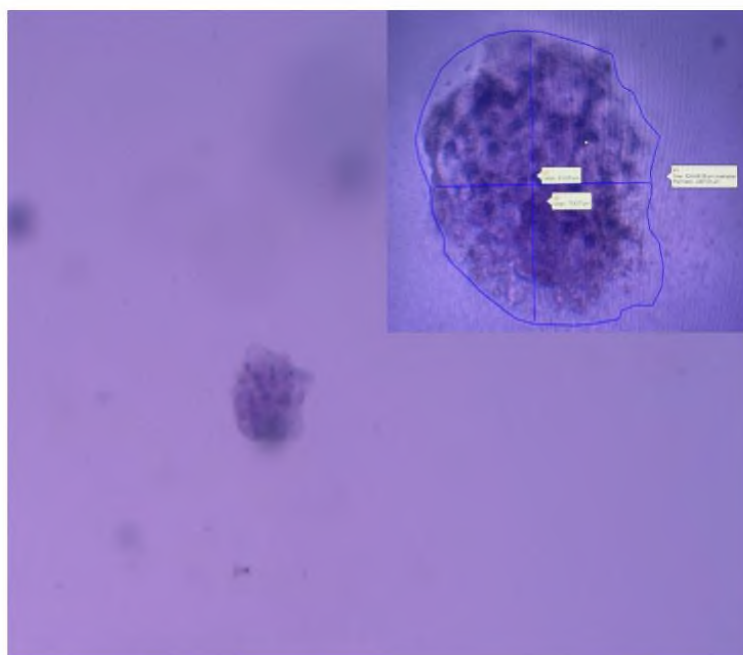


Figura 16. Colonia formada al día 21 en agar noble. El recuadro superior de la derecha se muestra un acercamiento de la colonia formada después de 21 días. Fotografía tomada a 20X.

El seguimiento de la formación de colonia forma parte del proceso de estandarización sobre los andamios de agar noble. En las imágenes se observó el crecimiento celular (**Figura 14b**) y la migración (**Figura 15a**), procesos que están involucrados en la formación de tumor in vivo. El ensayo tuvo una duración total de 21 días, la aplicación de tratamiento con PS se llevó a cabo cada dos días, el volumen fue variado dependiendo el día de aplicación tomando en cuenta el día de la semana para evitar la desecación del medio de cultivo, se tomaron fotografías a diferentes aumentos. Para cuantificar el ensayo se realizaron mediciones del tamaño de las colonias para detener el progreso de formación de tumor y por ende el ensayo cuando las colonias llegan a tener un área de 70 μm aproximadamente.

8.6 Estandarización de la formación de colonias en agarosa.

Se realizó también la estandarización de formación de colonias en agarosa para comparar con el método anterior y desarrollar el método que se adaptara mejor a las condiciones de trabajo y cultivo. Donde se muestran el crecimiento, proliferación y formación de tumor de la línea celular MCF-7.

En la primera figura se observa el cultivo inicial de las células dispersas (**Figura 17a**). Se observaron el crecimiento y la proliferación celular mediante la formación de colonia en forma granular y circular (**Figura 17b**). En la fase final del ensayo, se observaron colonias formadas en forma circular y granular (**Figura 17c**).

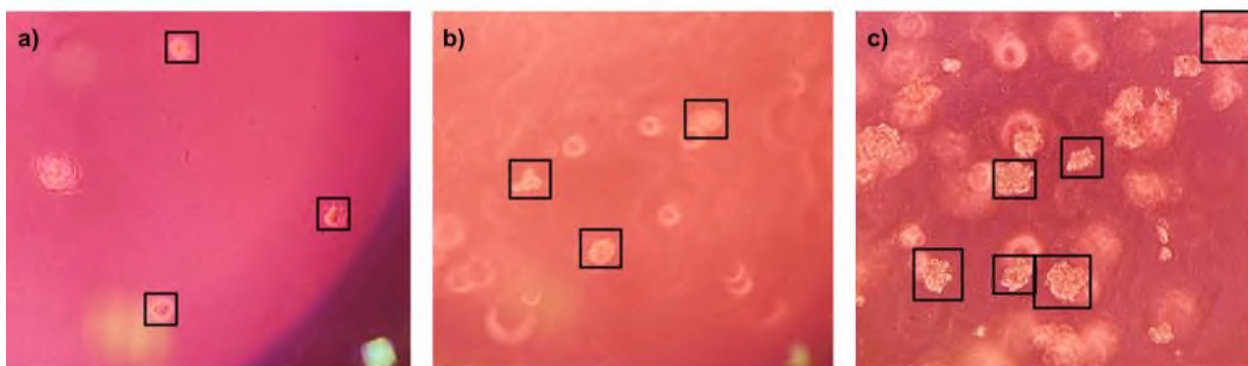


Figura 17. Seguimiento de la formación de colonias en agarosa al 5% en la línea celular MCF-7.

a) Día 1. b) Día 5. c) Día 19. Fotografías tomadas bajo microscopio invertido a 20X respectivamente.

8.7 Ensayo de formación de colonias en agarosa al 5% en MCF-7 con la parasporina A24-2.

Para el ensayo de formación de colonias con el tratamiento correspondiente con la PS A24-2, se optó por el ensayo en agarosa al 5%, debido a que en este ensayo el manejo de la agarosa a condiciones establecidas, permiten la estabilidad del medio de cultivo, la polimerización de la agarosa es un poco más lenta y gradual, por su consistencia densa permite una mejor adición de medio y de tratamiento con la PS A24-2 posterior al cultivo, aunque técnicamente ambos generan los mismos resultados.

Posterior al cultivo de las células se realizaron los tratamientos durante un periodo de 21 días. El volumen utilizado de la proteína se calculó para agregar la concentración de la IC₅₀ ya reportada por (Castrejon, 2020). Utilizando el cálculo de la concentración de la proteína obtenida en los lotes producidos, que fué de 329.0625 µg/mL, de acuerdo a esto se realizaron los cálculos correspondientes de volumen y concentración de la PS A24-2 (7.293 µL, 12 µg/mL) hasta concluir el ensayo al día 21. Como control negativo (-) se utilizó el medio DMEM suplementado en 5 pozos, y los tratamientos con la parasporina A24-2 se colocaron en 4 pozos en una placa de cultivo de 12 pocillos.

A continuación, se observan el cultivo inicial de las células MCF-7 tratadas con PS A24-2 y su dispersión al momento de plaquear (**Figura 18a**). Se observó también el crecimiento y la proliferación mediante la formación de colonia en forma granular y circular (**Figura 18b**). Al término de los 20 días de la fase de crecimiento de las colonias, se observan colonias formadas con forma circular y alargadas con aspecto granular (**Figura 18c**).

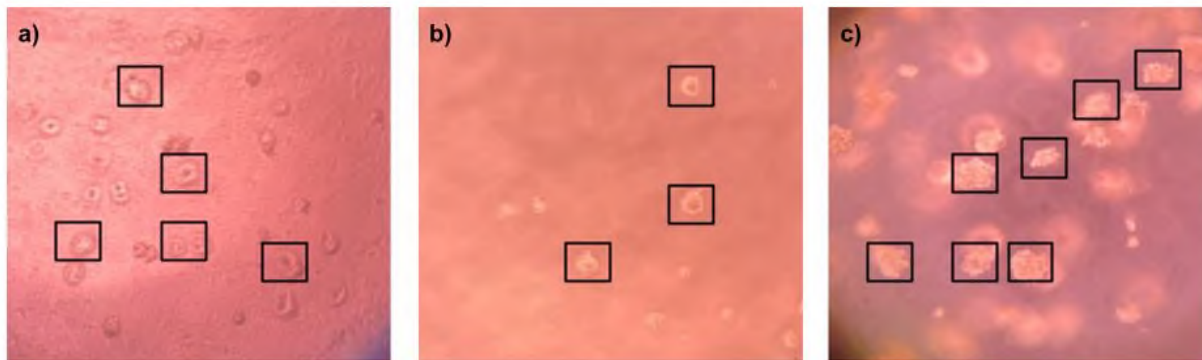


Figura 18. Seguimiento, desarrollo y formación de colonias en agarosa al 5% en MCF-7. a) Día 1. b) Día 5. c) Día 19. Fotografías tomadas bajo microscopio invertido a 20X.

Pasado el tiempo de formación de colonias de las células MCF-7 tratadas con la PS A24-2, estas fueron teñidas con cristal violeta, las imágenes fueron procesadas en el software Image J para cuantificar las colonias con un área aproximado de 70 µM para su posterior análisis estadístico.

8.7.1 Análisis estadístico del ensayo de formación de colonias en agarosa al 5% de células MCF-7 tratadas con PS A24-2.

En la **Figura 19**, se muestra la cuantificación del número de colonias formadas después de 21 días de mantenimiento del cultivo, así como el efecto de la parasporina A24-2 sobre la capacidad de formación de colonias en células MCF-7. Como se puede observar, hay una disminución del número de colonias formadas con el tratamiento con la parasporina A24-2 con respecto al control negativo medio DMEM (-). No obstante, las colonias formadas durante el tratamiento con la parasporina A24-2. La simbología que se encuentra en la desviación estándar hacen referencia a cada una de las medias de los tres experimentos realizados.

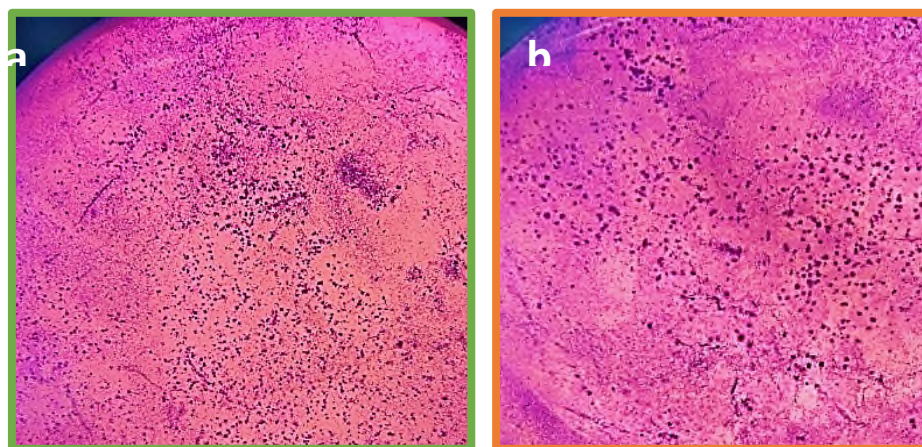
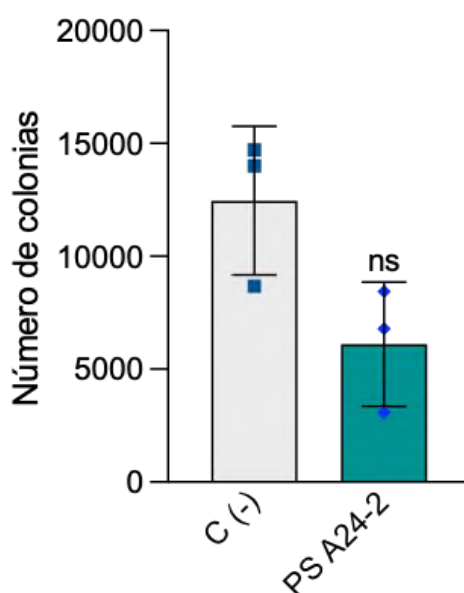


Figura 19. Crecimiento y formación de colonias de células en agarosa con MCF-7. a) control (-) DMEM y **b)** tratadas con parasporina A24-2 (12 µg/mL), no significativo (ns).

9. DISCUSIÓN.

El ensayo de formación de colonias es una técnica cuantitativa que evalúa la capacidad de una sola célula cancerosa para dividirse y formar una nueva colonia. La actividad clonogénica es un indicador de la presencia de células troncales de origen canceroso (Rajendran y Jain, 2018). En 2018 GLOBOCAN realizó una serie de estudios en tipos de cáncer con un alto índice de mortalidad, observando que todos ellos se caracterizaban por la presencia de un gran número de células troncales de origen canceroso, también conocidas como células iniciadoras de tumor, que hoy se sabe que son las responsables de la metástasis y la tumorigénesis (Bray *et al.*, 2018; Phi *et al.*, 2018). La selección natural en los tumores, al igual que la selección en los organismos, se produce mediante la competencia por el espacio y los recursos (Klein CA., 2009; Malaise *et al.*, 1973). La red de señalización bioquímica y biomecánica, son fundamentales en las interacciones célula-célula y célula-matriz, e influyen en el crecimiento, la migración y la diferenciación celular, además de servir como reservorio de citocinas y factores de crecimiento que son moléculas con actividad importante en el proceso metastásico y tumorigénico (Lepucki *et al.*, 2022; Méndez-García *et al.*, 2019). En el cáncer de mama, como en otros tipos de cáncer, la proliferación celular descontrolada lleva a la formación de tumores. Estos tumores pueden desarrollarse en diferentes áreas de la mama, sin embargo, el cáncer ductal es el más común (Nava-Castro *et al.*, 2014). Pacientes con un tumor primario de mama, tienen una tasa de supervivencia a cinco años del 99%, mientras que cuando se tienen tumores metastásicos, esta tasa disminuye hasta un 23% (Siegel *et al.*, 2012). Es importante mencionar, que existen de 2 a 6 veces mayor probabilidad de desarrollar un segundo tumor en la misma zona de la mama, que la probabilidad de desarrollar un tumor primario (Chen *et al.*, 1999). De ahí la importancia de encontrar nuevas moléculas antineoplásicas, que tengan actividad antitumoral y antimetastásica. En este sentido, la parasporina A24-2 ha demostrado tener actividad citotóxica contra la línea celular MCF-7 (**Figura 14**), sin embargo, no se conocía si la parasporina A24-2 posee las actividades antitumorigénica y antimetastásica. Por lo que, en este trabajo, se tuvo como meta principal evaluar si el péptido A24-2 es capaz de inhibir la capacidad formación de tumores en las células MCF-7. Para ello, inicialmente fue necesario establecer o estandarizar las condiciones del ensayo clonogénico o de formación de colonias con la línea celular MCF-7. Como se sabe, entre los factores que pueden afectar este tipo de ensayo, están aquellos relacionados con el modelo celular (principalmente la

velocidad de proliferación celular y la capacidad de formar colonias del tipo de célula a utilizar, además el tipo de soporte celular usado (la mecánica del material empleado). También están aquellos factores relacionados con las propiedades fisicoquímicas de la parasporina A24-2, principalmente la facilidad para difundir a través del andamio celular (biodisponibilidad) (Mostafa *et al.*, 2022; Rafehi *et al.*, 2011). En este trabajo, se evaluaron dos tipos de andamios celulares, la agarosa y el agar noble, este último es el más usado en los ensayos de formación de colonias. El ensayo de agar noble es una herramienta ideal para probar los efectos de nuevos compuestos sobre la proliferación y migración celular. Además permite la evaluación cuantitativa de la transformación celular, desde el punto de vista de la genética celular (Horibata *et al.*, 2015). Es decir, permite establecer un parámetro de toxicidad más eficiente de la viabilidad celular, ya que en el proceso de la formación de colonias se desarrolla durante el estado proliferativo de las células, por lo tanto, son más susceptibles a los efectos tóxicos. Por otro lado, el uso de la agarosa en los ensayos de formación de colonias es menos frecuente, sin embargo, también es útil en este tipo de ensayos. De hecho, Hosaka y Cols en (1986), describen que el uso de la agarosa es más práctica y visualmente ofrece mayor resolución durante la cuantificación, además de ofrecer mejor difusión del compuesto. Dichas las virtudes fueron detectadas después del proceso de estandarización, por lo cual se decidió usar la agarosa como sistema de soporte celular en este trabajo (**Figura 19**). Destacando que se pudo ver la morfología de las colonias con mayor nitidez en comparación con el agar noble (**Figura 15**).

Los resultados del ensayo de formación de colonias (**Figura 20**), demostraron que la parasporina A24-2 disminuye la capacidad tumorigénica de las células MCF-7, sin embargo, dicha inhibición no alcanzó una diferencia estadísticamente significativa, debido a la dispersión de los datos en cada experimento. En este contexto, hay que considerar varios aspectos que son fundamentales que pueden influir en los resultados del ensayo, Braselmann y Cols (2015), destacan la importancia de sembrar del mismo número células en cada ensayo, que justamente va de la mano de un conteo adecuado de células y de un correcto proceso de tripsinización, cuando se trata de células adherentes (como es el caso de las células MCF-7), si esta serie de pasos no se realizan bien, pueden conducir a que los datos tengan una gran dispersión tal y como se observó en este trabajo. Otro aspecto a considerar es la heterogeneidad de la población celular, independientemente de si se trata de una línea celular. Esto es porque que no todas las células

MCF-7 tendrán el mismo comportamiento biológico, es decir, no todas las células tendrán la capacidad de formar un tumor, a partir de una sola célula. Lorsch JR y Cols en el (2024), mencionan que una de las grandes problemáticas de las líneas celulares es la inestabilidad genómica, esto significa que la reproducibilidad de los resultados en muchas ocasiones puede verse afectada, principalmente por la expresión de algunos genes puede variar incluso, entre células de un mismo lote. Este fenómeno se ha descrito que ocurre marcadamente en la línea celular MCF-7 y en general en las células de cáncer de mama (Lorsch *et al.*, 2014; Lee *et al.*, 2015). Esta heterogeneidad podría alterar también, el número de colonias formadas, la morfología de las mismas, y su tamaño. Finalmente, el ensayo de formación de colonias implica cultivar a las células en una capa de agarosa suave o blanda, mezclada con medio de cultivo que descansa sobre otra capa de agarosa blanda, generando un microambiente que solo permite que aquellas células capaces de adaptarse a este ambiente, crezcan y se dividan, generando una colonia. El tipo de microambiente dependerá de la concentración y/o del grosor de la segunda capa de agarosa, de estos dos factores dependerá la difusión del oxígeno, de los nutrientes del medio y de la disponibilidad del compuesto a evaluar (Rafehi *et al.*, 2011). Es bien sabido que las colonias de células cancerosas son de mayor tamaño en una atmósfera con baja presión de oxígeno (3-5%) (Richter *et al.*, 1972; Courtenay, 1976, 1984). Todos los anteriores, son factores que pudieron haber contribuido con la dispersión estadística de los resultados de los 3 ensayos independientes de formación de colonias, por lo que se propone un aumento en el número de ensayos para estudios posteriores.

Los resultados, sugieren que la parasporina A24-2 disminuye el número de colonias formadas por la línea celular MCF-7. Es importante destacar que este es el primer trabajo que demuestra que una parasporina inhibe la actividad tumorigénica de una línea celular de cáncer. Existen un gran número de factores que promueven que las células de cáncer de mama MCF-7 invadan y formen un nuevo tumor (Mahalingaiah y Singh, 2014; Lester *et al.*, 2005; Chan *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2013). No obstante, se ha propuesto que uno de los mecanismos acción que siguen las parasporinas para causar daño selectivo sobre las células cancerosas es a través de la unión a un receptor de membrana (Brasseur *et al.*, 2015). Una hipótesis es que A24-2 se une a algún receptor clave del proceso tumorigénico, inhibiendo así la formación de colonias. Dentro de los receptores que se sabe de su participación clave con la tumorigénesis están el receptor P2 (P2Y) que es

activado por ATP, y subsecuentemente, y que induce la migración de células de cáncer de mama, a través la estimulación de la vía de señalización dependiente de MEK-ERK1/2; el receptor de factor de crecimiento β , en otros (Chadet *et al.*, 2014; Nava *et al.*, 2002; Rosman *et al.*, 2008; Liao *et al.*, 2014; Ortiz-Montero *et al.*, 2017). Si bien los resultados encontrados demuestran que la parasporina A24-2 tiene un efecto inhibitorio sobre la capacidad formadora de colonias en las células de cáncer de mama MCF-7, también es necesario fortalecer dichos resultados, tanto con el incremento el número de ensayos como, haciendo una evaluación a nivel molecular de algunos de las vías involucradas en el proceso tumorigénico, tal como FOXO, YAP y la antes mencionada MEK-ERK1/2, todas ellas involucradas en el proceso de invasión y formación de tumor en el cancer de mama (Ye *et al.*, 2019; Sharif *et al.*, 2015; Nava *et al.*, 2002).

En la actualidad, los fármacos que inhiben específicamente el propio proceso metastásico aún no han tenido un impacto clínico. Hay tres direcciones especialmente para este tipo de terapias, que suelen seguir los pasos de la cascada metastásica: **a)** inhibir o bloquear la diseminación metastásica, **b)** impedir el crecimiento de células cancerosas diseminadas y micro metástasis, y por último **c)** destruir las células cancerosas en las metástasis establecidas. La aplicación de cada tipo de terapia dependerá del grado de avance en la metástasis en los pacientes. Teniendo en cuenta estas tres posibilidades, los modelos preclínicos de metástasis pueden ayudar a descubrir vías novedosas y probar posibles terapias para esta neoplasia (Hebert *et al.*, 2023). Sin embargo, no hay terapias que valoren o evalúen la capacidad de inhibir la tumorigénesis con parasporinas. Los péptidos naturales están cobrando relevancia como nuevas estrategias terapéuticas contra patologías como el cáncer (Eghtedari *et al.*, 2021).

En conclusión, la comunicación de las células cancerosas invasoras con el microambiente del tumor permite que superen los desafíos del estroma, se asienten y colonicen. Estas características de las células cancerosas están impulsadas por modificaciones genéticas y epigenéticas en las células tumorales, el desarrollo de nuevas estrategias para el tratamiento contra el cáncer, específicamente contra el cáncer de mama ha sido tema de investigación desde largo tiempo, si bien existe una escasez de terapias específicas para las células en metástasis en estado latente, también es evidente que un gran número de pacientes que reciben un tratamiento excesivo con fármacos a combinados que son ineficaces o completamente innecesarios para la recaída en cáncer (Ganesh y Massague, 2021).

Finalmente, los resultados de este trabajo adquieren relevancia dado que es la primera vez que se reporta el efecto inhibitorio de la formación colonias por parte de una parasporina en el cáncer de mama; además se fortalece su potencial uso con agente terapéutico contra el cáncer.

10. CONCLUSIONES

- De los sistemas de soportes celulares evaluados para la estandarización el método de formación de colonias, el que ofreció mejores resultados en términos de visualización de la colonia, fue el de agarosa al 5%.
- La parasporina A24-2 provocó una disminución en el número de colonias de las células MCF-7 aunque fue no significativo estadísticamente. Este resultado es de gran relevancia ya que es la primera vez que se reporta esta propiedad para una parasporina.
- Finalmente, los bioensayos de citotoxicidad y hemólisis, se demuestra que la proteína A24-2 es una parasporina.

11. PERSPECTIVAS.

- Incrementar el número de ensayos que permitan fortalecer los resultados obtenidos en este trabajo.
- Analizar molecularmente las vías de señalización involucradas en la tumorigénesis, con el fin de determinar detalladamente el mecanismo de acción de la parasporina A24-2.
- Se propone una mezcla de dos o más parasporinas de la misma cepa de *Bacillus thuringiensis*, esto con la finalidad de aumentar la actividad anti proliferativa sobre las células tumorales, o determinar si alguna tiene un efecto significativo ante esta propiedad de que una célula pueda formar un tumor.

12. REFERENCIAS.

- Abe, Y., Inoue, H., Ashida, H., Maeda, Y., Kinoshita, T., Kitada, S. (2017). Glycan region of GPI anchored-protein is required for cytosidal oligomerization of an anticancer parasporin-2, Cry46Aa1 protein, from *Bacillus thuringiensis* strain 3. J. Invertebr. Pathol. 142, 71–81.
- Aizawa, K., Shigetane, I., Ishiwata: His discovery of sotto-kin (*Bacillus thuringiensis*) in 1901 and subsequent investigations in Japan. In: Proceedings of a Centennial Symposium Commemorating Ishiwata's Discovery of *Bacillus thuringiensis*. Ohba M, Nakamura O, Mizuki E and Akao T (eds.). pp. 1-14, 2001.
- Ajani, J.A., Song, S., Hochster, H.S., & Steinberg, I.B. (2015). Cancer stem cells: the promise and the potential. In Seminars in oncology (Vol. 42, pp. S3-S17). WB Saunders.
- Akiba, T., & Okumura, S. (2016). Parasporins 1 and 2: Their structure and activity. J. Invertebr. Pathol. 142, 44–49.
- Akiba, T., & Okumura, S. (2017). Parasporins 1 and 2: their structure and activity, Journal of Invertebrate Pathology, 142: 44–49.
- Akiba, T., Abe, Y., Kitada, S., Kusaka, Y., Ito, A., Ichimatsu, T., Katayama, H., Akao, T., Higuchi, K., Mizuki, E., *et al.* (2009). Crystal structure of the parasporin-2 *Bacillus thuringiensis* toxin that recognizes cancer cells. J. Mol. Biol., 13, 121–133.
- Ammons, D. R., Short, J. D., Bailey, J., Hinojosa, G., Tavaréz, L., Salazar, M., & Rampersad, J. N. (2016). Anti-cancer parasporin toxins are associated with different environments: discovery of two novel parasporin 5-like genes. Current microbiology, 72 (2), 184-189.
- Arvelo, F., & Poupon, M. F. (2001). Aspectos moleculares y celulares de la metástasis cancerosa. *Acta Cient Venez*, 52(4), 304-12.
- Bera, K., Kiepas, A., Godet, I., Li, Y., Mehta, P., Ifemembi, B., ... & Konstantopoulos, K. (2022). Extracellular fluid viscosity enhances cell migration and cancer dissemination. *Nature*, 611(7935), 365-373.
- Boncler, M., M. Różalski, U. Krajewska, A. Podśędek C. Watala. 2014. Comparison of Presto Blue and MTT assays of cellular viability in the assessment of antiproliferative effects of plant extracts on human endothelial cells. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 69: 9–16.

- Borowicz, S., Van Scoyk, M., Avasarala, S., Karuppusamy Rathinam, M.K., Tauler, J., Bikkavilli, R.K., Winn, R.A. The Soft Agar Colony Formation Assay. J. Vis. Exp. (92), e51998, doi:10.3791/51998 (2014).
- Braselmann, H., Michna, A., Heß, J., & Unger, K. (2015). CFAssay: statistical analysis of the colony formation assay. Radiation oncology, 10, 1-6.).
- 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.).
- Bravo, A., Soberón, M., & Gill, S.S. (2005). *Bacillus thuringiensis* mechanisms and use. In: Comprehensive Molecular Insect Science, Volume 6. Gilbert LI, Iatrou K and Gill SS (eds.). New York: Elsevier, pp. 175-206.
- 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-México. *Advances in Biological Chemistry*, 5(07), 293.
- Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. (2018). Global cancer statistics 2018: globocan estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA Cancer J Clin. 68:394–424.
- Castrejon, K. (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, UNPA. México.
- Chadet, S., Jelassi, B., Wannous, R., Angoulvant, D., Chevalier, S., Besson, P., & Roger, S. (2014). The activation of P2Y2 receptors increases MCF-7 breast cancer cells migration through the MEK-ERK1/2 signalling pathway. Carcinogenesis, 35(6), 1238-1247.
- Chaffer, C. L., & Weinberg, R. A. (2011). A perspective on cancer cell metastasis. Science 331, 1559–1564.
- Chan, S. W., Lim, C. J., Guo, K., Ng, C. P., Lee, I., Hunziker, W., ... & Hong, W. (2008). A role for TAZ in migration, invasion, and tumorigenesis of breast cancer cells. Cancer research, 68(8), 2592-2598.

- Chen, Q., Boire, A., Jin, X., Valiente, M., Er, E. E., Lopez-Soto, A., Jacob, L., Patwa, R., Shah, H., Xu, K., Cross, J. R., & Massagué, J. (2016). Carcinoma-astrocyte gap junctions promote brain metastasis by cGAMP transfer. *Nature*, 533(7604), 493–498. <https://doi.org/10.1038/nature18268>.
- Chen, Y., Thompson, W., Semenciw, R., & Mao, Y. (1999). Epidemiology of contralateral breast cancer. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 8(10), 855-861.).
- Chubicka, T; Girija, D; Deepa, K; Salini, S; Meera, N; Raghavamenon AC; Divya, MK; & Babu, TD. (2018). A parasporin from *Bacillus thuringiensis* native to peninsular India induces apoptosis in cancer cells through intrinsic pathway. *Journal of Biosciences*, 43 (2), 407-416.
- Cleator, S., Heller, W., & Coombes, R.C. (2007). Triple-negative breast cancer: therapeutic options, *The Lancet Oncology*, 8.3: 235–244.
- Comşa, Ş., Cimpean, A. M., & Raica, M. (2015). The story of MCF-7 breast cancer cell line: 40 years of experience in research. *Anticancer research*, 35(6), 3147-3154.
- Crickmore, N., Zeigler, D.R., Schnepf, E., Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Bravo, A., & Dean, D.H. (2020). *Bacillus thuringiensis* Toxin Nomenclature. Available online: http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/ (accessed on 3 April 2020).
- Crowley, C., Christensen, E., & Waterhouse, J. (2017). Measuring Survival of Adherent Cells with the Colony-Forming Assay. Translational Research Institute, Woolloongabba, Brisbane, Queensland 4102, Cold Spring Harb Protoc; doi: 10.1101/pdb.prot087171.
- Crowley, L.C., & Waterhouse, N.J. (2015a). Measuring survival of hematopoietic cancer cells with the colony-forming assay in soft agar. *Cold Spring Harb Protoc* doi: 10.1101/pdb.prot087189.
- Crowley, L.C., & Waterhouse, N.J. (2015b). Triggering death of adherent cells with ultraviolet radiation. *Cold Spring Harb Protoc* doi: 10.1101/pdb .prot087148.
- Cruz-Nolasco, A. (2014). Aislamiento e identificación de cepas de *Bacillus thuringiensis* productoras de proteína Cry. Tesis de Licenciatura. Universidad del Papalopan, México.
- Dale, M. M., Flower, R. J., Rang, H. P., & Ritter, J. M. (2008). Rang y Dale: farmacología (No. 615). Elsevier.

- Davalos, A.R., Coppe, J.P., Campisi, J., & Desprez, P.Y. (2010). Senescent cells as a source of inflammatory factors for tumor progression. *Cancer Metastasis Rev* 29: 273–283.
- De Leeuw, R., Berman-Booty, L.D., Schiewer, M.J., Ciment, S.J., Den, R.B., Dicker, A.P., & Knudsen K.E. (2015). Novel actions of next-generation taxanes benefit advanced stages of prostate cancer, *Clinical Cancer Research*, 21(4): 795–807.
- Dirección General de Información en Salud (DGIS) (2020). Egresos hospitalarios sectorial, 2017. Recuperado de: https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2021/cancer2021_Nal.pdf.
- Eghtedari, M., Jafari Porzani, S., & Nowruzi, B. (2021). Anticancer potential of natural peptides from terrestrial and marine environments: A review. In *Phytochemistry Letters* (Vol. 42, pp. 87–103). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2021.02.008>.
- Fares, J., Fares, M. Y., & Fares, Y. (2019). Immune checkpoint inhibitors: Advances and impact in neuro-oncology. *Surgical Neurology International*, 10.
- Franco-Molina, M.A., Mendoza-Gamboa, E., Roman-Calderon, M.E., Zapata-Benavides, P., Rivera-Morales, L.G., Zapata-Monsivais, L., Coronado-Cerda, E.E., Sierra-Rivera, C.A., Tamez-Guerra, R., & Rodriguez-Padilla, C. (2016) In vitro antitumoral activity of soluble protein extracts of *Bacillus thuringiensis*. *Afr J Microbiol Res* 10:324–329. doi:10.5897/AJMR2015.7551.
- Ganesh, K., & Massague, J. (2021). Targeting metastatic cancer. *Nature medicine*, 27(1), 34-44.
- Gao, X. L., Zhang, M., Tang, Y. L., & Liang, X. H. (2017). Cancer cell dormancy: mechanisms and implications of cancer recurrence and metastasis. *OncoTargets and therapy*, 10, 5219.
- Glare, T.R. & O'Callaghan, M. (2000). *Bacillus thuringiensis*: Biology, Ecology and Safety. Chichester, John Wiley, p. 350,.
- González, E., Granados, J.C., Short, J.D., Ammons, D.R., & Rampersad, J.(2011). Parasporins from a Caribbean Island: Evidence for a Globally dispersed *Bacillus thuringiensis* strain. *Curr. Microbiol.* 62, 1643–1648.
- Gupta, G.P., & Massague, J. (2006). Cancer metastasis: building a framework. *Cell* 127, 679–695.

- Hayakawa, T., Kanagawa, R., Kotani, Y., Kimura, M., Yamagiwa, M., Yamane Y., Takebe, S., & Sakai, H. (2007) Parasporin-2Ab, a newly isolated cytotoxic crystal protein from *Bacillus thuringiensis*. *Curr Microbiol* 55:278–283. doi:10.1007/s00284-006-0351-8.
- Hazes, B. (1996). The (QxW)₃ domain: A flexible lectin scaffold. *Protein Sci.* 5, 1490–1501.
- Hebert, J. D., Neal, J. W., & Winslow, M. M. (2023). Dissecting metastasis using preclinical models and methods. *Nature Reviews Cancer*, 1-17.
- Horibata, S., Vo, T. V., Subramanian, V., Thompson, P. R., Coonrod, S. A. (2015). Utilization of the Soft Agar Colony Formation Assay to Identify Inhibitors of Tumorigenicity in Breast Cancer Cells. *J. Vis. Exp.* (99), e52727, doi:10.3791/52727.
- Hosaka, Y., Tsukamoto, T., & Lieber, M. M. (1986). Soft Agarose Colony Formation Assay for Human Renal cell Carcinoma: Comparison of Optical Colony Counting versus Tritiated Thymidine Incorporation. *The Journal of urology*, 136(5), 1102-1109.).
- Inouye, K., Okumura, S., & Mizuki, E. (2008). Parasporin-4, A Novel Cancer Cell-killing Protein Produced by *Bacillus thuringiensis*. *Food Sci. Biotechnol.* 17, 219–227.
- International Agency for Research on Cancer (CIRC/OMS2018) (2018). Le fardeau du cancer atteint 18,1 millions de nouveaux cas et 9,6 millions de décès par cancer en 2018. Communiqué de presse n°263. <https://www.iarc.fr/wpcontent/uploads/2018/09/pr263F.pdf>. Accessed 12 Sept 2018.
- Instituto de patología Alicante, (2017). Diagnóstico anatomopatológico de biopsias, patología quirúrgica y citologías: recuperado de: <http://ipalicante.com/cancer-de-mama/>.
- Ishiwata, S. (1901). On a kind of severe flacherie (sotto disease). *Dainihon Sanshi Kaiho* 114: 1-5.
- Ito, A., Sasaguri, Y., Kitada, S., Kusaka, Y., Kuwano, K., Masutomi, K., Mizuki, E., Akao, T., & Ohba, M.A. (2004). *Bacillus thuringiensis* crystal protein with selective cytotoxic action to human cells. *J Biol Chem* 279:21282–21286.
- Jung, Y.C., Mizuki, E., & Côte, J.C. (2007). Isolation and characterization of a novel *Bacillus thuringiensis* strain expressing a novel crystal protein with cytotoxic activity against human cancer cells. *J. Appl. Microbiol.* 103, 65–79.

- Karakus, F., Eyol, E., Yılmaz, K., & Ünüvar, S. (2018). Inhibition of cell proliferation, migration and colony formation of LS174T Cells by carbonic anhydrase inhibitor. *Afri Health Sci.* 18(4): 1303-1310. <https://dx.doi.org/10.4314/ahs.v18i4.51>.
- Katayama, H., Kusaka, Y., & Mizuki, E. (2011). Parasporin-1 Receptor and Use Thereof. U.S. Patent 20110038880 2011. 132.
- Katayama, H., Kusaka, Y., Yokota, H., Akao, T., Kojima, M., Nakamura, O., Mekada, E., & Mizuki, E. (2007). Parasporin-1, a novel cytotoxic protein from *Bacillus thuringiensis*, induces Ca²⁺ influx and a sustained elevation of the cytoplasmic Ca²⁺ concentration in toxin-sensitive cells. *J Biol Chem* 282:7742-7752.
- Kitada, S., Abe, Y., Maeda, T., & Shimada, H. (2009). Parasporin-2 requires GPI-anchored proteins for the efficient cytotoxic action to human hepatoma cells, *Toxicology*, 264(1-2): 80–88.
- Kitada, S., Abe, Y., Shimada, H., Kusaka, Y., Matsuo, Y., Katayama, H., Okumura, S., Akao, T., Mizuki, E., & Kuge, O. (2006). Cytotoxic actions of parasporin-2, an anti-tumor crystal toxin from *Bacillus thuringiensis*. *J. Biol. Chem.* 281, 26350–26360.
- Klein CA. (2009). Parallel progression of primary tumours and metastases. *Nat Rev Cancer.* Apr;9(4):302-12. doi: 10.1038/nrc2627. PMID: 19308069.
- Kotze, A.C., Grady, J.O., Gough, J.M., Pearson, R., Bagnall, N.H., Kemp, D.H., & Akhurst, R.J. (2005). Toxicity of *Bacillus Thuringiensis* to Parasitic and Free-Living Life-Stages of Nematode Parasites of Livestock. *Int. J. Parasitol.* 35, 1013–1022.
- Krishnan, V., Domanska, B., Elhigazi, A., Afolabi, F., West, M.J., & Crickmore, N. (2017). The human cancer cell active toxin Cry41Aa from *Bacillus thuringiensis* acts like its insecticidal counterparts. *Biochem. J.* 474, 1591–1602.
- Kuilman, T., Michaloglou, C., Mooi, W.J., & Peeper, D.S. (2010). The essence of senescence. *Genes Dev* 24: 2463–2479.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural protein during the assembly of head of the bacteriophage T4. *Nature* 227:680–685.
- Lee, A. V., Oesterreich, S., & Davidson, N. E. (2015). MCF-7 cells—changing the course of breast cancer research and care for 45 years. *Journal of the National Cancer Institute*, 107(7), djv073.

- Lepucki, A., Orlińska, K., Mielczarek-Palacz, A., Kabut, J., Olczyk, P., & Komosińska-Vashev, K. (2022). The role of extracellular matrix proteins in breast cancer. *Journal of Clinical Medicine*, 11(5), 1250.
- Lester, R. D., Jo, M., Campana, W. M., & Gonias, S. L. (2005). Erythropoietin promotes MCF-7 breast cancer cell migration by an ERK/mitogen-activated protein kinase-dependent pathway and is primarily responsible for the increase in migration observed in hypoxia. *Journal of Biological Chemistry*, 280(47), 39273-39277.
- Liang, X.H., Jackson S., Seaman, M., Brown, K., Kempkes, B., Hibshoosh, H., & Levine, B. (1999). Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature*, 402, 672–676.
- Liao, X. H., Lu, D. L., Wang, N., Liu, L. Y., Wang, Y., Li, Y. Q., ... & Zhang, T. C. (2014). Estrogen receptor α mediates proliferation of breast cancer MCF-7 cells via a p21/PCNA/E 2 F 1-dependent pathway. *The FEBS journal*, 281(3), 927-942.
- Lim, H. N., Baek, S. B., & Jung, H. J. (2019). Bee venom and its peptide component melittin suppress growth and migration of melanoma cells via inhibition of PI3K/AKT/mTOR and MAPK pathways. *Molecules*, 24(5), 929.
- Logan, N. (2005) *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and other aerobic endospore-forming bacteria. In: Topley & Wilson's Microbiology & Microbial Infections (Tenth Edition). Bacteriology. Borriello SP, Murray PR and Funke G (eds.). London: Hodder Arnold, pp. 922-952.
- Lorsch, J. R., Collins, F. S., & Lippincott-Schwartz, J. (2014). Fixing problems with cell lines. *Science*, 346(6216), 1452-1453.
- Mahalingaiah, P. K. S., & Singh, K. P. (2014). Chronic oxidative stress increases growth and tumorigenic potential of MCF-7 breast cancer cells. *PloS one*, 9(1), e87371.
- Malaise, E. P., Chavaudra, N., & Tubiana, M. (1973). The relationship between growth rate, labelling index and histological type of human solid tumours. *European Journal of Cancer* (1965), 9(4), 305-312.)
- Marqus, S., Pirogova, E., & Piva, T.J. (2017). Evaluation of the use of therapeutic peptides for cancer treatment, *Journal of Biomedical Science*, 24.1: 21.

- Martin, P., & Travers, R. (1989). Worldwide abundance and distribution of *Bacillus thuringiensis* isolates. *Appl Environ Microbiol* 55:2437-2442.
- Méndez-García, L. A., Nava-Castro, K. E., Ochoa-Mercado, T. D. L., Palacios-Arreola, M. I., Ruiz-Manzano, R. A., Segovia-Mendoza, M., ... & Morales-Montor, J. (2019). Breast cancer metastasis: are cytokines important players during its development and progression?. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 39(1), 39-55.
- 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 cytotoxic spectrum of *Bacillus thuringiensis* toxins: From insects to human cancer cells. *Toxins*, 12(5), 301.
- Menyhart O, Harami-Papp H, Sukumar S, Schafer R, Magnani L, de Barrios O, et al. Guidelines for the selection of functional assays to evaluate the hallmarks of cancer. *Biochim Biophys Acta*. 2016;1866:300–19. [PubMed] [Google Scholar].
- Minsalud (2020) Cáncer. Recuperado de: <https://www.minsalud.gov.co/salud/publica/PENT/Paginas/Prevenciondel-cancer.aspx>.
- Mizuki, E., Ohba, M., Akao, T., Yamashita, S., Saitoh, H., & Park, Y.S. (1999). Unique activity associated with non-insecticidal *Bacillus thuringiensis* parasporal inclusions: In vitro cell-killing action on human cancer cells. *J. Appl. Microbiol*, 86, 477–486.
- Mizuki, E., Park, Y.S., Saitoh, H., Yamashita, S., Akao, T., Higuchi, K., & Ohba, M. (2000). Parasporin, a human leukemic cell-recognizing parasporal protein of *Bacillus thuringiensis*. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 7, 625–634.
- Moshage H., B. Kok, J.R. Huizenga & P.L. Jansen. (1995). Nitrite and nitrate determinations in plasma: a critical evaluation. *Clinical Chemical*. 41(6 Pt 1):892-6.
- Mostafa Yusefi, Michiele Lee-Kiun Soon, Sin-Yeang Teow, Elaine Irene Monchouguy, Bibi Noorheen Haleema Mooneerah Neerooa, Zahra Izadiyan, Hossein Jahangirian, Roshanak Rafiee-Moghaddam, Thomas J. Webster, Kamyar Shameli (2022). Fabrication of cellulose nanocrystals as potential anticancer drug delivery systems for colorectal cancer treatment. *International Journal of Biological Macromolecules*, 199, 372-385.

- Nagamatsu, Y., Okamura, S., Saitou, H., Akao, T., & Mizuki, E. (2010). Three Cry toxins in two types from *Bacillus thuringiensis* strain M019 preferentially kill human hepatocyte cancer and uterus cervix cancer cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 74, 494–498.
- Nava, V. E., Hobson, J. P., Murthy, S., Milstien, S., & Spiegel, S. (2002). Sphingosine kinase type 1 promotes estrogen-dependent tumorigenesis of breast cancer MCF-7 cells. *Experimental cell research*, 281(1), 115-127.
- Nava, V. E., Hobson, J. P., Murthy, S., Milstien, S., & Spiegel, S. (2002). Sphingosine kinase type 1 promotes estrogen-dependent tumorigenesis of breast cancer MCF-7 cells. *Experimental cell research*, 281(1), 115-127.
- Nava-Castro, K. E., Palacios-Arreola, M. I., Ostoa-Saloma, P., Muñoz-Hernández, S., Cerbón, M. A., Gomez-Icazbalceta, G., ... & Morales-Montor, J. (2014). The immunoendocrine network in breast cancer. *Advances in Neuroimmune Biology*, 5(2), 109-131.
- Navarro, K. (2001). Modelo termodinámico: Producción de proteína Cry por *Bacillus thuringiensis*. Tesis de Maestría. CINVESTAV. México.
- O'Connor, S., Szej, E., Nikodinovic-Runic, J., O'Connor, A., Byrne, A. T., Devocelle, M., O'Donovan, N., Gallagher, W. M., Babu, R., Kenny, S. T., Zinn, M., Zulian, Q. R., & O'Connor, K. E. (2013). The anti-cancer activity of a cationic anti-microbial peptide derived from monomers of polyhydroxyalkanoate. *Biomaterials*, 34(11), 2710–2718. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.12.032>.
- Ohba, M., Mizuki, E., Uemori, A. (2009). Parasporin, a new anticancer protein group from *Bacillus thuringiensis*. *Anticancer Res.* 29, 427–433.
- Okumura, S., Ohba, M., Mizuki, E., Crickmore, N., Côté, J.C., Nagamatsu, Y., Kitada, S., Sakai, H., Harata, K., & Shin, T. (2010). Parasporin nomenclature. Available online: <http://parasporin.fitc.pref.fukuoka.jp/list.html> (accessed on 3 April 2020).
- Okumura, S., Saitoh, H., Ishikawa, T., Inouye, K., & Mizuki, E. (2011). Model of action of parasporin-4, a cytotoxic protein from *Bacillus thuringiensis*. *Biochim. Biophys.*
- Okumura, S., Saitoh, H., Ishikawa, T., Mizuki, E., & Inouye, K. (2008). Identification and characterization of a novel cytotoxic protein, parasporin-4, produced by *Bacillus thuringiensis* A1470 strain. *Biotechnol. Annu.* 14, 225–252.

- Okumura, S., Saitoh, H., Ishikawa, T., Wasano, N., Yamashita, S., Kusumoto K., Akao, T., Mizuki, E., Ohba, M., & Inouye, K. (2005). Identification of a Novel Cytotoxic Protein, Cry45Aa, from *Bacillus thuringiensis* A1470 and Its Selective Cytotoxic Activity against Various Mammalian Cell Lines. *J. Agric. Food Chem.* 53, 6313–6318.
- Organización Mundial de la Salud [OMS]. (2015a). Cáncer. Nota descriptiva N° 297. Recuperado de: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/> [Revisado el 22 agosto de 2019].
- Ortiz-Montero, P., Londoño-Vallejo, A., & Vernet, J. P. (2017). Senescence-associated IL-6 and IL-8 cytokines induce a self-and cross-reinforced senescence/inflammatory milieu strengthening tumorigenic capabilities in the MCF-7 breast cancer cell line. *Cell Communication and Signaling*, 15, 1-18.
- Pantel, K. & Brakenhoff, R. H. (2004). Dissecting the metastatic cascade. *Nat. Rev. Cancer* 4, 448–456.
- Pepit, L., Gibert, M., Gillet, D., & Laurent-Winter, C. (1997). Boquet P and Popoff MR: Clostridium perfringens epsilon-toxin acts on MDCK cells by forming a large membrane complex. *J Bacteriol* 179: 6480-6487.
- Periyasamy, A., Kkani, P., Chandrasekaran, B., Ponnusamy, S., Viswanathan, S., Selvanayagam, P., & Rajaiah, S. (2016) Screening and characterization of a non-insecticidal *Bacillus thuringiensis* strain producing parasporal protein with selective toxicity against human colon cancer cell lines. *Ann Microbiol*:1–12. doi:10.1007/s13213-016-1204-8.
- Phi LT, Sari IN, Yang Y-G, Lee S-H, Jun N, Kim KS, (2018). Cancer Stem Cells (CSCs) in drug resistance and their therapeutic implications in cancer treatment. *Stem Cells Int.* 2018:5416923. doi: 10.1155/2018/5416923).
- Rafehi, H., Orlowski, C., Georgiadis, G. T., Ververis, K., El-Osta, A., & Karagiannis, T. C. (2011). Clonogenic assay: adherent cells. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (49), e2573.
- Rafehi, H., Orlowski, C., Georgiadis, G. T., Ververis, K., El-Osta, A., & Karagiannis, T. C. (2011). Clonogenic assay: adherent cells. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (49), e2573.

- Rajendran V, Jain MV. (2018). In Vitro Tumorigenic Assay: Colony Forming Assay for Cancer Stem Cells. *Methods Mol Biol.* 1692:89-95. doi: 10.1007/978-1-4939-7401-6_8).
- Riggio, A.I., Varley, K.E., & Welm, A.L. (2021). The lingering mysteries of metastatic recurrence in breast cancer. *British journal of cancer*, 124(1), 13-26.).
- Riss, T. L., R. A. Moravec, A. L. Niles, S. Duellman, H. A. Benink, J. Worzella, L. Minor. 2016. Cell Viability Assays. En: *Assay Guidance Manual* (Eds. Sittampalam G. S., N. P. Coussens, Brimacombe K., et al.). Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences Bethesda, pp. 357- 388.
- Roboz, G.J. (2012). Current treatment of acute myeloid leukemia, *Current Opinion in Oncology*, 24(6): 711–719.
- Rosman, D. S., Phukan, S., Huang, C. C., & Pasche, B. (2008). TGFBR1* 6A enhances the migration and invasion of MCF-7 breast cancer cells through RhoA activation. *Cancer research*, 68(5), 1319-1328.
- Salaverry, O. (2013) La etimología del cáncer y su curioso curso histórico. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica* 30(1), 137-141.
- Schnepf, E., Crickmore, N., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Feitelson, J., Zeigler, D., & Dean, D. (1998). *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol Mol Biol Rev* 6:775–806.
- Sedelies, K.A., Ciccone, A., Clarke, C.J., Oliaro, J., Sutton, V.R., Scott, F.L., Silke, J., Susanto, O., Green, D.R., & Johnstone, R.W. (2008). Blocking granulemediated death by primary human NK cells requires both protection of mitochondria and inhibition of caspase activity. *Cell Death Differ* 15: 708–717.
- Seltzer, S., Corrigan, M., & O'Reilly, S. (2020). The clinicomolecular landscape of de novo versus relapsed stage IV metastatic breast cancer. *Exp. Mol. Pathol.* 114, 104404.
- Sharif, G. M., Schmidt, M. O., Yi, C., Hu, Z., Haddad, B. R., Glasgow, E., ... & Wellstein, A. (2015). Cell growth density modulates cancer cell vascular invasion via Hippo pathway activity and CXCR2 signaling. *Oncogene*, 34(48), 5879-5889.

- Shi, Z. D., Pang, K., Wu, Z. X., Dong, Y., Hao, L., Qin, J. X., ... & Han, C. H. (2023). Tumor cell plasticity in targeted therapy-induced resistance: mechanisms and new strategies. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 8(1), 113.
- Siegel R, DeSantis C, Virgo K, Stein K, Mariotto A, Smith T, Cooper D, Gansler T, Lerro C, Fedewa S, Lin C, Leach C, Spillers R, Cho H, Scoppa S, Hachey M, Kirch R, Jemal A, Ward E. (2012). Cancer treatment and survivorship statistics. *CA Cancer J Clin* 62(4):220–241).
- Siegel, R.L., Miller, K.D., & Jemal, A. (2020). Cancer statistics, 2020. *CA Cancer J. Clin.* 70, 7–30.
- Steeg, P. S. (2016). Targeting metastasis. *Nat. Rev. Cancer* 16, 201–218.
- Tao, Z., Shi, A., Lu, C., Song, T., Zhang, Z., & Zhao, J. (2015). Breast cancer: epidemiology and etiology, *Cell Biochemistry and Biophysics*, 72(2): 333–338. The potential. *Semin Oncol*;42(suppl 1):S3–17
- Técnicas de laboratorio en bioquímica, (s.f.). Ensayo del MTT. <https://biomodel.uah.es/tecnicas/cel/MTT.htm>
- Tevaarwerk, A. J., Gray, R. J., Schneider, B. P., Smith, M. L., Wagner, L. I., Fetting, J. H., ... & Sparano, J. A. (2013). Survival in patients with metastatic recurrent breast cancer after adjuvant chemotherapy: little evidence of improvement over the past 30 years. *Cancer*, 119(6), 1140-1148.
- Ulrich, A. (2002). Biophysical aspects of using liposomes as delivery vehicles. *Biosci Rep* 22:129–150.
- Valastyan, S. & Weinberg, R. A. (2011). Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms. *Cell* 147, 275–292.
- Velásquez, L.F., Rojas, T., Daníthza, S. & Ceron, J.A. (2018). Proteínas de *Bacillus thuringiensis* con actividad citotóxica: Parasporinas. *Rev. colomb. Biotecnol.* 20(2): 89-100.
- Visvader, J.E. (2011). Cells of origin in cancer. *Nature*;469:314–22.
- Visvader, J.E., & Lindeman, G.J. (2012). Cancer stem cells: current status and evolving complexities. *Cell Stem Cell*;10:717–28.
- Yavari, B., Mahjub, R., Saidijam, M., Raigani, M., & Soleimani, M. (2018). The potential use of peptides in cancer treatment, *Current Protein and Peptide Science*, 19(8): 759–770.

- Ye, F., Gao, G., Zou, Y., Zheng, S., Zhang, L., Ou, X., ... & Tang, H. (2019). circFBXW7 inhibits malignant progression by sponging miR-197-3p and encoding a 185-aa protein in triple-negative breast cancer. *Molecular Therapy-Nucleic Acids*, 18, 88-98.
- Ye, X. & Weinberg, R. A. (2015). Epithelial-mesenchymal plasticity: a central regulator of cancer progression. *Trends Cell Biol.* 25, 675–686.
- Zeng, Q., Michael, I. P., Zhang, P., Saghafinia, S., Knott, G., Jiao, W., McCabe, B. D., Galván, J. A., Robinson, H. P. C., Zlobec, I., Ciriello, G., & Hanahan, D. (2019). Synaptic proximity enables NMDAR signalling to promote brain metastasis. *Nature*, 573(7775), 526–531.
- Zhang, C., Zhai, W. E. I., Xie, Y. A. N., Chen, Q., Zhu, W. E. I., & Sun, X. (2013). Mesenchymal stem cells derived from breast cancer tissue promote the proliferation and migration of the MCF 7 cell line in vitro. *Oncology letters*, 6(6), 1577-1582.

13. ANEXOS.

Producción de inclusiones proteicas con caldo nutritivo en medio líquido

Se realizó un cultivo de la cepa A24 de *Bacillus thuringiensis* en 9 matraces de 1 L, que contenía un total de 330 mL de caldo nutritivo por cada matraz, el medio nutritivo se esterilizó para posteriormente ser inoculado con un disco de spora de la cepa A24 de *Bacillus thuringiensis*, productora de la parasporina A24-2. El cultivo se dejó como mínimo de 7 días y un máximo de 14 días a condiciones de incubación y agitación de 30 °C ,180 rpm.

Transcurrido el tiempo de incubación, se centrifugó para recuperar el material insoluble, donde está la inclusión parasporal que contiene a la PS (A24-2). Enseguida, las proteínas insolubles se lavaron con 10 mL de agua destilada, seguido de un lavado con 10 mL de solución isotónica al duplicado de NaCl al 0.85%(P/V), continuando con 10 mL de agua destilada para eliminar la solución anterior, después con 5 mL de agua acidificada por duplicado de un pH de 2.5, teniendo por último un lavado con 10 mL de agua destilada, con la configuración de la centrífuga a 5500 rpm por 15 minutos a 5°C por ciclo, dejándolo al final en una solución de agua en suspensión.

Producción de inclusiones proteicas con medio LB broth, Miller en medio líquido

Se realizó un cultivo de la cepa A24 de *Bacillus thuringiensis* en 9 matraces de 1 L, que contenía un total de 330 mL de medio LB broth, Miller por cada matraz, el medio se esterilizó para posteriormente ser inoculado con un disco de spora de la cepa A24 de *Bacillus thuringiensis*, productora de la parasporina A24-2. El cultivo se dejó como máximo 7 días a condiciones de incubación y agitación de 30 °C ,120 rpm.

Se realizó el cultivo líquido de la cepa A24 de *Bacillus thuringiensis* en los medios caldo nutritivo, LB y Gerry Rowe según sus propias especificaciones. Se inoculó con un disco de esporas cada medio líquido. Las condiciones de cultivo fueron 30 °C, 180 rpm por 7 días, para todos los medios así utilizados.

Transcurrido el tiempo de incubación, se procedió a recuperar la biomasa y continuamente seguido de los lavados de proteína descrito en el protocolo anterior.

Producción de inclusiones proteicas con Agar Nutritivo en medio sólido

La producción de las inclusiones proteicas se llevó a cabo en cajas de cultivo sólido con Agar nutritivo, dejando transcurrir 12 días antes de la recolección de la biomasa.

Una vez recolectada la biomasa se procedió a lavar la biomasa recolectada, según los pasos anteriores que se realizaron en cada medio de cultivo hasta obtener las inclusiones proteicas libres de restos celulares que no son de utilidad.

Preparación de Compuestos para corrimiento electroforetico de proteínas

- ❖ Buffer tris a 1.5 M pH 8.8: 18.2g de tris, ajustar el pH y aforar con agua destilada a 100 mL.
- ❖ Buffer tris a 0.5 M pH 6.8: 6.5g de tris, ajustar el pH y aforar con agua destilada a 100 mL.

Tabla 1. Preparación de LAEMMLI al 2X para la solubilización de las proteínas en un volumen total de 11 mL.

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

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

Tabla 2. Buffer para corrimiento electroforetico para 1L.

Tris base	3.04 g
Glicina	15 g
SDS	1 g

Tabla 3. Preparación de reactivos para teñir y desteñir geles.

TCA 12.5 %	12.5 g de acido tricloroacetico y aforar a 100 ml con agua destilada	
Etanol al 50%	50 ML de etanol y aforar a 100 mL con agua destilada	
Azul de comassie al 0.1 %	0.1 g de azul de comassie	Disolver en metanol, acido acetico y h2O, (40 mL de metanol + 7 mL de acido acetico + 53 mL de H2O).
Et/Ac/Agua	Para 100 mL	30 mL de etanol + 7 mL de acido acetico + 63 mL de agua
Met/Ac/Agua	Para 100 mL	25 mL de etanol + 10 mL de acido acetico + 65 mL de agua

Procedimiento para teñir y destenir los geles

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

Tabla 4. Preparación del gel al 10%. Separador.

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

Tabla 5. Preparación del gel concentrador.

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

Preparación de 1 L de PBS al 1X

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

Tabla 6. Buffer Tris base para elución de proteínas aforado a un litro.

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

Se dejó en refrigeración a 4°C.

Cuantificación de proteínas por el método de Lowry

Una vez ya obtenida la proteína y suspendida en PBS se deja en refrigeración envuelta en aluminio para evitar la posible degradación.

A continuación se describe paso a paso el método de Lowry.

1. Materiales y reactivos

Tubos de 2 mL, lápiz y marcador permanente.

Pipetas, tubos falcon de 15 mL, 50 mL.

Reactivo A: NaCO_3 al 2%, NaOH 0.1M (Carbonato de sodio e hidróxido de sodio).

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

Reactivo C: Tartrato sódico potásico al 2%.

Reactivo de Lowry: se prepara en el momento antes de iniciar el ensayo. Mezclando A, B y C en proporciones de 10:0.1:0.1 (volumen) ejemplo: A: 9.8 ml + B: 100 μL + C: 100 μL .

Reactivo DOC: dexosicolato de sodio al 0.4%.

Reactivo Folin: 1:1 (agua + reactivo de Folin).

Solución patrón de albumina de suero bovino (BSA) en concentración 1mg/mL.

Proteína o muestra problema.

2. Protocolo experimental

Para determinar la concentración de proteínas de la muestra problema se construyó una curva patrón o de calibrado a partir de una solución patrón (BSA). La concentración que tienen las muestras problema se determinó por interpolación de los valores de absorbancia en la curva patrón. **El tubo 0, que solo contiene agua destilada y los reactivos, sirve de blanco para el ajuste del colorímetro de cero absorbancias.**

3. Procedimiento.

1. Se enumeró los tubos de plástico como 0, 5, 10, 30, 50 y se marcó los tubos de las muestras (las muestras van por duplicado, la curva se duplica si se desea).
2. Se pipeteó la solución patrón de albumina.
3. Se colocó en los otros tubitos 5 μL de muestra.

4. Se preparó el reactivo de Lowry a partir de ABC.
5. Se pipeteó el volumen de agua indicado en la tabla.
6. Se pipeteó a todos los tubos el reactivo DOC.
7. Se pipeteó a todos los tubos el reactivo de Lowry.
8. Se mezcló el contenido de cada tubo en un vortex y se deja reposar 10 minutos.
9. Se preparó el reactivo de Folin.
10. Y terminado los 10 minutos, se añadió a los tubos el reactivo de Folin, mezclando bien hasta que se dispersó el color.

Tabla 7. Curva de calibración y cuantificación por el método de Lowry.

Tubo	Agua tipo II	Albumina (1 mg/mL)	Muestra	DOC 0.4%	al Reactivo de Lowry	Reactivo Folin
0	50 µL	-----	-----	100 µL	1 mL	100 µL
5	45 µL	5 µL	-----	100 µL	1 mL	100 µL
10	40 µL	10 µL	-----	100 µL	1 mL	100 µL
30	20 µL	30 µL	-----	100 µL	1 mL	100 µL
50	-----	50 µL	-----	100 µL	1 mL	100 µL
muestra	45 µL	-----	5 µL	100 µL	1 mL	100 µL

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

- Para preparar la solución de STOCK de MTT
 1. Se disolvió 5 mg de MTT en 1 mL 1X en PBS. Se esterilizó mediante filtración.

Tratamiento de las células con MTT

2. Se añadió 10 µl de la solución de Stock de MTT a cada paso.
3. Se incubó durante 2-5 horas a 37°C.

Solubilización del formazan

4. Se retiró con cuidado el medio de cultivo de cada pozo sin extraer las células
 5. Se agregó 100 µl de DMSO a cada pozo y se mezcló pipeteando hacia arriba y hacia abajo.
- NOTA: hay que asegurarse de agregar 100 µl de DMSO a un pozo sin nada como blanco.
6. Incubar a 37°C durante 15 minutos.

Medir la absorbancia

7. Se midió la absorbancia a 570 nm inmediatamente.