

Ciudad de México, 3 de Diciembre de 2020.

Dra. Patricia Enzaldo de la Cruz

Coordinadora Divisional del servicio Social.

Presente

Por este medio nos dirigimos a usted para solicitar su ayuda para la conclusión del Servicio Social del alumno Alejandro Axel Alavez Ariza, matrícula 2123057181.

Ya que por la situación de la pandemia por el SARS-CoV-2 y las medidas implementadas por las autoridades de salud del Gobierno Federal, se tuvo que modificar tanto título como objetivos del trabajo realizado. Esto debido a que el desarrollo del proyecto se estaba llevando a cabo en el laboratorio de "Oncología Traslacional de Precisión", del Instituto Nacional de Medicina Genómica, el cuál tuvo que ser cerrado dada la emergencia sanitaria por la COVID-19. Por lo que nos vimos en la necesidad de modificar el trabajo a los experimentos realizados hasta el cierre del laboratorio. Las fechas de inicio y terminó del sevicio social eran: 12 de Diciembre del 2019- 12 de Junio del 2020.

El título original era: "Desarrollo de un sistema analítico para la inmunodetección de proteínas de origen microbiano y de células tumorales".

El objetivo general era: "Desarrollar un ensayo para la inmunodetección de proteínas de interés para la salud humana mediante un sistema de electroforesis con tinción inversa-Western Blot para caracterizar su relevancia biológica".

Por los exerimentos realizados el título quedaría como: "Desarrollo de un método de obtención de la proteína microbiana serralisina, como analito de interés para estudios sobre matrices biológicas de origen humano asociadas a tumores cerebrales".

El objetivo general es: "Desarrollar un método de purificación para la obtención y purificación de la proteína bacteriana serralisina, como analito de interés en matrices biológicas de origen humano, asociadas con tumores cerebrales, como reactivos biológicos para el desarrollo de de inmunoensayos de interés para la salud humana"

Como puede ver tanto el título como el objetivo general son muy parecidos. El cambio es con la finalidad de reflejar lo que en realidad el alumno desarrollo en el tiempo que estuvo realizando sus actividades. No pudo implementar el Western-Blot pero si realizó otros experimentos que se muestran en el escrito.

El estudiante Alejandro mostró excelentes cualidades de trabajo en equipo, interés en su trabajo y aprendizaje, durante su estancia en nuestro laboratorio, que contribuyeron al avance de nuestros proyectos. Lamentablemente, Alejandro y su familia tuvieron serios problemas de salud asociados a la contingencia sanitaria actual, por lo que le fue imposible presentar su reporte en el período de tiempo acordado. Sin embargo, el estudiante mantuvo constantemente su preocupación y vinculación en la medida de sus posibilidades con nuestro equipo de trabajo.

Teniendo en cuenta los elementos de fuerza mayor expuestos anteriormente, solicitamos respetuosamente a esta Comisión, se proceda a aceptar los cambios propuestos para terminar con este último paso en la formación de nuestro estudiante, que ha demostrado con creces su potencialidad como futuro profesional.

Además por la situación económica que enfrentamos es indispensable que Alejandro se titule ya que le solicitan el título en su trabajo.

Aprovechamos la ocasión para saludarla, deseando que estén bien de salud junto con sus familiares.

Muchas gracias por su atención y apoyo.

Saludos cordiales,

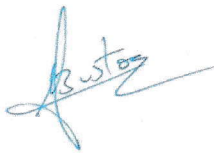


Dra María del Carmen Abrahantes Pérez

Asesora Externa

Investigadora Principal: Oncología Traslacional de Precisión.

INMEGEN



Dr. Jaime A. Bustos Martínez

Asesor Interno

Profesor Titular C

Depto. Atención a la Salud

Mtra. María Elena Contreras Garfias  
Directora de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud  
PRESENTE

Por este medio le informo del término del Servicio Social, cuyos datos son los siguientes :

Fecha de Recepción	Día	Mes	Año	Fecha de Aprobación	Día	Mes	Año
--------------------	-----	-----	-----	---------------------	-----	-----	-----

### Datos del Alumno

Nombre : Alejandro Axel Alavez Ariza	
Matrícula : 2123057181	Licenciatura : Química Farmacéutica Biológica <input type="checkbox"/>
Domicilio : Calle 27, No. 5, Colonia Unidad Habitacional Santa Cruz Meyehualco, 09290, Ciudad de México, CDMX.	
Teléfono : 87567164	Celular : 5545393173
Correo Electrónico : alejandroaxelalavezariza@gmail.com	CURP : AAAA931224HDFLRL08

### Datos del Proyecto

Nombre del Proyecto : Desarrollo de un método de obtención de la proteína microbiana serralisina, como analito de interés para estudios sobre matrices biológicas de origen humano asociadas a tumores cerebrales.							
Lugar donde se realizó el Servicio Social : Instituto Nacional de Medicina Genómica. México.							
Dependencia : Secretaria de Salud de México.							
Entidad Federativa : Distrito Federal							
Municipio : Tlalpan	Localidad : CDMX.						
Fecha de Inicio	Día	Mes	Año	Fecha de Término	Día	Mes	Año
	12	12	19		12	6	20

### PARA SER LLENADO POR LOS ASESORES

Sector: 3.- Público Tipo: 1.- Externo

Orientación: 8.- Salud, Alimentación Y Nutrición

### FIRMAS

Dr. Jaime A. Bustos Martínez No. Ec.8758

Asesor Interno  
Nombre, firma y No. Económico

Alejandro Axel Alavez Ariza

Alumno  
Nombre, firma

Dra. Maria del Carmen Abrahantes Pérez

Asesor Externo No. Ec. H134955  
Nombre, firma y No. Económico

V. B. de la Comisión  
Nombre y firma de la persona que autoriza  
Dra. María Angélica Gutiérrez Nava

Ciudad de México a 04 de diciembre de 2020  
Oficio No: INMG-DED-SFA-330-2020  
Asunto: Carta de término de servicio social

Mtra. María Elena Contreras Garfías  
Directora de la División  
Universidad Autónoma Metropolitana  
Presente

Por este medio hago constar que el estudiante **Alejandro Axel Alavez Ariza**, con número de matrícula **2123057181**, alumno de la Licenciatura Químico Farmacéutico Biológico, ha concluido satisfactoriamente una estancia académica de servicio social, bajo la tutoría de la Dra. María del Carmen Abrahantes Pérez, Investigadora en Ciencias Médicas en la Unidad de Medicina Traslacional del Instituto.

El periodo de su estancia fue del 12 de diciembre de 2019 al 12 de junio de 2020, cubriendo un total de 480 horas en un periodo de seis meses.

Agradeciendo de antemano su atención a la presente, le envío un cordial saludo.

Atentamente



Lic. Alejandra Elizabeth Rangel Barajas  
Responsable del Programa de Participación Estudiantil

C.c.p. Dra. María del Carmen Abrahantes Pérez.-Investigadora en Ciencias Médicas del Inmegen y Tutora del alumno.-Presente.  
Expediente del alumno.





**SALUD**  
SECRETARÍA DE SALUD



Instituto Nacional de  
Medicina Genómica  
MÉXICO

Ciudad de México a 03 de diciembre del 2020  
ASUNTO: CARTA DE LIBERACIÓN DE SERVICIO SOCIAL

**Dr. Juan Esteban Barranco Florido**  
**Jefe del Departamento de Sistemas Biológicos**  
**Universidad Autónoma Metropolitana**  
**Presente**

Estimado Dr. Barranco:

Por medio de la presente me permito comunicar a usted que el alumno **Alejandro Axel Alavez Ariza**, con número de matrícula **2123057181**, de la licenciatura de **QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**; realizó el servicio social en el laboratorio de "Oncología Traslacional de Precisión", del Instituto Nacional de Medicina Genómica, ubicado en Periférico Sur No. 4809, Col. Arenal Tepepan, C.P. 14610, Alcaldía Tlalpan, en México, Ciudad de México; con el proyecto titulado: "**Desarrollo de un método de obtención de la proteína microbiana serralisina, como analito de interés para estudios sobre matrices biológicas de origen humano asociadas a tumores cerebrales**", perteneciente al proyecto genérico: Evaluación de productos relacionados con la salud. Bajo el tutorado de la **Doctora María del Carmen Abrahantes Pérez**, número de registro profesional del Ministerio de Relaciones Exteriores de Cuba (MINREX, Cuba) y apostillado en el Consulado de México en Cuba: **H134955**.

El alumno realizó el servicio social en el período del **12 de Diciembre del 2019 al 12 de Junio del 2020**, cubriendo un total de horas de **480 horas**.

Por lo que solicito su apoyo para los trámites de liberación correspondientes. Agradeciendo de antemano su atención a la presente, le envío un cordial saludo.

**Atentamente,**

**Dra. María del Carmen Abrahantes Pérez**  
Investigadora en Ciencias Médicas D.  
Instituto Nacional De Medicina Genómica.  
Número de Registro Profesional: H134955



Casa abierta al tiempo

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**  
**Unidad Xochimilco**

Ciudad de México 3 de diciembre de 2020

ASUNTO: CARTA DE LIBERACIÓN DE SERVICIO SOCIAL

**Dr. J. Esteban Barranco Florido**

**Jefe del Departamento de Sistemas Biológicos**

**PRESENTE**

Por este medio me permito comunicar a usted que el alumno **Alejandro Axel Alavez Ariza**, matrícula número **2123057181**, de la carrera de **QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**; realizó el Servicio Social en laboratorio de "Oncología Traslacional de Precisión", del Instituto Nacional de Medicina Genómica; con el proyecto titulado: "**Desarrollo de un método de obtención de la proteína microbiana serralisina, como analito de interés para estudios sobre matrices biológicas de origen humano asociadas a tumores cerebrales.**" perteneciente al proyecto genérico: Evaluación de productos relacionados con la salud. Bajo la asesoría del **Doctor Jaime A. Bustos Martínez**, núm. econ. **8758**.

El alumno realizó el servicio social en el periodo del **12 de Diciembre del 2019** al **12 de Junio del 2020**; cubriendo un total de **480 horas**.

Por lo que solicito su apoyo para los trámites de liberación correspondientes. Sin más, reciba saludos cordiales.

ATENTAMENTE

---

Dr. Jaime A. Bustos Martínez 8758

Depto. De Atención a la Salud



Casa abierta al tiempo

# UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA Unidad Xochimilco

División de Ciencias Biológicas y de la Salud  
Licenciatura en Química Farmacéutica Biológica

## Desarrollo de un método de obtención de la proteína microbiana serralisina, como analito de interés para estudios sobre matrices biológicas de origen humano asociadas a tumores cerebrales.

---

### Proyecto Genérico:

Evaluación de productos relacionados con la salud.

### Etapas:

Desarrollo de métodos y técnicas analíticas para el control físico, químico, biológico y/o microbiológico de productos relacionados con la salud.

### Lugar y periodo de realización:

Instituto Nacional de Medicina Genómica. México.

### Periodo de Realización:

12 de Diciembre del 2019 al 12 de Junio de 2020.

---

**Alavez Ariza Alejandro Axel**

**Asesor Interno**

Bustos Martínez Jaime Amadeo

**Asesor Externo**

Abrahantes Pérez María del Carmen

## INDICE

1. INTRODUCCIÓN .....	4
2. MARCO TEÓRICO.....	6
2.1 BIOMARCADORES .....	6
2.2 VIMENTINA EN CÉLULAS TUMORALES Y TEJIDOS.....	7
2.3 ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE LA VIMENTINA .....	7
2.4 SERRATIA MARCESCENS .....	8
2.5 ASPECTOS BIOLÓGICOS DE LAS SERRALISINA.....	8
2.6 SERRALISINA Y SU ESTRUCTURA QUÍMICA .....	9
2.7 PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS .....	10
2.7.1 SEMIPURIFICACIÓN: PRECIPITACIÓN SALINA Y SEPARACIÓN POR MEMBRANAS.....	10
2.7.2 CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO IÓNICO.....	11
2.8 ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA .....	12
2.9 TINCIÓN NEGATIVA DE BIOMOLÉCULAS.....	13
2.10 INMUNOHISTOQUÍMICA ANALÍTICA (IHA) .....	13
2.11 MATRICES BIOLÓGICAS Y ANALITO DE INTERÉS.....	14
3. JUSTIFICACIÓN .....	15
4. OBJETIVO GENERAL.....	15
5. OBJETIVOS PARTICULARES.....	16
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
6.1 CEPA DE S. MARCESCENS ATCC14756.....	16
6.2 PRODUCCIÓN DE SERRALISINA.....	17
6.3 SEMIPURIFICACIÓN DE SERRALISINA DERIVADA DE LA CEPA S. MARCESCENS ATCC14756 .....	17
6.3.1 PRECIPITACIÓN CON SULFATO DE AMONIO .....	17
6.3.2 SEPARACIÓN POR MEMBRANA .....	18
6.4 CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO IÓNICO DEAE .....	18
6.5 ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE).....	19
6.6 TINCIÓN CON AZUL DE COOMASSIE.....	19
6.7 TINCIÓN INVERSA EN GEL DE POLIACRILAMIDA.....	20
6.8 CULTIVO Y EXPANSIÓN DE LA LÍNEA CELULAR HUMANA DE GLIOBLASTOMA MULTIFORME U87-MG .....	20
6.9 MÉTODO DE OBTENCIÓN DE PLASMA HUMANO Y CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA .....	21
7. RESULTADOS .....	22



7.1 OBTENCIÓN DE LA PROTEÍNA SERRALISINA.....	23
7.1.1 PRECIPITACIÓN DE SERRALISINA CON SULFATO DE AMONIO .....	24
7.1.2 CONCENTRACIÓN DEL SOBRENADANTE DE CULTIVO ESTÉRIL (SNCE) POR MEMBRANAS DE 10 KDA .....	24
7.2 PURIFICACIÓN CROMATOGRÁFICA.....	26
7.3 OBTENCIÓN DE MATRICES BIOLÓGICAS .....	30
7.3.1 CULTIVO EXPANDIDO DE LA LÍNEA DE CÉLULAS DE GLIOBLASTOMA MULTIFORME U87-MG .....	30
7.3.2 OBTENCIÓN DE PLASMA Y CÉLULAS MONONUCLEARES DE INDIVIDUOS APARENTEMENTE SANOS .....	31
8. DISCUSIÓN.....	35
9. CONCLUSIONES .....	36
10. RECOMENDACIONES.....	37
11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	38

# 1. INTRODUCCIÓN

Los tumores malignos cerebrales (primarios y metastásicos) así como a nivel del sistema nervioso central son un problema de salud a nivel mundial y en México. En el 2018 se estima que se produjeron más de 296 mil de nuevos casos y 241, 037 muertes según el *Observatorio del cáncer global (Global Cancer Observatory: GLOBOCAN)*, (Bray y cols., 2018).

La mortalidad por estos tumores aumenta a medida que incrementa la edad en la que son diagnosticados. En países desarrollados solamente el 14% de los pacientes diagnosticados con tumores del sistema nervioso central tienen una supervivencia de más de 10 años y solo el 1% de ellos es prevenible (Alegría-Loyola y cols., 2017). La tendencia es que estos tipos de malignidades sean cada vez más frecuentes, no tanto por un verdadero incremento en su incidencia, sino por el incremento en la expectativa de vida de la población en general y por los avances tecnológicos que permiten un diagnóstico más oportuno y por ende mayor sobrevivencia de los pacientes, (De Robles y cols., 2015). Particularmente para aquellos tipos de cáncer que metastizan a cerebro.

Las estrategias más comunes para el diagnóstico del cáncer consisten en la toma de muestra de una fracción del tejido afectado. Esta muestra permite el estudio de biomarcadores específicos, así como evaluar las características genéticas del tumor. Sin embargo, los procedimientos de toma de muestras de tejido son invasivos y riesgosos para el paciente, y en algunos casos no es posible por la inaccesibilidad del tumor. Además, una biopsia sólida es costosa, requiere mucho tiempo, y no se puede aplicar reiteradamente. Por esta razón, en los últimos años las biopsias líquidas se imponen como alternativa para el análisis de biomarcadores pertenecientes al tejido tumoral, principalmente desde sangre periférica. Las mismas tienen notables ventajas sobre el método tradicional: no tiene riesgo, no es invasivo, no requiere cirugía, reduce el costo y el tiempo de diagnóstico. Uno de los biomarcadores más estudiados desde biopsias líquidas son las células tumorales circulantes (CTC). La detección de CTC en función de sus propiedades biológicas

se relaciona principalmente con las proteínas presentes en la membrana celular. Para identificar las CTC se pueden utilizar procedimientos basados en la inmunoselección, con el empleo de anticuerpos contra proteínas de membrana que son *antígenos asociados al tumor (anti-tumor-associated antigen, TAA)*. Este tipo de procedimiento se denomina selección positiva (Marrugo-Ramírez y cols., 2018).

La vimentina es una proteína intracelular en células normales, pero en determinados estados patológicos como cáncer, se han detectado en la superficie celular. Además, en los tejidos cancerosos, se ha demostrado su asociación con mayor crecimiento, invasión y migración, por lo que es un excelente biomarcador para diagnóstico y blanco molecular para la terapia del cáncer (Satelli & Li; 2011).

Disponer de un método analítico rápido y económico para detectar vimentina en la superficie de CTC y/o circulantes en sangre libremente, así como otras moléculas proteicas asociadas a tumores cerebrales, es de suma importancia para el futuro de las biopsias líquidas. Para el desarrollo y validación de estos nuevos métodos analíticos se requieren de controles positivos, que puedan identificarse en las matrices biológicas humanas sin reacciones cruzadas, ni interferencias. Es por ello que estos controles positivos proteicos deben ser de especies no humanas, cuyo proceso de obtención y purificación sea rápido, económico y reproducible, dadas las grandes cantidades que se requieren del mismo para el establecimiento de estos métodos analíticos.

La serralisina es una metaloproteasa sobreexpresada al medio extracelular de la bacteria *Serratia marcescens*. Un procedimiento de co-expresión y purificación de esta metaloproteasa con el pigmento prodigiosina fue desarrollado por el grupo de la Dra Abrahantes-Pérez (Abrahantes-Pérez y cols, 2006; Espinosa y cols, 2009), desde la cepa *S. marcescens* CMIB4202 obtenida por su grupo de investigación. Sin embargo, las condiciones de cultivo para obtener esta metaloproteasa sin la prodigiosina, desde una cepa comercial, podría ser relevante para obtener esta molécula como analito de interés para las matrices biológicas humanas.

Este trabajo está destinado a la obtención de un proceso de purificación de la proteína bacteriana serralisina desde la cepa comercial *S. marcescens* ATCC14756. Esta molécula de origen bacteriano será empleada como analito de interés en calidad de reactivo biológico para diferentes matrices biológicas de origen humano. La misma se utilizará para el desarrollo de sistemas analíticos destinados a la detección altamente sensible de marcadores moleculares asociados a tumores cerebrales, desde biopsia líquida, tales como vimentina. La electroforesis con tinción inversa-Wester-Blot, será uno de los métodos sensibles (1–10 ng de biomoléculas por banda), rápidos y económicos a desarrollar posteriormente (Castellanos-Serra & Hardy, 2006), donde la serralisina se empleará como control positivo y analito de interés en diferentes matrices biológicas de origen humano. Esta estrategia permitirá el desarrollo de los métodos analíticos de interés con exactitud y precisión adecuada, al ser la serralisina de diferente especie a las matrices biológicas objeto de análisis.

## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1 Biomarcadores

La definición de biomarcador está dada por “*the Biomarker Definition Working Group* (BDWG)” en 2001 (Biomarkers Definitions Working Group, 2001). De acuerdo con la misma un biomarcador es una característica que puede ser objetivamente medida y evaluada como un indicador de un proceso biológico normal, un proceso patológico o una respuesta farmacológica a una intervención terapéutica. La detección de biomarcadores constituye uno de los parámetros claves en oncología de precisión, que proporciona información para estratificar a los pacientes con

cáncer en términos de diagnóstico, pronóstico y respuesta a las terapias. El análisis de datos genómicos de muestras de tejido normal y de tumores malignos se está convirtiendo en una de las principales fuentes de información clínicamente relevantes para la estratificación de pacientes con cáncer y la optimización de la terapia. Sin embargo, otras variables moleculares, como la presencia de proteínas biomarcadores en muestras biológicas, son más informativas que los datos genéticos en algunos tipos de neoplasias (Pulido y cols 2019).

## **2.2 Vimentina en células tumorales y tejidos**

La vimentina, en condiciones fisiológicas normales, está presente desde el núcleo hasta la membrana plasmática en las células de origen mesenquimatoso, donde se sabe que proporciona soporte estructural celular y mantiene integridad del tejido (Liu y cols., 2010). Se sobreexpresa en diferentes líneas celulares, en el cerebro humano (células ependimarias, el plexo coroideo, las células meníngicas y algunas células subpiales, y células endoteliales), y tejidos cancerosos (Yamada y cols., 1992). En el año 2011, esta molécula se convirtió en un biomarcador y blanco molecular relevante para el diagnóstico y terapia del cáncer, al demostrarse que se expresaba en la superficie de células tumorales de diferentes orígenes histológicos (Arun, 2011). Estudios recientes han mostrado numerosas evidencias que avalan a la vimentina como un blanco molecular para la terapia del cáncer (Strouhalova y cols, 2020), particularmente muy asociado a la capacidad infiltrante del glioblastoma (Nowicki y cols, 2019).

## **2.3 Estructura y Función de la Vimentina**

La vimentina es una proteína multifuncional de 57 kDa ( Fuchs & Weber, 1994), (Zhao y cols., 2018) compuesta de 466 aminoácidos, con un alto grado de

conservación evolutiva entre los vertebrados (Battaglia y cols. 2018), pertenece al tipo III de 6 familias diferentes de filamentos intermedios ( Fuchs & Weber, 1994), (Zhao y cols., 2018). La “unidad de construcción” primaria de todos los filamentos intermedios (FI) es un dímero en forma de barra de dos cadenas de aminoácidos idénticas o estrechamente relacionadas, con una longitud de 60-100 residuos (Nicolet y cols., 2010).

#### **2.4 *Serratia marcescens***

La *Serratia marcescens* es una bacteria Gram-negativa, anaerobica facultativa en forma de varilla y un patógeno nosocomial oportunista. La bacteria es capaz de secretar muchas enzimas hidrolíticas como proteasas, lipasas, chitinasas, hemolysinas y nucleasas que pueden utilizar en ciertos procesos industriales y médicos. La bacteria *S. marcescens* secreta una metaloproteasa llamada Serralisina con actividad proteolítica. A la Serralisina también se conoce como serrapeptidasa, serratiopeptidasa, y serratia peptidasa (Araghi y cols., 2019).

#### **2.5 Aspectos biológicos de las Serralisina**

La función fisiológica de las serralisinas no está clara. Presumiblemente, tienen funciones en la digestión / absorción de nutrientes. La mayoría de los estudios de serralisinas se han centrado en su peculiar mecanismo de secreción (Delepelaire & Wandersman, 1989), (Delepelaire & Wandersman, 1990), (Duong y cols., 1992), (Létoffé y cols., 1990). Estas son secretadas al medio por bacterias Gram-negativas y se agrupan como toxinas RTX (se repite en toxinas) (Wandersman, 1989), (Welch, 1991) (Wandersman y cols., 1992). Las toxinas RTX poseen una señal de secreción C-terminal y se secretan en un solo paso hacia el medio, con la ayuda de solo tres proteínas de membrana. La señal de secreción esencial se encuentra entre los 50

a 100 residuos C-terminales y está precedida por una serie de repeticiones ricas en glicina con la secuencia consenso GGXGXDX (L / I / F / V) X. La función de estas repeticiones no se conoce bien, aunque su número está correlacionado con el tamaño de la proteína y se cree que mejoran la eficiencia de secreción. Las Serralisinas poseen de cuatro a seis de estas repeticiones.

Todas las Serralisinas se sintetizan y secretan como zimógenos inactivos y se activan autocatalíticamente en el medio en presencia de cationes divalentes, como  $Zn^{2+}$  o  $Ca^{2+}$  (Létoffé y cols., 1990).

La Serralisina se considera uno de los factores de virulencia producidos durante la infección por *Serratia* o *Pseudomonas*, aunque su importancia parece ser menor que la de otras toxinas (Gupta y cols., 1996).

## **2.6 Serralisina y su estructura química**

La Serralisina es una proteína monocatenaria con una masa molecular de aproximadamente 55 kDa y un punto isoeléctrico entre 4,5 y 5,5. Todas las serralisinas se unen a un átomo de zinc en su dominio N-terminal, que se requiere para la catálisis, mientras que en el dominio C-terminal se unen a 7 ó 8 iones de calcio. La estructura primaria de la Serralisina de *Serratia marcescens* SM6 y *Serratia sp.* E-15 (Nakahama y cols., 1986), (Braunagel & Benedik, 1990), así como las secuencias de proteasas homólogas de *Pseudomonas aeruginosa*, *Erwinia chrysanthemi* y *Proteus mirabilis*, han revelado que la identidad de secuencia entre las diversas especies es aproximadamente del 50%. Como miembro de la familia de toxinas RTX, las serralisinas poseen repeticiones en tándem de una secuencia molecular distintiva GGXGXDXLX y no presentan cisteínas. Los dominios proteolíticos (aproximadamente residuos 20 220) presentan un pliegue típico de varias metaloproteasas de matriz (Stöcker y cols., 1995). El Zn II catalíticamente activo está unido a las tres histidinas de la secuencia molecular distintiva HEXXHXXGXXH (Hege & Baumann, 2001). El dominio C-terminal consiste de un

sándwich de hoja  $\beta$  extendido donde las secuencias moleculares distintivas GGXGXDX (L / I / F / V) X forman un rodillo  $\beta$  paralelo que une cinco iones calcio. En este dominio se encuentran otros dos iones de calcio. Hay poca estructura  $\alpha$ -helicoidal dentro de este dominio, especialmente en la señal de secreción C-terminal, que está completamente plegada en una estructura de hoja  $\beta$ .

## **2.7 Purificación de proteínas**

Las proteínas se purifican mediante métodos de fraccionamiento. Estos son una serie de etapas independientes basadas en las diversas propiedades fisicoquímicas de la proteína de interés, y que se usan para separarlas de manera progresiva de otras moléculas. Generalmente la purificación ocurre en dos etapas: 1) semipurificación, donde de manera selectiva se eliminan gran cantidad de contaminantes; y 2) purificación cromatográfica, donde se eliminan los contaminantes que garantizan que la proteína de interés tenga la pureza deseada, generalmente mayor del 90%.

### **2.7.1 Semipurificación: precipitación salina y separación por membranas**

La precipitación salina es un método de semipurificación que tiene en cuenta las características físico-químicas de las moléculas proteicas. El mismo se basa en las interacciones electrolito-no electrolito, en el cual a altas concentraciones salinas (o alta fuerza iónica) algunos solutos como proteínas o polímeros precipitan debido al aumento de las interacciones hidrofóbicas entre ellos. Este fenómeno está vinculado al fenómeno cosmotrópico ejercido por algunas sales. La concentración salina y el tipo de sal requerida para la precipitación varían de soluto a soluto. Este fenómeno se emplea para la separación de proteínas.

La precipitación con sulfato de amonio es uno de los métodos más utilizados para la purificación y fraccionamiento de proteínas, ya sea a gran escala o a escala



de laboratorio, que se puede utilizar para separar proteínas al alterar su solubilidad en presencia de una alta concentración de sal.

La separación por membranas es otro método de semipurificación, basado en la talla molecular de las moléculas. La ultrafiltración es un método de separación por membranas que permite el proceso de fraccionamiento de las proteínas empleando diferentes “*cut off*”, tales como 10 y 3 kDa, entre otros tamizajes moleculares. La ultrafiltración puede eliminar otras proteínas con pesos moleculares inferiores al “*cut-off*” del módulo utilizado pudiendo concentrar la proteína de interés al nivel deseado. Este procedimiento, como valor añadido puede ser empleado para realizar diafiltración y preparar la muestra concentrada en el tampón del próximo paso de la purificación.

### **2.7.2 Cromatografía de intercambio iónico**

La cromatografía de intercambio iónico es un método que permite la separación de moléculas basada en sus propiedades de carga eléctrica. Se compone de dos fases: la fase estacionaria o intercambiador iónico, y la fase móvil. La fase estacionaria insoluble lleva en la superficie cargas electrostáticas fijas, que retienen contraiones móviles. Los iones de ésta compiten con los analitos por los sitios activos de la fase estacionaria (Fekete, 2015). El principio básico de la cromatografía de intercambio iónico es que las moléculas cargadas se adhieren a los intercambiadores de forma reversible, de modo que dichas moléculas pueden ser asociadas o disociadas cambiando el ambiente iónico. La separación mediante intercambiadores iónicos se realiza por lo general, en dos fases: en la primera las sustancias a separar se unen al intercambiador utilizando condiciones que originan una unión fuerte y estable; a continuación, se eluye de la columna con tampón de diferentes pH o diferente fuerza iónica, compitiendo los componentes del tampón con el material por los sitios de unión (Lang, 2015).

Un intercambiador iónico es por lo general, un polímero que tiene grupos cargados unidos, la mayoría de las proteínas son estables en un margen de pH

determinado, en el que están cargadas positiva o negativamente. Por lo tanto, si una proteína es estable a valores de pH por encima del punto isoeléctrico, se debe utilizar un intercambiador aniónico. Si es estable a valores de pH situados por debajo del punto isoeléctrico, debe utilizarse un intercambiador catiónico (Lenhoff, 2016).

**INTERCAMBIADORES ANIÓNICOS:** Son portadores de grupos con cargas positivas que unen aniones de forma reversible. Si el grupo cargado es positivo, es un intercambiador de aniones. Los intercambiadores débilmente básicos más corrientes son los grupos aminos alifáticos o aromáticos.

**INTERCAMBIADORES CATIÓNICOS:** Los intercambiadores catiónicos son portadores de grupos con carga negativa que unen cationes de modo reversible. Un grupo típico que se utiliza en los intercambiadores de cationes es el grupo sulfónico. Si se une un H<sup>+</sup> al grupo, se dice que el intercambiador se encuentra en forma ácida y puede, por ejemplo, intercambiar un H<sup>+</sup> por un Na<sup>+</sup> o dos H<sup>+</sup> por un Ca<sup>2+</sup>. El grupo ácido sulfónico es un intercambiador de cationes fuertemente ácido. Otros grupos de utilización corriente son el carbonilo e hidroxilo fenólico, dos intercambiadores catiónicos débilmente ácidos.

## **2.8 Electroforesis en gel de poliacrilamida**

Los geles como medio para la migración electroforética aumentan enormemente la eficacia de la separación de proteínas. Pueden emplearse geles de agarosa o acrilamida para la separación precisa de biomoléculas como proteínas y complejos de proteínas, ácidos nucleicos, virus, así como orgánulos complejos (Seelert & Krause, 2008). La electroforesis en gel de poliacrilamida es ampliamente utilizada para la separación de proteínas (*Sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis*, SDS-PAGE). En general, las proteínas de interés se localizan en el gel después de SDS-PAGE y deben eluirse del gel mediante varios métodos (por ejemplo, difusión pasiva, electroelución). Las proteínas eluidas de los geles se pueden utilizar con éxito en una variedad de aplicaciones posteriores, incluida la

identificación y microcaracterización de proteínas mediante métodos inmunoquímicos (por ejemplo, Western blot), bioquímicos (por ejemplo, espectrometría de masas) y biológicos basados en células (Eugenio Hardy, 2015).

## **2.9 Tinción negativa de biomoléculas**

El uso de imidazol (ImH) en combinación con sales de zinc fue introducido en 1990 para la detección de proteínas separadas en geles de electroforesis. Esta técnica de detección está basada en la precipitación selectiva de un complejo imidazol-zinc en toda la matriz de gel excepto en las zonas donde se encuentran biomoléculas. Debido a que las bandas de biomoléculas permanecen transparentes e incoloras, la técnica se clasifica como negativa o procedimiento inverso para tinción en gel. Se menciona como "tinción inversa" o "tinción de imidazol-zinc", (Castellanos-Serra & Hardy, 2006).

## **2.10 Inmunohistoquímica analítica (IHA)**

La técnica de IHA se basa en el uso de anticuerpos monoclonales o policlonales sensibles dirigidos a proteínas biomarcadoras específica. Es una de las técnicas de diagnóstico más universales en la oncología clínica moderna. La IHA proporciona información local a nivel unicelular sobre la expresión de biomarcadores en todo el tumor y su microambiente, lo que guía al patólogo en el diagnóstico y pronóstico de la mayoría de las neoplasias malignas sólidas. Las ventajas de resolución de poder de la IHA incluyen la monitorización de la expresión de biomarcadores sin alterar la arquitectura del tejido, lo que tiene especial relevancia en tumores que muestran una alta heterogeneidad intratumoral (ITH, intratumor heterogeneity), la oportunidad de detectar modificaciones postraduccionales de proteínas que son funcionales y clínicamente relevantes, y la posibilidad de monitorear la localización subcelular de la proteína biomarcadora. Existen técnicas alternativas para monitorear la presencia de proteínas biomarcadoras del cáncer utilizando anticuerpos, que incluyen

radioinmunoensayo, ensayos de inmunoabsorción ligados a enzimas (ELISA), matrices de proteínas basadas en membranas, perlas, y western blot; aunque su implementación en la clínica es más limitada, pero son ampliamente utilizadas en la investigación.

## **2.11 Matrices biológicas y analito de interés**

Las muestras biológicas son una cantidad limitada de cualquier sustancia o material proveniente de un organismo; pueden ser órganos completos, tejidos, células, ADN, ARN, proteínas o fluidos corporales como orina, saliva, sangre, sudor, humor vítreo, líquido cefalorraquídeo, etc. Este material es utilizado para representar y estudiar enfermedades, genotipos particulares, pruebas de paternidad o ancestría. Las muestras biológicas constituyen las matrices biológicas de analitos de interés contenidos en las mismas. El analito de interés es la molécula que se desea identificar y/o cuantificar dentro de una matriz biológica.

Existen varias técnicas de preparación de muestras para los analitos de matrices biológicas. El desafío al que se enfrentan muchos científicos es identificar una técnica de preparación de muestras con la que minimizar los efectos de las interferencias de la matriz y, al mismo tiempo, mantener un elevado número de muestras analizadas y la sensibilidad del sistema analítico.

**MATERIAL DE REFERENCIA:** Material o sustancia, en el cual una o más de sus propiedades están suficientemente bien establecidas para que sea usado en la calibración de un aparato, la estimación de un método de medición, para asignar valores a los materiales, o como controles positivos de las técnicas analíticas, (Pulido y cols, 2019).

### 3. JUSTIFICACIÓN

El desarrollo de nuevos métodos analíticos para la identificación de blancos moleculares asociados a tumores cerebrales, requiere de la disponibilidad de las matrices biológicas que son de interés para el estudio de origen humano, y de controles positivos bien caracterizados que permitan la identificación del mismo dentro de las matrices complejas. Esto implica que los controles positivos sean de diferente especie. Cuando se trata de identificar blancos moleculares de origen proteico asociados a tumores cerebrales, las matrices biológicas tienen relevancia crucial; ya que son muestras muy valiosas, por la complejidad de su obtención en neurocirugías. Por esta razón, las biopsias líquidas, en particular de sangre periférica, son una de las fuentes más preciadas en la actualidad para identificar moléculas asociadas al tumor circulantes en sangre. Este tema, ubicado en las ciencias de fronteras en neurooncología, es un lineamiento de los científicos y neurooncólogos para lograr métodos simples de alta sensibilidad que permitan diagnosticar, realizar medicina de precisión y evaluar la evolución de los pacientes para permitir la dirección clínica de sus tratamientos.

### 4. Objetivo General

Desarrollar un método de purificación para la obtención y purificación de la proteína bacteriana serralisina, como analito de interés para matrices biológicas de origen humano, asociadas con tumores cerebrales, como reactivos biológicos para el desarrollo de inmunoensayos de interés para la salud humana.

## 5. Objetivos particulares

- 5.1 Establecer condiciones de cultivo de la cepa *S. marcescens* ATCC14756 para obtener la metaloproteasa serralisina en el sobrenadante de cultivo de forma íntegra, sin autodegradación.
- 5.2 Evaluar diferentes métodos de semipurificación de la serralisina y de concentración del sobrenadante de cultivo.
- 5.3 Evaluar condiciones de purificación cromatográfica de la serralisina y establecer un proceso reproducible.
- 5.4 Obtener cultivos expandidos de la línea celular humana de glioblastoma multiforme U87-MG, como matriz biológica de interés.
- 5.5 Ajustar el método de Ficoll a 10 mL de sangre periférica para obtener plasma y células mononucleares de sangre periférica, de individuos aparentemente sanos, como matrices biológicas para el desarrollo de métodos analíticos de investigación aplicada a la salud humana.
- 5.6 Diseñar un ensayo para la inmunodetección de proteínas de interés en matrices biológicas complejas asociadas a tumores cerebrales, mediante un sistema de electroforesis con tinción inversa-Western Blot, con un mismo gel y doble revelado.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 Cepa de *S. marcescens* ATCC14756

La cepa de *S. marcescens* ATCC14756 se adquirió certificada de “*The American Type Culture Collection*” (ATCC). Las colonias aisladas en Agar triptona de Soya (ATS), fueron inoculadas en pre-cultivos (una colonia por precultivo) de 150 mL de Caldo Triptona de Soya (CTS) (a 37 °C), durante 8 h, con agitación.

## 6.2 Producción de serralisina

Los pre-cultivos se utilizaron como inóculo de cultivos en CTS de 2 L a una densidad inicial de 0.1, durante 12 h, con agitación, a 37 °C. En paralelo se realizaron cultivos similares, pero con 5 mM de EDTA. Los cultivos se centrifugaron a 12,000 g. Los sobrenadantes de cultivos se filtraron en condiciones asépticas mediante filtros de membrana de 0.22 µm, se alicotaron en tubos de 50 mL, se almacenaron a -20°C, y constituyeron el material biológico de partida para los estudios de semi-purificación y purificación.

## 6.3 Semipurificación de Serralisina derivada de la cepa *S. marcescens* ATCC14756

### 6.3.1 Precipitación con sulfato de amonio

A 33 mL del filtrado estéril del cultivo sin EDTA de *S. marcescens* ATCC14756, se le agregó 3.3 mL de Tris-HCl 1 M pH 8 y se agitó gentilmente. Una vez homogénea la muestra, se colocó 1 mL en 33 tubos (Eppendorf) de 5 mL, seguido de la adición de una solución saturada al 100% de sulfato de amonio (**Tabla 1**), manteniendo en todo momento las muestras en hielo. Se agitaron gentilmente con una micropipeta, posteriormente se incubó con agitación suave durante 1 hora (equipo: Rockit). Luego las muestras se centrifugaron a 10000 g durante 20 min, 4°C, 4 de aceleración y 4 de desaceleración, se eliminó el sobrenadante, se colectaron en otros tubos y se almacenaron a -20°C para posteriores análisis, (Amersham Pharmacia Biotech. 2001).

**Tabla 1.** Volumen requerido de la solución de sulfato de amonio, para alcanzar la concentración deseada de esta sal en el volumen de la muestra de interés: Sobrenadante filtrado del cultivo sin EDTA de la cepa *Serratia marcescens*.

<b>% Solución Muestra</b>	<b>Volumen de la solución muestra (mL)</b>	<b>Factor para el Volumen requerido al 100 % de saturación</b>	<b>Volumen de la solución de Sulfato de Amonio (µL)</b>
<b>20</b>	1 mL por tripicado	0.250	275
<b>25</b>	1 mL por tripicado	0.333	366
<b>30</b>	1 mL por tripicado	0.429	472
<b>35</b>	1 mL por tripicado	0.538	592
<b>40</b>	1 mL por tripicado	0.667	734
<b>45</b>	1 mL por tripicado	0.818	900
<b>50</b>	1 mL por tripicado	1	1100
<b>55</b>	1 mL por tripicado	1.222	1344
<b>60</b>	1 mL por tripicado	1.5	1800
<b>65</b>	1 mL por tripicado	1.857	2230
<b>70</b>	1 mL por tripicado	2.333	2800

### 6.3.2 Separación por membrana

Por otra parte, de manera paralela a la precipitación con sulfato de amonio, se realizó otro estudio de semipurificación por el método de separación por membrana. Para ello se utilizaron unidades Amicon Ultra-15 para filtración con centrífuga (Merck), con tamiz molecular de 10 kDa. La muestra concentrada se sometió a diafiltración con 5 volúmenes del tampón de equilibrio de la cromatografía de intercambio iónico como paso posterior a esta etapa.

### 6.4 Cromatografía de intercambio iónico DEAE

La cromatografía de intercambio de iones es un método para separar y purificar proteínas y otras biomoléculas cargadas. Para el proceso de purificación cromatográfica se utilizó una matriz de Dietiletanolamina (DEAE), en columnas empacadas con 5 ml de la misma (Bio-Scale Mini DEAE, BioRad). El sistema



cromatográfico que se utilizó fue ÄKTA™ (start 29022094, Code no: 29022094, Serial no: 2404304, Mfg Year: 2018/09, Voltage:100-240 V, Frequency: 50-60 Hz, Max Power: 95 VA, Fuse: F5AL250V, Protection Class: IP21). El tampón de equilibrio que se utilizó fue 50 mM de tampón fosfato pH 8.0, y también fue el tampón base para realizar el gradiente discreto de NaCl: 0.1, 0.15, 0.2, 0.5, 1, y 2 M de NaCl. La absorbancia se midió a 280 nm. La limpieza de la matriz se realizó con 0.2 M de NaOH y la higienización se realizó con etanol al 20%. La conservación del sistema y de la matriz se realizó con alcohol al 20%. Las fracciones colectadas se conservaron a -30°C.

## **6.5 Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)**

La electroforesis en gel de poliacrilamida se realizó utilizando el método Laemmli (Gallagher,2006; Sambrook, 2001) con gel de separación inferior (pH 8,8) y gel concentrador superior (pH 6,8). Las muestras (~ 20 µl) se mezclaron en tampón de carga (Laemmli) y después de calentar durante 5 minutos a 95°C, se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida al 12.5%, y amperaje de corrida de 20 mA. El peso molecular de proteínas se comparó con el marcador de proteína (Amersham™ ECL™ Rainbow™ Marker - Full Range). Las bandas de proteínas se visualizaron mediante la tinción de Azul de Coomassie o Tinción Inversa. (Araghi et al. 2019). ; Castellanos-Serra & Hardy, 2006

## **6.6 Tinción con Azul de Coomassie**

Se preparó la solución de tinción disolviendo 0.25 g de Coomassie Brilliant Blue R-250 por 100 ml de solución de metanol: ácido acético. Se sumergió el gel en al menos 5 volúmenes de solución de tinción y se colocó en una plataforma de rotación lenta durante un mínimo de 4 horas. Se destiñó con la solución de metanol: ácido

acético sin el tinte, en una plataforma oscilante lenta durante 4-8 horas (Sambrook, 2001).

### **6.7 Tinción Inversa en gel de poliacrilamida**

A los geles sin teñir con azul brillante de Coomassie, para proteínas separadas y detectadas en condiciones desnaturalizantes, se les adicionó 0.2 M imidazol que contenía SDS al 0,1%, se agitó suavemente durante 10-15 min. Se desechó la solución. Se eliminó los residuos de la solución de imidazol lavando rápidamente el gel con abundante agua (30 s) después se agregó la solución de sulfato de zinc al 0.2 M y se agitó manualmente el gel durante aproximadamente 1 min. Se observó el gel sobre una superficie negra, el fondo del gel se visualizó blanco debido a la precipitación del complejo de imidazolato de zinc, y cuando se observaron las bandas de proteínas como zonas transparentes, se paró la reacción. Se lavó el gel brevemente (tres cambios, 1 min) y se mantuvo el gel teñido negativamente en agua (Castellanos-Serra & Hardy, 2006).

### **6.8 Cultivo y expansión de la línea celular humana de glioblastoma multiforme U87-MG**

La línea de células humana U-87 MG (ATCC® HTB-14™ U87) es una línea celular de glioblastoma, astrocitoma derivada de gliomas malignos humanos. Ésta se recibió en el laboratorio en hielo seco, procedentes del ATCC. Su descongelación se realizó lo más rápido posible en un baño de agua a 37 °C, se transfirieron a 9 ml de medio de cultivo DMEM, suplementado con 10% de suero fetal bobino (medio completo), en tubo cónico de 15 ml, se mezcló suavemente. Posteriormente se centrifugaron a 1200 rpm durante 5 minutos para sedimentar. Luego se desechó el medio y se resuspendió el sedimento suavemente en 10 ml de medio completo tibio. Luego las células se dividieron en dos frascos de cultivo T25 que contenían 5 ml de medio tibio, y se incubaron a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub>. Cada dos días se les realizó cambio de medio. Cuando las células alcanzaron una confluencia del 70 al 90%, se

realizó su expansión 1: 4, en frascos de cultivo T75. La capa celular previo a la expansión se lavó con un volumen igual de PBS pH 7,4 (Gibco / Invitrogen) y desechó. Luego se agregó 3 ml de tripsina al 0,25% (p / v) + solución de EDTA (Gibco / Invitrogen) 0,5 mM para y las células se observaron bajo un microscopio invertido hasta que la capa de células se dispersó (generalmente en 5 minutos). Posteriormente se le adicionó 6 volúmenes de medio completo y se colectaron las células suavemente y se centrifugaron a 1.000 rpm durante 5 minutos, se decantó el sobrenadante y el precipitado celular se resuspendió en medio completo fresco y se distribuyó en los frascos de cultivo T75 (15 ml por frasco). Estas células se cultivaron en medio de crecimiento: DMEM (Gibco / Invitrogen) -suero bovino fetal al 10% (HyClone) – 50 µg / ml de gentamicina, en atmósfera de 5% CO<sub>2</sub> a 37°C. Para realizar el banco de trabajo, las células se almacenaron en nitrógeno líquido: medio de crecimiento completo suplementado con DMSO al 5% (v / v) en alícuotas de 1 ml con aproximadamente 5 x 10<sup>6</sup> células. La criopreservación se realizó según las recomendaciones de la ATCC.

### **6.9 Método de obtención de plasma humano y células mononucleares de sangre periférica**

Para obtener las matrices biológicas de plasma y células mononucleares de sangre periférica de individuos aparentemente sanos (que se utilizarán como controles negativos), se empleó el método de Ficoll. Ficoll-Paque es un medio en gradiente de densidad comúnmente usado para aislar células mononucleares provenientes de sangre periférica humana, utilizando un procedimiento de centrifugación basado en el método desarrollado por Bøyum (Bøyum, A., Scand. J. 1968). Los linfocitos, monocitos y plaquetas no son lo suficientemente densos para penetrar en las capas del medio de Ficoll-Paque. Estas células, por lo tanto, se reúnen como una banda concentrada en la interfase entre el plasma y el medio Ficoll de la muestra. Esta banda permite aislar las células mononucleares para ser recuperadas con un alto rendimiento en un pequeño volumen (Checa Rojas, 2018).

El plasma se filtró en condiciones esterilizantes y se realizaron alíquotas de 1 mL, que fueron conservadas a -30°C.

Las células mononucleares (CMN) de sangre periférica se crioconservaron. Las alíquotas de la solución de criopreservación se prepararon agregando 500 µL de DMSO a crioviales de 1.5 mL. Se almacenaron en el congelador a -20°C. Se recuperaron la cantidad apropiada de crioviales con solución de Criopreservación y descongelaron a temperatura ambiente. Una vez descongelados se homogenizó la solución y se mantuvo bajo hielo a -4°C. Rotulando cada criovial.

La concentración celular obtenida del procedimiento de aislamiento de CMN con RPMI se ajustó. Se agregó 1 mL de la suspensión de CMN al criovial que contiene la solución de criopreservación. Repitiendo hasta procesar todas las células extraídas. Se homogenizaron la mezcla de CMN y solución de criopreservación por agitación gentil y se mantuvo en hielo a 4°C. Los crioviales se mantuvieron en el congelador de -20°C durante al menos 2 horas. Se transfirieron los crioviales al ultracongelador (-80) durante al menos 8 horas (no más de 24 horas). Por último se transfirieron los crioviales al tanque de nitrógeno líquido en fase líquida a -196°C.

## 7. Resultados

En el INMEGEN, recientemente se creó un nuevo laboratorio de Oncología Traslacional de Precisión, verticalizado en neurooncología, con proyectos novedosos dirigidos a la caracterización proteogenómica de tumores cerebrales primarios y metastásicos (pediátricos y adultos) mediante biopsias líquidas de sangre periférica, para el diagnóstico y medicina de precisión. Uno de sus objetivos es el desarrollo de métodos analíticos simples para identificar nuevas moléculas asociadas al tumor circulantes en sangre, que permitan posteriormente desarrollar métodos analíticos novedosos para el diagnóstico y medicina de precisión basados en las mismas.

Este trabajo, destinado a la obtención de una molécula proteica bacteriana como reactivo biológico, y a matrices biológicas de origen humano asociadas a tumores cerebrales constó de tres partes:

1) Obtención de la proteína serralisina, derivada del sobrenadante de cultivo de la cepa *S. marcescens* ATCC14756 como reactivo biológico para el desarrollo de métodos analíticos. Esta proteína constituirá el analito de interés para determinar los parámetros de especificidad, exactitud, límite de detección, entre otros, de la técnica analítica a desarrollar posteriormente, para identificar moléculas proteicas asociadas a tumores cerebrales circulantes en sangre.

2) Obtención de cultivos expandidos de la línea celular humana de glioblastoma multiforme U87-MG, para la obtención de extractos celulares (matriz biológica celular tumoral) como modelo de este tumor cerebral.

3) Obtención de las matrices biológicas humanas de interés desde individuos aparentemente sanos: plasma y células mononucleares (matriz biológica celular normal).

### **7.1 Obtención de la proteína serralisina.**

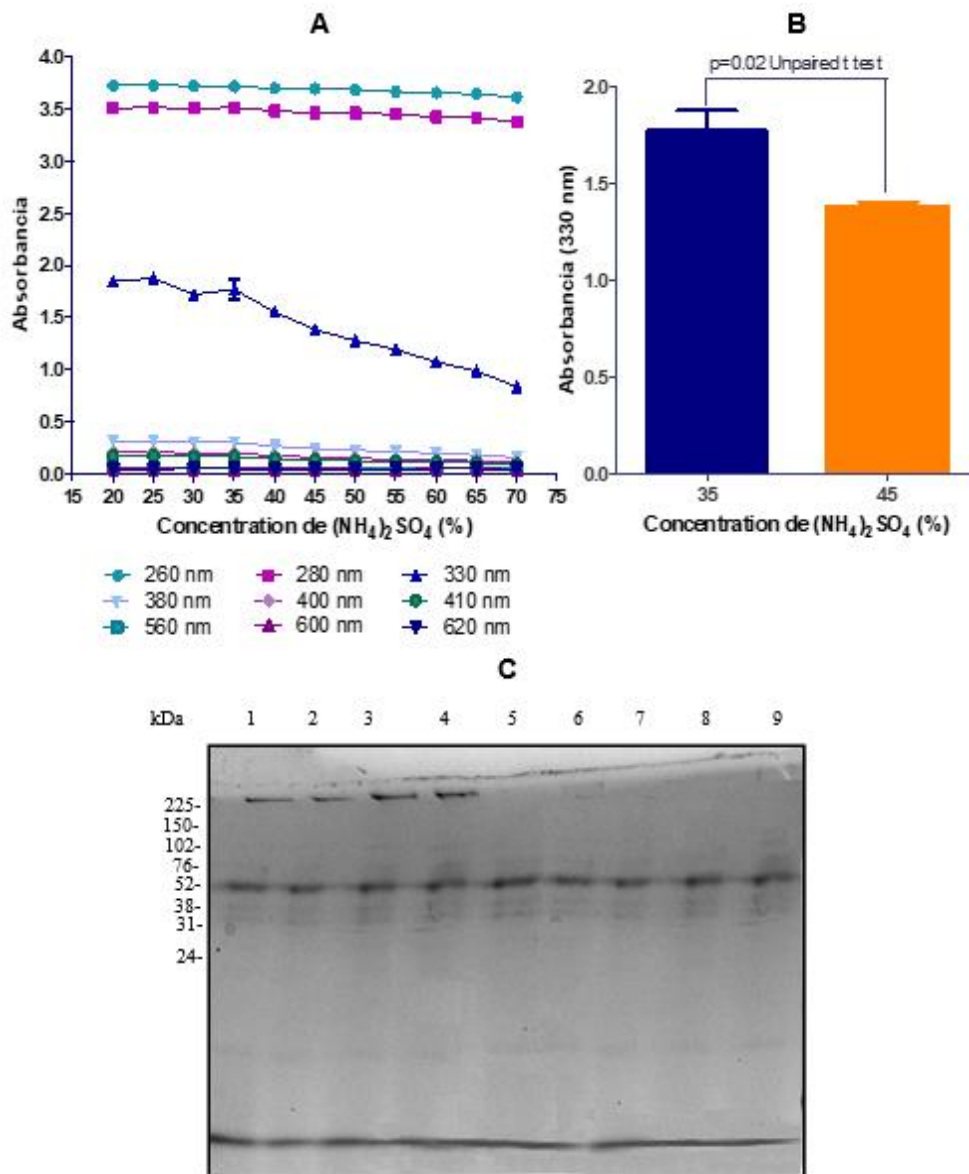
El sobrenadante de cultivo en triptona de soya, a 37°C, con agitación, de la cepa *S. marcescens* ATCC14756 filtrado estérilmente por 0.2 µm (SNCE), se fraccionó y fue sometido a tres procedimientos independientes: dos tipos de semipurificación y un proceso de purificación cromatográfica, para evaluar las condiciones factibles para la obtención de la serralisina como reactivo biológico: analito de interés (control positivo) en matrices biológicas complejas humanas para el establecimiento de métodos analíticos.

### **7.1.1 Precipitación de Serralisina con sulfato de amonio**

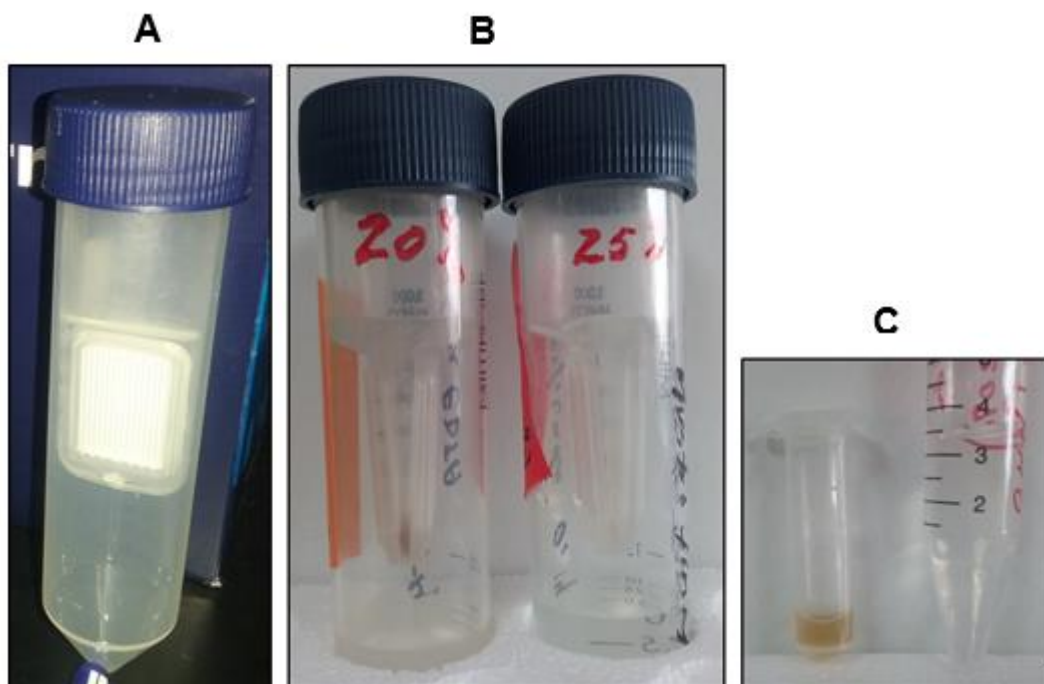
La evaluación del paso de semipurificación con sulfato de amonio se realizó con los porcentajes de 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, y 70. Posteriormente se midió la absorbancia del sobrenadante con diferentes longitudes de onda, 260, 280, 330, 380, 400, 410, 560, 600, 620 nm. La Figura 1 muestra las curvas que relacionan la concentración de sulfato de amonio con la absorbancia medida para cada longitud de onda. La capacidad del sulfato de amonio para precipitar las proteínas del SNCE, dependiente de su concentración, solamente se pudo apreciar para la curva obtenida con 330 nm (Fig. 1A). Entre 35 y 40% de sulfato de amonio, existieron diferencias significativas con la prueba *t* de *Student* no pareada ( $p=0.02$ ), Fig. 1B, donde la proteína mayoritaria que precipitó se encuentra a la altura de 52 kDa, aproximadamente (Fig. 1C), indicando que debe ser nuestra proteína de interés (55 kDa). Ello sugiere que la concentración de 35% de sulfato de amonio puede ser empleada para semipurificar nuestro analito de interés, con doble intención: concentración de la muestra inicial y eliminación de contaminantes no deseados.

### **7.1.2 Concentración del Sobrenadante de Cultivo Estéril (SNCE) por membranas de 10 kDa**

El segundo método de semipurificación de la serralisina fue el tamizaje molecular, mediante membrana de 10 kDa. La Figura 2A muestra el dispositivo de concentración que se empleó para realizar el procedimiento de interés. En la Figura 2B-C se puede observar la concentración de la muestra con evidente asociación a un pigmento de color carmelita, y el filtrado de contaminantes incoloro. En la muestra concentrada con moléculas de talla molecular mayor de 10 kDa, se observó una proteína mayoritaria de talla molecular aproximada a la altura de 52 kDa (datos no mostrados), lo cual sugiere la presencia en esta fracción de nuestra proteína de interés: serralisina.



**Figura 1.** Precipitación con sulfato de amonio. A- Curvas de la fracción soluble de la precipitación con concentraciones discontinuas de sulfato de amonio a diferentes longitudes de onda. B- Estadística entre los puntos de inflexión de la curva de la fracción soluble de la precipitación con lectura de absorbancia a 330 nm. C- Electroforesis SDS-PAGE 12.5 % de acrilamida. Tinción con Coomassie. Fracciones precipitadas y solubilizadas con tampón Laemmli 1x. 1: Fracción precipitada al 30%, 2: Fracción precipitada al 35%, 3: Fracción precipitada al 40%, 4: Fracción de precipitada al 45%, 5: Fracción precipitada al 50%, 6: Fracción precipitada al 55%, 7: Fracción precipitada al 60%, 8: Fracción precipitada al 65%, 9: Fracción precipitada al 70%.



**Figura 2.** Concentración del sobrenadante de cultivo estéril (SNCE). A- Dispositivo de concentración con membrana de 10kDa. B- Proceso de concentración. A la izquierda se muestra el concentrado en el dispositivo y a la derecha el filtrado con moléculas contaminantes de talla molecular menor que 10kDa. C- Colección del concentrado (izquierda) y filtrado molecular (derecha).

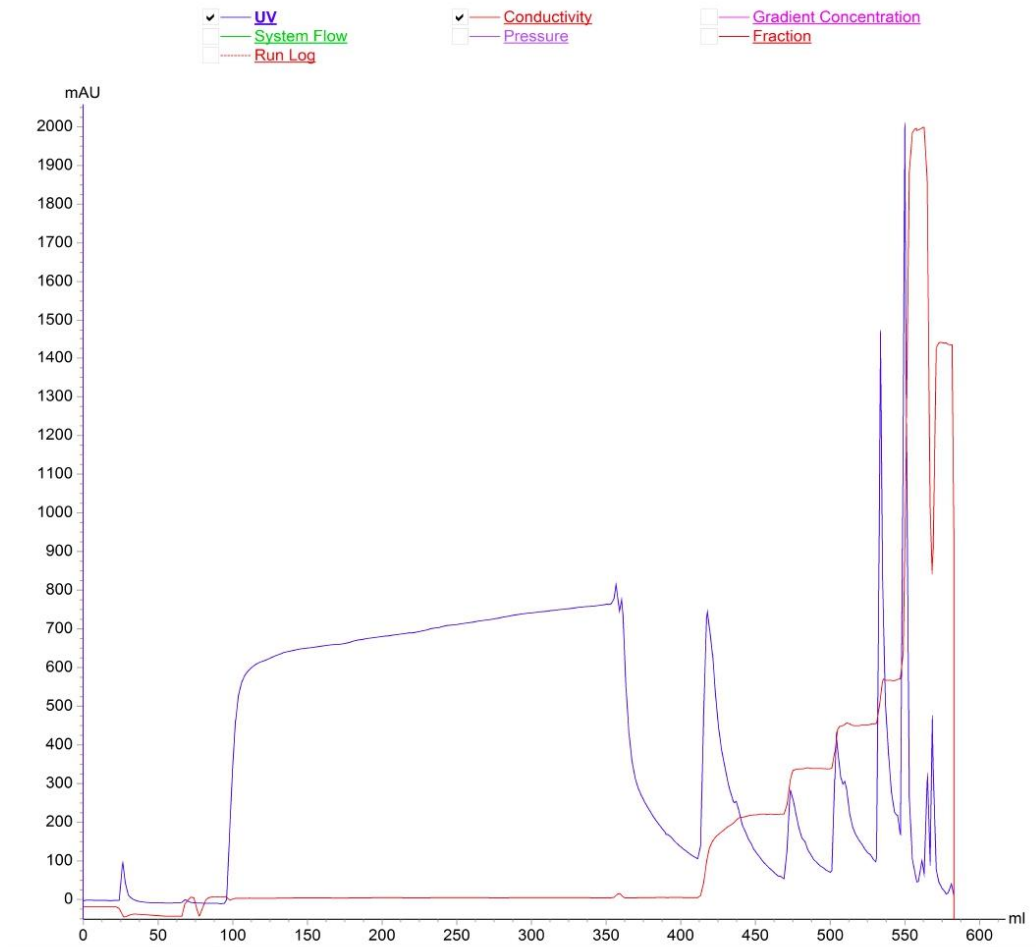
## 7.2 Purificación cromatográfica.

Además de los dos procesos de semipurificación con principios diferentes, también se evaluó la purificación mediante sistemas cromatográficos. En este caso, la muestra inicial del SNCE se diluyó en el tampón de equilibrio (Fosfato 50 mM, pH 8.0) de la matriz cromatográfica DEAE. El proceso de purificación con gradiente discontinuo de NaCl se realizó con 150 mL del SNCE diluido en 150 mL del tampón de equilibrio de la matriz cromatográfica, para un volumen de aplicación de 300 mL. El perfil cromatográfico (Fig. 3) mostró resolución entre las diferentes concentraciones de NaCl, con las condiciones cromatográficas seleccionadas: Flujo de aplicación y de elusión: 3 ml/min y 5 ml/min, respectivamente, y 280 nm de longitud de onda en el detector. La fracción eluida con 0.2 M de NaCl mostró una

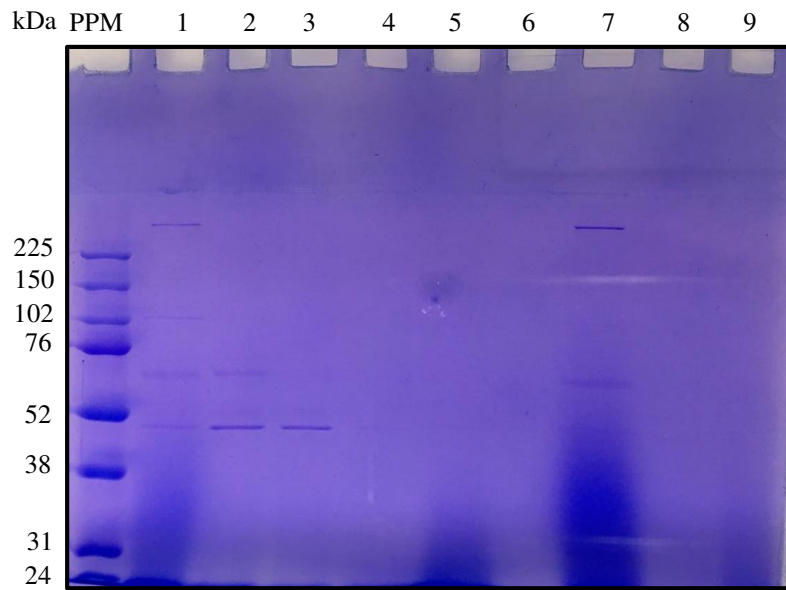


pureza mayor que 95% (Fig. 4), mediante el método de tinción con Comassie, mientras que la fracción de 0.1 M de NaCl, mostró a la proteína de interés pero con menor pureza; ya que presentó un contaminante de talla superior, claramente visible. Este procedimiento se repitió 27 veces con resultados similares, lo cual demostró la reproducibilidad del proceso de purificación establecido (Fig.5), y permitió obtener las cantidades suficientes de serralisina para realizar los primeros estudios de interés.

El método de tinción inversa, el cual es más sensible que el método de tinción con comassie y que puede ser utilizado para realizar wertern blot directo para inmunoidentificación de proteínas de interés, que en nuestro caso serán las proteínas asociadas a los tumores cerebrales, muestra el incremento de la sensibilidad del método; ya que se observaron dos contaminantes de talla superior, donde sigue siendo la proteína a la altura de 52 kDa la mayoritaria, y que debe corresponder a la serralisina (Fig. 6).



**Figura 3.** Cromatograma del proceso de purificación de la proteína serralisina. Gradiente de NaCl: 0.1; 0.2; 0.3; 0.4; 0.5; y 2 M de NaCl.



**Figura 4.** Electroforesis SDS-PAGE 12.5 % de acrilamida. Tinción con coomassie. 1: Fracción no adsorbida; 2: 0.1 M; 3: 0.2 M; 4: vacío; 5: 0.3M; 6:0.4M; 7: 0.5 M; 8: vacío; 9: 2M.

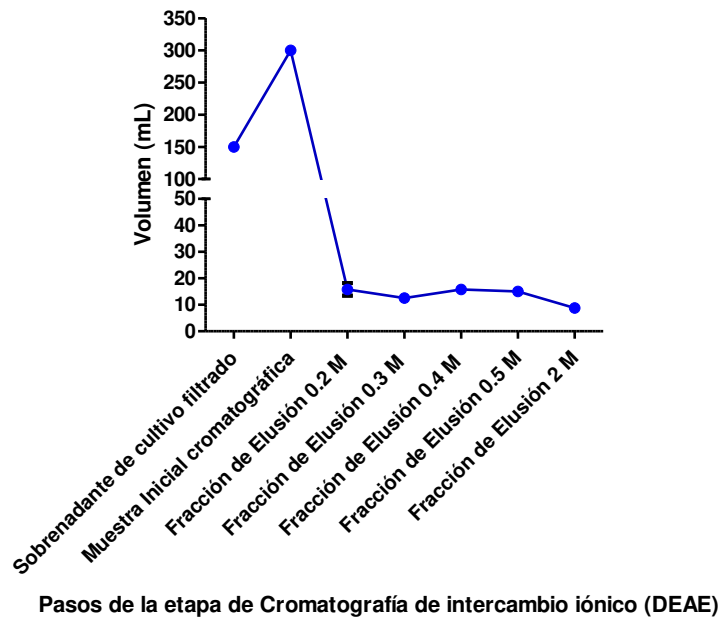
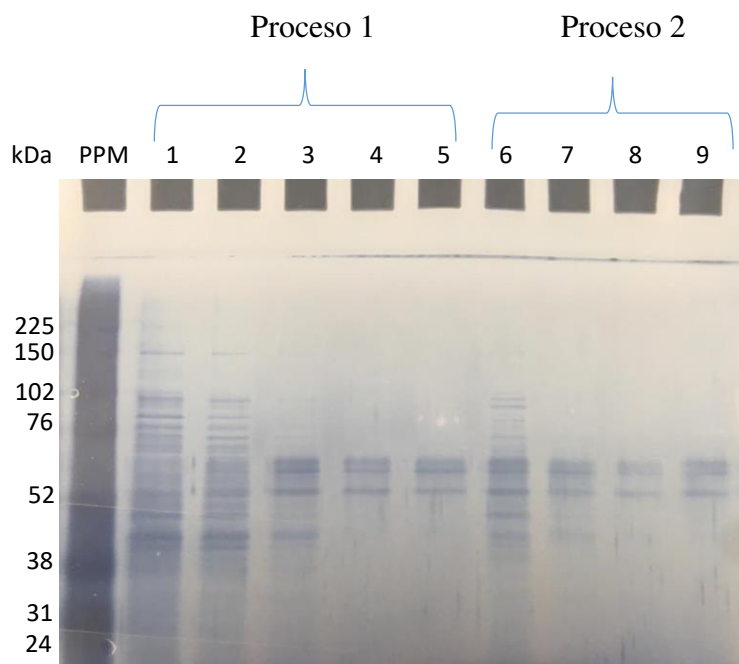


Figura 5. Reproducibilidad de los pasos del proceso de purificación por cromatografía. Se representan los datos de 6 procesos independientes. La muestra del sobrenadante de cultivo (150 mL) se diluye dos veces en el tampón de equilibrio (150 mL) cromatográfico, para un volumen final de aplicación de 300 mL.

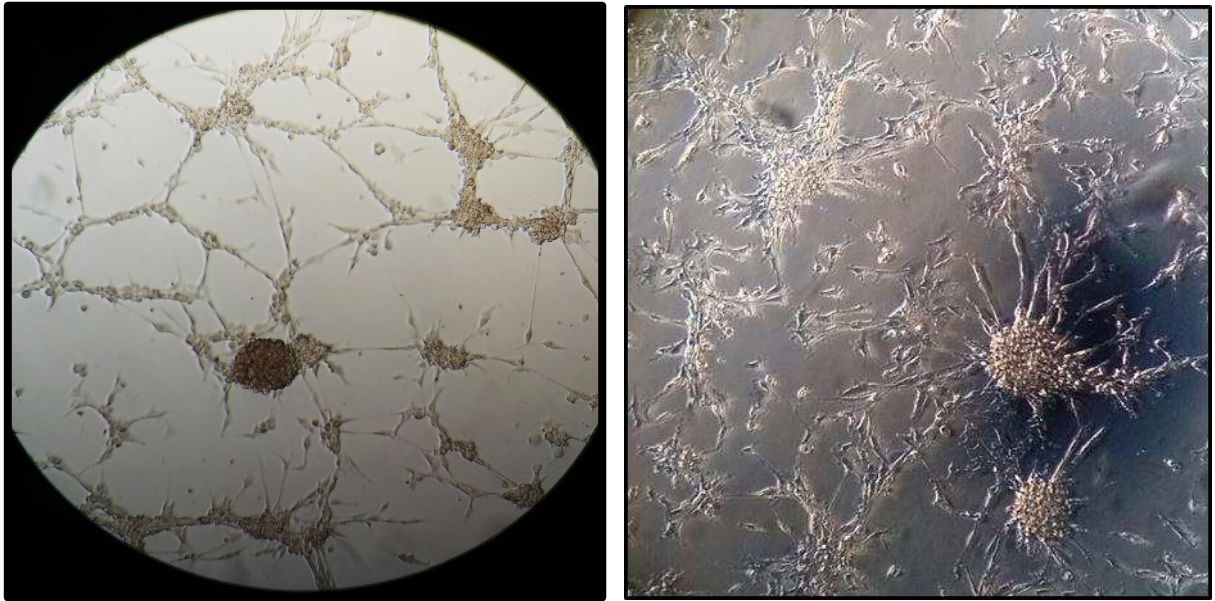


**Figura 6.** Electroforesis SDS-PAGE 12.5 % de acrilamida. Tinción inversa. 1- Muestra inicial; 2 y 6- fracción no absorbida; 3 y 7- 0.1 M; 4 y 8- 0.2M; 5 y 9-0.5 M.

### 7.3 Obtención de matrices biológicas

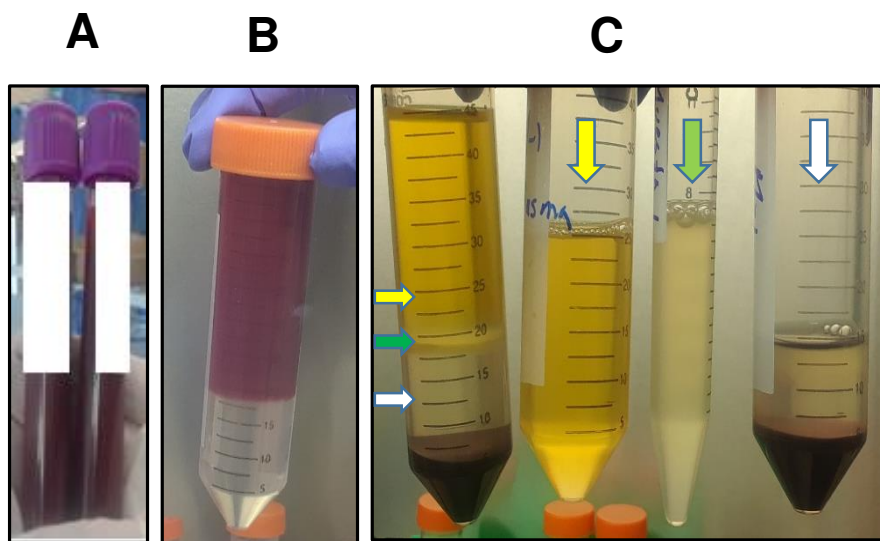
#### 7.3.1 Cultivo expandido de la línea de células de glioblastoma multiforme U87-MG

La Figura 7 muestra la expansión del cultivo de la línea U87-MG con similares características morfológicas y de enrejado que caracteriza al glioblastoma multiforme. Los cultivos expandidos en frascos de 75 cm permitieron realizar un banco de trabajo de la línea celular obtenida desde la ATCC, conservada en nitrógeno líquido para su posterior empleo para la obtención de extractos celulares como matriz biológica para realizar el establecimiento de la técnica de interés futura.



**Figura 7.** Cultivo y expansión de la línea de células de glioblastoma humano U87. A-Magnificación: 100x.  
A-Magnificación: 200x

La figura 8 muestra el proceso de estratificación de la sangre periférica de individuos aparentemente sanos mediante el método de Ficoll. El proceso se optimizó para 10 mL de sangre periférica. Se obtuvo la separación adecuada del plasma y de las células mononucleares. El plasma filtrado estérilmente se alicoto en fracciones de 1 ml y se conservó a  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ , mientras que las células mononucleares se congelaron mediante los procedimientos estándar para mantenerlas viables y se conservaron en nitrógeno líquido. Dos meses después de la congelación, se descongelaron varios viales y se evaluó la viabilidad celular, siendo ésta mayor al 80% (Fig. 9).



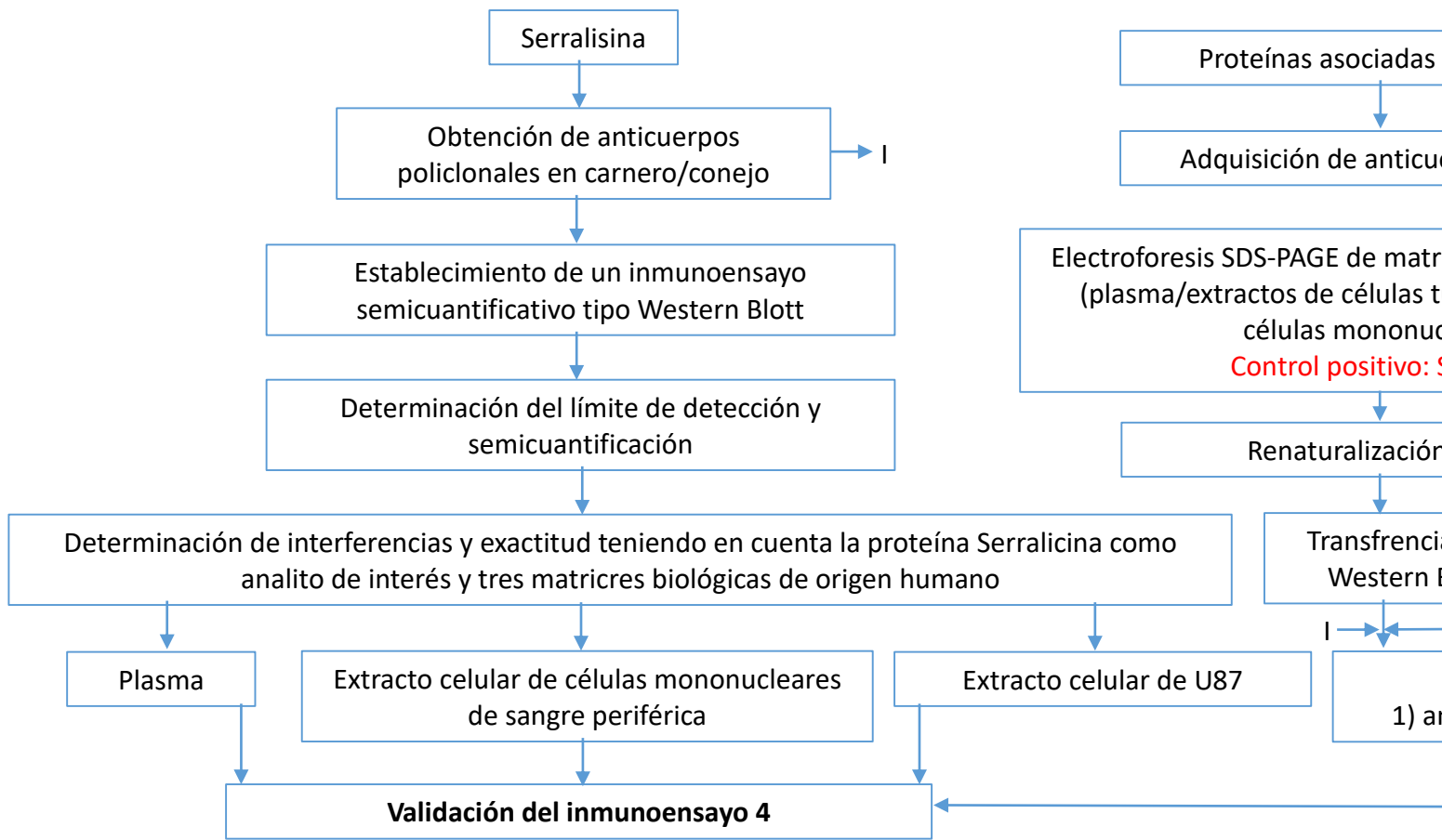
**Figura 8.** Fraccionamiento de sangre periférica de individuos aparentemente sanos. A- Sangre Total. B- Método de Ficoll por diferencia de densidad. C- Separación de componentes de la sangre por capas estratificadas. Flecha amarilla: plasma. Flecha verde: células mononucleares normales. Flecha blanca: desecho.



**Figura 9.** Aislamiento y cultivo de células mononucleares normales desde sangre periférica. Magnificación: 100x.

#### **7.4 Diseño de un nuevo inmunoensayo rápido y económico para la identificación de proteínas asociadas a tumores cerebrales, en matrices biológicas de origen humano relevantes, de interés para la salud humana.**

Una vez que se obtuvieron las matrices biológicas de interés de forma reproducible y quedó establecido el proceso de obtención y purificación de la serralisina como reactivo biológico para control positivo que se utilizará como analito de interés, nos dimos a la tarea de diseñar un método rápido y económico que nos permita identificar proteínas asociadas a tumores cerebrales circulantes en sangre. Este método esquematizado en la Fig. 10, se basa en la adición del analito de interés (serralisina) a diferentes matrices biológicas, ya obtenidas en este trabajo: extracto de células tumorales, extracto de células normales, y plasma. Posteriormente, realizar su inmunoidentificación mediante electroforesis-tinción inversa-western blot, con revelados dobles: 1) control positivo (serralisina) y 2) marcador molecular del tumor. Luego se evaluará la sensibilidad y especificidad del sistema, que permitan inmunoidentificar proteínas asociadas al tumor a la vez que se visualice nuestro control positivo del ensayo (serralisina). Ello permitirá de una manera rápida y económica identificar proteínas asociadas a tumores cerebrales, tales como vimentina, circulantes en sangre y poder facilitar direcciones clínicas de los pacientes, con alcance a gran parte de los pacientes, debido a su factibilidad económica y rápida realización (menos de 24 h).



**Figura 10.** Diseño de un nuevo inmunoensayo rápido y económico para la identificación de proteínas asociadas a cáncer, en matrices biológicas de interés para la salud humana.



## 8. Discusión

El desarrollo de un método de purificación para la obtención de la proteína bacteriana serralisina, como analito de interés en matrices biológicas de origen humano, a partir de la cepa comercial de *S. marcescens* ATCC14756, permitió de manera segura, reproducible y rápida, disponer de este reactivo biológico para el diseño y desarrollo de métodos analíticos de interés para la salud humana. La obtención de la serralisina en el medio de cultivo de caldo de triptona de soya sin autodegradaciones, evidenció que la triptona es la fuente clave de *S. marcescens* para producir serralisina (Mohankumar & Raj, 2011).

La semipurificación, mediante la alteración de la solubilidad con altas concentraciones de sales permitió la eliminación de contaminantes de la serralisina y la concentración de esta molécula (Fekete, 2015). El precipitado obtenido en un rango de 35% y 45% de sulfato de amonio es muy ventajoso; ya que las bajas concentraciones salinas permitieron evitar diálisis para pasos posteriores (Araghi et al. 2019).

La muestra SNCE diluida y aplicada a la columna DEAE de naturaleza aniónica permitió la adsorción de la serralisina por su carga (Lenhoff, 2016), y su separación de la matriz de intercambio aniónico mediante el incremento de la fuerza iónica con gradiente discreto de NaCl (Wong et al., 2012; Nakahama et al., 1986; Braunagel & Benedik, 1990).

En 1984, Matsumoto y su grupo purificaron cuatro proteasas de *S. marcescens* kums 3958 utilizando precipitación con sulfato de amonio, cromatografía de intercambio de iones DEAE y gel de filtración Sephadex (Fournier et al., 2012). Los resultados de su gel de agarosa mostraron tres proteasas con pesos moleculares de 52, 56.60 y 73 kDa. En *Serratia marcescens* SM6 se observaron dos pesos moleculares distintos: una proteína a la altura de 52 kDa en

mayor proporción y otra de 55 kDa en menor proporción. (Braunagel & Benedik, 1990). En nuestro caso, para *S. marcescens* ATCC14756 se observó por tinción con Coomassie la proteína de 52 kDa después de la purificación, mientras que con tinción inversa (Castellanos-Serra & Hardy, 2006), de mayor sensibilidad, se observaron otras dos bandas más tenues de mayor talla molecular que 52 kDa. Estos resultados sugieren que los procedimientos utilizados en este trabajo, permiten obtener proteínas bacterianas como reactivos biológicos para ser empleado como analito de interés y/o control positivo para el desarrollo de técnicas analíticas con matrices biológicas de origen humano.

Las matrices biológicas de células tumorales y normales humanas son de gran utilidad como modelos para la detección de marcadores moleculares asociados a tumores cerebrales; ya que pueden contribuir a proporcionar información para estratificar a los pacientes con tumores cerebrales (Pulido y cols 2019), tales como la vimentina. Esta molécula se ha asociado con la capacidad infiltrante de glioblastomas, (Strouhalova y cols, 2020; Nowicki y cols, 2019). Las matrices biológicas derivadas de líneas de células tumorales establecidas y comerciales, como la obtenida desde el modelo humano de glioblastoma U87-MG, así como el plasma y células mononucleares obtenidas desde sangre periférica, constituyen material biológico humano útil en conjunto con la serralisina (Pulido y cols, 2019), para el desarrollo de métodos analíticos potencialmente aplicables al diagnóstico y medicina de precisión de tumores cerebrales.

## 9. Conclusiones

1-La metaloproteasa serralisina derivada de *S. marcescens* ATCC14756 puede ser obtenida en el sobrenadante de cultivo de triptona de soya, de manera íntegra, sin autodegradaciones.

2-La serralisina puede ser semipurificada mediante precipitación con sulfato de amonio, paso que también facilitaría la concentración de la muestra inicial previo a procesos cromatográficos.

3-La serralisina puede ser purificada mediante un solo paso cromatográfico con matriz DEAE de intercambio iónico y con gradiente discreto de NaCl, con pureza adecuado como reactivo biológico, en la fracción de 0.2M de NaCl, de forma reproducible.

4- El cultivo expandido de la línea celular U87-MG permite obtener una fuente reproducible de células de glioblastoma humano como matriz biológica para el desarrollo de métodos analíticos con fines de investigación aplicada.

5- El método de Ficoll ajustado a 10 mL de sangre periférica, permite obtener plasma y células mononucleares, como matrices biológicas para el desarrollo de métodos analíticos con fines de investigación aplicada.

6- La obtención de proteínas controles positivos bien caracterizadas y matrices biológicas de interés para la salud humana permiten diseñar sistemas analíticos rápidos, económicos, y factibles para la investigación aplicada, útil para la salud humana.

## 10. Recomendaciones

- 1- Obtener anticuerpos policlonales anti-serralisina.
- 2- Desarrollar el método analítico diseñado para inmunoidentificar proteínas asociadas a tumores cerebrales circulantes en sangre, basado en electroforesis-tinción inversa-western blot con doble revelado.

## 11. Referencias Bibliográficas

- Abrahantes-Pérez, M. C., Reyes-González, J., Veliz Rios, G., Bequet-Romero, M., Gomez Riera, R., Anais Gasmury, C., ... & Váldez, J. (2006). Cytotoxic proteins combined with prodigiosin obtained from *Serratia marcescens* have both broad and selective cytotoxic activity on tumor cells. *Journal of chemotherapy*, 18(2), 172-181.
- Alegría-Loyola, M. A., Galnares-Olaldes, J. A., Mercado, M. (2017), Tumores del sistema nervioso central. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*, [S.l.], v. 55, n. 3, p. 330-340.
- Amersham Pharmacia Biotech. (2001). Extraction and Clarification Procedures. *Protein Purification Handbook*. 67-68.
- Arun S. S. L. (2011). Vimentin as a potential molecular target in cancer therapy Or Vimentin, an overview and its potential as a molecular target for cancer therapy. *Cell Mol Life Sci*, 68(18), 3033-3046.
- Battaglia, R. A., Delic, S., Herrmann, H., & Snider, N. T. (2018). Vimentin on the move: new developments in cell migration. *F1000Research*, 7, F1000 Faculty Rev-1796.
- Biomarkers Definitions Working Group, Atkinson Jr, A. J., Colburn, W. A., DeGruttola, V. G., DeMets, D. L., Downing, G. J., ... & Spilker, B. A. (2001). Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clinical pharmacology & therapeutics*, 69(3), 89-95.
- Braunagel, S.C., Benedik, M.J. (1990). The metalloprotease gene *from Serratia marcescens* strain SM6. *Mol. Gen. Genet.* 222, 446-451.
- Bray F., Ferlay J., Soerjomataram I., Siegel R.L., Torre L.A., Jemal A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence

- and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 2018; 68:394–424.
- Castellanos-Serra, L. y Hardy, E. (2006). Negative detection of biomolecules separated in polyacrylamide electrophoresis gel. *Natural Protocoles*, 1 (3), 1544-1551. doi:10.1038/nprot.2006.233.
  - De Robles P., Fiest K. M., Frolkis A. D., Pringsheim T., Atta C., St Germaine-Smith C. (2015). The worldwide incidence and prevalence of primary brain tumors: a systematic review and meta-analysis. *Neuro Oncol*; 17(6):776-83.
  - Delepelaire, P., Wandersman, C. (1989). Protease secretion by *Erwinia chrysanthemi*. *J. Biol. Chem.* 264, 9083-9089.
  - Delepelaire, P., Wandersman, C. (1990). Protein secretion in Gram-negative bacteria. *J. Biol. Chem.* 265, 17118-17125.
  - Duong, F., Lazdunski, A., Cami, B., Murgier, M. (1992). Sequence of a cluster of genes controlling synthesis and secretion of alkaline protease in *Pseudomonas aeruginosa*: relationship to other secretory pathways. *Gene* 121, 47-54.
  - Espinosa, R., Abrahantes, M. D. C., Valdés, J., Lugo, V., Pupo, M., Aguilar, P., ... & Musacchio, A. (2009). Proceso de fermentación para la producción de la proteína P50 de *Serratia marcescens*. *Biotecnología Aplicada*, 26(3), 214-217.
  - Eugenio Hardy, D. Q. (2015). Scale-up of the polyacrylamide gel electrophoresis-reverse staining-extrusion-passive elution technique for the straightforward recovery of milligrams of recombinant proteins. *Biotecnología Aplicada*, 32(2), 2301-2305.
  - Fournier P, Bian H, Szeberényi J, Schirmacher V. (2012). Analysis of three properties of Newcastle disease virus for fighting cancer: tumor-selective replication, anti-tumor cytotoxicity, and immunostimulation. *Methods Mol Biol.* 797:177–204.

- Fuchs E, Weber K. (1994). Intermediate filaments: structure, dynamics, function, and disease. *Annu Rev Biochem.* 63:345–382.
- Gallagher, S.R. (2006). One-dimensional SDS gel electrophoresis of proteins. *Curr Protoc Mol Biol*;Chapter 10:Unit 10.2A.
- Global Cancer Observatory. (2019) International Agency for Research on Cancer. World Health Organization: Cancer Today. Recuperado de <https://gco.iarc.fr/today/fact-sheets-cancers>
- Gupta, S.K., Masinick, S.A., Hobden, J.A., Berks, R.S., Hazlett, L.D. (1996). Bacterial proteases and adherence of *Pseudomonas aeruginosa* to mouse cornea. *Exp. Eye Res.* 62, 641-649.
- Létoffé, S., Delepelaire, P., Wandersman, C. (1990). Protease secretion by *Erwinia chrysanthemi*: the specific secretion functions are analogous to those of *Escherichia coli* A-haemolysin. *EMBO J.* 9, 1375-1382.
- Liu L.K., Jiang X.Y., Zhou X.X., (2010). Upregulation of vimentin and aberrant expression of E-cadherin/b-catenin complex in oral squamous cell carcinomas: correlation with the clinicopathological features and patient outcome. *Mod Pathol* ;23:213–224.
- Marrugo-Ramírez, J., Mir, M., & Samitier, J. (2018). *Blood-Based Cancer Biomarkers in Liquid Biopsy: A Promising Non-Invasive Alternative to Tissue Biopsy. International Journal of Molecular Sciences, 19(10), 2877.*
- Mohankumar A, Raj R. H. K. (2011). Production and characterization of serratiopeptidase enzyme from *Serratia marcescens*. *Inter J Biol*;3:39–51.
- Nakahama, K., Yoshimura, K., Marumoto, R., Kikuchi, M., Lee, I.S., Hase, T., Matsubara, H. (1986). Cloning and sequencing of *Serratia* protease gene. *Nucleic Acids Res.* 14, 5843-5855.
- Nicolet, S., Herrmann, H., Aebi, U., & Strelkov, S. V. (2010). *Atomic structure of vimentin coil 2. Journal of Structural Biology, 170(2), 369–376.*

- Pulido, R., Mingo, J., Gaafar, A., Nunes-Xavier, C. E., Luna, S., Torices, L., López, J. I. (2019). *Precise Immunodetection of PTEN Protein in Human Neoplasia. Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, a036293.
- Sambrook, Joseph. (2001). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, N.Y: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 3, 2013-2029.
- Satelli, A., Li, S. (2011). Vimentin in cancer and its potential as a molecular target for cancer therapy. *Cell. Mol. Life Sci.* 68, 3033–3046.
- Seelert, H., & Krause, F. (2008). *Preparative isolation of protein complexes and other bioparticles by elution from polyacrylamide gels. ELECTROPHORESIS*, 29(12), 2617–2636. doi:10.1002/elps.200800061
- Sigma-Aldrich. (22 de Julio de 2020). Recuperado de <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Bulletin/a5479bul.pdf>
- Stöcker, W., Grams, F., Baumann, U., Reinemer, P., GomisRu"th, F.X., McKay, D.B., Bode, W. (1995). The metzincins-topological and sequential relations between astacins, adamalysins, serralysins and matrixins define a superfamily of zinc-peptidases. *Protein Sci.* 4, 823-840.
- Strouhalova, K., Pře"chová, M., Gandalovi"čová, A., Brábek, J., Gregor, M., & Rosel, D. (2020). Vimentin Intermediate Filaments as Potential Target for Cancer Treatment. *Cancers*, 12(1), 184.
- Nowicki, M. O., Hayes, J. L., Chiocca, E. A., & Lawler, S. E. (2019). Proteomic analysis implicates vimentin in glioblastoma cell migration. *Cancers*, 11(4), 466.
- Wandersman, C. (1989). Secretion, processing and activation of bacterial extracellular proteases. *Mol. Microbiol.* 3, 1825-183.
- Wandersman, C., Delepelaire, P., Létoffé, S., Ghigo, J.M. (1992). A signal peptide-independent protein secretion pathway. *Antonie van Leeuwenhoek* 61, 111-113.

- Welch, R.A. (1991). Pore-forming cytolysins of Gram-negative bacteria. *Mol. Microbiol.* 5, 521-528.
- Wong C-H, Wu C-Y, Wang C-C, Alice L.Y. (2012). Diagnóstico del cáncer basado en niveles de anticuerpos contra Globo H y sus fragmentos. Patentes de Google.
- Zhao, J., Zhang, L., Dong, X., Liu, L., Huo, L., & Chen, H. (2018). High Expression of Vimentin is Associated With Progression and a Poor Outcome in Glioblastoma. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology*, 26(5), 337–344.