



Universidad del Papaloapan

Terra Uberissima, Mens Aperta

Campus Tuxtepec

Síntesis de nanoliposomas que contienen parasporinas de *Bacillus thuringiensis* con actividad antiproliferativa

TESIS

Que para obtener el título de:

Maestría en Biotecnología

Presenta:

I.B. Alain Cruz Nolasco

Directora de Tesis

Dra. Ana Karin Navarro Martinez

Co-Director de Tesis

Dr. Miguel Ángel Peña Rico

San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, México. 2017

Este trabajo se desarrolló en los laboratorios de Bioprocesos de la Universidad del Papaloapan campus Tuxtepec, en el laboratorio 3 de la 6ª planta de la Torre de Investigación de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México en la ciudad de México y en el *Laboratório de Pesquisa em Microbiologia* del *Centro Universitário Franciscano* en la ciudad de Santa María, Río Grande do Sul, en Brasil. Esta investigación contó con los apoyos del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología mediante el proyecto No. 258587-CB-2015-01, la asignación de la beca de Maestría (CVU: 559840, Becario: 293554) y la beca del programa Becas mixtas 2014 - MZO2015 Movilidad en el Extranjero (290842).

Agradecimientos

A toda mi familia, por su apoyo incondicional, en especial a mi madre, **Marisa**, a mi hermana, **Itzel**, a mi hermano, **Helder** y a mi cuñado, **Edwin**. Los quiero.

In memoriam, a mi padre, **Sotero**, por sus enseñanzas, por su carácter. A mi tío **Fidel**, porque nunca se rindió. A mi tía **María**, por tener siempre una sonrisa. A mis amigos que también han perdido la batalla contra el cáncer, su partida aumenta en mí la necesidad de seguir estudiando este tema. ¡Buena travesía!

A mi directora, la **Dra. Ana Karin**, por seguirme guiando en el camino de la investigación, por sus consejos, por su amistad y por su confianza.

A mi co-director, el **Dr. Miguel Ángel**, por su amistad, por su valiosa orientación y apoyo durante toda la investigación.

À meu amigo, o **Dr. Roberto**, pela oportunidade de trabalhar em seu laboratório, por sua orientação e amizade.

A mis **revisores** de tesis, por contribuir de buena manera a una mejor presentación de este escrito.

Al Laboratorio Nacional de Investigaciones en Nanociencias y Nanotecnología (**LINAN-Tuxtepec**) y al Cuerpo Académico de Recursos Naturales e Innovación Tecnológica (**UNPA-CA30**), por la infraestructura y equipos proporcionados para la realización de esta tesis.

A **CONACYT**, por brindarme el apoyo necesario para poder ser parte de un posgrado de calidad.

A mi *Alma mater*, la **Universidad del Papaloapan**, por seguir forjando profesionistas oaxaqueños.

Contenido

RESUMEN	8
ABSTRACT	9
I. Introducción	10
II. Antecedentes.....	12
2.1 <i>Bacillus thuringiensis</i>	13
2.2 Parasporinas.....	16
2.3 Cáncer	19
2.3.1 Cáncer de mama (CM).	20
2.4 Nanotecnología.....	23
2.4.1 Generalidades de la nanotecnología	23
2.4.2 Liposomas	25
2.4.3 Deposición interfacial.....	26
III. Justificación	27
IV. Hipótesis.....	29
V. Objetivo General.....	30
VI. Objetivos Particulares.....	31
VII. Materiales y Métodos	32
7.1 Producción de parasporinas de <i>B. thuringiensis</i>	33

7.2	Selección de las inclusiones proteicas parasporales.	34
7.3	Identificación de los extractos proteicos que contienen parasporinas. .	35
7.3.1	Curva estándar	35
7.3.2	Bioensayo dosis respuesta de las inclusiones proteicas.	36
7.3.3	Caracterización morfológica de las parasporinas mediante MEB.....	37
7.4	Preparación de los nanoliposomas.	37
7.5	Caracterización de los liposomas	39
7.5.1	Determinación del diámetro de partícula, índice de polidispersión y el potencial zeta.....	39
7.5.2	Microscopía Electrónica de Barrido de los nanoliposomas.....	39
VIII.	Resultados y Discusión	40
8.1	Producción y selección de parasporinas.....	41
8.2	Bioensayos dosis respuesta de las inclusiones proteicas parasporales libres. 42	
8.3	Obtención de la LC ₅₀ de las parasporinas libres.	53
8.4	Microscopía electrónica de barrido de la parasporinas libres.	56
8.5	Síntesis de nanoliposomas, determinación del diámetro de partícula, índice de polidispersión (Pdl) y potencial Z.....	59
8.6	Microscopía electrónica de barrido de los nanoliposomas.....	61
IX.	Conclusiones	66
X.	Perspectivas	68
XI.	Bibliografía.....	70
XII.	Anexo A.....	84

12.1	Preparación de reactivos para SDS-PAGE.....	85
12.2	Preparación de geles para SDS-PAGE	86
12.3	Técnica para teñir y desteñir los geles de SDS-PAGE	87
12.4	Preparación de reactivo para electroelución de proteínas	87
12.5	Descongelamiento de las líneas celulares cancerígenas.....	87
12.6	Tripsinizado de las líneas celulares cancerígenas.....	88
12.7	Preparación de la solución de isopropanol acidificado.	89
12.8	Preparación de la solución de Bromuro 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT)	89
XIII.	Anexo B.....	90
13.1	Gráficos de las mediciones de tamaño promedio de partícula e índice de polidispersión de los nanoliposomas sintetizados.....	91
13.2	Gráficos de Potencial Z de los nanoliposomas sintetizados	96

Índice de Figuras

Figura 1.	Micrografía de <i>Bacillus thuringiensis</i>	13
Figura 2.	SDS-PAGE al 7% de las cepas AC3, A-13, A-34 y AX.....	41
Figura 3.	Curva estándar de la línea MDA.....	43
Figura 4.	Curva estándar de la línea MCF-7.....	43
Figura 5.	Actividad antiproliferativa de la parasporina A34-1.....	45
Figura 6.	Ensayo dosis respuesta de la parasporina A34-1.....	46

Figura 7. Actividad antiproliferativa de la parasporina A34-2.....	47
Figura 8. Ensayo dosis respuesta de la parasporina A34-2.....	48
Figura 9. Actividad antiproliferativa de la parasporina AX-1.....	49
Figura 10. Ensayo dosis respuesta de la parasporina AX-1.....	50
Figura 11. Actividad antiproliferativa de la parasporina AX-2.....	51
Figura 12. Ensayo dosis respuesta de la parasporina AX-1.....	52
Figura 13. Micrografías MEB de la cepa A34.....	56
Figura 14. Micrografías MEB de la cepa AX.....	58
Figura 15 . Micrografías MEB de los liposomas de la parasporina AX-1.....	62
Figura 16. Micrografía MEB de los liposomas AX-2.....	63
Figura 17. Micrografía MEB de los liposomas A34-1.....	63
Figura 18. Micrografía MEB de los liposomas A34-2.....	64
Figura 19. Micrografía MEB de los liposomas Blanco.....	64
Figura 20. Diámetro de partícula y Pdl de liposomas blanco (sin parasporina).....	91
Figura 21. Diámetro de partícula y Pdl de liposomas con la parasporina AX-1.....	92
Figura 22. Diámetro de partícula y Pdl de liposomas con la parasporina AX-2.....	93
Figura 23. Diámetro de partícula y Pdl de liposomas con la parasporina A34-1.....	94

Figura 24. Diámetro de partícula y Pdl de liposomas con la parasporina A34-2...	95
Figura 25. Potencial Zeta de los liposomas Blanco.....	96
Figura 26. Potencial Zeta de los liposomas AX-1.....	97
Figura 27. Potencial Zeta de los liposomas AX-2.....	98
Figura 28. Potencial Zeta de los liposomas A34-1.....	99
Figura 29. Potencial Zeta de los liposomas A34-2.....	100

Índice de Tablas

Tabla 1. Características de las parasporinas.....	17
Tabla 2. Relación de cepas utilizadas para la producción de posibles parasporinas y tipo de suelo en el que se aislaron.....	33
Tabla 3. Preparación de las soluciones para deposición interfacial.....	38
Tabla 4. Concentración de los eluidos proteicos cuantificados en Nanodrop.....	42
Tabla 5. Relación de las LC ₅₀ de cada parasporina por línea celular.....	54
Tabla 6. Diámetro de partícula, índice de polidispersión y potencial Z de los nanoliposomas sintetizados.....	59

RESUMEN

Bacillus thuringiensis (*Bt*) es una bacteria Gram positiva que es ampliamente conocida por su importancia en el control biológico, debido a su capacidad de producir inclusiones cristalinas formadas por proteínas con actividad insecticida (Cry y Cyt). Recientemente, se ha reportado que algunos cristales proteicos, que no presentan actividad insecticida, muestran citotoxicidad contra células cancerígenas humanas. Estas proteínas citotóxicas son conocidas como Parasporinas (PS). Por otra parte, las nanopartículas de fármacos pueden utilizarse como vectores de moléculas anticancerígenas ya que pueden tener un control de liberación sostenida y una alta biodisponibilidad. Este trabajo tuvo como objetivo identificar, dentro de una colección de cepas de *Bt* aisladas en la región de la cuenca del Papaloapan, parasporinas con actividad antiproliferativa contra dos líneas celulares de cáncer de mama (MDA y MCF-7). Posteriormente, la nanoencapsulación de estas parasporinas en liposomas. Se utilizaron 4 cepas de *Bt* de las cuales se seleccionaron 8 proteínas para ser probadas contra ambas líneas. Se obtuvieron 4 parasporinas con actividad antiproliferativa, cuyos pesos moleculares están entre los 50 y 75 kDa. Se produjeron, por medio de deposición interfacial, 4 diferentes liposomas estables que contenían a las parasporinas con un tamaño promedio de partícula de 200 nm, un índice de polidispersión de entre 0.138 – 0.195 y un potencial Z de entre -26.3 a -22 mV.

ABSTRACT

Bacillus thuringiensis (*Bt*) is a Gram positive bacteria that is widely known for its importance on biological control, due to their ability to produce crystalline inclusions formed by insecticide proteins (Cry and Cyt). Recently, it has been reported that, some crystals proteins that are not active against insects, induce apoptosis against human cancer cell lines. These cytotoxic proteins are known as Parasporins (PS). The PS has been classified in six kinds based on the homology of their amino acid sequences. Moreover, nanoparticles can be used as vectors for anticancer molecules, this due to their control sustained release and high biodisponibility. The aim of this study was identify, within a collection of *Bt* strains isolated at the Papaloapan region, parasporins for two human breast cancer cell lines (MDA and MCF-7). Later, this parasporins were nanoencapsulate in liposomes. Four strains of *Bt* were used, of which 8 proteins were selected to be tested against both human breast cancer cells. Four parasporines with antiproliferative activity were obtained, its molecular weights are between 50 and 75 kDa. By interfacial deposition were produced 4 different stabled liposomes activated with parasporins inside with a zise average of 200 nm, a Pdl between 0.138 – 0.195 and a Z-potencial between -26.3 to -22 mV.

I. Introducción

A finales del siglo pasado, *Bacillus thuringiensis* (el insecticida biológico más usado en el mundo, Sauka & Benintende, 2008) empezó a ser materia de estudio en el área de la salud por ser una bacteria capaz de producir algunas inclusiones proteicas con actividad antiproliferativa específica contra líneas celulares cancerígenas (Mizuki *et al.*, 1999).

La nanotecnología, al ser un campo interdisciplinario, brinda la posibilidad de hacer construcciones a escala nanométrica encapsulando fármacos, confiriéndoles protección y aumentando su biodisponibilidad para poder ser utilizados como tratamiento contra diversos padecimientos clínicos, principalmente el cáncer (Kwangjae *et al.*, 2008, Putheti *et al.*, 2008, Soppimatha *et al.*, 2001).

En este trabajo, se plantea el estudio de varias inclusiones proteicas de distintas cepas de *B. thuringiensis*, aisladas del suelo de la región de la cuenca del Papaloapan, contra líneas cancerígenas. Se propone también, una metodología para la preparación de construcciones nanométricas para encapsular las proteínas que presentan actividad antiproliferativa y así mismo, el análisis de algunas características físicas y químicas de las mismas.

II. Antecedentes

2.1 *Bacillus thuringiensis*

Bacillus thuringiensis (*B. thuringiensis*) es una bacteria Gram positiva con forma de bacilo, su tamaño promedio es de 2 a 5 μm de largo por 1 μm de ancho y se caracteriza por la formación de un cristal proteico de diferente peso molecular (Figura 1), en el momento de la esporulación (Schnepf *et al.*, 1998). *B. thuringiensis* es miembro del grupo de *Bacillus cereus*, el cual también incluye a *B. cereus* y *B. anthracis*. *B. thuringiensis* está tan genéticamente relacionado a *B. cereus*, que es distinguible sólo por la presencia de una inclusión parasporal proteica formada durante su esporulación (Rowe & Margaritis, 1987).

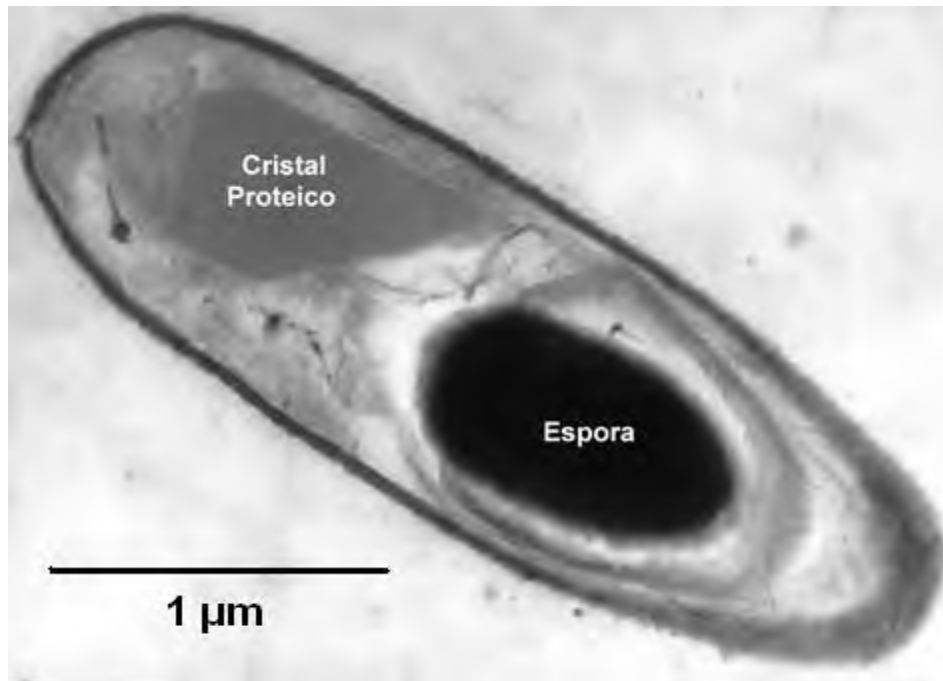


Figura 1. Micrografía obtenida por transmisión electrónica de *B. thuringiensis*. Se muestra la espora bacteriana y el cristal proteico (Sanchis, 2010).

B. thuringiensis es una bacteria cosmopolita, ya que se ha aislado de diferentes ambientes naturales, como el suelo, filoplanos de diversos granos y productos almacenados (Martin & Travers, 1989).

B. 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 diferenciación de la bacteria en esporas. Las esporas, cuando se encuentran en un ambiente favorable de crecimiento (medio con nutrientes necesarios para su desarrollo, temperatura alrededor de 30 °C y pH de 7.0 aproximadamente), pueden germinar e iniciar su crecimiento exponencial (Schnepf *et al.*, 1998).

B. thuringiensis es uno de los principales microorganismos utilizados en el control biológico (Who, 1999), esto es debido a las inclusiones proteicas cristalinas denominadas δ -endotoxinas (proteínas *Cry* e *Cyt*) (Bravo *et al.*, 2007), las cuales son liberadas al mismo tiempo con la espora durante la lisis celular (Lereclus *et al.*, 1989; Arantes *et al.*, 2002). Estas δ -endotoxinas son extremadamente tóxicas contra insectos de los órdenes Lepidóptera, Díptera y Coleóptera (Hofte & Whiteley 1989).

Hasta el momento más de doscientos genes que codifican para cristales proteicos con actividad insecticida se han clonado, secuenciado y con base en la homología de aminoácidos se han clasificado en treinta y dos grupos de genes *cry* y dos grupos de genes *cyt* (Crickmore *et al.*, 1998). Las proteínas tóxicas para lepidópteros pertenecen a los grupos *Cry1*, *Cry9*, y *Cry2*. Las toxinas activas

contra coleópteros son las proteínas Cry3, Cry7, y Cry8, las cuales tienen actividad contra insectos lepidópteros también. Las proteínas Cry5, Cry12, Cry13, y Cry14 actúan contra nematodos, mientras que las proteínas Cry2, Cry4, Cry10, Cry11, Cry16, Cry17, Cry19 y las proteínas Cyt son tóxicas para dípteros (Crickmore *et al.*, 1998). Debido a que dichas inclusiones parasporales son biodegradables, y que no contaminan suelos ni aguas, *B. thuringiensis* se utiliza como insecticida ecológico para controlar plagas agrícolas, plagas forestales y vectores de enfermedades (Yasutake, 2006).

La mayoría de las cepas de *B. thuringiensis* pueden sintetizar más de un tipo de cristal que pueden ser formados por diferentes proteínas Cry, en algunos casos cinco toxinas han sido encontradas, por ejemplo, la subsp. *israelensis*. El peso molecular de esas toxinas puede variar entre 14 y 142 kDa. Dependiendo de la composición de aminoácidos, el cristal puede ser bipiramidal, cuboide, romboide, ovoide, esférico, rectangular o irregular. La particularidad de cristalización de las toxinas puede disminuir la susceptibilidad a la degradación por proteasas del huésped (Schnepf *et al.*, 1998).

Además de las δ -endotoxinas, *B. thuringiensis* puede producir otras toxinas, como la α -exotoxina, β -exotoxina, hemolisinas, enterotoxinas, quitinasas y fosfolipasas (Hansen & Salamiou, 2000). También producen proteínas parasporinas que exhiben actividad citotóxica específica contra células tumorales humanas (Ohba *et al.*, 2009, Okumura *et al.*, 2015).

2.2 Parasporinas

Mizuki *et al.*, en 1999, realizaron un análisis masivo de cepas de *B. thuringiensis*, en el cual 1744 de éstas fueron investigadas en cuanto a su actividad citotóxica contra células de leucemia humana y su capacidad hemolítica en eritrocitos de oveja. Esto llevó al descubrimiento de cepas de *B. thuringiensis* productoras de proteínas capaces de discriminar entre células T sanas y leucémicas, matando preferencialmente a éstas últimas (Mizuki *et al.*, 1999). Posteriormente Mizuki *et al.*, 2000, reportaron una proteína Cry con actividad anticancerígena obtenida de la cepa A1190, lo cual llevó a la creación de una nueva clasificación de proteínas, las parasporinas (PSs). Las parasporinas se definen como proteínas no hemolíticas, tóxicas preferencialmente para células cancerosas (Mizuki *et al.*, 1999 y 2000). A partir de esto, las parasporinas tomaron importancia debido a su potencial como tratamiento contra el cáncer.

Lee *et al.*, en el 2000 y 2001 reportaron que las proteínas paraesporales de *B. thuringiensis* var. *shandongensis* son citotóxicas contra células T de leucemia humana; así mismo, Kim *et al.*, (2000) demostraron que *B. thuringiensis* var. *dakota* produce una proteína altamente citotóxica contra la línea celular MOLT-4 y moderadamente citotóxica contra las células HeLa de cáncer cervicouterino.

Hasta el momento, seis clases de parasporinas han sido encontradas (Tabla 1), con un total de diecinueve diferentes PS identificadas a partir de 17 diferentes cepas de *B. thuringiensis*. Esta clasificación es con base a la homología de sus

secuencias de aminoácidos, realizada por el Comité de Clasificación y Nomenclatura de Parasporinas (<http://parasporin.fitc.pref-fukuoka.jp/index.html>). De las PSs identificadas, 11 pertenecen al grupo PS1, 3 al grupo PS2, 2 al PS3, mientras que los grupos PS4, PS5 y PS6 poseen apenas un representante cada uno. El modo de acción de las parasporinas difieren entre las familias, así como el espectro citotóxico y el nivel de actividad (Ohba *et al.*, 2009).

Tabla 1. Características de las parasporinas (Ohba *et al.*, 2009).

Parasporina	Cepa de origen de <i>B. thuringiensis</i>	Peso molecular (kDa)
PS1Aa1 (Cry31Aa1)	A1190	81
PS2Aa1 (Cry46Aa1)	A1547	37
PS3Aa1 (Cry41Aa1)	A1462	88
PS4Aa1 (Cry45Aa1)	A1470	34
PS5Aa1 (Cry64Aa1)	A1100	34
PS6Aa1 (Cry63Aa1)	M019	84

La PS1 producida por *B. thuringiensis* A1190 (84-HS-1-11) tiene un peso de 81 kDa pero una vez activada forma un heterodímero de 15 kDa y 56 kDa, no forma poros y es citotóxica contra líneas celulares HeLa y MOLT-4 (Katayama *et al.*, 2007). La PS1 provoca un aumento en el flujo de Ca^{2+} por la unión con los receptores de la proteína G o por las proteínas G heterotriméricas, induciendo, probablemente, apoptosis en las células cancerígenas (Katayama *et al.*, 2007). La PS2 producida por *B. thuringiensis* A1547 (94-F-45-14) en su forma inactiva posee un peso de 37 kDa mientras que cuando es activada cambia a 30 kDa, y es

formadora de poros (Kitada *et al.*, 2006). La PS2 es citotóxica contra líneas celulares HepG2 y MOLT-4, pero es poco probable que genere apoptosis (Ito *et al.*, 2004). Se ha visto que estas toxinas se ubican en la periferia de las células cancerosas al igual que las cadherinas, las cuales son responsables de la adhesión célula-célula (Kitada *et al.*, 2006). Las PS3 producidas por *B. thuringiensis* A1462 tienen un peso de 88 kDa y cuando está activa su tamaño es de 64 kDa. Aparentemente, estas parasporinas son formadoras de poros, aumentando la permeabilidad de las células cancerígenas (Yamashita *et al.*, 2005). Las PS4 producida por *B. thuringiensis* A1470 son de 31 kDa, pero una vez activadas son de 27 kDa y sólo se ha reportado que su mecanismo de acción es diferente al de las PS1, PS2 y PS3 (Ohba *et al.*, 2009). La PS6 producida por *B. thuringiensis* M019 es citotóxica contra líneas celulares de cáncer de hígado y cervicouterino (Nagamatsu *et al.*, 2010).

Las PS1, PS2, PS3 y PS4 han sido nombradas por el Comité de Clasificación y Nomenclatura de δ -endotoxina de *B. thuringiensis* como: Cry31Aa, Cry46Aa, Cry45Aa y Cry41Aa, respectivamente (Crickmore *et al.*, 1998). La morfología del cristal paraesporal también es diferente; PS1 esférico, PS2 y PS4 tienen forma irregular y PS3 bipiramidal (Kitada *et al.*, 2006).

La abundancia de *B. thuringiensis* en la naturaleza como productor de parasporinas y la forma de actuar de éstas, lo ha hecho candidato potencial para el tratamiento contra el cáncer.

Debido a que distintas cepas de *B. thuringiensis* producen diferentes proteínas citotóxicas con amplias variaciones en su efecto anticancerígeno y mecanismo de acción, se ha incrementado el número de estudios al respecto, así como el de estudios para determinar su efecto *in vivo* y poder ser considerada en un futuro como diana terapéutica en humanos.

2.3 Cáncer

El cáncer es la enfermedad crónico-degenerativa de mayor incidencia entre los adultos, en comparación con los niños y jóvenes. Es un padecimiento que no hace distinción de razas, nivel socioeconómico o sexo, aunque se observa una diferencia en los tipos de cáncer que afectan a hombres y mujeres. Al respecto, la Organización Mundial de la Salud en 2015, identifica que a nivel mundial, los tumores malignos de pulmón, próstata, colorrectal, estómago e hígado son los más comunes entre los varones, mientras que en las mujeres son los de mama, colorrectal, pulmón, cuello del útero y estómago (OMS, 2014 y 2015a).

La OMS define el cáncer como el proceso de crecimiento y diseminación incontrolada de células. Este crecimiento descontrolado genera tumores o neoplasias que suelen invadir el tejido circundante y puede provocar metástasis en puntos distantes del organismo. Cualquier parte del cuerpo es susceptible de verse afectada, de forma tal que existen más de 100 tipos de esta enfermedad. Si bien no hay una causa directa que origine su aparición, la OMS (2015a), a través

del Centro Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer (IARC, por sus siglas en inglés), clasifica los agentes cancerígenos en tres grandes grupos:

- Cancerígenos físicos: radiaciones ionizantes y ultravioleta.
- Cancerígenos químicos: tabaco, alcohol, asbestos, arsénico, aflatoxinas.
- Cancerígenos biológicos: infecciones causadas por ciertos virus, bacterias o parásitos.

2.3.1 Cáncer de mama (CM).

El cáncer de mama (CM) es el tipo de neoplasia maligna que más afecta a las mujeres. El principal factor de riesgo para el CM es el envejecimiento, pero hay otros factores, como los relacionados con la vida reproductiva de la mujer (pubertad precoz, primera gestación después de los 30 años, uso de anticonceptivos orales, menopausia tardía y terapias hormonales de remplazo). Además de antecedentes familiares de CM, en los que son frecuentemente observadas alteraciones en genes implicados con la regulación del metabolismo hormonal y a la reparación de ADN (Brasil, 2011, 2014; Stuckey, 2011; Abdulkareem & Zurmi, 2012). El CM puede ser diferenciado, según las clasificaciones terapéuticas, en tres grupos principales. El grupo ER+, que expresa el receptor de estrógeno (Van't Veer *et al.*, 2002); el HER2 elevado, que presenta una alta expresión del receptor del factor de crecimiento epidermal humano (Slamon *et al.*, 1987); y el triple negativos, donde no se expresan los receptores de estrógeno (ER), progesterona (PR) y HER2 (Perou, 2011). Esas variaciones en las

características moleculares de un mismo tipo de cáncer, muestran la importancia de tomar medidas preventivas o definir tratamientos teniendo en consideración las características individuales (Wacholder *et al.*, 2010).

El CM es ahora causante de un mayor número de muertes en México, comparado con el cáncer cervicouterino, y afecta a mujeres adultas de todas las edades y niveles de ingreso. Actualmente, es la segunda causa de muerte entre las mujeres mexicanas adultas de 30 a 54 años de edad (Lozano *et al.*, 2008).

Según datos de la Organización Panamericana de la Salud (OPS), en el continente americano, el CM es el más común entre las mujeres (29% respecto del total de casos de cáncer) y es la segunda causa de muerte por tumores malignos para este grupo de población, superada únicamente por el cáncer de pulmón (15% contra 18%); para el año 2030, la OPS estima más de 596 000 casos nuevos y más de 142 100 muertes en la región, principalmente en la zona de América Latina y el Caribe (OPS, 2014a y 2014b).

En el aspecto de la salud social, la epidemia de CM constituye una prioridad ya establecida en los países desarrollados. En los países en desarrollo, por el contrario, se ha prestado insuficiente atención a este problema sanitario emergente. La evidencia reciente demuestra que el CM es hoy en día una de las principales causas de muerte y discapacidad entre las mujeres de países en vías de desarrollo (Mathers *et al.*, 2001). En forma paralela, la investigación ha producido nuevas opciones terapéuticas, muchas de las cuales tienen un costo elevado. Por consiguiente, la epidemia de CM representa un nuevo desafío para el

financiamiento y la protección del gasto público, en particular para los países en desarrollo (Knaul *et al.*, 2009).

Los principales tratamientos contra los diferentes tipos de cáncer son: cirugía, radioterapia, quimioterapia incluyendo terapia hormonal e inmunoterapia (Miller *et al.*, 1981). Un porcentaje importante de cánceres pueden curarse mediante cirugía, radioterapia o quimioterapia, especialmente si se detectan en una fase temprana (OMS, <http://www.who.int/topics/cancer/es/>). La desventaja de los tratamientos es que no tienen selectividad por las células tumorales, lo que aumenta los efectos indeseables y en consecuencia la disminución de la calidad de vida de los pacientes. Otra consecuencia de los efectos secundarios de los tratamientos contra el cáncer es que los pacientes no pueden tolerar o sobrevivir a una combinación de diferentes fármacos al mismo tiempo, lo que puede limitar la capacidad del médico para eliminar la enfermedad. Esto ha generado la búsqueda de nuevos tratamientos contra el cáncer, por ejemplo, los agentes biológicos diana-específico o *target*. El *target* es un fármaco que actúa directamente sobre proteínas o mecanismos implicados en la proliferación y crecimiento de las células tumorales. Entre los agentes utilizados se encuentran moléculas fundamentales para el desarrollo de la célula tumoral como: proteínas del ciclo celular, moduladores de apoptosis, moléculas de señalización intracelular, receptores de crecimiento y moléculas implicadas en la capacidad de invasión y en la angiogénesis (Morrow y Kim, 2005). Otra estrategia, que aún está en desarrollo, es suministrar los medicamentos mediante nanopartículas, disminuyendo los efectos secundarios de los mismos. Además, las nanopartículas con fármacos

pueden eliminar a las células cancerígenas antes de que éstas puedan generar una resistencia a cualquier compuesto individual (Brigger *et al.*, 2012).

2.4 Nanotecnología

2.4.1 Generalidades de la nanotecnología

La nanotecnología implica el desarrollo de herramientas capaces de manipular y construir nuevas estructuras a nivel atómico. Las nanopartículas empleadas como sistemas de suministro de fármacos son de un tamaño submicrométrico de entre 3 y 200nm, generalmente hechas de polímeros (Kwangjae *et al.*, 2008). Dependiendo del proceso utilizado se pueden obtener nanoesferas o nanocápsulas (Brigger *et al.*, 2012).

El termino nanotecnología surgió por primera vez en la presentación del investigador Richard Feynman titulada “There’s Plenty of Room at Botton”, en el Encuentro Anual de la Sociedad Americana de Física de 1959, en el Instituto Tecnológico de California. Feynman vislumbró una tecnología capaz de construir nano-objetos átomo por átomo, molécula por molécula. Esta tecnología se refiere a la manipulación a escala atómica, lo que genera cambios en diferentes propiedades químicas y físicas. En algunos casos estos cambios pueden ayudar a incrementar la capacidad de eliminar las barreras y las membranas celulares y generar una mayor solubilidad de las moléculas (Yang *et al.*, 2008).

La nanotecnología es un campo interdisciplinario, que abarca áreas como: la química, la física, la biología, las ciencias de la computación, la ingeniería y la medicina. Esta tecnología también se ha destacado en el área farmacéutica, sobretodo en el desarrollo de nuevas formas de dosificación. Se han reportado diversos materiales para la producción de nanoestructuras que cambian el tipo, las propiedades y características de liberación de los fármacos incorporados. Las nanoestructuras más utilizadas son las nanopartículas (lipídicas o poliméricas), los nanotubos, los liposomas, los puntos cuánticos (quantum dots) y los dendrímeros (Putheti *et al.*, 2008).

Las nanoesferas se componen de una matriz polimérica en la que se adsorbe el fármaco. Las nanocápsulas están rodeados por una pared de polímero con un núcleo acuoso o aceitoso, donde se puede retener el fármaco (Soppimatha *et al.*, 2001).

Las nanopartículas tienen un futuro prometedor en la industria farmacéutica, especialmente en la vectorización de medicamentos anticancerígenos y antibióticos. Las nanopartículas de fármacos presentan un control de liberación sostenida, una mayor selectividad (aumentando así el índice terapéutico), una disminución de los efectos secundarios y sobretodo protegen al fármaco de la degradación en el trato tracto gastrointestinal, lo que aumenta la biodisponibilidad.

2.4.2 Liposomas

Los liposomas son los “nano-acarreadores” más comunes y más utilizados para la administración dirigida de fármacos. Esto es debido a que han mejorado terapias de aplicaciones biomédicas mediante la estabilización de compuestos terapéuticos y aumentando la distribución de compuestos dirigidos a sitios específicos de manera *in vivo* (Koning & Storm, 2003). Los liposomas se definen como vesículas de fosfolípidos que consisten en una o más bicapas lipídicas concéntricas que encapsulan espacios acuosos, esto le confiere a los liposomas la capacidad de atrapar compuestos lipofílicos e hidrofílicos (Metselaar & Storm, 2005). El centro acuoso y el exterior lipídico biocompatible permiten la encapsulación y entrega de varias macromoléculas, tales como ADN y proteínas (Monteiro *et al.*, 2014) para el diagnóstico y tratamiento de infinidad de enfermedades, como el cáncer y en los últimos años en la terapia génica (Smyth 1999). La encapsulación dentro de los liposomas protege a los compuestos contra la inactivación temprana, la degradación y la dilución (Ulrich, 2002). Farmacológicamente, los liposomas se consideran inactivos con toxicidad mínima ya que los fosfolípidos que los componen son naturales (Hua & Wu, 2013). Sin embargo, los liposomas pueden ser inestables y su distribución de tamaño puede no ser homogénea. El índice de polidispersión (Pdl) nos da un valor estimativo de qué tan homogénea es la muestra en cuanto al tamaño de partícula. El potencial zeta es una propiedad de los materiales que mide el potencial electrocinético en sistemas coloidales en la química coloidal. Los sistemas coloidales se componen de, al menos, dos fases una de ellas finamente dividida en pequeñas partículas (fase dispersa) a las que

rodea completamente la otra sustancia (medio de dispersión). Desde un punto de vista físico, el potencial zeta es el potencial eléctrico en la doble capa interfacial; es decir que es el punto donde se unen la capa difusa y la de Stern (Batalla *et al.*, 2014). La importancia del potencial zeta es: que su valor está relacionado con la estabilidad de las dispersiones coloidales ya que indica el grado de repulsión entre partículas adyacentes, cargadas en un sistema coloidal (Hunter, 1988). Para las moléculas y partículas que son lo suficientemente pequeños, un alto potencial zeta le confiere estabilidad, es decir, el sistema coloidal se resistirá a la agregación (Batalla *et al.*, 2014).

2.4.3 Deposición interfacial

La deposición interfacial es una técnica de emulsificación espontánea utilizada para la producción de nanoliposomas. En la deposición interfacial se vierte una fase oleosa en una acuosa. La fase oleosa está conformada por fosfolípidos que envuelven al fármaco hidrofílico, un antioxidante que da estabilidad a las vesículas lipídicas formadas y un solvente orgánico. La fase acuosa está compuesta por el fármaco hidrofílico y un surfactante ambos en una solución acuosa como medio dispesante. La mezcla oleosa se inyecta lentamente en el medio acuoso agitado, resultando en la deposición del fosfolípido en forma de vesículas de aproximadamente 230 nm de tamaño que contienen en su interior al fármaco hidrofílico (Couvreur *et al.* 1995, Fessi *et al.*, 1989).

III. Justificación

B. thuringiensis es una bacteria cosmopolita que se puede aislar de suelo, hojas, insectos muertos, etc. Durante su fase de esporulación, *B. thuringiensis* produce las δ -endotoxinas, proteínas Cry o paraesporinas. Las paraesporinas tienen actividad antiproliferativa contra diferentes líneas celulares cancerígenas.

Por otro lado, las nanoestructuras tienen un amplio desarrollo en diferentes áreas, como la catálisis, el transporte de fluidos, el suministro controlado de fármacos y el almacenamiento de gases, en compuestos orgánicos, contaminantes y energía. Los nanoliposomas pueden aumentar la vida útil, incrementar la eficiencia de las moléculas que contienen, controlar la liberación de la sustancia activa en función de los parámetros externos, además de reducir los procesos de degradación y pérdida de propiedades. Estas características han favorecido su aplicación en el área farmacéutica, entre ellas en fármacos contra cáncer.

Debido a que los nanoliposomas confieren protección contra la degradación y pérdida de propiedades, así como un mejor control de liberación de la sustancia activa, en el presente proyecto se generarán, por medio de la técnica de deposición interfacial, nanoliposomas de parasporinas producidas por *B. thuringiensis* contra líneas celulares de cáncer de mama (MDA y MCF-7).

IV. Hipótesis.

Mediante el método de deposición interfacial es posible generar nanoliposomas conteniendo parasporinas de *B. thuringiensis*.

V. Objetivo General

Generar nanoliposomas de parasporinas de *B. thuringiensis* con actividad antiproliferativa contra las líneas celulares de cáncer de mama MDA y MCF-7.

VI. Objetivos Particulares

1. Obtener extractos proteicos de cepas de *B. thuringiensis* con peso molecular de 50-85 KDa que pudieran ser parasporinas.
2. Determinar mediante ensayos dosis respuesta contra las líneas celulares cancerígenas (MDA y MCF-7) si los extractos proteicos contienen parasporinas.
3. Obtener nanoliposomas que contengan parasporinas de *B. thuringiensis*.

VII. Materiales y Métodos

7.1 Producción de parasporinas de *B. thuringiensis*

Para la obtención de las parasporinas se cultivaron distintas cepas de *B. thuringiensis*, las cuales fueron aisladas del suelo de la región del Papaloapan en trabajos previos (Bravo-D *et al*, 2015). Las cepas seleccionadas fueron *B. thuringiensis* var *Higo* (AC3), *B. thuringiensis* IAM 12077 (A13), *B. thuringiensis* var *tolworthi* (A34) y *B. thuringiensis* BMB 171 (AX) (Tabla 2).

Tabla 2. Relación de cepas utilizadas para la producción de posibles parasporinas y tipo de suelo en el que se aislaron.

Aislado	Especie	Suelo cultivado con:
AC-3	<i>thuringiensis</i> var <i>higo</i>	Plátano
AX	<i>thuringiensis</i> BMB171	Caña
A13	<i>thuringiensis</i> IAM 12077	Caña
A34	<i>thuringiensis</i> var <i>tolworthi</i>	Caña

Las condiciones de cultivo fueron: 300 mL de medio nutritivo, agitación 120 rpm, temperatura 30 °C, operación durante 7 días hasta alcanzar al menos el 90% de esporas libres. Al término de la fermentación, se centrifugó el mosto a 5500 rpm por 30 min. Se lavó el precipitado resultante, el cual contenía las proteínas insolubles, con una solución de agua acidulada a un pH de 2.5 por triplicado a 5500 rpm por 15 min y con una solución isotónica de NaCl al 0.85% (P/V) también por triplicado a 5500 rpm por 15 min. Se lavó con agua destilada entre las centrifugaciones de agua acidulada y solución isotónica, y al final de los lavados a 5500 rpm por 15 min. El pellet resultante se resuspendió en 3 mL de agua destilada.

Posteriormente, las muestras lavadas se solubilizaron según el método de Laemmli (Laemmli, 1970). A continuación se hizo una electroforesis en geles desnaturizantes de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) al 7% para seleccionar las inclusiones proteicas de entre 50 y 85 kDa. La electroforesis se corrió en buffer Tris Glicina por 1 h a 100 V según lo reportado por Navarro (2001). Se utilizó albúmina sérica bovina (BSA) (67 kDa) como estándar.

7.2 Selección de las inclusiones proteicas parasporales.

Después del SDS-PAGE, se recuperaron las bandas de entre 50 y 85 kDa directamente de la matriz de poliacrilamida para realizar una electroelución a 10 mA por 200 min. Al término de la electroelución, las muestras eluidas se solubilizaron. Con estas muestras se hizo nuevamente SDS-PAGE al 7% y se corrió a 100 V por 1 h para asegurar la presencia de una sola proteína. Se cuantificó la proteína eluída con el NanoDrop según especificaciones del equipo con la aplicación Protein 280. Debido a que el SDS en el que estaban disueltas las proteínas es tóxico para las células, posterior a la elución, se eliminó. Para esto, se efectuó una diálisis con una membrana Spectra/Por Membrane MWCO: 6-8000. La diálisis se realizó con un buffer de Tris-base y glicina, las proteínas se colocaron dentro de la membrana, una vez sellada la bolsa de diálisis, ésta fue sumergida en el buffer por 24 h cambiándolo cada 2 h en refrigeración.

7.3 Identificación de los extractos proteicos que contienen parasporinas.

7.3.1 Curva estándar

Los ensayos dosis respuesta de las inclusiones proteicas parasporales contra las líneas celulares cancerígenas se realizaron en el laboratorio 3 de la sexta planta de la torre de investigación de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México. Se probó la actividad antiproliferativa de las inclusiones proteicas purificadas en las células de cáncer de mama (MDA y MCF-7), aplicando el método de Bromuro 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) (Mosmann, 1983) para evaluar proliferación celular. El ensayo MTT mide la proliferación celular y la reducción de la viabilidad celular mediante la reducción de las sales que componen al reactivo. La reducción es el producto metabólico de las células activas por la acción de enzimas deshidrogenasas, generando equivalentes reductores como NADH y NADPH. El formazán intracelular púrpura resultante puede ser solubilizado y cuantificado por métodos espectrofotométricos. Primero se hizo una curva de calibración a diferentes concentraciones de células MDA Y MCF-7 (2.5, 5, 10, 15 y 20 x 10³ células por pozo) en placas de 96 pozos, con 90 µL de medio DMEM y se incubaron al 5% de CO₂ por 20 h a 37 °C. Posteriormente, a cada pozo se le adicionaron 20 µL de reactivo MTT y se incubó nuevamente la placa en las condiciones mencionadas por 4 h. Después de este tiempo, se retiró el sobrenadante y se agregaron 100 µL de isopropanol ácido. Se tomó una lectura de absorción a 595 nm en un lector de placas Agilent 300 Cary

UV/Vis. Se realizó una gráfica de absorbancia contra concentración celular y se calculó por medio de una regresión lineal la relación entre ambas variables (absorbancia y concentración celular).

7.3.2 Bioensayo dosis respuesta de las inclusiones proteicas.

Para los ensayos dosis respuesta de las proteínas purificadas: se cultivaron 2×10^4 de células en 90 μL por cada pozo en medio DMEM y se dejaron a 5% de CO_2 por 20 h a 37 °C. Posteriormente, se agregaron a cada pozo distintas concentraciones de las proteínas purificadas en 10 μL (0.1, 0.25, 0.5, 0.75 y 1 μg) y se guardaron al 5% de CO_2 por 20h a 37 °C. Posteriormente, se añadieron 20 μL de MTT a cada pozo y nuevamente se dejaron al 5% de CO_2 por 4h a 37 °C. Al término de este tiempo, se retiró el sobrenadante y se agregaron 100 μL de isopropanol ácido. Se tomó una lectura de absorción a 595 nm. El resultado de las absorbancias se comparó con la curva de calibración, de esta forma se determinó una LC_{50} partiendo de la curva estándar.

Las proteínas que presentaron actividad antiproliferativa contra las líneas celulares cancerígenas MDA Y MCF-7, fueron seleccionadas para la preparación de nanoliposomas.

7.3.3 Caracterización morfológica de las parasporinas mediante MEB

Las cepas seleccionadas productoras de parasporinas con actividad antiproliferativa contra las líneas celulares MDA y MCF-7 (AX y A34), fueron evaluadas mediante microscopía electrónica de barrido para conocer la morfología de los cristales que producen. Para esto, las cepas fueron cultivadas en 300 mL de caldo nutritivo, 120 rpm de agitación y temperatura 30 °C. La duración del cultivo fue de 7 días para garantizar la esporulación. Al término de la fermentación, se tomaron 15 mL del mosto y se transfirieron a un tubo falcón de 50 mL, se congeló este volumen a -20 °C por 24 h. Después del congelamiento, las muestras fueron liofilizadas por 24 h a una presión de 0.050 mBar a -50 °C en un liofilizador Labconco. El producto de la liofilización fue depositado en los soportes metálicos previamente preparados con cinta de carbono para su análisis por MEB. Las muestras fueron metalizadas con oro por un periodo de 90 s utilizando un metalizador Quorum Q150R / evaporador de carbón con bomba rotatoria, y posteriormente observadas en el microscopio electrónico de barrido JEOL modelo JSM-6390LV.

7.4 Preparación de los nanoliposomas.

Los nanoliposomas fueron realizados mediante el método de deposición interfacial. En la fase oleosa se usó como fosfolípido el reactivo Lipoid S100,

Vitamina E como antioxidante, etanol como solvente orgánico y se le agregó colesterol para agregarle más rigidez a los liposomas. Para la fase acuosa se utilizó como surfactante el reactivo Tween 80 y se le agregó la parasporina soluble. Ambas fases se prepararon por separado para un volumen final de 5 mL. Las cantidades de los reactivos necesarios para la elaboración de los nanoliposomas se presentan en la Tabla 3.

Tabla 3. Preparación de las soluciones para deposición interfacial

Fase oleosa		Fase acuosa	
Reactivo	Cantidad	Reactivo	Cantidad
Lipoid S100	0.04 g	Tween 80	0.0075 g
Vitamina E	0.001 g	Parasporina soluble	4.5 mL
Colesterol	0.0075 g		
Etanol	0.5 mL		

La fase oleosa se disolvió en el etanol a 30 °C con agitación constante por 15 min. La fase acuosa, de igual manera, se disolvió con agitación constante a 30 °C por 15 min. Posteriormente, con una jeringa de insulina se tomó la fase oleosa y se depositó en la fase acuosa, se mantuvieron en agitación a 30 °C por 10 min. Al término de los 10 min se filtró la solución resultante con un filtro con tamaño de poro de 0.45 μm y sucesivamente con uno de 0.22 μm . La dispersión resultante se guardó en refrigeración para su análisis posterior.

Se prepararon 4 distintos liposomas por duplicado, uno para cada proteína purificada previamente; además se hicieron liposomas libres de proteínas, estos liposomas sólo contenían el buffer de Tris-Glicina en el que están las proteínas.

7.5 Caracterización de los liposomas

7.5.1 Determinación del diámetro de partícula, índice de polidispersión y el potencial zeta

A los nanoliposomas se les determinó el índice de polidispersión (Pdl), el diámetro de partícula y el potencial zeta mediante dispersión dinámica de luz en el equipo Zetasizer (Nano-ZS Zen, modelo 3600, Malvern Instruments, UK). Para estas determinaciones se utilizó agua destilada para diluir las dispersiones (500 v/v). Los resultados obtenidos fueron analizados mediante el software del equipo Zetasizer.

7.5.2 Microscopía Electrónica de Barrido de los nanoliposomas.

Las emulsiones líquidas que contenían las nanoliposomas de parasporinas, fueron depositadas en los soportes metálicos previamente preparados con cinta de carbono y se dejaron fijar en vacío por 24 h. Posteriormente, se metalizaron las muestras fijadas con oro por 90 s utilizando un metalizador Quorum Q150R / evaporador de carbón con bomba rotatoria y observadas en el microscopio electrónico de barrido JEOL modelo JSM-6390LV.

VIII. Resultados y Discusión

8.1 Producción y selección de parasporinas

Se cultivaron las 4 cepas seleccionadas (AC3, A13, A34 y AX) y se corrieron SDS-PAGE al 7% de las proteínas insolubles resultantes. Se obtuvieron bandas de distintos pesos moleculares para cada cepa cultivada. De la cepa AC3, A13, A34 y AX se obtuvieron 9, 9, 7 y 5 proteínas, respectivamente. Se seleccionaron dos proteínas de entre 50 y 85 kDa para cada cepa para ser recuperadas por electroelución [Figura 2]. Las bandas seleccionadas fueron las que presentaron mayor intensidad para cada cepa en el gel.

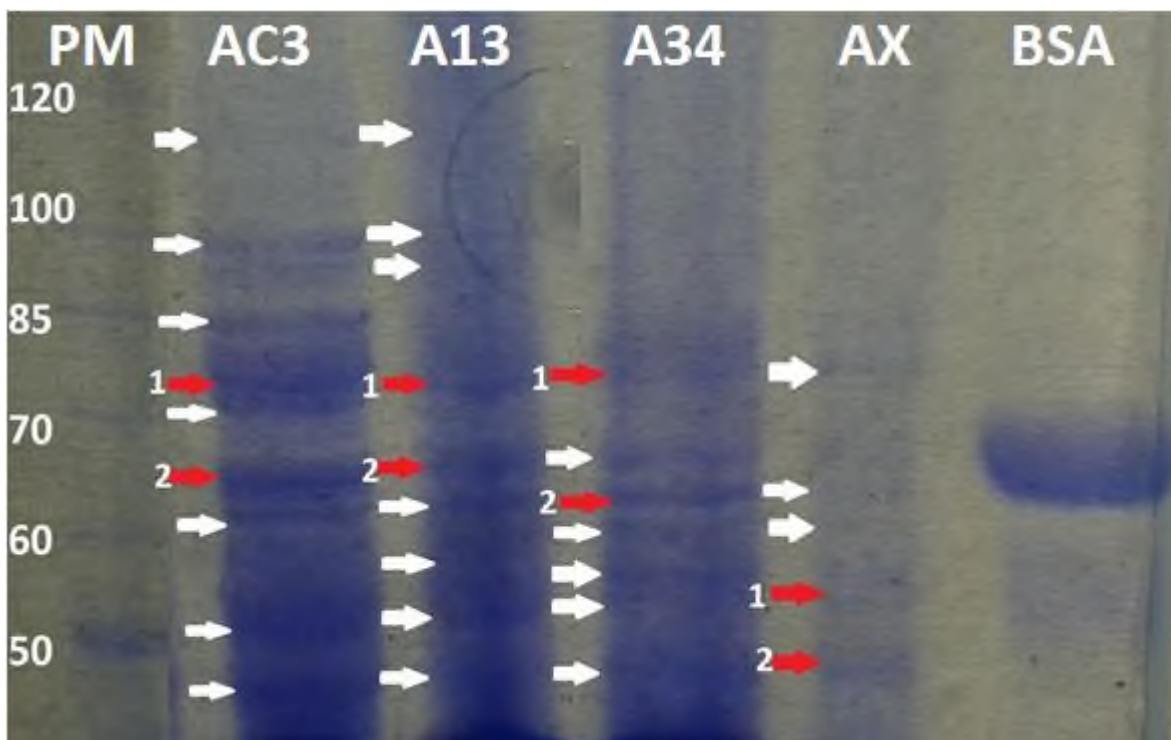


Figura 2. SDS-PAGE al 7% de las cepas AC3, A13, A34 y AX. Las flechas indican las proteínas obtenidas de cada cepa. Las flechas en rojo, marcan las proteínas seleccionadas para la elución.

Las concentraciones de las proteínas eluidas se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Concentración de los eluidos proteicos cuantificados en Nanodrop.

Proteína	Peso Molecular (~kDa)	Concentración (mg/mL)
AC3-1	75	1.17
AC3-2	67	1.04
A13-1	75	0.46
A13-2	67	0.54
A34-1	75	0.14
A34-2	65	0.34
AX-1	55	0.34
AX-2	50	0.23

La diferencia en las concentraciones de los eluidos se debe a que no se expresan en la misma cantidad en el ciclo de vida del bacilo por lo tanto, después de la elución las concentraciones recuperadas son diferentes.

8.2 Bioensayos dosis respuesta de las inclusiones proteicas parasporales libres.

Las curvas estándar de las líneas MDA y MCF-7 se observan en las Figuras 3 y 4 respectivamente. Como se puede ver, el ajuste es: $y = 7E-06x + 0.1845$, $R^2 = 0.8539$ para la curva de las células MDA y para las células MCF-7 el ajuste es: $y = 4E-05x + 0.0618$, $R^2 = 0.9747$. Mediante la curva estándar se evaluó la concentración de células para los bioensayos con las diferentes proteínas. La curva estándar de la línea MCF-7 es similar a lo reportado previamente por Sieuwerts *et al.*, (1995), quienes describen una relación lineal entre la cantidad de

células y la absorbancia. Sin embargo, las células MDA no mostraron un comportamiento lineal entre el número de células y las absorbancias, lo cual difiere a lo reportado por Jafarian *et al.*, (2014). Debido a esto no se presentan resultados de número de células MDA contra concentración de proteínas.

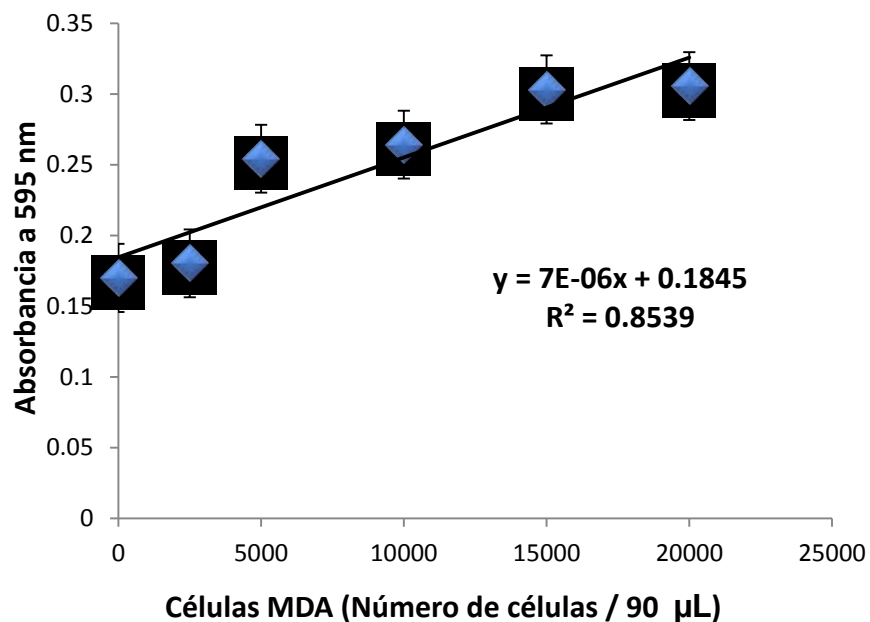


Figura 3. Curva estándar de la línea MDA. La ecuación es el resultado del modelo de regresión lineal.

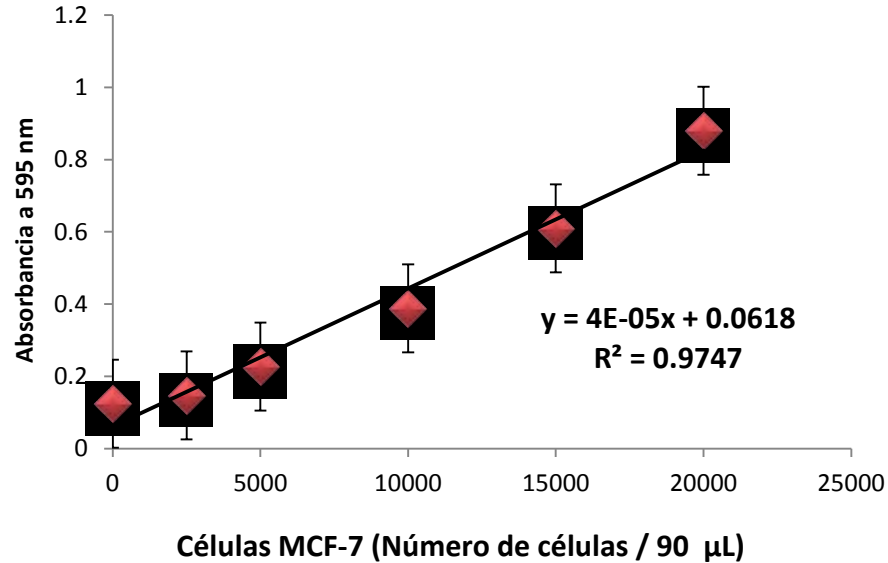


Figura 4. Curva estándar de la línea MCF-7. La ecuación es el resultado del modelo de regresión lineal.

De las 8 proteínas probadas en ambas líneas celulares, sólo 4 presentaron actividad antiproliferativa (A34-1, A34-2, AX-1 y AX-2) sobre las líneas celulares MDA y MCF-7. Se observó un efecto dosis respuesta en ambas líneas ya que la proliferación celular decreció a medida que la concentración proteica aumentaba. Sin embargo, las proteínas AC3-1, AC3-2, A13-1 y A13-2 no mostraron ninguna actividad contra las dos líneas tumorales. No obstante, éstas podrían ser evaluadas en otras líneas celulares con la finalidad de saber si tienen actividad antiproliferativa en otros tipos de cáncer. Los resultados de los bioensayos de las 4 proteínas sobre ambas líneas cancerígenas se presentan de la siguiente manera: la proteína A34-1 en las Figuras 5 y 6, la A34-2 en las Figuras 7 y 8, la AX-1 en las Figuras 9 y 10 y la AX-2 en las Figuras 11 y 12.

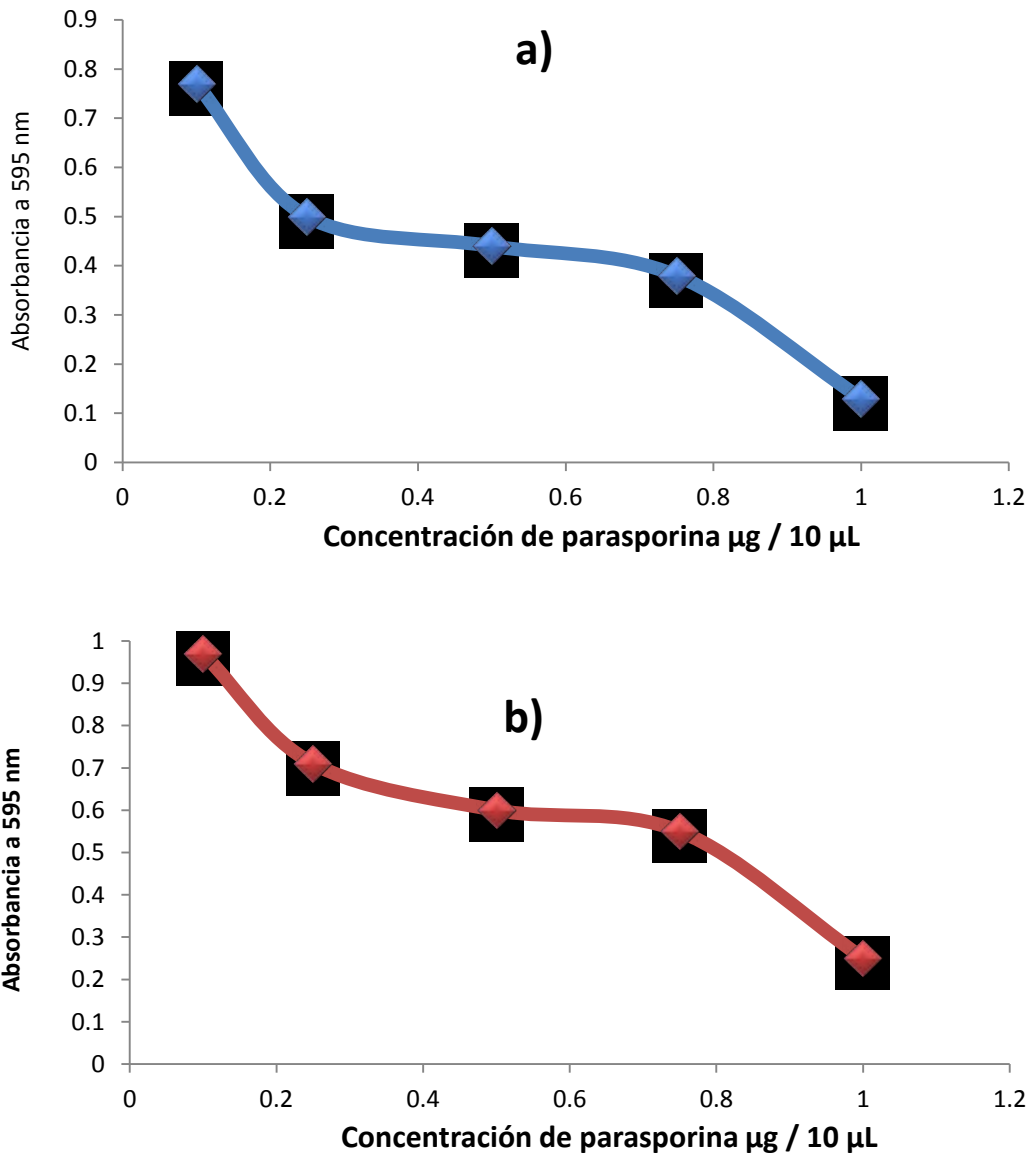


Figura 5. Actividad antiproliferativa de la parasporina A34-1. a) Contra MDA, b) contra MCF-7. Las concentraciones proteicas utilizadas fueron 0.1, 0.25, 0.5, 0.75 y 1 μg para ambos bioensayos.

La absorbancia de las células decrece con el aumento de la concentración proteica en ambos casos con la parasporina A34-1. En la Figura 6 se muestra el comportamiento de la cantidad de células contra la concentración proteica de la

parasporina A34-1. La cantidad celular inicial fue de 2×10^4 , por lo tanto se indica la mitad de ésta, 1×10^4 como la cantidad esperada para conocer la LC_{50} .

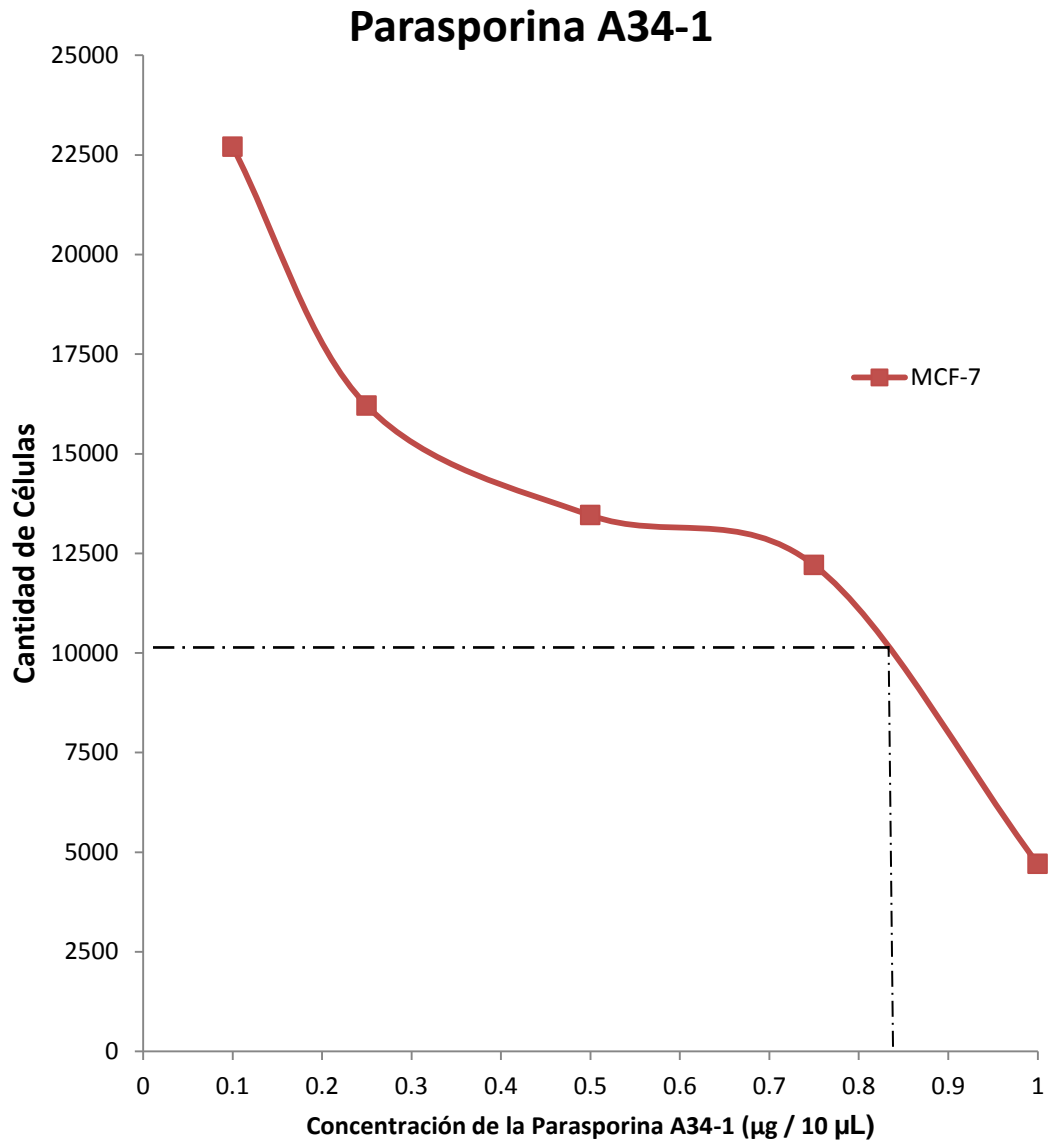


Figura 6. Ensayo dosis respuesta de la parasporina A34-1. Número de células contra concentración proteica.

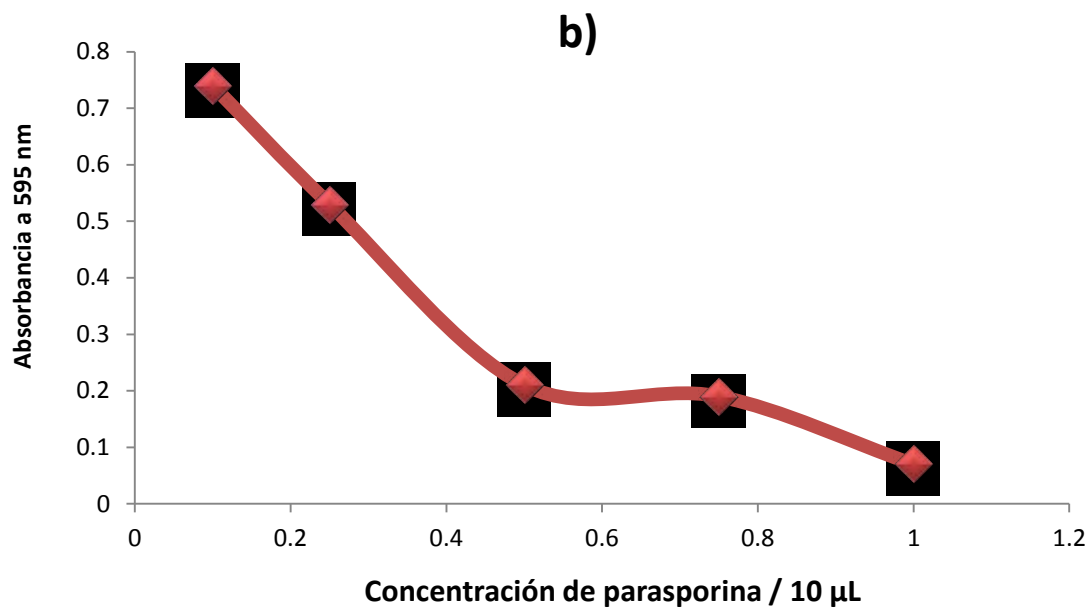
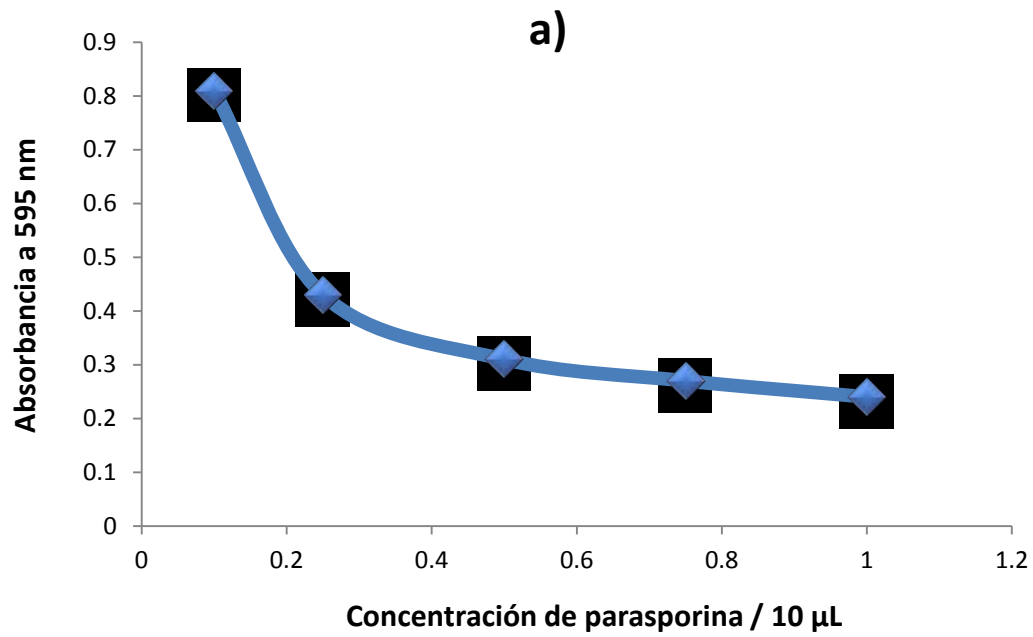


Figura 7. Actividad antiproliferativa de la parasporina A34-2. a) Contra MDA, b) contra MCF-7. Las concentraciones proteicas utilizadas fueron 0.1, 0.25, 0.5, 0.75 y 1 µg para ambos bioensayos

La absorbancia de ambas líneas celulares decrece con el aumento de la concentración proteica de la parasporina A34-2, hay un efecto dosis respuesta. En la Figura 8 se ve de manera gráfica el comportamiento de la cantidad de células contra la concentración proteica de la parasporina A34-2.

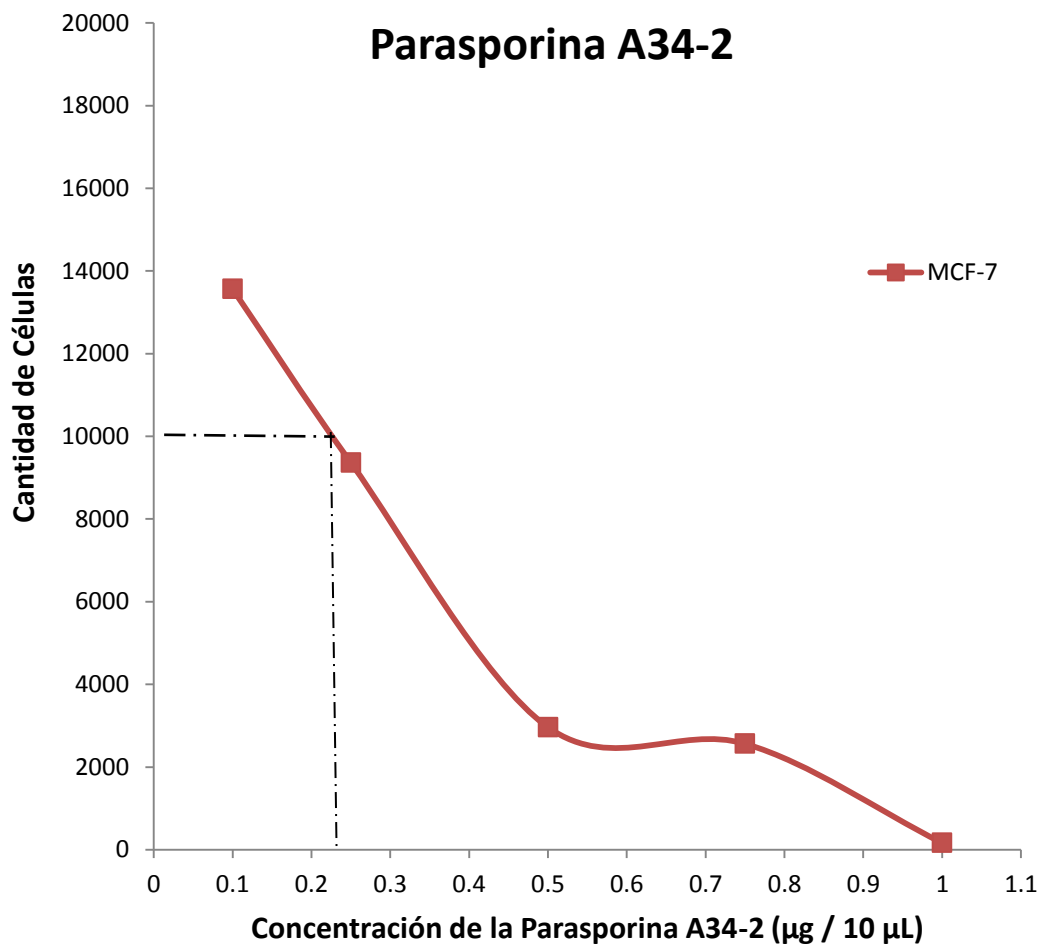


Figura 8. Ensayo dosis respuesta de la parasporina A34-2. Número de células contra concentración proteica.

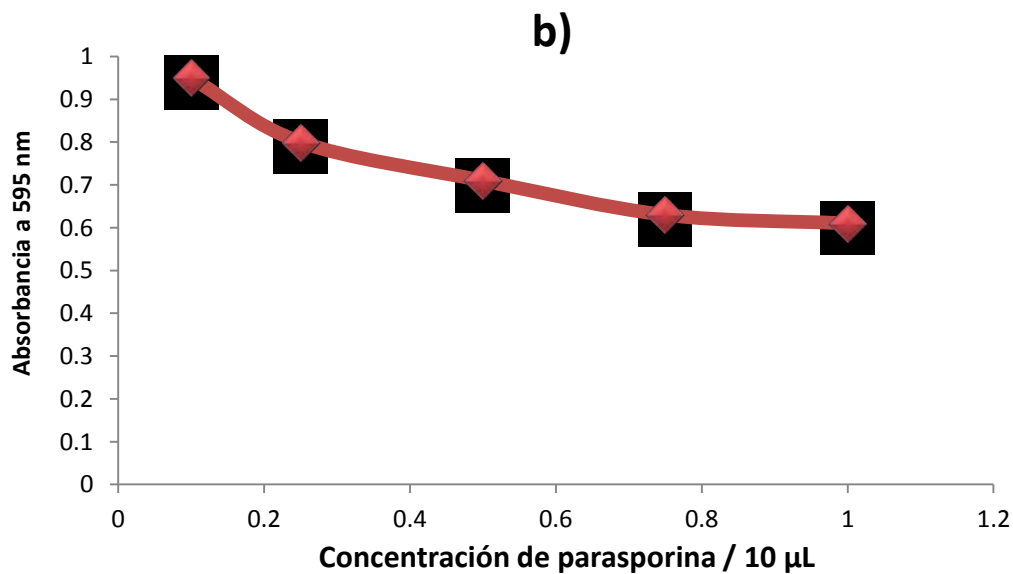
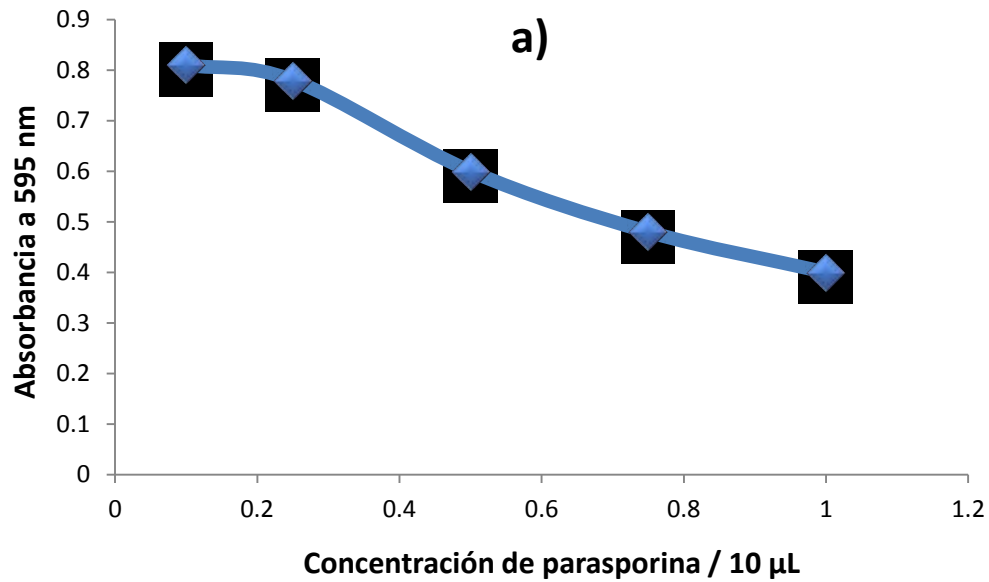


Figura 9. Actividad antiproliferativa de la parasporina AX-1. a) Contra MDA, b) contra MCF-7. Las concentraciones proteicas utilizadas fueron 0.1, 0.25, 0.5, 0.75 y 1 µg para ambos bioensayos

La absorbancia en ambas líneas celulares decrece con el aumento de la concentración proteica de la parasporina AX-1.

En la Figura 10 se observa el efecto dosis respuesta de la parasporina AX-1 en las células MCF-7.

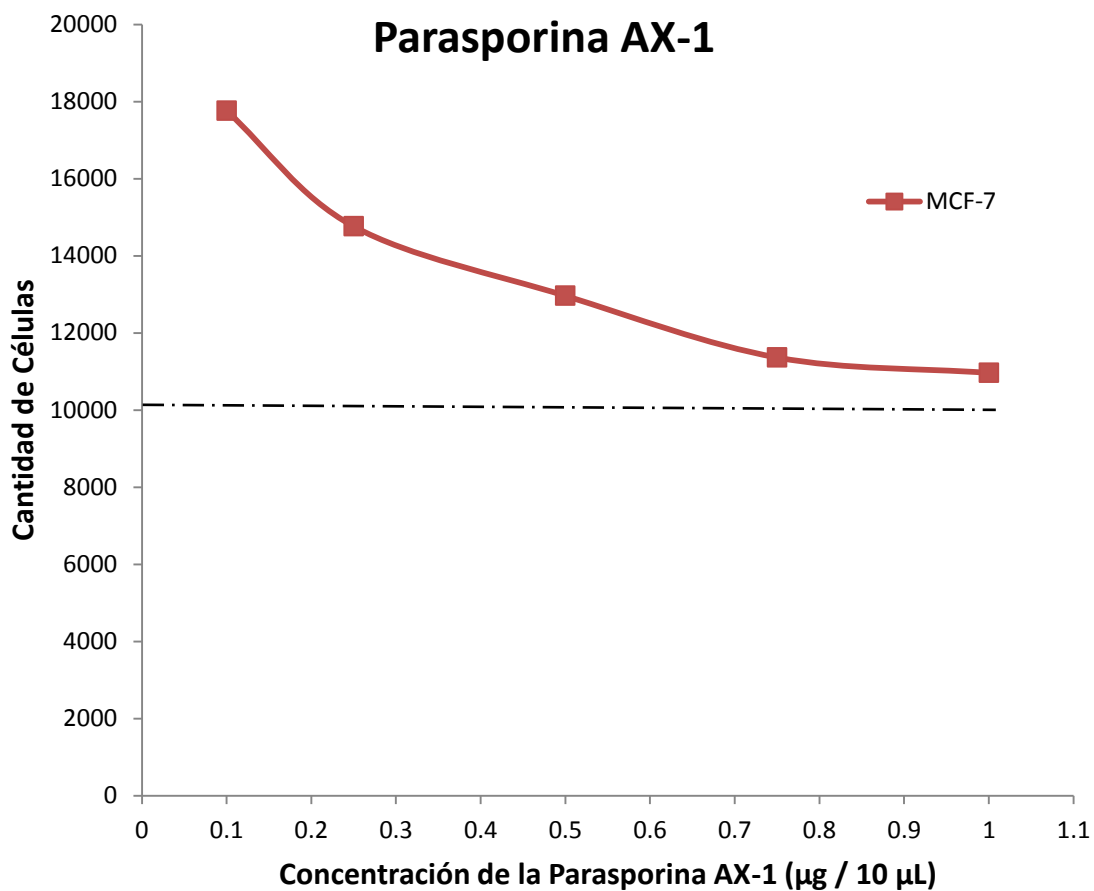


Figura 10. Ensayo dosis respuesta de la parasporina AX-1. Número de células contra concentración proteica.

Las concentraciones de la parasporina AX-1 utilizadas, no presentaron una dosis respuesta suficiente para que la concentración celular en ambas líneas (MDA y MCF-7) se redujera a un 50% (1×10^4 células / pozo). Se sugiere incrementar la dosis de dicha parasporina en ambas líneas celulares

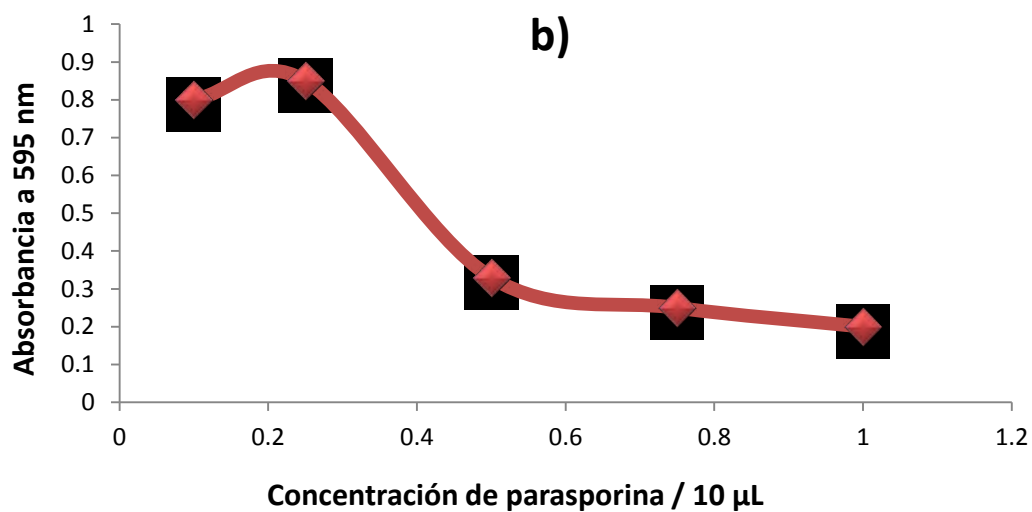
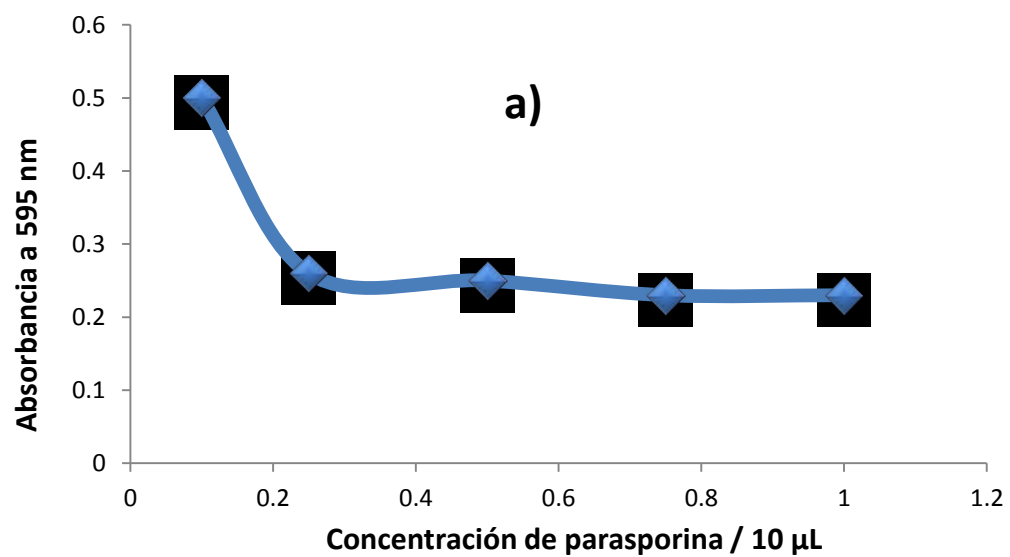


Figura 11. Actividad antiproliferativa de la parasporina AX-2. a) Contra MDA, b) contra MCF-7. Las concentraciones proteicas utilizadas fueron 0.1, 0.25, 0.5, 0.75 y 1 µg para ambos bioensayos.

La absorbancia en ambas líneas celulares decrece con el aumento de la concentración proteica de la parasporina AX-2. En la Figura 12 se presenta el

comportamiento de la cantidad de células MCF-7 contra la concentración proteica de la parasporina AX-2.

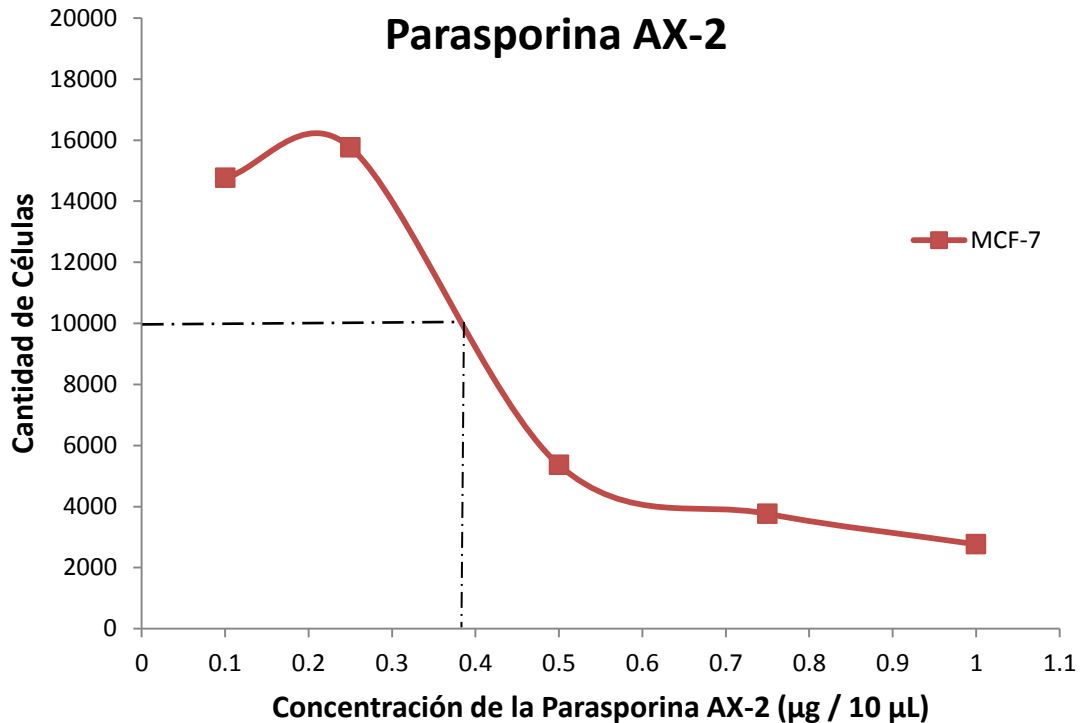


Figura 12. Ensayo dosis respuesta de la parasporina AX-2. Cantidad de células contra concentración proteica.

De las 8 proteínas probadas (AC3-1, AC3-2, A13-1, A13-2, A34-1, A34-2, AX-1 y AX-2) en ambas líneas celulares, sólo 4 presentaron actividad antiproliferativa (A34-1, A34-2, AX-1 y AX-2 respectivamente). La proliferación celular en las líneas MDA y MCF-7 decrece a mayor concentración de estas 4 proteínas, lo que sugiere que éstas son parasporinas.

Con base en los ensayos dosis respuesta contra las células MCF-7, la concentración necesaria de la parasporina A34-1 para que disminuya en 50% el número de células, se encuentra entre 0.8 y 0.9 µg/10 µL. Considerando que la

cantidad de células es proporcional a la absorbancia la concentración de parasporina necesaria para disminuir al 50% la absorbancia son 0.2 y 0.3 $\mu\text{g}/10 \mu\text{L}$ para A34-2 y 0.3 y 0.4 $\mu\text{g}/10 \mu\text{L}$ para AX-2. Como se puede observar se requiere menor concentración de la proteína A34-2 para reducir a la mitad la concentración de células de MCF-7, seguida de la parasporina AX-2 y por último la A34-1

La parasporina con mayor actividad antiproliferativa contra la línea MDA, fue la AX-2, con un peso aproximado de 50 kDa, producida por la cepa *B. thuringiensis* BMB171. Para la línea MCF-7, la parasporina con mayor actividad antiproliferativa, fue la A34-2 de 65 kDa aproximadamente, producida por la cepa *B. thuringiensis* var *tolworthi*. Actualmente no existen reportes que indiquen que estas cepas de *B. thuringiensis* sean productoras de parasporinas. Consecuentemente, los resultados evidencian la novedad del estudio en este tipo de cepas.

8.3 Obtención de la LC_{50} de las parasporinas libres.

Los resultados de las LC_{50} de cada parasporina se obtuvieron mediante la los ensayos de dosis respuesta (Tabla 5). Para la parasporina AX-1 no se pudo obtener la concentración necesaria para la disminución del 50% del número de células, haciendo necesario probar una mayor concentración de parasporinas contra las células tumorales. Aunque no se pudo obtener la LC_{50} de dicha proteína, se utilizó para la síntesis de sus nanopartículas.

Tabla 5. Relación de las LC₅₀ de cada parasporina por línea celular.

Parasporina	Peso molecular (~kDa)	LC ₅₀ (µg/mL)		LC ₅₀ (µg/10µL)	
		MDA	MCF-7	MDA	MCF-7
A34-1	75	92	85	0.92	0.85
A34-2	65	96	23	0.96	0.23
AX-2	50	24	39	0.24	0.39

La parasporina con menor LC₅₀ fue la AX-2 para MDA y la A34-2 para MCF-7. Mientras que la mayor LC₅₀ para ambas líneas celulares se obtuvo para la parasporina A34-1. Teixeira *et al.*, (2012) observó que la proteína Cyt2Ba de 66kDa presenta una LC₅₀ de 20 µg/mL para la línea MCF-7 parecida a la LC₅₀ obtenida para A34-2.

Las LC₅₀ de las proteínas estudiadas son mayores en comparación con las reportadas en la literatura. Se han descrito proteínas de pesos similares pero con una actividad más fuerte para líneas tumorales. Brasseur *et al.*, (2015) encontraron que la parasporina de clase 2, PS2Aa1 de 37 kDa presenta LC₅₀ de 2 y 3.5 µg/mL para MCF-7 y MDA respectivamente. También se observaron parasporinas clase 1, como PS1Ac2 de 60 kDa con una concentración letal media de 2 µg/mL para células HeLa (de cáncer cervicouterino) (Kuroda *et al.*, 2013). El peso de las proteínas analizadas está dentro de las clasificaciones 1,3 y 5. Estos pesos generalmente presentan actividad en células HeLa, como la parasporina PS1Ab de 81 kDa que fue reportada por Uemori *et al.*, (2008), la cual también tiene actividad en células tumorales HepG2 (de cáncer de hígado), MOLT-4, HL60 y Jurkat, estas últimas 3 de leucemia, A549 (de cáncer de pulmón), CaCo-2 (de cáncer de colon) (Jung *et al.*, 2006, Okumura *et al.*, 2006, Mesnage *et al.*, 2011,

Nagamatsu *et al.*, 2010). Se compararon las LC₅₀ de las parasporinas utilizadas en este estudio con las de otras sustancias o extractos que presentan actividad antiproliferativa contra líneas tumorales de mama reportados en la literatura y observamos que las actividades antiproliferativas son muy similares. Por ejemplo: los flavonoides extraídos de la planta *Justicia gendarussa*, presentan una concentración letal de 40 µg/mL para MDA (Ayob *et al.*, 2014). De igual manera, los extractos de hojas de la planta *Ziziphus spina-christi* muestran una LC₅₀ de 20 µg/mL contra MDA y MCF-7 (Jafarian *et al.*, 2012). Sin embargo también se han reportado concentraciones letales muy bajas en contra de ambas líneas celulares tales como extractos de semillas de *Piper cubeba*, los cuales tienen una LC₅₀ de 4 µg/mL (Graidist *et al.*, 2015). Existen también antibióticos naturales que se utilizan como antitumorales como lo es la Magainina II extraída de la piel de rana, esta proteína presenta una dosis letal de 200 µg/mL contra ambas líneas (Anghel *et al.*, 2013). De esta manera, las proteínas utilizadas en los bioensayos en este trabajo, son similares en tamaño a otras producidas por otras cepas *B. thuringiensis* que también tienen actividad antiproliferativa contra líneas de cáncer de mamá. Sin embargo, para poderlas clasificar según la nomenclatura convencional de las parasporinas se requiere de experimentos adicionales como son la secuenciación de los genes *cry*. En cuanto a la concentración letal, los resultados mostrados por nuestras proteínas son mayores a los presentados por otras parasporinas pero son similares a los presentados por extractos vegetales y menores a otras proteínas naturales.

8.4 Microscopía electrónica de barrido de la parasporinas libres.

Las micrografías por MEB de los liofilizados de los cultivos AX y A34 muestran la morfología de los cristales proteicos que forman (Figuras 13 y 14).

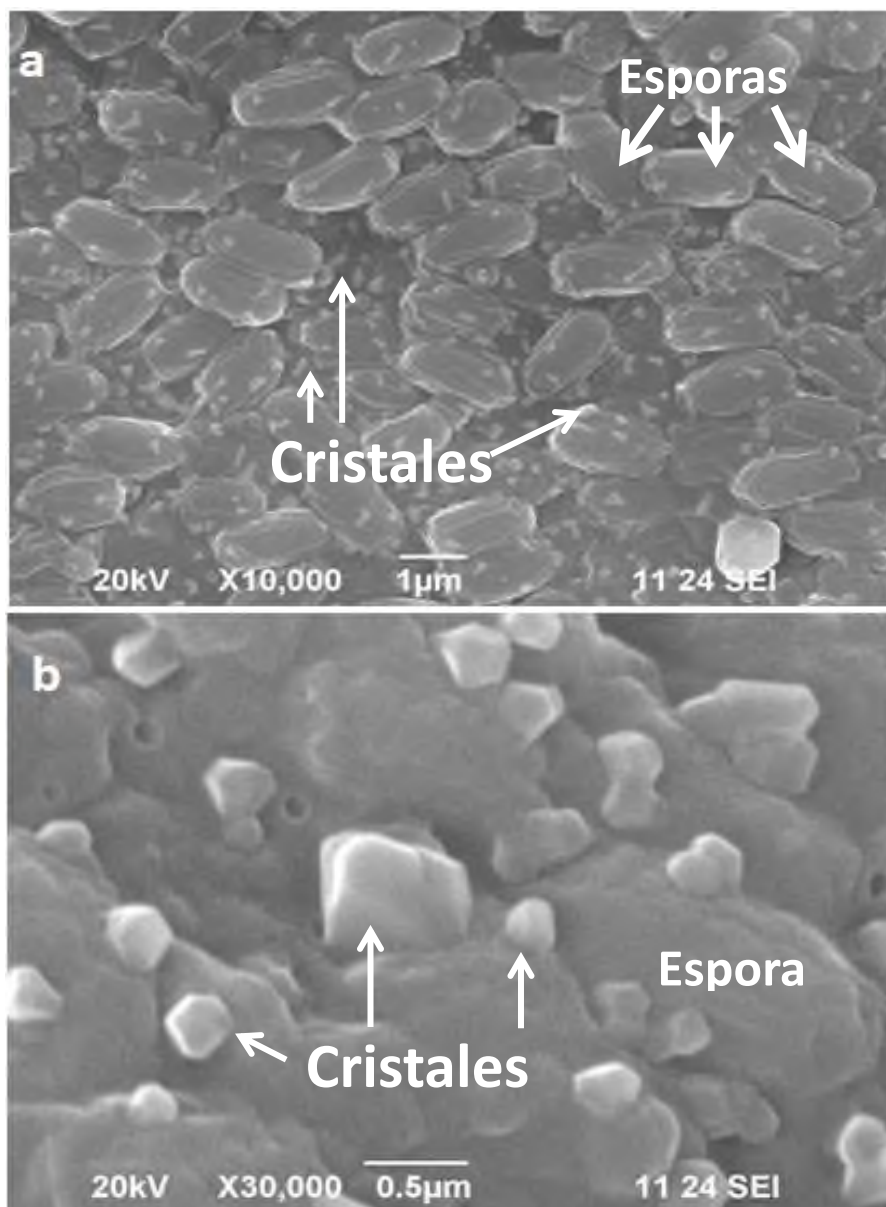


Figura 13. Micrografías MEB de la cepa A34. a). Esporas y cristales. b). Diversas morfologías y tamaños de cristales presentes en un mismo cultivo.

Para la cepa A34 (Figura 13) se observaron cristales de formas irregulares de distintos tamaños. También se ven las esporas como una característica del final del ciclo de vida de *B. thuringiensis*, al momento de toma de la muestra. Las esporas de la cepa A34 son de un tamaño aproximado de 2 μm de largo por 1 μm de ancho. Los cristales son de diferentes morfologías y tamaños como romboidales de 0.3 μm por 0.3 μm aproximadamente, amorfos de hasta 0.6 μm por 0.6 μm .

De igual manera que la cepa A34, la cepa AX (figura 14) presentó esporas y cristales de diferentes morfologías y tamaños.

El tamaño de las esporas de AX y A34 está dentro de los previamente reportados. De manera general se ha reportado que las esporas de *B. thuringiensis* tienen un tamaño de 2 a 3 μm de largo por 1 μm de ancho (Bechtel & Bulla, 1976)

La presencia de cristales en el análisis micrográfico de las cepas de *B. thuringiensis* es la principal característica que distingue a esta especie de otras. Las diferentes morfologías de los cristales pueden ofrecer información sobre su toxicidad insecticida (Tailor *et al.*, 1992; Lereclus *et al.*, 1993), pero se sabe muy poco sobre la relación entre éstas y su asociación con las parasporinas. Futuros estudios comparativos entre producción de parasporinas y su análisis micrográficos, pueden ser una herramienta de reconocimiento de cepas productoras de estas proteínas. En la literatura se ha reportado que las cepas HD-1 y HD-73 producen cristales proteicos de romboidales (Bechtel & Bulla, 1976). Mientras que la cepa S1338 produce cristales proteicos amorfos, éstos han sido reportados con actividad antiproliferativa.

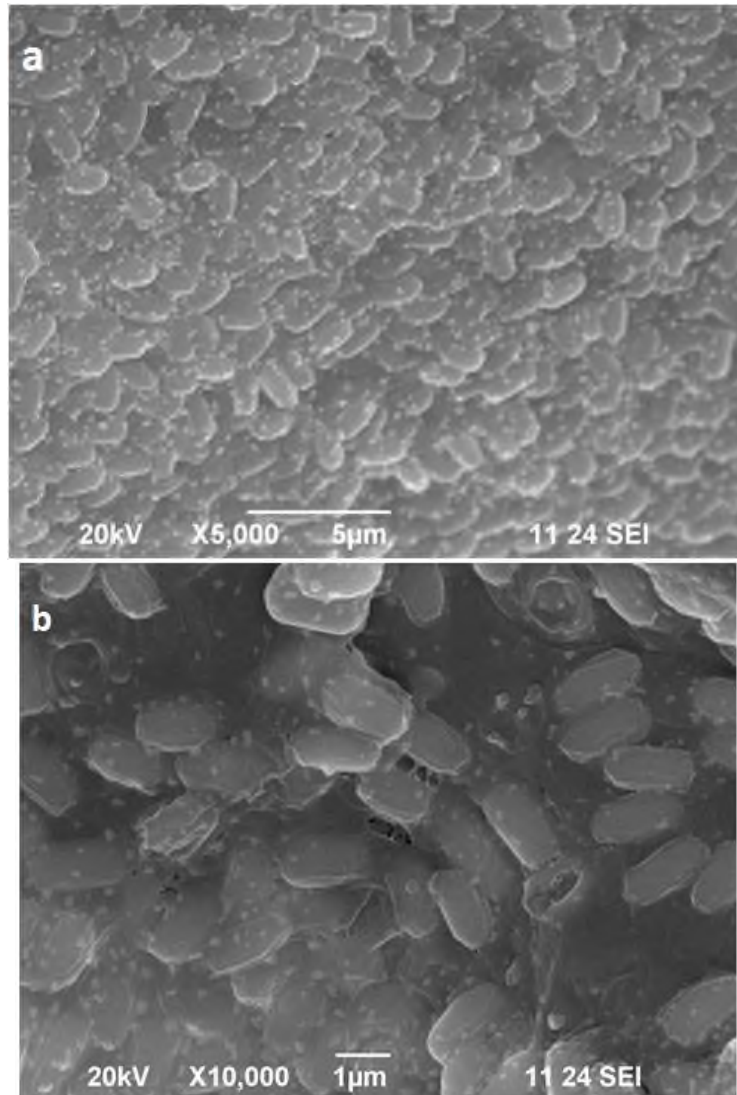


Figura 14. Micrografías MEB de la cepa AX. a). Esporas y cristales. b). Diversas morfologías y tamaños de cristales presentes en un mismo cultivo.

La cepa AX fue identificada en trabajos previos (Bravo-D *et al*, 2015, Cruz-Nolasco, 2014) como *B. thuringiensis* BMB171 y la cepa A34 como *B. thuringiensis* var *tolworthi*. La cepa *B. thuringiensis* var *tolworthi* según Gitahy *et al.*, (2007) produce Cry9C con tipo de cristal amorfo-esférico. Mientras que la morfología de los cristales producidos por la cepa BMB171 no han sido reportados.

8.5 Síntesis de nanoliposomas, determinación del diámetro de partícula, índice de polidispersión (Pdl) y potencial Z

Posterior a la elaboración de los nanoliposomas por medio de la técnica de deposición interfacial, se obtuvieron cuatro liposomas por duplicado de cada una de las cuatro parasporinas (AX-1, AX-2, A34-1 Y A34-2) con actividad antiproliferativa contra las líneas celulares MDA y MCF-7. Además se obtuvo un nanoliposoma por duplicado sin parasporinas para ser considerado como un tratamiento blanco negativo. De estas diez dispersiones (4 de parasporinas y un blanco, todas por duplicado), se determinaron sus diámetros de partícula, su índice de polidispersión (Pdl) y el potencial Z de cada dispersión. Los resultados se observan en la Tabla 6. Los resultados gráficos brindados por el software, son presentados en el Anexo B.

Tabla 6. Diámetro de partícula, índice de polidispersión y potencial Z de los nanoliposomas sintetizados.

Medición	Nanoliposoma									
	AX-1		AX-2		A34-1		A34-2		Blanco	
	N1	N2	N1	N2	N1	N2	N1	N2	N1	N2
Diámetro de partícula (nm)	169.6	176.3	155	180.7	169.1	188.8	182.1	202.5	182	196.3
Pdl	0.160	0.140	0.132	0.147	0.138	0.160	0.195	0.204	0.177	0.168
Potencial Z (mV)	-24.8	-25.8	-23.1	-26.3	-23.5	-22	-24.6	-26.1	-18.9	-15.3

La polidispersión se refleja en el valor numérico del índice de polidispersión. El valor máximo para el Pdl es 1 y, cuanto más se aproxime a cero, más

monodispersa es la disolución, y por tanto la distribución es homogénea (Malvern Instruments Limited, 2011). Las diez dispersiones presentaron un tamaño promedio de partícula de alrededor de 200 nm. El índice de polidispersión presentado fue de alrededor de 0.2, lo cual nos indica que las dispersiones son homogéneas en cuanto a su distribución de tamaño.

Con base al número de capas (laminaridad) y diámetro, según Malam y colaboradores (2009), los liposomas se clasifican en vesículas multilaminares (MLVs, diámetro mayor a 200 nm), vesículas grandes unilaminares (LUVs, diámetro de 100-400 nm), y vesículas pequeñas unilaminares (SUVs, diámetro menor a 100 nm). Según González-Pérez (2004), el tamaño de los liposomas para SUV está entre 20-50 nm, LUV 70-200 nm y otros de 0.02 micras a 3.5 micras. Tomando en cuenta esta clasificación, los liposomas sintetizados en este trabajo caen dentro de la clasificación de grandes unilaminares (LUV), ya que tienen un tamaño promedio de 200nm.

La importancia del potencial zeta es que su valor puede estar relacionado con la estabilidad de las dispersiones coloidales. De esta manera, el potencial zeta indica el grado de repulsión entre partículas adyacentes, cargadas en una dispersión (Hunter, 1988). Para las moléculas y partículas que son lo suficientemente pequeñas, un alto potencial zeta le confiere estabilidad, es decir, la solución o dispersión se resistirá a la agregación. Cuando el potencial es bajo, se tiene atracción entre las partículas, se supera a la repulsión y se forman coágulos, en lugar de dispersión. Por lo tanto, los coloides de alto potencial zeta se estabilizan

eléctricamente, mientras que, los coloides con bajos potenciales zeta tienden a coagular (Brian *et al.*, 2004).

El Potencial Zeta obtenido de las dispersiones de los nanoliposomas de parasporinas, fue un valor alto para cada una, (< -20 mV). Por lo tanto podemos decir que los liposomas son aceptables ya que cuando el potencial es mayor a -20 mV se tienen agregados de los liposomas, lo cual aumenta su tamaño, y pueden presentar una distribución no homogénea (Batalla *et al.*, 2014).

8.6 Microscopía electrónica de barrido de los nanoliposomas.

Para las dispersiones de AX-1, AX-2, A34-1, A34-2 y el blanco, se observan esferas bien definidas de un tamaño aproximado de 200 nm (Figuras 15, 16, 17, 18 y 19 respectivamente). Estos resultados concuerdan con la medición del tamaño promedio de partículas.

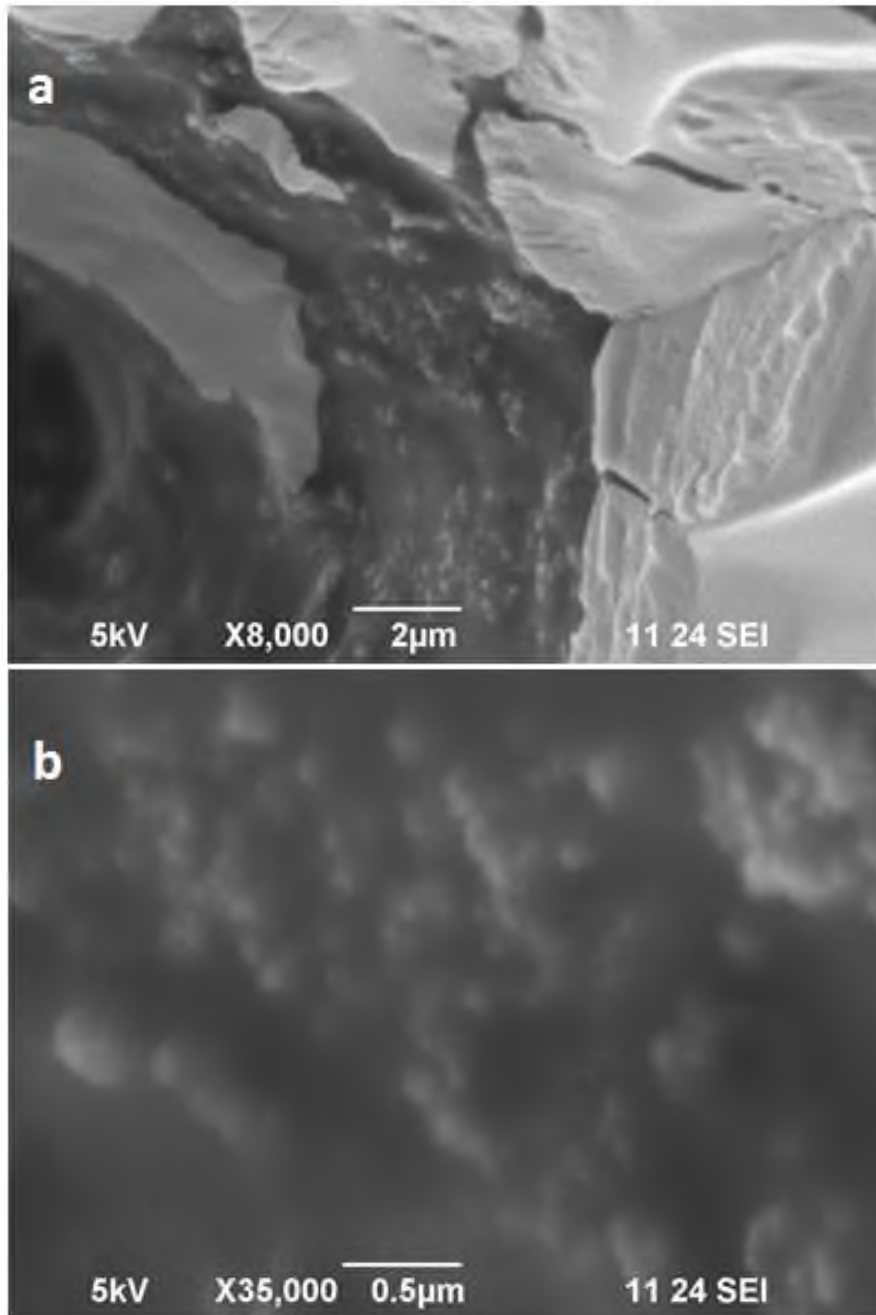


Figura 15 . Micrografías MEB de la dispersión hecha con la parasporina AX-1. a) Liposomas aglomerados. b) Liposomas con mayor aumento.

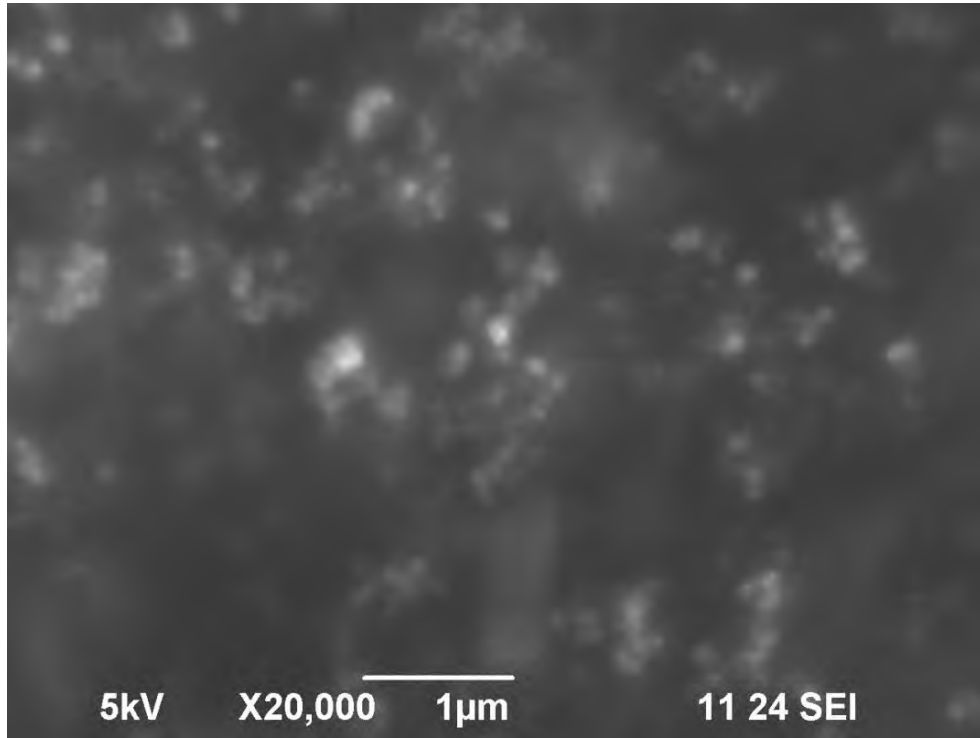


Figura 16. Micrografía MEB de la dispersión AX-2

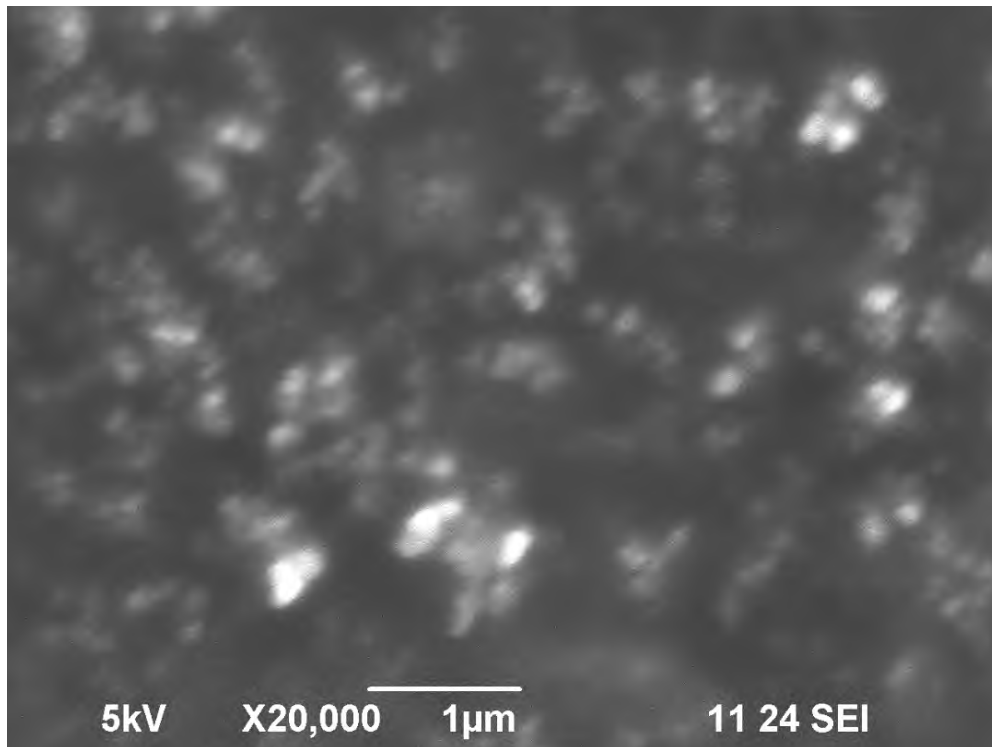


Figura 17. Micrografía MEB de la dispersión A34-1.

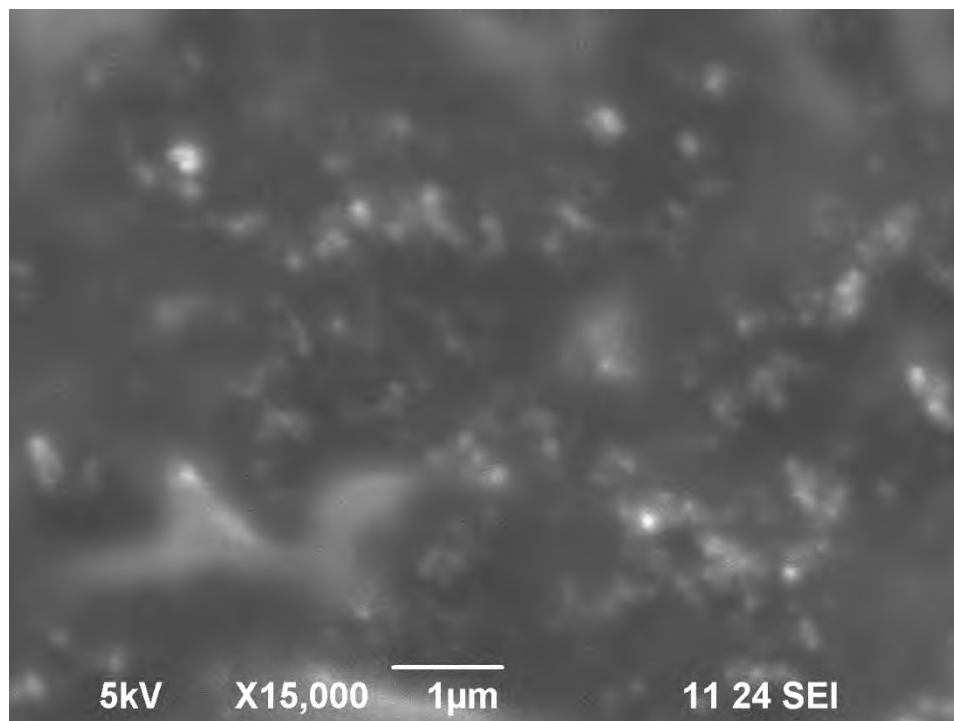


Figura 18. Micrografía MEB de la dispersión A34-2.

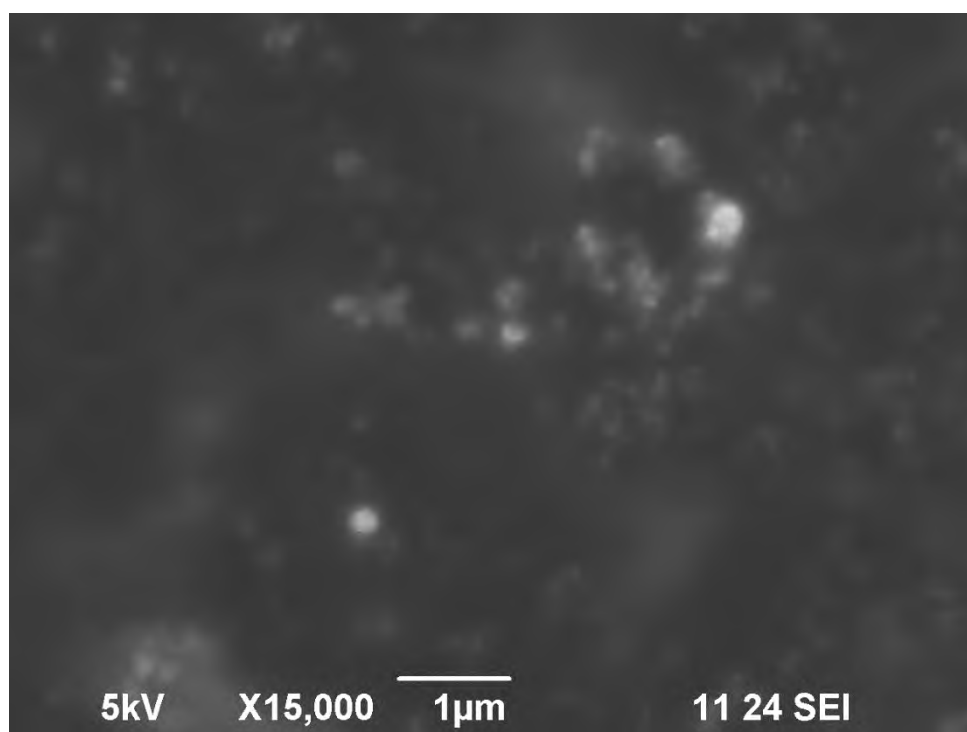


Figura 19. Micrografía MEB de los liposomas Blanco.

En las micrografías MEB se aprecia la forma esférica característica de los liposomas. Las dispersiones son homogéneas, están alrededor de los 200 nm. Se han reportado distintos tamaños de liposomas acarreadores de fármacos, Sabeti *et al.*, (2012) encapsularon en liposomas diclofenaco sódico en Palmitoil, sus vesículas fueron esféricas ligeramente deformadas y de un tamaño aproximado de 400 nm. También se han producido liposomas con antibióticos usados en quimioterapia contra el cáncer, un ejemplo de esto es la Doxorubicina hidroclicorada encapsulada con Di-Oleil-Fosfatidil Colina, Di-Palmitoil-Fosfatidil Glicerol, Trioleina y Colesterol, el tamaño resultante de estas construcciones fue de 33 μm con un potencial z de -18.9 mV, con una estabilidad óptima de 7 días y con una forma esférica (Maheshkuma *et al.*, 2013). Los liposomas hechos en este trabajo son de menor tamaño que los de Doxorubicina y con potencial z mayor, lo que puede suponer que nuestras construcciones son viables de igual o mejor manera. De igual manera se han sintetizado nanopartículas de plata (AgNPs) conteniendo sobrenadante del cultivo líquido de *Bacillus funiculus*, y puestos en contra de la línea MDA. El tamaño de estas partículas fue de 10-20 nm y mostraron actividad antiproliferativa con una LC_{50} de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Gurunathan *et al.*, 2013). En la literatura no se encontraron reportes de liposomas de parasporinas.

IX. Conclusiones

Con base a los bioensayos hechos en las líneas celulares MDA y MCF-7 de cáncer de mama, las proteínas A34-1 (~75 kDa) y A34-2 (~65 kDa) producidas por la cepa de *B. thuringiensis tolworthi* y las proteínas AX-1 (~55 kDa) y AX-2 (~50 kDa) producidas por la cepa de *B. thuringiensis spp*, son parasporinas, ya que presentaron actividad antiproliferativa sobre estas líneas.

Las parasporinas A34-2 y AX-2 fueron las que mostraron mayor actividad antiproliferativa.

Mediante el método de deposición interfacial es posible generar nanoliposomas con parasporinas de *B. thuringiensis*, con las características físicas adecuadas para su uso.

X. Perspectivas

Este trabajo presenta las bases para hacer biosensayos de diversas proteínas de *B. thuringiensis* contra líneas celulares cancerígenas, además de la preparación de liposomas viables para hacer bioensayos, esto da lugar a desarrollar los siguientes temas de investigación:

- Evaluación de la actividad antiproliferativa de los liposomas ya sintetizados conteniendo las parasporinas AX y A34 contra las líneas MDA y MCF-7.
- Estudios morfológicos de los nanoliposomas mediante Microscopia electrónica de transmisión (TEM).
- Estudios de estabilidad de los nanoliposomas conteniendo las parasporinas AX y A34.
- Determinación del posible mecanismo de acción de las parasporinas AX y A34 contra las líneas MDA y MCF-7.
- Caracterización molecular de las parasporinas AX y A34 y su clasificación con base en la homología de sus secuencias de aminoácidos según el Comité de Clasificación y Nomenclatura de Parasporinas.
- Escrutinio de diversos extractos proteicos insolubles de *Bacillus thuringiensis* con actividad antiproliferativa contra diferentes líneas celulares cancerígenas (cervicouterino, hígado, colon, riñón, pulmón, etc.).

Por otro lado, establecer el protocolo para producir nanopartículas de plata (AgNPs) con el sobrenadante del cultivo líquido de nuestras cepas de *B. thuringiensis* productoras de parasporinas y hacer bioensayos en líneas cancerígenas como lo proponen Gurunathan *et al.*, (2013).

XI. Bibliografía

Abdulkareem, I. H., Zurmi, I. B. (2012). Review of hormonal treatment of breast cancer. Niger J Clin Pract 15:9-14.

Anghel, R., Jitaru, F., Bsdescu, L., Bsdescu, M. & Ciocoiu, M. (2013). The Cytotoxic Effect of Magainin II on the MDA-MB-231 and M14K Tumour Cell Lines. BioMed Res Intl 2013, 831709

Arantes, O. M. N., Vilas-Bôas, L. A. & Vilas-Bôas, G. F. L. T. (2002). *Bacillus thuringiensis*: Estratégias no controle biológico. In: Serafini, L. A.; Barros, N. M.; 78 Azevedo, J. L. (Org.). Biotecnologia: avanços na agricultura e agroindústria. Caxias do Sul: EDUSC:269-293.

Ayob, Z., Pauliena S., Bohari, M., Samad, A. & Jamil, S. (2014). Cytotoxic activities against breast cancer cells of local *Justicia gendarussa* crude extracts. Evid-Based Complement Alternat Med 2014:732980

Batalla, M. J., Cuadros, M. A. & San Martín-Martínez, E. (2014). Potencial zeta en la determinación de carga superficial de liposomas. Lat Am J Phys Educ 8:1–6.

Bechtel, D. & Bulla, L. (1976). Electron Microscope Study of Sporulation and Parasporal Crystal Formation in *Bacillus thuringiensis*. J Bact, 1472-1481.

Bian, J., Kirby, E. F. & Hasselbrink, Jr. (2004). Zeta potential of microfluidic substrates: 1. Theory, experimental techniques, and effects on separations. Electrophor 25:187-202

Brasil (2011). Instituto Nacional de Câncer. Estimativa 2012: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro:INCA.

Brasil (2014). Instituto Nacional de Câncer. Programa Nacional de Controle do Câncer de Mama. www.inca.gov.br. Acesso 2016.

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 8:0135106.

Bravo, A., Gill, S. S. & Soberón, M. (2007). Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. Toxicon 49:423-35.

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

Brigger, I., Dubernet, C. & Couvreur, P. (2012). Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. Adv Drug Deliver Rev 64:24-36

Colomé, L. M., Raffin, R. P., Assumpcao, E. R., Pohlmann, A. R. & Guterres, S. S. (2010). Theospheres based on theobroma grandiflorum seed butter: development of innovative nanoparticles for skin application. Soft Mater. 8:72-88.

Couvreur, P., Dubernet, C. & Puisieux, F. (1995). Controlled drug delivery with nanoparticles: current possibilities and future trends. Eur J Pharm Biopharm 41:2-13.

Crickmore, N., Zeigler, D., Feitelson, J., Schnepf, E., Van-Rie, J., Lereclus, D., Baum, J. & Dean, D. (1998). *Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature <http://www.biols.susx.ac.uk/Home/NeilCrickmore/Bt/index.html>

Cruz- Nolasco, A. (2014). Aislamiento e identificación de cepas de *Bacillus thuringiensis* productoras de proteína Cry. Tesis de Licenciatura. Universidad del Papalopan, México.

Fessi, H., Puisieux, F., Devissanguet, J. P., Ammoury, N. & Benita, S. (1989). Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *Int J Pharm* 55:1-4.

González Pérez, M. (2004). Los liposomas: usos y perspectivas, *Rev Cubana de Quim* 16:8-33.

Graidist, P., Martla, M. & Sukpondma, M. (2015). Cytotoxic activity of *Piper cubeba* extract in breast cancer cell lines. *Nutrients* 7:2707-2718.

Gitahy, P., de Souza, M., Monnerat, R., Arrigoni, E. & Baldani, J. (2007). A brazilian *Bacillus thuringiensis* strain highly active to sugarcane borer *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). *Brazilian J of Microbiol* 38:531-537.

Gurunathan, S., Han, J., Eppakayala, V., Jeyaraj, M. & Kim, J. (2013). Cytotoxicity of Biologically Synthesized Silver Nanoparticles in MDA-MB-231 Human Breast Cancer Cells. *BioMed Res Int* 2013:1-10

Hansen, B. M. & Salamiou, S. (2000). Virulence of *Bacillus thuringiensis* In: *Entomopat. Bact* 41-44.

Höfte, H. & Whiteley, H.R. (1989). Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis* strains from aquatic environments in Spain. *Curr Microbiol* 40:402408.

Hua, S. & Wu, S. (2013). The use of lipid-based nanocarriers for targeted pain therapies. *Front Pharmacol* 4:143.

Hunter, R. J. (1998). Zeta potential, In: *Colloid Science: Principles and Applications*, (Academic Press UK)

Instituto Nacional de Estadística y Geografía (2015). Estadísticas a propósito del día mundial de la lucha contra el cáncer de mama (19 de octubre). <http://www.inegi.org.mx/saladeprensa/aproposito/2015/mama0.pdf>

Instituto Nacional del Cáncer. (2015). Estadios del cáncer de seno. Recuperado el 6 de agosto de 2016, de: <http://www.cancer.gov/espanol/pdq/tratamiento/seno/Patient/page2>

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.

Jafarian, A., Zolfaghari, B. & Shirani, K. (2012). Cytotoxicity of different extracts of arial parts of *Ziziphus spina-christion* HeLa and MDA-MB-468 tumor cells. *Adv Biomed Res* 3:38.

Jafarian, A., Zolfaghari, B., & Shirani, K. (2014). Cytotoxicity of different extracts of arial parts of *Ziziphus spina-christi* on HeLa and MDA-MB-468 tumor cells. *Adv Biomed Res* 3:38.

Jung, Y-C., Mizuki, E., Akao, T. & Cote, J. (2006). 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

Katayama, H., Kusaka, Y., Yokota, H., Akao, T., Kojima, M., Nakamura, O., Mekada, E. & Mizuki, E. (2007). Parasporin-1, a novel cytotoxic protein from *Bacillus thuringiensis*, induces Ca_2^+ influx and a sustained elevation of the cytoplasmic Ca_2^+ concentration in toxin-sensitive cells. *J Biol Chem* 282:7742-7752.

Katayama, H., Yokota, H., Akao, T. & Nakamura, O. (2005). Parasporin1, a novel cytotoxic protein to human cells from non-insecticidal parasporal inclusions of *Bacillus thuringiensis*. *J Biochem* 137:17-25.

Kim, H. S., Yamashita, S., Akao, T., Saitoh, H., Higuchi, K., Park, Y. S., Mizuki, E. & Ohba, M. (2000) In vitro cytotoxicity of non-cyt inclusion proteins of a *Bacillus thuringiensis* isolate against human cells, including human cancer cells. *J Appl Microbiol* 89:16-23.

Kitada, S., Abe, Y., Shimada, H., Kusaka, Y., Matsuo, Y., Katayama, H., Okumura, S., Akao, T., Mizuki, E., Kuge, O., Sasaguri, Y., Ohba, M. & Ito, A. (2006). Cytocidal actions of parasporin-2, an antitumour crystal toxin from *Bacillus thuringiensis*. *J Biol Chem* (281):26350-26360.

Knaul, F., Nigenda, G., Lozano, R., Arreola-Ornelas, H., Langer, A. & Frenk, J. (2009). Cáncer de mama en México: una prioridad apremiante. *Salud Pública Mex* 51:335-344.

Koning, G. & Storm, G. (2003). Targeted drug delivery systems for the intracellular delivery of macromolecular drugs. *Drug Discov.* 8:482–483.

Kuroda, S., Begum, A., Saga, M., Hirao, A., Mizuki, E., Sakai, H. & Hayakawa T. (2013). Parasporin 1Ac2, a Novel Cytotoxic Crystal Protein Isolated from *Bacillus thuringiensis* B0462 Strain. *Curr Microbiol* 66:475–480.

Kwangjae, C., Xu, W., Shuming, N., Zhuo, C. & Dong, M. (2008). Therapeutic nanoparticles for drug delivery in cancer. *Clin Cancer Res* 14:1310–1316.

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural protein during the assembly of head of the bacteriophage T4. *Nature* 227:680–685.

Lee, D. W., Akao, T., Yamashita, S., Katayama, H., Maeda, M., Saitoh, H., Mizuki, E & Ohba, M. (2000). Non insecticidal parasoral proteins of a *Bacillus thuringiensis* serovar *shandongiensis* isolate exhibit a preferential cytotoxicity against human leukaemic T cells. *Biochem Biophys Res Comm* 272:218-23.

Lee, D., Katayama, H., Akao, T., Maeda, M., Tanaka, R., Yamashita, S., Saitoh, H., Mizuki, E. & Ohba, M. (2001). A 28 kDa protein of the *Bacillus thuringiensis* serovar *shandongiensis* isolate 89-T-34-22 induces a human leukemic cell-specific cytotoxicity. *Biochim Biophys Acta* 1547:57-63.

Lereclus, D., Arantès, O., Chaufaux, J. & Lecadet, M. (1989). Transformation and expression of a cloned delta-endotoxin gene in *Bacillus thuringiensis*. FEMS Microbiol Let 60:211-218.

Lereclus, D., Delecluses, A. & Lecadet, M. (1993) Diversity of *Bacillus thuringiensis* toxins and genes. 37-70.

Lozano, R., Knaul, F., Gómez-Dantés, H., Arreola-Ornelas, H. & Méndez O. (2008). Tendencias en la mortalidad por cáncer de mama en México, 1979-2006. Observatorio de la Salud. Documento de trabajo. Competitividad y Salud, Fundación Mexicana para la Salud.

Maheshkumar, S., Reddy, K., Goud, P., Kiranmayi, N. & Arvind, G. (2013). Formulation and characterization of doxorubicin hydrochloride liposomes by double emulsion method. Int Res J Pharm 4:197-201.

Malam Y, Loizidou, M. & Seifalian A. (2009). Liposomes and nanoparticles: nanosized vehicles for drug delivery in cancer. Trends Pharmacol Sci 30:592-599.

Malvern Instruments Limited (2011). Dynamic light scattering. Common terms defined.

Martin, P. & Travers, R. (1989) Worldwide abundance and distribution of *Bacillus thuringiensis* isolates. Appl Environ Microbiol 55:2437-2442.

Mathers, C., Lopez, A. & Murray C. (2001). The Burden of Disease and Mortality by Condition: Data, Methods, and Results for 2001. New York: Oxford University Press 45-93.

Mesnager, R., Clair, E., Gress, S., Then, C., Székács, A. & Séralini, G. (2011). Cytotoxicity on human cells of Cry1Ab and Cry1Ac *Bt* insecticidal toxins alone or with a glyphosate-based herbicide. *J Appl Toxicol* 33:695-699.

Metselaar, J. & Storm, G. (2005). Liposomes in the treatment of inflammatory disorders. *Expert Opin Drug Deliv* 2:465-476.

Miller, A., Hoogstraten, B., Staquet, M. & Winkler, A. (1981). Reporting results of cancer treatment. *Cancer* 47:207-214.

Mizuki, E., Park, Y. S., Saitoh, H., Yamashita, S., Akao, T., Higuchi, K. & Ohba, M. (2000) Parasporin, a human leukaemic cell-recognizing parasporal protein of *Bacillus thuringiensis*. *Clin Diagn Lab Immunol* 7:625-34.

Monteiro, N., Martins, A., Reis, R. & Neves, N. (2014). Liposomes in tissue engineering and regenerative medicine. *J R Soc Interface* 11:20140459.

Morrow, P. & Kim, E. S. (2005). New biological agents in the treatment of advanced non-small cell lung cancer. *Semin Respir Crit Care Med* 26:323-332.

Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: applications to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65:55-63

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* 74:494-98.

Nagamatsu, Y., Okamura, S., Saitou, H., Akao, T. & Mizuki E. (2009). 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.

Navarro, K. (2001). Modelo termodinámico: Producción de proteína Cry por *Bacillus thuringiensis*. Tesis de Maestría. CINVESTAV. México.

Ohba, M., Mizuki, E. & Uemori, A. (2009). Parasporin, a new anticancer protein group from *Bacillus thuringiensis*. *Anticancer Res* 29:427-34.

Okumura, S., Ohba, M., Mizuki, E., Crickmorer, N., Côté, J. C., Nagamatsu, Y., Kitada S., Sakai, H., Harata, K. & Shin, T. (2015). "Parasporin nomenclature". <http://parasporin.fitc.pref.fukuoka.jp>

Okumura, S., Saitoh, H., Wasano, N., Katayama, H., Higuchia, K., Mizuki, E. & Inouye, K. (2006). Efficient solubilization, activation, and purification of recombinant Cry45Aa of *Bacillus thuringiensis* expressed as inclusion bodies in *Escherichia coli*. *Prot Expr Purif* 47:144–151.

Organización Mundial de la Salud [OMS]. (2014). 10 datos sobre el cáncer. Recuperado el 6 de agosto de 2016, de: <http://www.who.int/features/factfiles/cancer/es/>

Organización Mundial de la Salud [OMS]. (2015a). Cáncer. Nota descriptiva N° 297. Recuperado el 6 de agosto d 2016, de: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>

Organización Panamericana de la Salud [OPS]. (2014a). Cáncer de mama en las Américas. Recuperado el 8 de noviembre de 2016, de: http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_download&gid=21588&Itemid

Organización Panamericana de la Salud [OPS]. (2014b). La OPS observa el mes de concientización sobre el cáncer de mama. Recuperado el 8 de noviembre de 2016, de: http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=10087&Itemid=40591&lang=es

Perou, C. (2011). Molecular stratification of triple-negative breast cancers. *The oncologist*. 16: 61–70.

Putheti, R., Okigbo, R., Madhusoodhan, S. & Chavanpatil, S. (2008). Nanotechnology importance in the pharmaceutical industry. *Afr J Pure Appl Chem* 2: 27-31.

Rowe, G. E. (1990). Central metabolism of *Bacillus thuringiensis* during growth and sporulation. London, Ontario, Canada. Ph. D. Thesis.

Rowe, G. & Margaritis, A. (1987) Bioprocess developments in the production of bioinsecticides by *B. thuringiensis*. *CRC Crit Rev in Biotech* 6:87-127.

Sabeti, B., Noordine M, Javar, H., Davoudi, E. & Kadivar, A. (2014). Characterization of Diclofenac Liposomes Formulated with Palm Oil Fractions. *Trop J Pharma Res* 13:185-190.

Sanchis, V. (2010) Vincent Sanchis - Researcher in life sciences. Día de consulta 6 de agosto 2016 <http://www.komunich.de/vincent-sanchis/france/bacillus-thuringiensis.html>

Sauka, D. & Benintende G. (2008). *Bacillus thuringiensis*: generalidades. Un acercamiento a su empleo en el biocontrol de insectos lepidópteros que son plagas agrícolas. Rev Arg Microbiol 40: 124-140.

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.

Sieuwert, A., Klijn, J., Peters, H. & Foekens, J. (1995). The MTT tetrazolium salt assay scrutinized: how to use this assay reliably to measure metabolic activity of cell cultures in vitro for the assessment of growth characteristics, IC_{50} -values and cell survival. Eur J Clin Chem Clin Biochem. 33:813-823.

Slamon, D., Clark, G., Wong, S., Levin, W., Ulrich, A. & McGuire, W. (1987). Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/new oncogene. Science 235:177–182.

Smyth, N. (1999). New Directions in Liposome Gene Delivery. Mol Biotechnol 11: 5.

Soppimatha, K., Aminabhavia, T., Kulkarnia, A. & Rudzinski, W. (2001). Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. J Contl Rel 70:1-20.

Stuckey, A. (2011). Breast cancer: epidemiology and risk factors. *Clin Obstet Gynecol* 54:96-102.

Taylor, R., Tippet, J., Gibb, G., Pells, S., Pike, D., Jordan, I. & Ely, S. (1992). Identification and characterization of a novel *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin entomocidal to coleopteran and lepidopteran larvae. *Mol Microbiol Ox*, 6:1211-1217.

Teixeira, R., Pereira, D, Monnerat, R. & Ribeiro. B. (2012). Cytotoxicity Analysis of Three *Bacillus thuringiensis* Subsp. *israelensis* δ -Endotoxins towards Insect and Mammalian Cells. *PLoS ONE* 9:e46121.

Uemori, A., Ohgushi, A., Yasutake, K., Maeda, M., Mizuki, E. & Ohba, M. (2013). Parasporin-1Ab, a Novel *Bacillus thuringiensis* Cytotoxin Preferentially Active on Human Cancer Cells *In Vitro*. *Antican Res* 28:91-96.

Ulrich, A. (2002). Biophysical aspects of using liposomes as delivery vehicles. *Biosci Rep* 22:129–150.

Van't Veer, L., Dai, H., Van De Vijver, M., He, Y., Hart, A., Mao, M., Peterse, H., Van Der Kooy, K., Marton, M., Witteveen, A., Schreiber, G., Kerkhoven, R., Roberts, C., Linsley, P., Bernards, R. & Friend, S. (2002). Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* 415:530-536.

Wacholder, S., Hartge, P., Prentice, R., Garcia-Closas, M., Feigelson, H., Diver, W., Thun, M., Cox, D., Hankinson, S., Kraft, P., Rosner, B., Berg, C., Brinton, L. A., Lissowska, J., Sherman, M., Chlebowski, R. Kooperberg, C., Jackson, R.,

Buckman, D, Hui, P., Pfeiffer, R., Jacobs, K., Thomas, G., Hoover, R., Gail, M., Chanock, J. & Hunter, D. (2010). Performance of common genetic variants in breast cancer risk models. *N Engl J Med* 11:986-93,

Who. (1999). Guideline specifications for bacterial larvicides for public health use. World Health Organization.

Yamashita, S., Katayama, H., Saitoh, H., Akao, T., Park, Y. S., Mizuki, E., Ohba, M. & Ito, A. (2005). Typical three-domain Cry proteins of *Bacillus thuringiensis* strain A1462 exhibit cytotoxic activity on limited human cancer cells. *J Biochem* 138:663–672.

Yang, W., Peters, J. & Williams, R. (2008). Inhaled nanoparticles: a current review. *Int J Pharm* 356:239-247.

Yasutake, K. (2006). Occurrence of parasporin-producing *Bacillus thuringiensis* in Vietnam. *Can J Microbiol* 52:365–372.

XII. Anexo A

12.1 Preparación de reactivos para SDS-PAGE

- *Buffer* Tris pH 6.8

6 g de Tris Base en 100 mL de agua destilada ajustando el pH a 6.8 con HCl.

- *Buffer* Tris pH 8.8

18.5 g de Tris Base en 100 mL de agua destilada ajustando el pH a 8.8 con HCl.

- *Buffer* Laemmli para solubilizar proteínas

Componente	Volumen (mL)
<i>Buffer</i> Tris pH 6.8	5
SDS (10% p/v)	2
Glicerol	2
2-Mercaptoetanol	1
Azul de bromofenol (1% p/v)	1

- *Buffer* de electroforesis Tris-Glicina 5X para proteínas aforado a 600 mL

Componente	Cantidad (g)
Tris Base	9
SDS	3
Glicina	43.2

- Solución de trabajo de azul brillante de Coomasie R250

Disolver 0.25 g de azul brillante de Coomasie R250 en 90 mL de metanol: H₂O (v/v 1:1) y 10 mL de ácido acético glacial.

12.2 Preparación de geles para SDS-PAGE

- Gel Separador al 7% (para 2 geles)

Componente	Volumen (mL)
<i>Buffer</i> Tris pH 8.8	2.3
Agua destilada	5.11
Acrilamida (30%)	2.7
TEMED (8.4% v/v)	0.05
Persulfato de Amonio (12.5% p/v)	0.092

- Gel concentrador (para 2 geles)

Componente	Volumen (mL)
<i>Buffer</i> Tris pH 6.8	1.5
Agua destilada	1.8
Acrilamida (30%)	1
TEMED (8.4% v/v)	0.03
Persulfato de Amonio (12.5% p/v)	0.06

12.3 Técnica para teñir y desteñir los geles de SDS-PAGE

Solución	Tiempo de agitación (min)
Ácido Tricloro acético (12.5% p/v)	30
Azul de Coomasie R250	60
Etanol (50%)	10
Etanol/Ác. Acético/Agua (3:1:6)	30
Metanol/Ác. Acético/Agua (5:2:13)	10

Entre cada paso se deben hacer 3 lavados con agua destilada

12.4 Preparación de reactivo para electroelución de proteínas

- *Buffer* de elución de proteínas aforado a 1 L. Resguardado a 4 °C.

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

12.5 Descongelamiento de las líneas celulares cancerígenas.

- 1) Las células se encuentran originalmente a -196 °C dentro de un tanque de N₂ líquido.
- 2) Una vez fuera del tanque de N₂, los criotubos se introducen rápidamente en un contenedor de agua a 37 °C hasta que las células se descongelen.

- 3) Posteriormente, en un tubo Falcón de 15 mL, se agregan las células ya descongeladas junto con 10 mL de medio de cultivo D-MEM.
- 4) Se centrifuga a 2000 rpm durante 10 minutos.
- 5) El sobrenadante se descarta y el paquete celular se resuspende en 1 mL de medio de cultivo.
- 6) La suspensión celular obtenida se siembra entonces en botellas de cultivo de 75 cm² con 20 mL de medio de cultivo.
- 7) Se mantienen a 37 °C en incubadora de CO₂ al 5%, hasta tener una confluencia mayor del 70% (el tiempo depende la línea celular, por lo que se recomienda revisarlo cada tercer día).

12.6 Tripsinizado de las líneas celulares cancerígenas

- 1) Cuando la confluencia del cultivo celular es mayor del 70%, se procede a tripsinizar.
- 2) En la campana de flujo laminar, con ayuda de una pipeta de 10 mL, se aspira el medio de cultivo y se desecha.
- 3) Se lava con 5 mL de PBS estéril, deslizándolos por la pared opuesta a donde creció el cultivo.
- 4) Se aspira el PBS y se desecha.
- 5) Se adicionan 2 mL de solución de Tripsina-EDTA al 0.25% y con la botella cerrada, se esparce homogéneamente por todo el cultivo.

- 6) Se observa al microscopio hasta que las células se desprendan de la botella.
- 7) La reacción se detiene añadiendo 5 mL de PBS-Albúmina o de su respectivo medio de cultivo
- 8) La suspensión obtenida se coloca en un tubo Falcon de 15 mL y se centrifuga a 1000 rpm durante 5 min.
- 9) El sobrenadante se descarta y el paquete celular se resuspende en 1 mL de medio de cultivo.

12.7 Preparación de la solución de isopropanol acidificado.

Adicionar 0.1 mL de HCl concentrado en 4.99 mL de isopropanol y almacenar a 4 °C

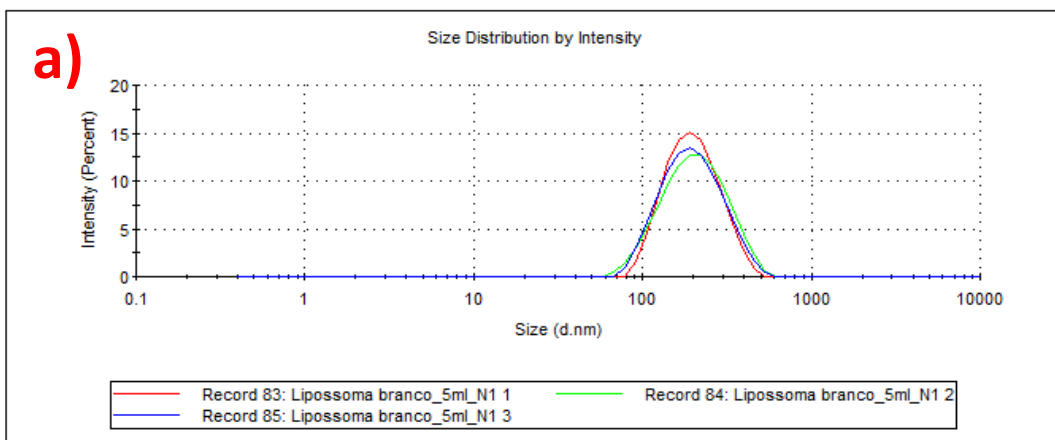
12.8 Preparación de la solución de Bromuro 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT)

- 1) Disolver el MTT en PBS 1X estéril a una concentración de 5 mg/mL.
- 2) Esterilizar por filtración la solución obtenida en una membrana de 0.22 µm.
- 3) Almacenar en alícuotas de 1 mL en tubos eppendorf cubiertos con aluminio a -20 °C.

XIII. Anexo B

13.1 Gráficos de las mediciones de tamaño promedio de partícula e índice de polidispersión de los nanoliposomas sintetizados.

	Size (d.nm):	% Intensity:	St Dev (d.nm):
Z-Average (d.nm): 182,0	Peak 1: 209,3	100,0	85,59
Pdl: 0,177	Peak 2: 0,000	0,0	0,000
Intercept: 0,966	Peak 3: 0,000	0,0	0,000
Result quality : Good			



	Size (d.nm):	% Intensity:	St Dev (d.nm):
Z-Average (d.nm): 196,3	Peak 1: 232,0	99,3	97,80
Pdl: 0,168	Peak 2: 50,04	0,7	6,940
Intercept: 0,950	Peak 3: 0,000	0,0	0,000
Result quality : Good			

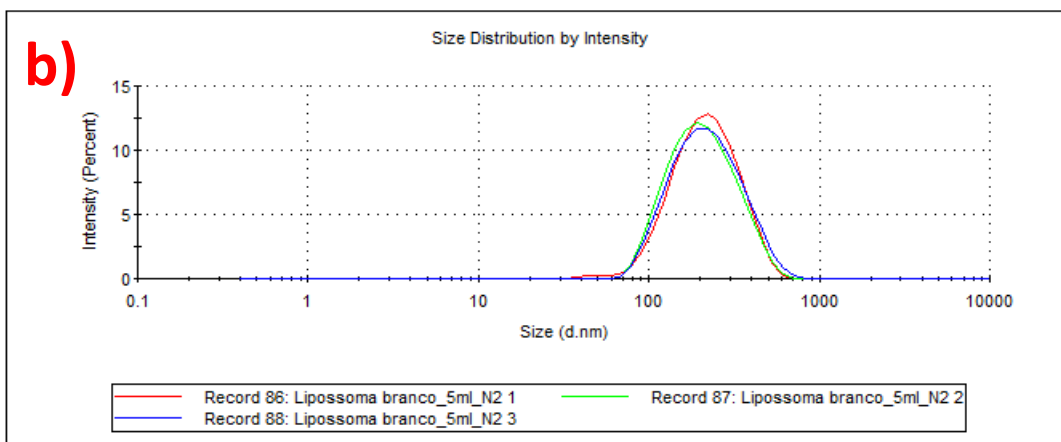
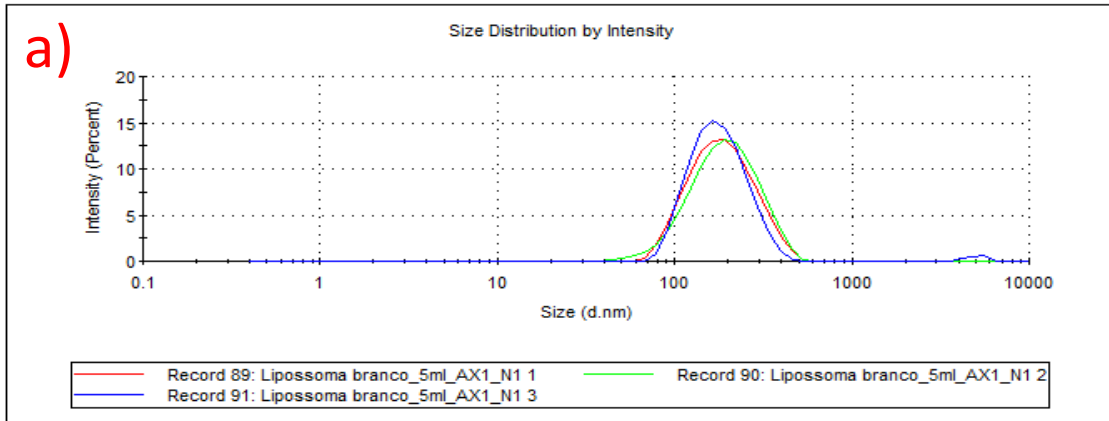


Figura 20. Diámetro de partícula y Pdl de liposomas blanco (sin parasporina) a) Muestra (N1) y b) Duplicado (N2)

	Size (d.nm):	% Intensity:	St Dev (d.nm):
Z-Average (d.nm): 169,6	Peak 1: 184,0	98,5	66,05
Pdl: 0,160	Peak 2: 4998	1,5	609,0
Intercept: 0,940	Peak 3: 0,000	0,0	0,000

Result quality : Good



	Size (d.nm):	% Intensity:	St Dev (d.nm):
Z-Average (d.nm): 176,3	Peak 1: 205,7	100,0	85,24
Pdl: 0,140	Peak 2: 0,000	0,0	0,000
Intercept: 0,965	Peak 3: 0,000	0,0	0,000

Result quality : Good

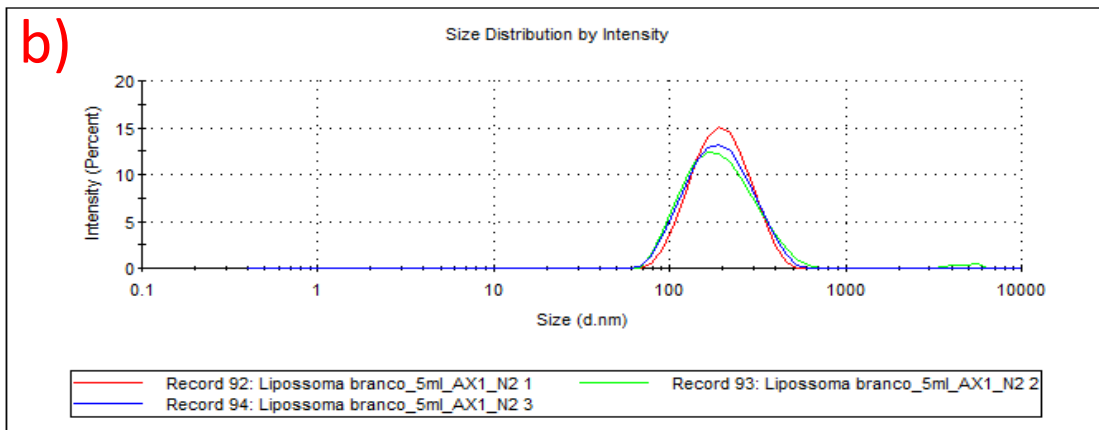
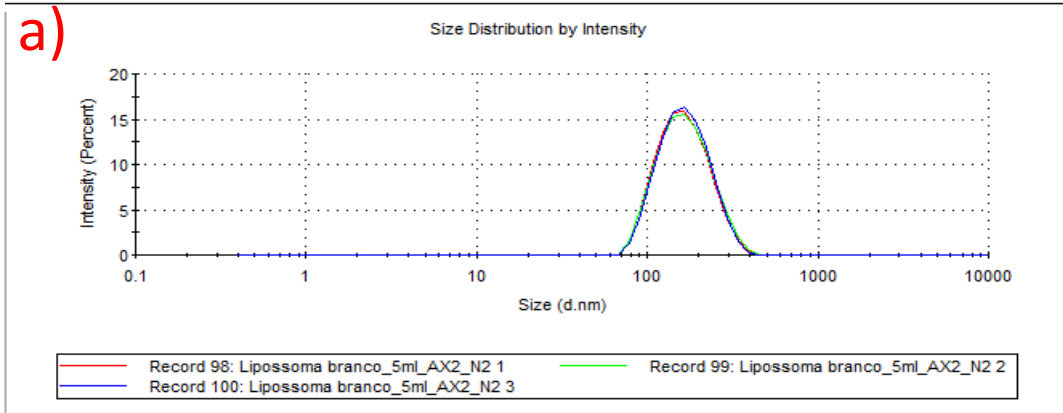


Figura 21. Diámetro de partícula y Pdl de liposomas con la parasporina AX-1. a) Muestra (N1) y b) Duplicado (N2)

Z-Average (d.nm): 155,0	Peak 1: 169,6	% Intensity: 100,0	St Dev (d.nm): 58,24
Pdl: 0,132	Peak 2: 0,000	% Intensity: 0,0	St Dev (d.nm): 0,000
Intercept: 0,964	Peak 3: 0,000	% Intensity: 0,0	St Dev (d.nm): 0,000

Result quality : Good



Z-Average (d.nm): 180,7	Peak 1: 214,6	% Intensity: 100,0	St Dev (d.nm): 88,38
Pdl: 0,147	Peak 2: 0,000	% Intensity: 0,0	St Dev (d.nm): 0,000
Intercept: 0,958	Peak 3: 0,000	% Intensity: 0,0	St Dev (d.nm): 0,000

Result quality : Good

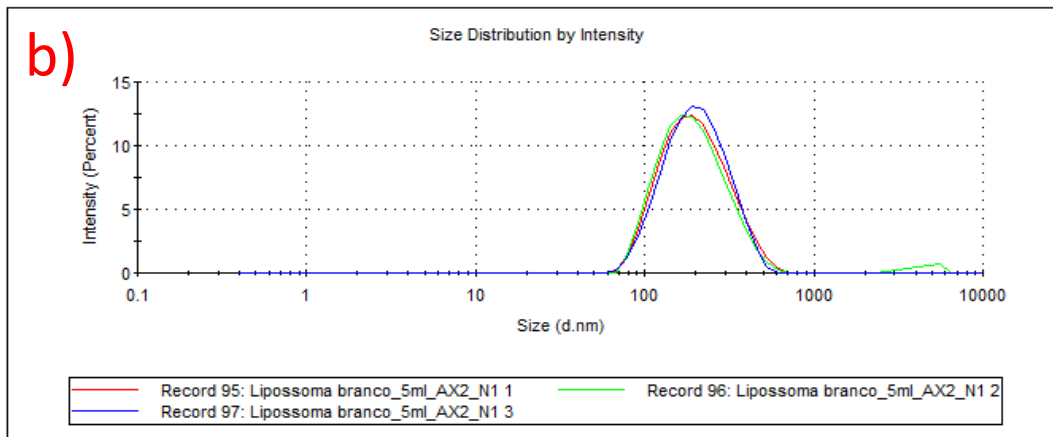
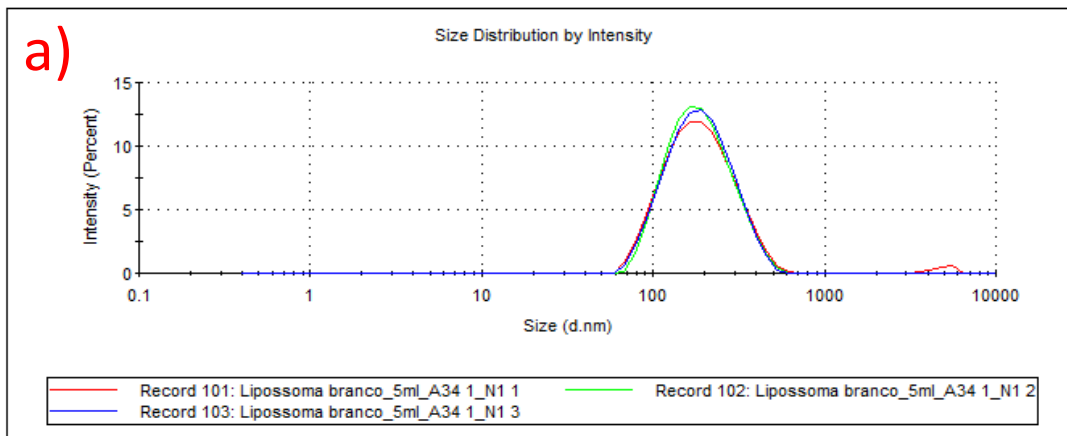


Figura 22. Diámetro de partícula y Pdl de liposomas con la parasporina AX-2. a) Muestra (N1) y b) Duplicado (N2)

	Size (d.nm):	% Intensity:	St Dev (d.nm):
Z-Average (d.nm): 169,1	Peak 1: 199,3	100,0	84,43
Pdl: 0,138	Peak 2: 0,000	0,0	0,000
Intercept: 0,949	Peak 3: 0,000	0,0	0,000

Result quality : Good



	Size (d.nm):	% Intensity:	St Dev (d.nm):
Z-Average (d.nm): 188,8	Peak 1: 225,0	98,6	90,00
Pdl: 0,160	Peak 2: 48,43	1,4	8,419
Intercept: 0,946	Peak 3: 0,000	0,0	0,000

Result quality : Good

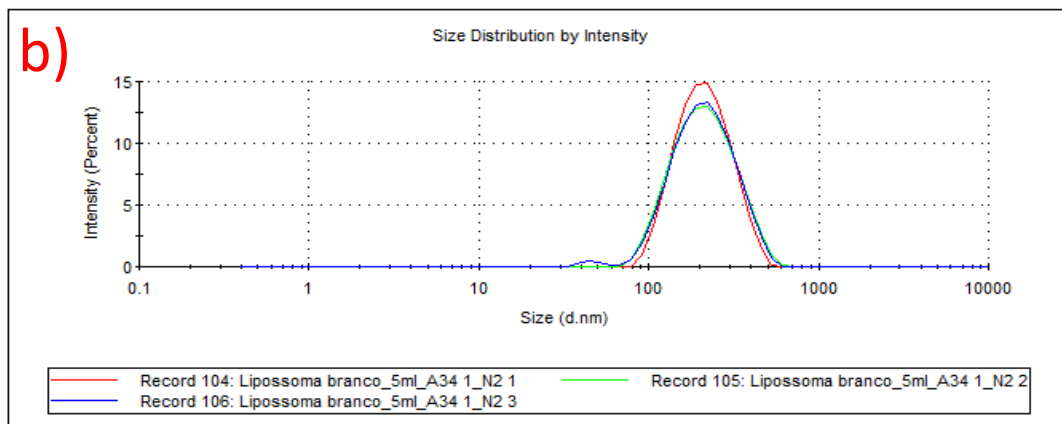
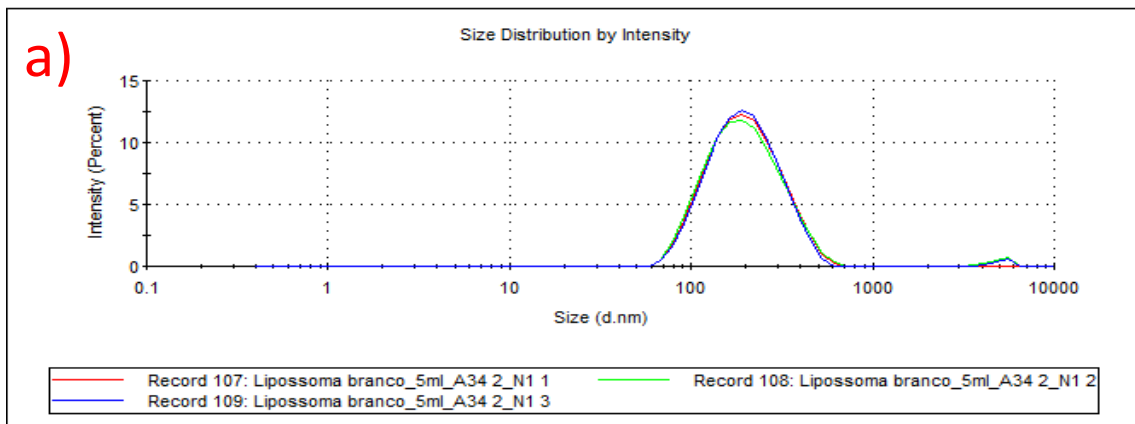


Figura 23. Diámetro de partícula y Pdl de liposomas con la parasporina A34-1. a) Muestra (N1) y b) Duplicado (N2)

	Size (d.nm):	% Intensity:	St Dev (d.nm):
Z-Average (d.nm): 182,1	Peak 1: 209,6	98,9	89,71
Pdl: 0,195	Peak 2: 5167	1,1	491,9
Intercept: 0,952	Peak 3: 0,000	0,0	0,000

Result quality : Good



	Size (d.nm):	% Intensity:	St Dev (d.nm):
Z-Average (d.nm): 202,5	Peak 1: 243,3	100,0	116,0
Pdl: 0,204	Peak 2: 0,000	0,0	0,000
Intercept: 0,955	Peak 3: 0,000	0,0	0,000

Result quality : Good

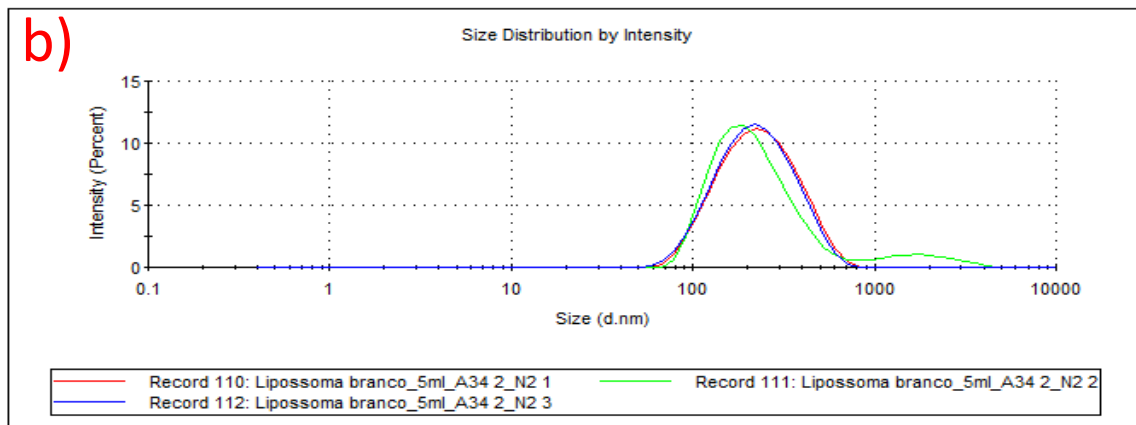
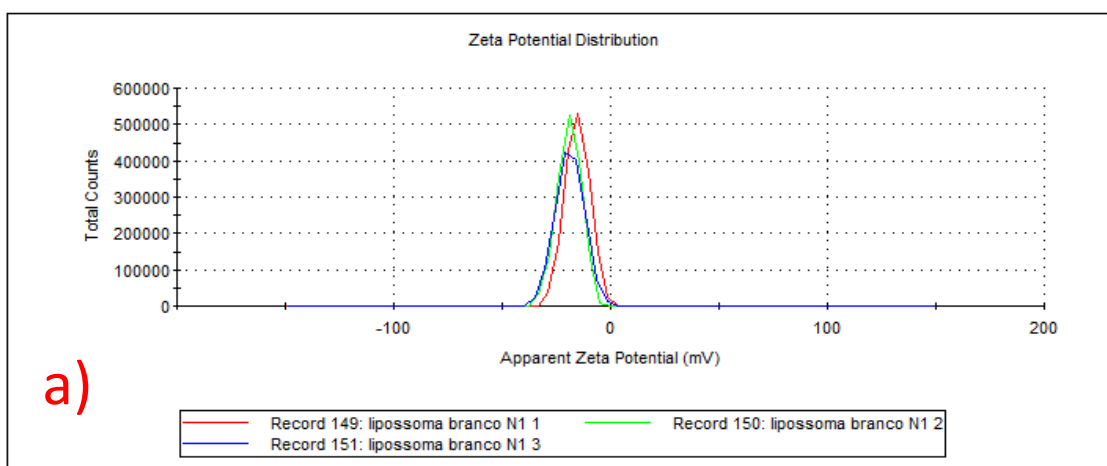


Figura 24. Diámetro de partícula y Pdl de liposomas con la parasporina A34-2. a) Muestra (N1) y b) Duplicado (N2)

13.2 Gráficos de Potencial Z de los nanoliposomas sintetizados

	Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV): -18,9	Peak 1: -18,9	100,0	6,46
Zeta Deviation (mV): 6,46	Peak 2: 0,00	0,0	0,00
Conductivity (mS/cm): 1,14	Peak 3: 0,00	0,0	0,00

Result quality : **Good**



	Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV): -15,3	Peak 1: -15,3	100,0	6,14
Zeta Deviation (mV): 6,14	Peak 2: 0,00	0,0	0,00
Conductivity (mS/cm): 1,15	Peak 3: 0,00	0,0	0,00

Result quality : **Good**

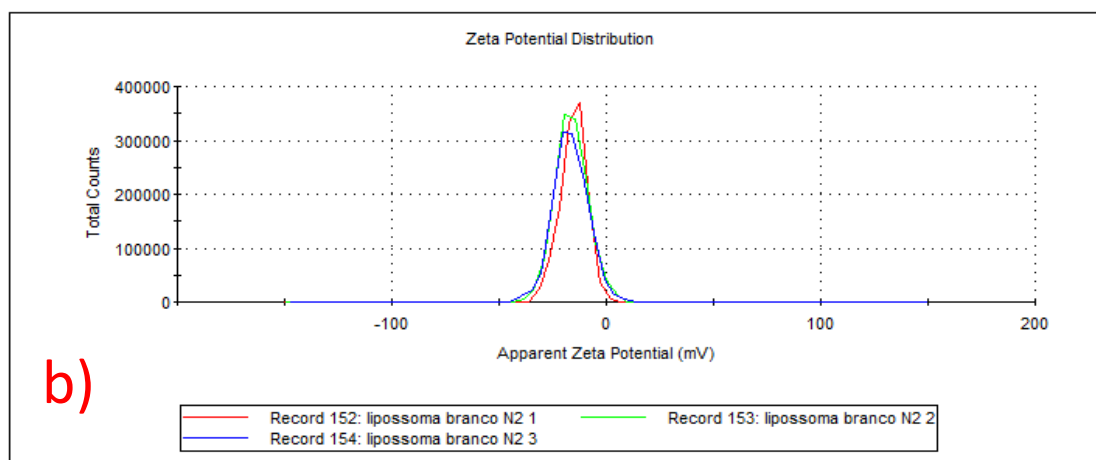
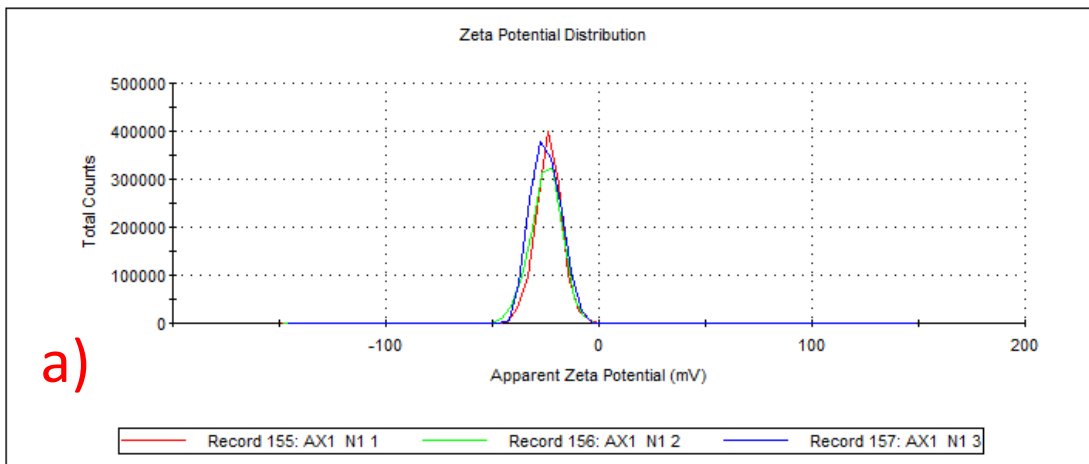


Figura 25. Potencial Zeta de los liposomas Blanco. a) Muestra (N1) y b) Duplicado (N2).

	Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV): -24,8	Peak 1: -24,8	100,0	6,89
Zeta Deviation (mV): 6,89	Peak 2: 0,00	0,0	0,00
Conductivity (mS/cm): 1,22	Peak 3: 0,00	0,0	0,00

Result quality : **Good**



	Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV): -25,8	Peak 1: -25,8	100,0	6,11
Zeta Deviation (mV): 6,11	Peak 2: 0,00	0,0	0,00
Conductivity (mS/cm): 1,21	Peak 3: 0,00	0,0	0,00

Result quality : **Good**

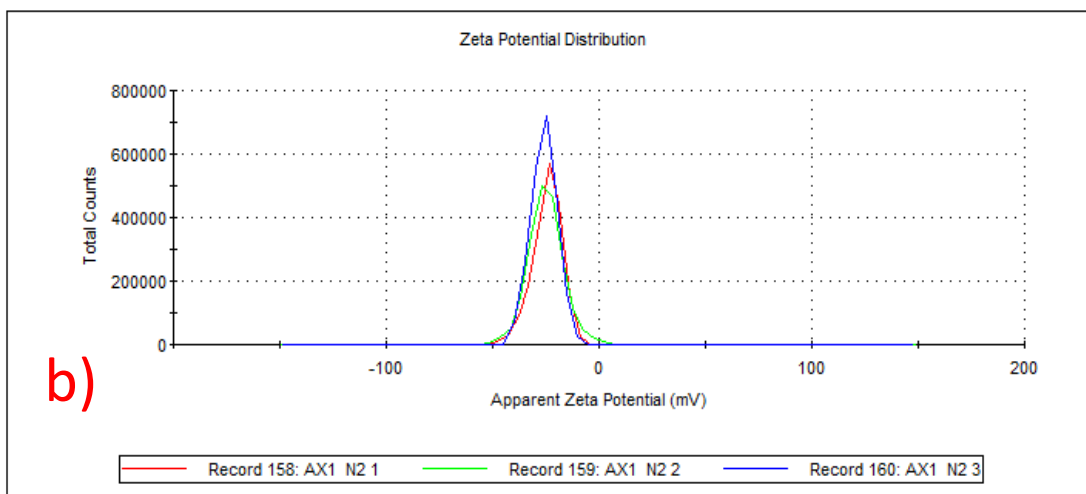
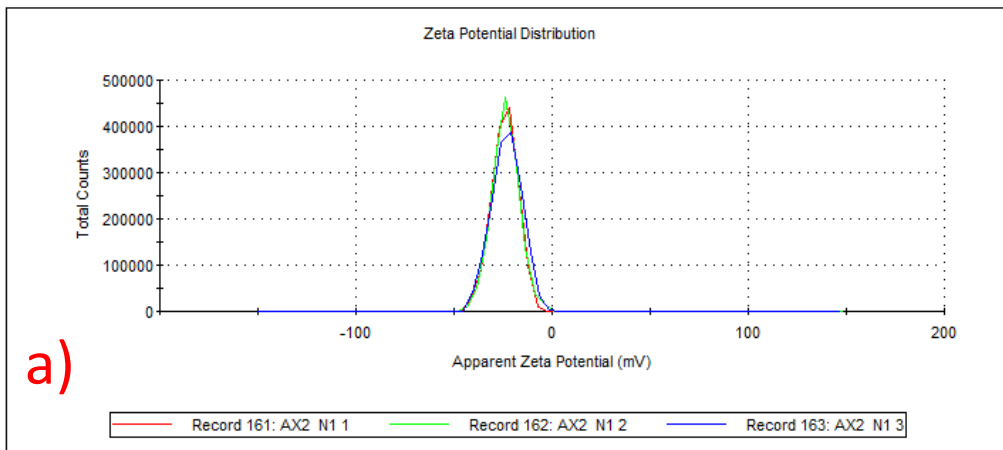


Figura 26. Potencial Zeta de los liposomas AX-1. a) Muestra (N1) y b) Duplicado (N2).

	Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV): -23,1	Peak 1: -23,1	100,0	7,71
Zeta Deviation (mV): 7,71	Peak 2: 0,00	0,0	0,00
Conductivity (mS/cm): 1,23	Peak 3: 0,00	0,0	0,00

Result quality : Good



	Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV): -26,3	Peak 1: -26,3	100,0	6,48
Zeta Deviation (mV): 6,48	Peak 2: 0,00	0,0	0,00
Conductivity (mS/cm): 1,24	Peak 3: 0,00	0,0	0,00

Result quality : Good

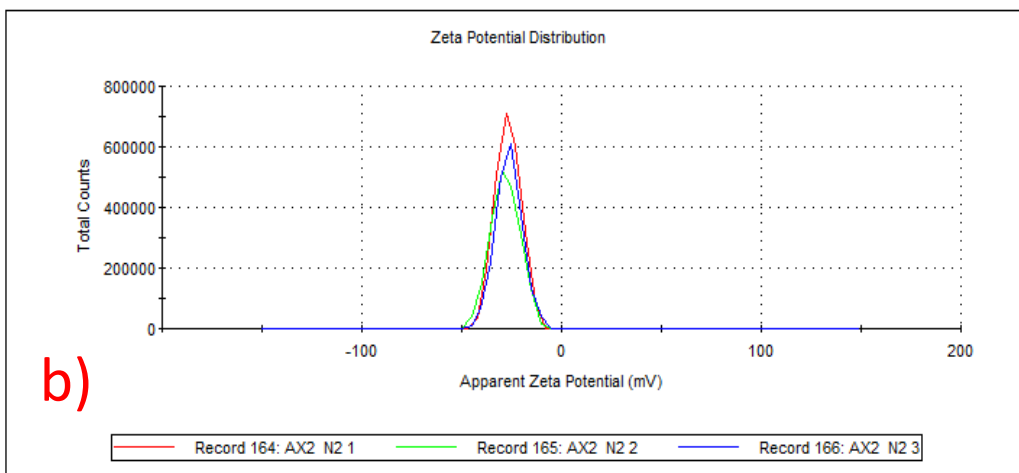
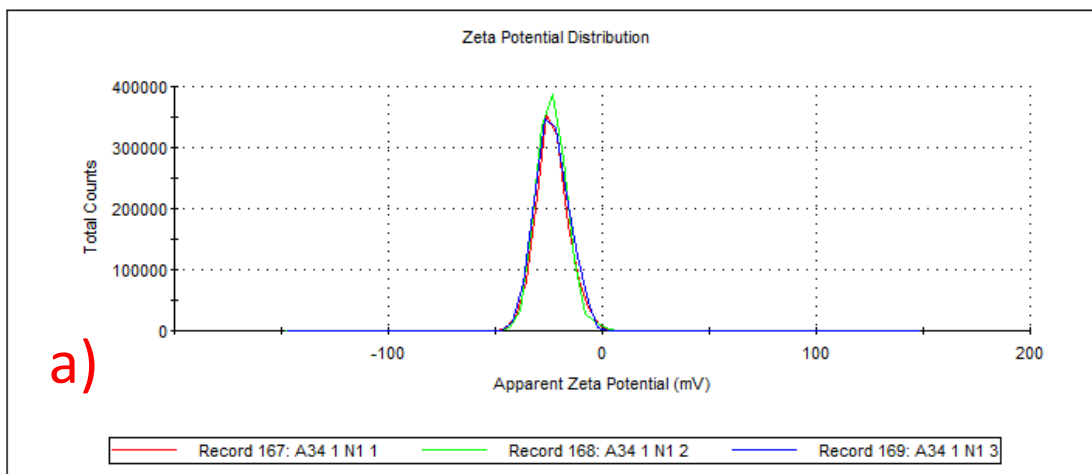


Figura 27. Potencial Zeta de los liposomas AX-2. a) Muestra (N1) y b) Duplicado (N2).

	Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV): -23,5	Peak 1: -23,5	100,0	7,64
Zeta Deviation (mV): 7,64	Peak 2: 0,00	0,0	0,00
Conductivity (mS/cm): 1,24	Peak 3: 0,00	0,0	0,00

Result quality : Good



	Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV): -22,0	Peak 1: -22,0	100,0	6,44
Zeta Deviation (mV): 6,44	Peak 2: 0,00	0,0	0,00
Conductivity (mS/cm): 1,23	Peak 3: 0,00	0,0	0,00

Result quality : Good

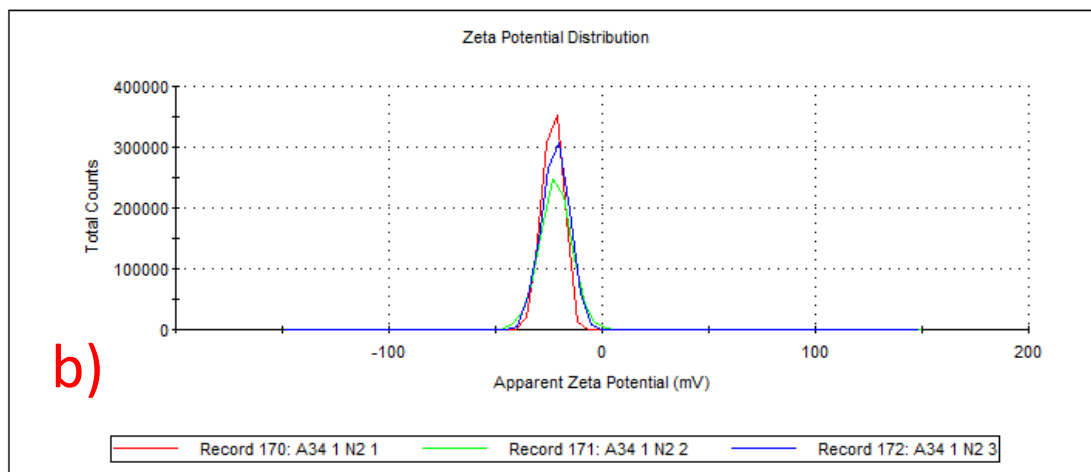
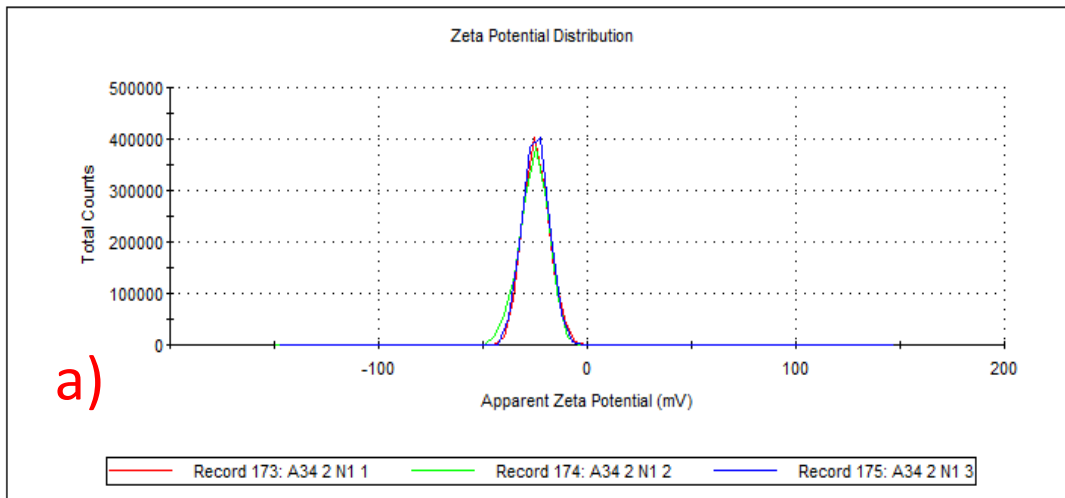


Figura 28. Potencial Zeta de los liposomas A34-1. a) Muestra (N1) y b) Duplicado (N2).

	Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV): -24,6	Peak 1: -24,6	100,0	6,00
Zeta Deviation (mV): 6,00	Peak 2: 0,00	0,0	0,00
Conductivity (mS/cm): 1,24	Peak 3: 0,00	0,0	0,00

Result quality : Good



	Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV): -26,1	Peak 1: -26,1	100,0	7,20
Zeta Deviation (mV): 7,20	Peak 2: 0,00	0,0	0,00
Conductivity (mS/cm): 1,24	Peak 3: 0,00	0,0	0,00

Result quality : Good

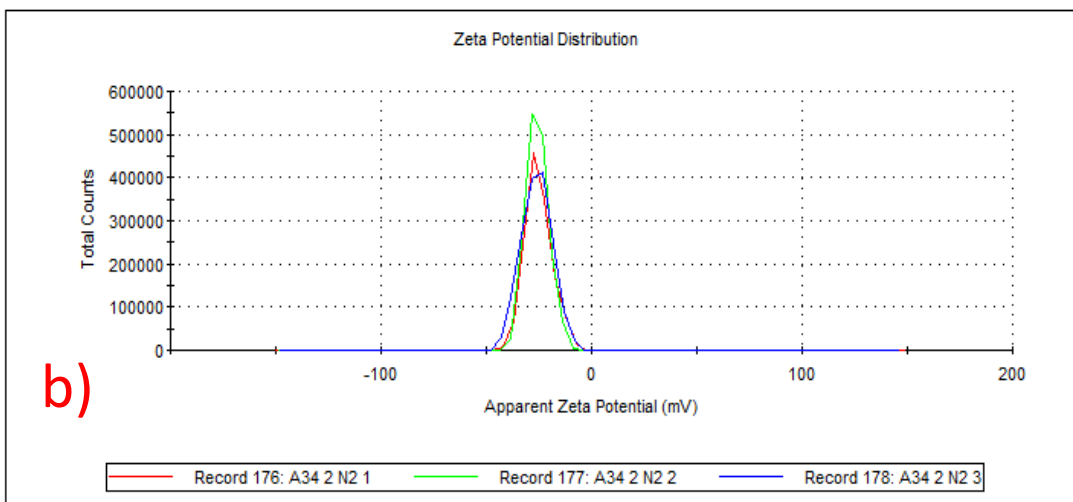


Figura 29. Potencial Zeta de los liposomas A34-2. a) Muestra (N1) y b) Duplicado (N2).