



UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA

IMPLEMENTACIÓN DEL MODELO PARA CARACTERIZACIÓN DE

Bacillus thuringiensis serovar neoleonensis (T24001)

EN EL CONTEXTO DE CÁNCER DE CUELLO UTERINO

PRESENTA:

Silvia Fernanda Camero
Hernández

Asesor Externo

Silvio Alejandro López Pazos

Asesor Interno

Sandra Mónica Estupiñan

Bacteriología y laboratorio clínico
Bogotá D.C.

INTRODUCCIÓN



Cáncer de cuello uterino

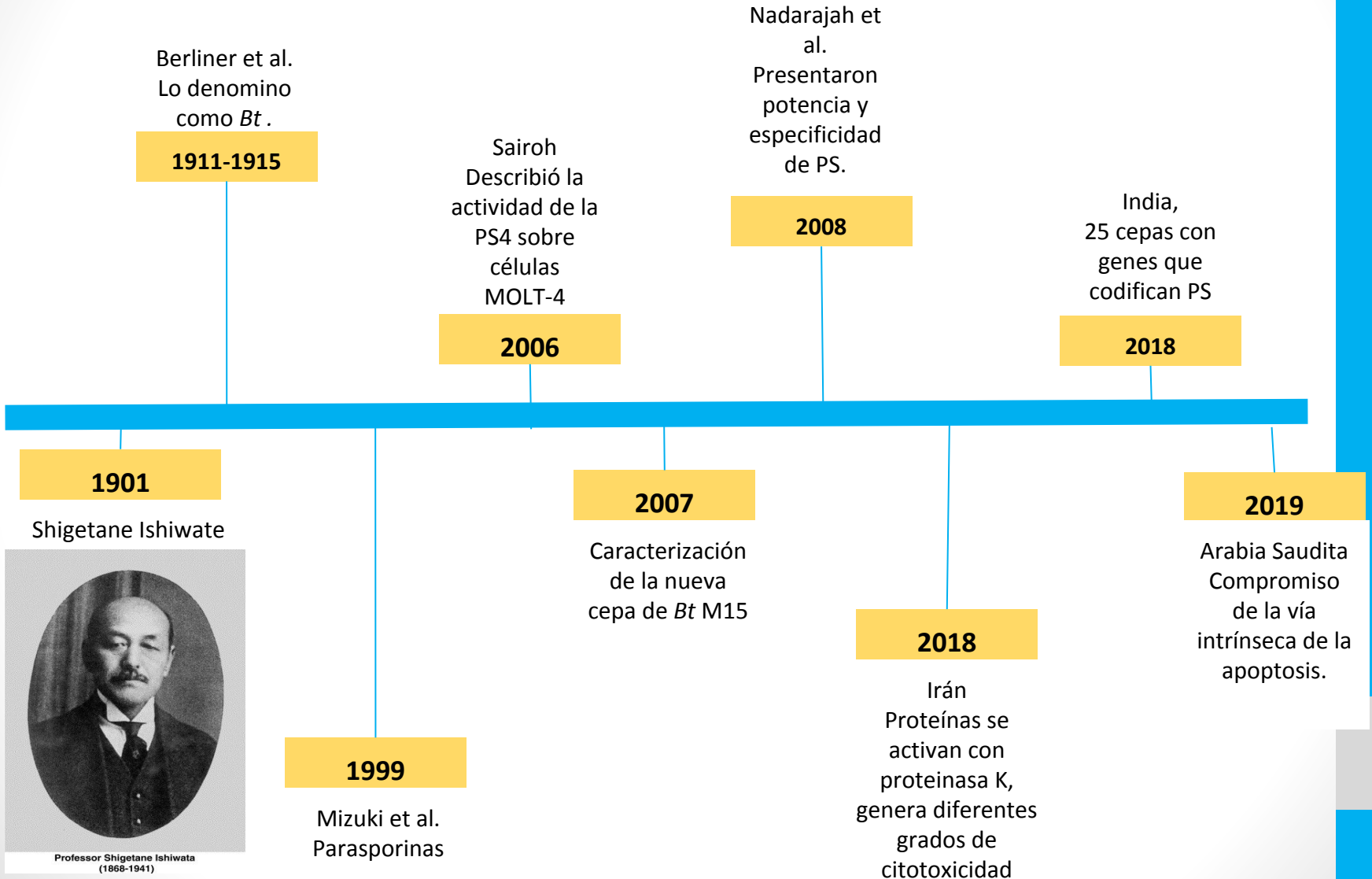


***Bacillus thuringiensis ser.
neoleonensis (T24001)***



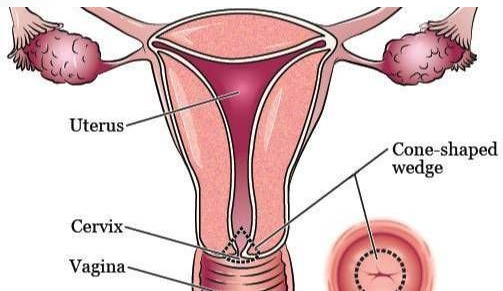
Cultivo celular

Antecedentes



Marco Teórico

Cáncer de cuello uterino



Factores de Riesgo

- Embarazo precoz
- Múltiples partos
- Infecciones de transmisión sexual
- Tabaco
- Anticonceptivos orales
- Sistema Inmune debilitado

Causas

VPH

Serotipos

16 y 18

45, 33, 31, 52, 58 y 35

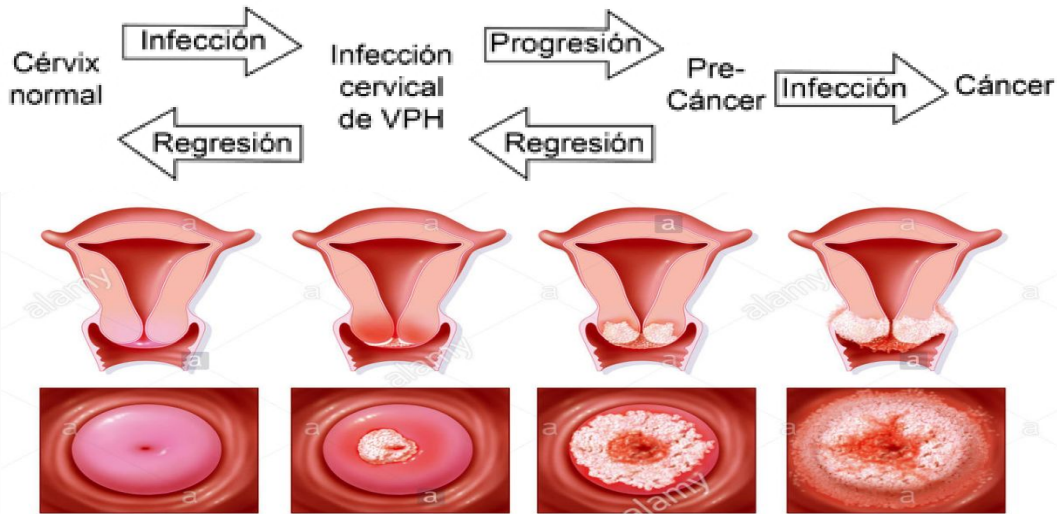
Predisposición genética

Genes Supresores de Tumores

Proto-oncogenes

Genes reparadores de ADN

Telomerasa



Img. Recuperada de : <https://www.istockphoto.com/es/foto/etapas-del-c%C3%A1ncer-de-cuello-uterino-gm940411550-257081470>

Síntomas

- ❖ Sangrado vaginal inusual.
- ❖ Flujo vaginal inusual.
- ❖ Dolor pélvico.
- ❖ Dolor o sangrado luego de las relaciones sexuales.

CCU en Colombia → Segundo tipo de cáncer más frecuente

Vacuna contra VPH

TETRAVALENTE
(VPH 16, 18, 6 Y 11)
BIVALENTE
(VPH 16 Y 18)



Diagnóstico

Citología vaginal
Test de VPH

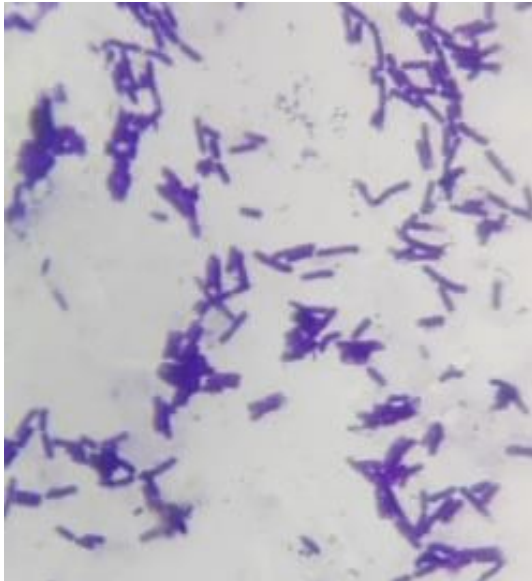


- **Bacillus thuringiensis**

Bacteria Gram positiva en forma de bastón de tamaño 1 a 1.2 micrómetros de ancho y 3 a 5 micrómetros de largo

Dos fases principales:

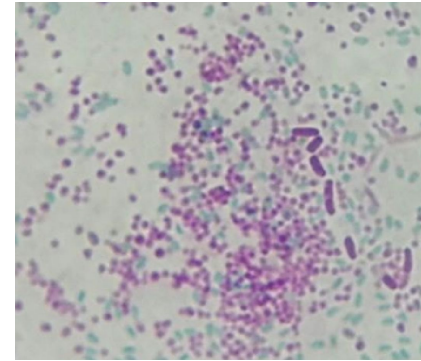
- la forma vegetativa



No es patógeno obligado si no Saprófito ambiental.

Toxinas insecticidas Vip

- la fase de esporulación



Proteínas Cry

ETX/MTX

Proteínas Cyt

Parasporinas

PARASPORINAS

Proteínas paraesporales que presentan actividad citotóxica contra células provenientes de tejido tumoral.

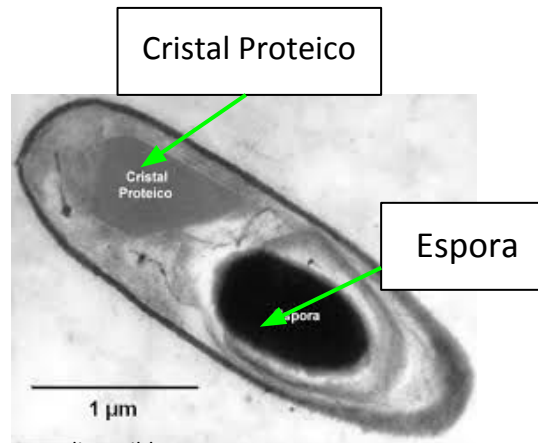
No presenta:
Actividad insecticida ni
hemolítica

Mizuki et al. (1999)

Descubrió actividad de las PS.

Selectiva y específica

No presenta toxicidad frente a células de tejido normal.



Img. disponible en: <http://eprints.uanl.mx/14439/1/1080252167.pdf>

19 PS
Niveles : PS1 - PS6

***Bt. neoleonensis* (T24001)**
Guanajuato, México

Mecanismo de acción
Receptor Beclin-1

Objetivos

General.

Establecer el modelo para evaluación de *Bacillus thuringiensis* cepa *neoleonensis* sobre células de cáncer de cuello uterino.

• Específicos.

1. Caracterizar microscópica y bioquímicamente la cepa *Bacillus thuringiensis neoleonensis* T24001
2. Instaurar el cultivo *in vitro* de células de cáncer de cuello uterino.
3. Determinar viabilidad de células de cáncer de cuello uterino *in vitro*.

Diseño de la Metodología

Tipo de Investigación



Experimental-cualitativa-cuantitativa

Universo
cepas de Bt.

Población
Cepas de Bt con actividad
citotóxica hacia línea celular de
cáncer.

Muestras
Cepa de *Bt neoleonensis* de
posible actividad sobre línea
celular de cáncer de cuello
uterino.

Variables e Indicadores

Variable independiente: Presencia de secuencias de ADN y cristales asociados a PS.

Variable dependiente: Viabilidad de línea celular de cáncer de cuello uterino.

Indicadores: porcentaje de viabilidad celular.

Métodos

Caracterizar microscópica y bioquímicamente la cepa *Bacillus thuringiensis neoleonensis*

A partir de cultivo de *Bt.* en medio LB o Tripticasa soya

Caracterización Microscópica

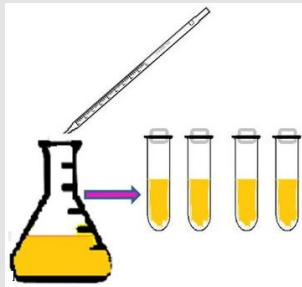
1. Coloración de Gram
2. Coloración de Schaeffer fulton
3. Microscopía de contraste de fases

Extracción de cristales de parasporinas

1. PMFS
2. DTT
3. Buffer carbonatado



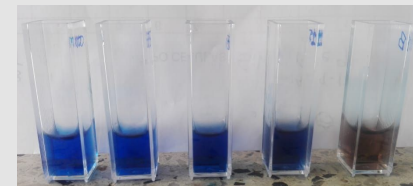
Antibiograma (Gentamicina, ampicilina, tetraciclina)



Método de dilución en agar.

Concentración de antibiótico
100ug/ml - 0.4ug/ml

Cuantificación de proteínas parasporales



Método de Bradford
Lectura de proteínas a 590nm

Métodos

-Instaurar el cultivo *in vitro* de células de cáncer de cuello uterino.

Descongelación



Pase



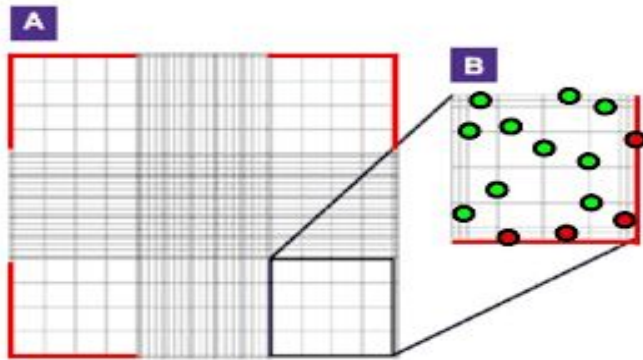
Congelación



Métodos

Determinar viabilidad de células de cáncer de cuello uterino *in vitro*.

Ensayo de viabilidad Celular con Tripán Blue



Viabilidad

células vivas : Blancas

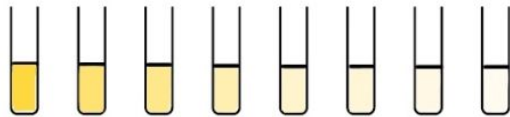
células muertas : Azul

$$\% \text{células vivas} = \frac{\# \text{cls vivas}}{\# \text{células totales}} * 100$$

$$\text{Concentración} = \# \text{cls vivas} * 10.000 * 2$$



Diluciones a partir de 1×10^6 células/ml

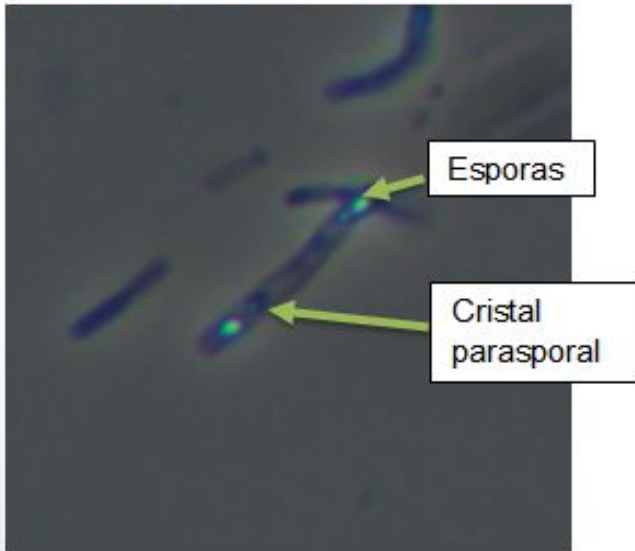
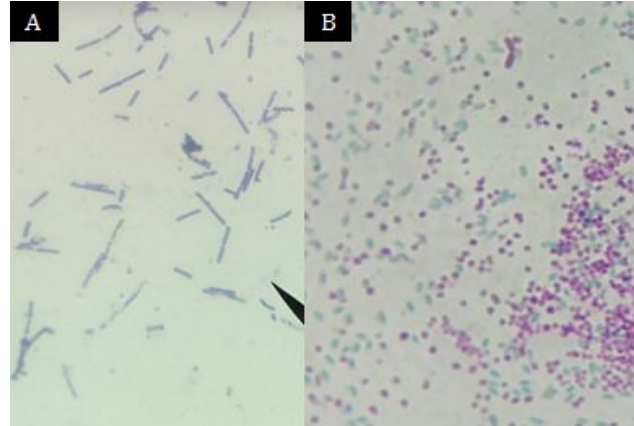


Rango : 40000 a 5000 células /ml aprox.

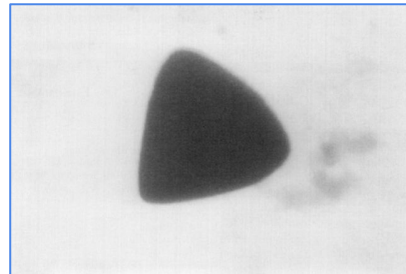
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	cel/mL
A													5000
B													10000
C													15000
D													20000
E													25000
F													30000
G													35000
H													40000
	24horas			48horas			72horas			96horas			

Resultados y Discusión

CARACTERÍSTICAS FÍSICAS



Fotografía *Bt neoleonensis* en microscopía de contraste de fases



Fotografía de Cristal de Bt GM-18 en microscopía electrónica. (Rodríguez et al.)

HÁBITAT



Actividad nematocida

Proteína Cry 6

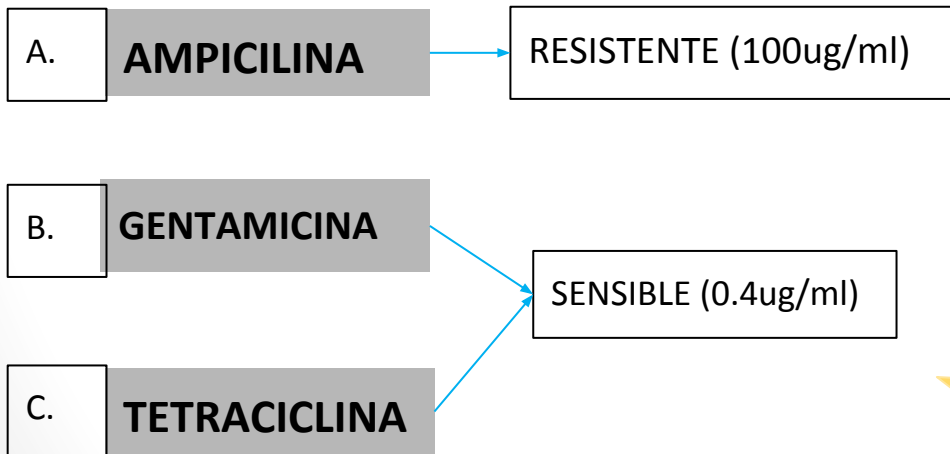
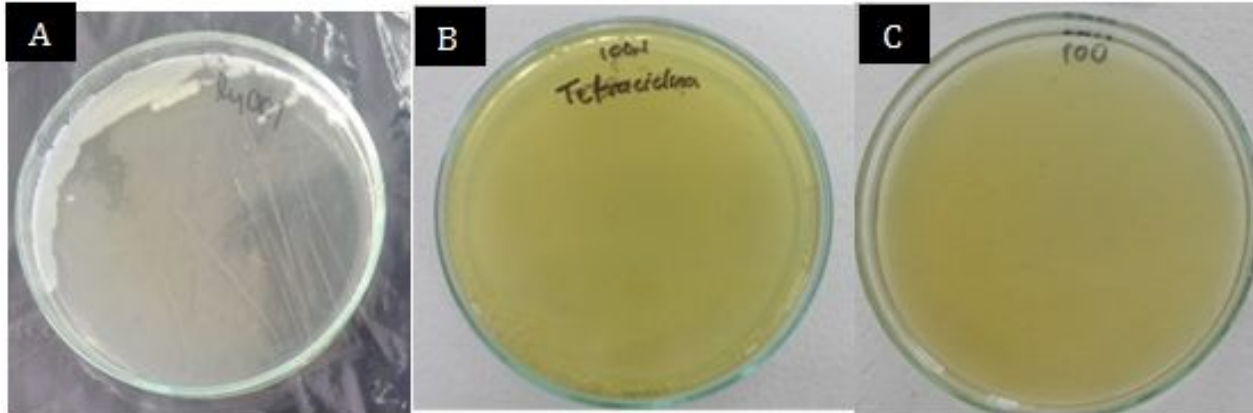
No presenta actividad insecticida

Actividad citotóxica contra células MOLT-4

ANTIBIOGRAMA

Bt neoleonensis (T24001)

Útil para diferenciar géneros de *Bacillus* (*Bacillus cereus* y *Lysinibacillus sphaericus*)

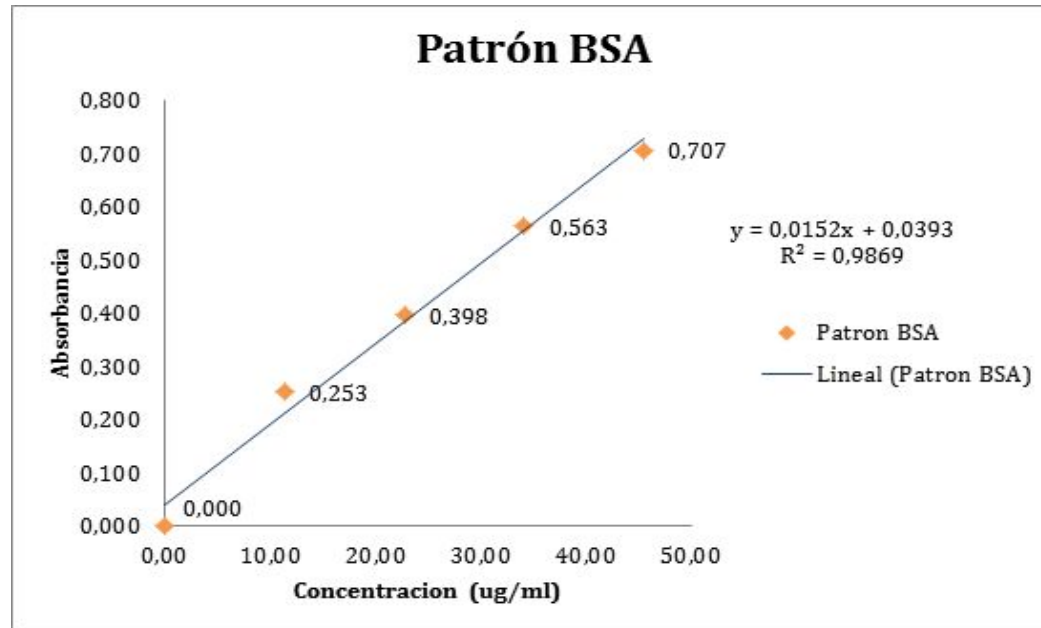


Datos similares

Bt. var kenya, *kurstaki*,
aizawai, *monterrey* y
mexicanaensis.

IMPORTANTE
Area industrial y
agrícola

Curva de patrón de calibración con proteína Albúmina (BSA)



	Estandar(0,5 mg/ml)	1	2	3	promedio	concentracion
Blanco	0	0	0	0	0,000	0,00
1	25	0,269	0,269	0,221	0,253	11,36
2	50	0,42	0,41	0,363	0,398	22,73
3	75	0,605	0,57	0,515	0,563	34,09
4	100	0,776	0,73	0,615	0,707	45,45
<i>Bt. neoleonensis</i>		0,383	0,386	0,3845	0,385	22,747

Resultados y Discusión

Condiciones ambientales

Incubación 37°C, CO2 5%, HUMEDAD.

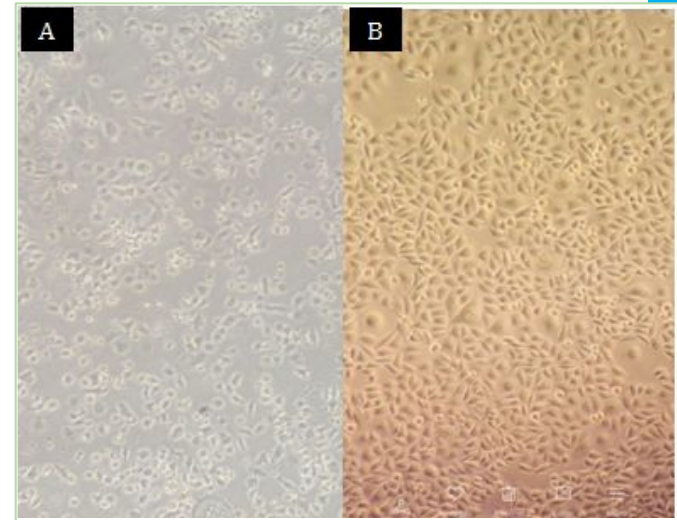
Medio de cultivo DMED

Glucosa

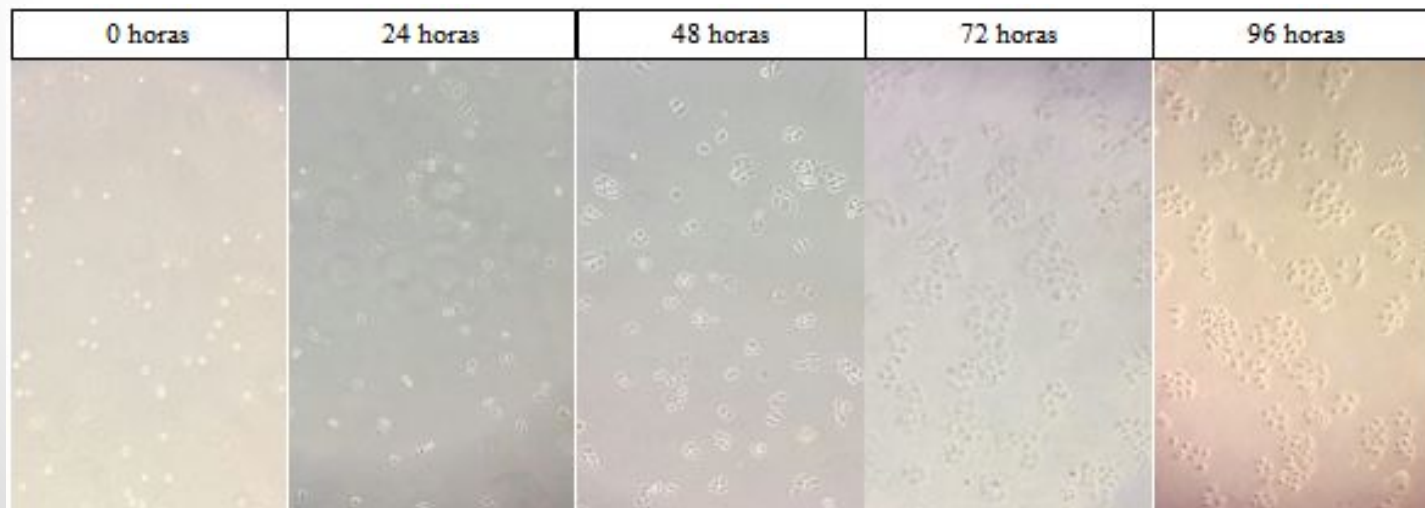
Calcio

SFB

Aminoácidos



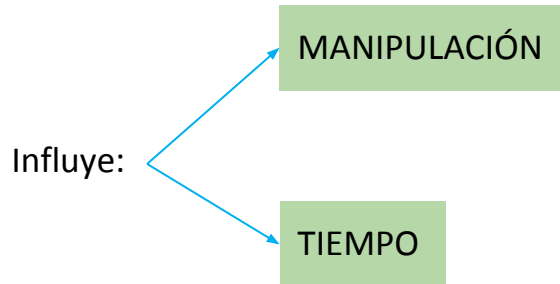
A. Células SiHa, B. Células HeLa



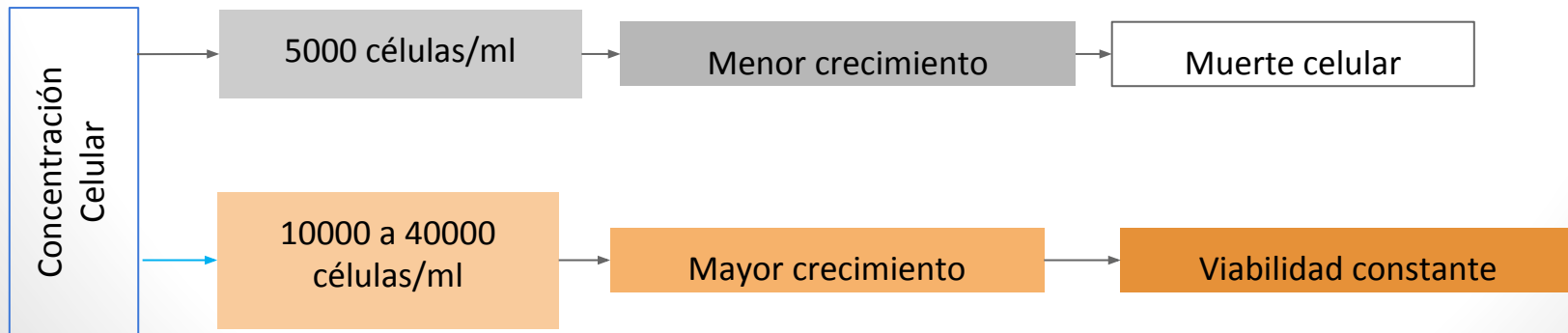
Mayor confluencia a las 96 horas de incubación.

Resultados y Discusión

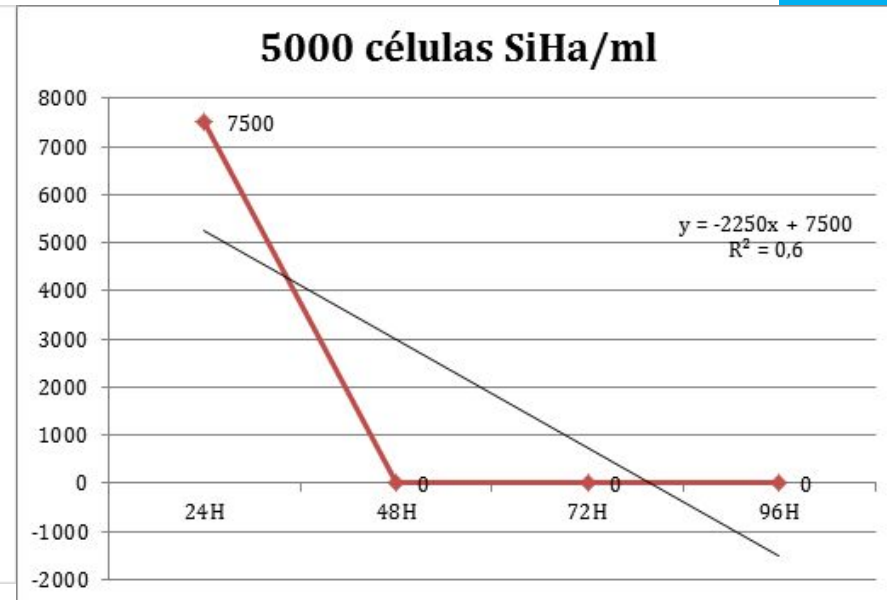
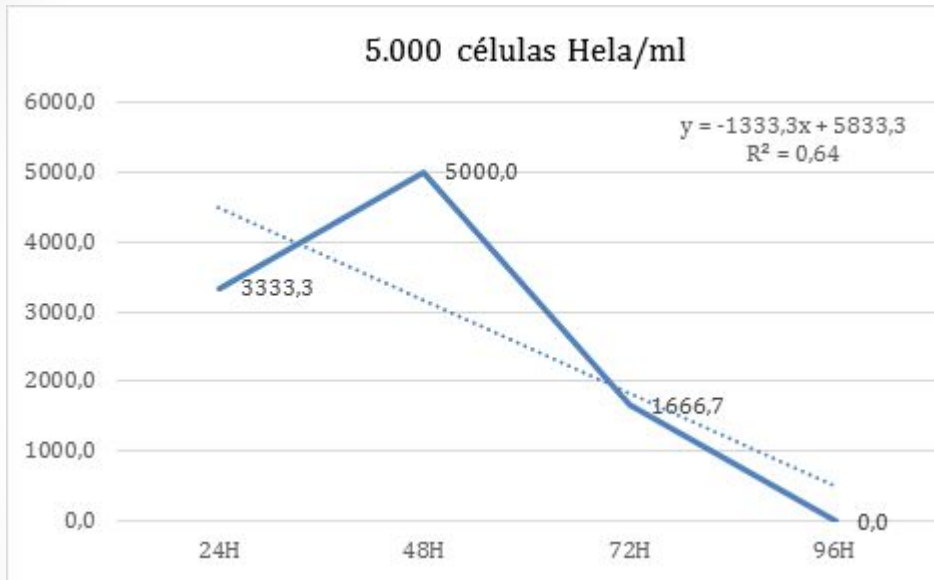
Marcador predictivo del comportamiento y funciones de un tejido tumoral *in vitro*



Dilución	Células HeLa				Células SiHa			
	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas
20ul	3333,3	5000	1666,7	0	7500	0	0	0
40ul	5000	8333,3	11666,7	11666,7	11000	10000	7500	7500
60ul	6666,7	11666,7	15000	30000	25000	17500	25000	7500
80ul	10000	13333,3	28333,3	36666,7	32000	25000	17500	5000
100ul	15000	20000	60000	56666,7	32500	25000	22500	20400
120ul	36666,7	51666,7	108333,3	175000	42500	32500	32500	17500
140ul	38333,3	83333,3	183333,3	365000	58500	40000	45000	27500
160ul	43333,3	138333,3	156666,7	198333,3	61000	40000	52500	25000



Concentración de 5000 células/ml de HeLa y SiHa

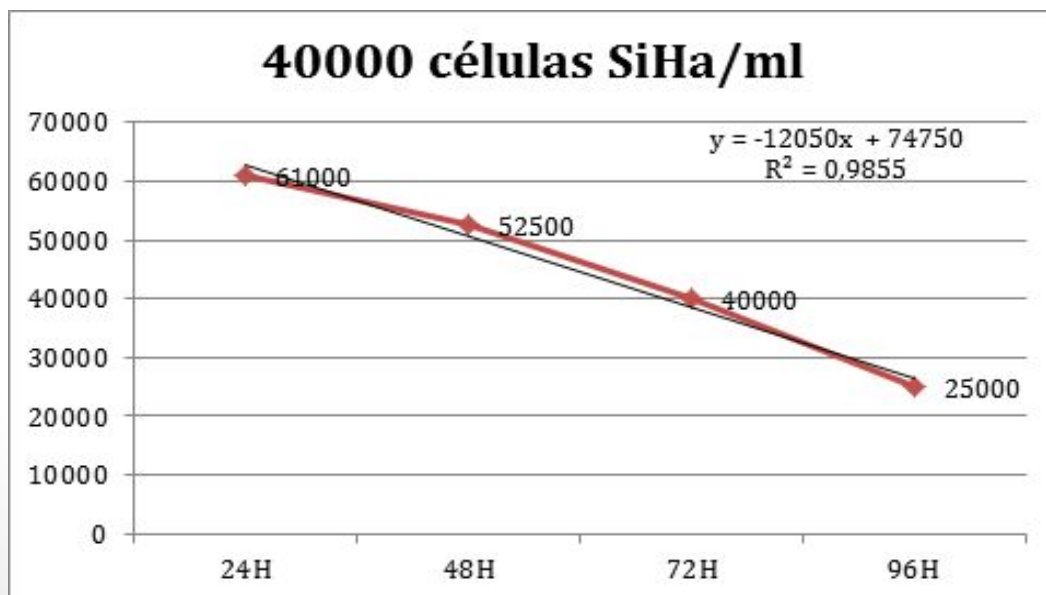
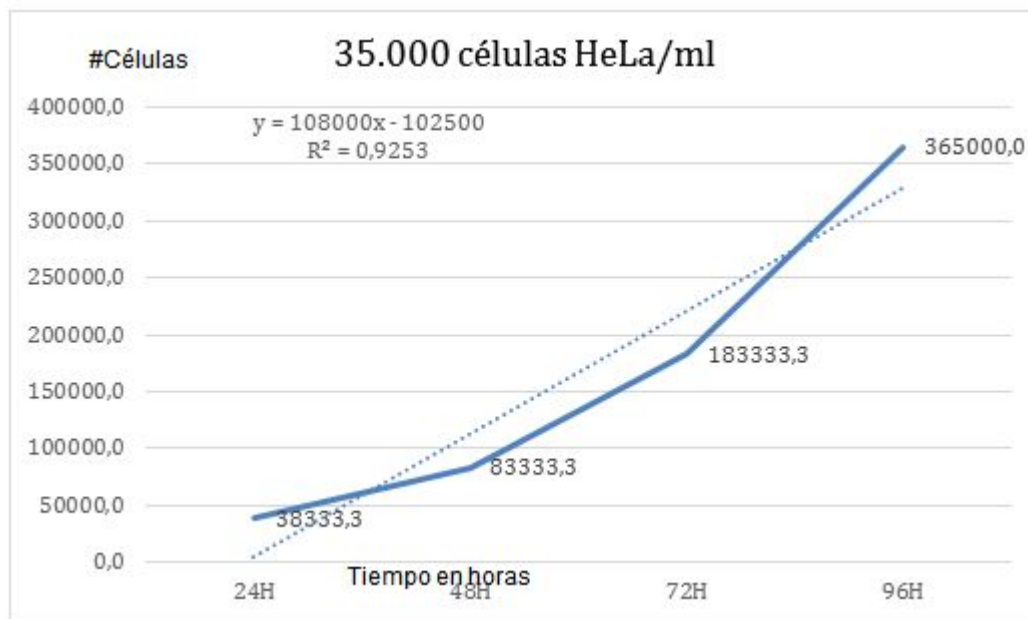


Células muy dispersas

Impide el contacto entre célula a célula

Vías de señalización necesarias para las funciones celulares

Se obtuvo mayor crecimiento en células HeLa que SiHa



Mayor recuento en la línea celular HeLa con 365000 células/ml a las 96 horas

CONCLUSIÓN

1. En este trabajo se identificó la presencia de cristales de la cepa *Bt neoleonensis*, además se purificó cristales los cuales fueron cuantificados obteniéndose **22.74 ug/mL**. Además se encontró que la cepa es sensible a tetraciclina y gentamicina.

2. Se cultivaron las líneas celulares HeLa y SiHa, encontrándose que las células HeLa tuvieron mayor capacidad de supervivencia porque a partir de 1×10^6 células/mL se obtuvo una confluencia de aproximadamente 90% a los 4 días del ensayo.

3. En las pruebas de viabilidad se encontró recuentos de **365000 células/mL** en la línea HeLa a partir de una dilución inicial de **35000 células/mL a las 96 horas**.

4. Este trabajo implementa las metodologías básicas para evaluación biológica de *Bt neoleonensis* en cultivos celulares asociados a cáncer, que puede ser utilizado para otras cepas de Bt de potencial anticancerígeno.

Gracias por la atención
prestada

Referencias

Portela-Dussán DD, Chaparro-Giraldo A, López-Pazos SA. La biotecnología de *Bacillus thuringiensis*. 2013 Dec: p. 87-95.

Rodrigo Padilla C, Galán-Wong L, Barjac Hd, Roman-Calderón E, Tames-Guerra R, Dulmage H. *Bacillus thuringiensis* Subspecies *neoleonensis* Serotype H-24, a New Subspecies Which Produces a Triangular Crystal'. JOURNAL OF INVERTEBRATE PATHOLOGY. 1990; 56(2): p. 280-282.

Mizuki E, Ohba M, Akao T, Yamashita S, Saitoh H, Park YS. Unique activity associated with non-insecticidal *Bacillus thuringiensis* parasporal inclusions: in vitro cell-killing action on human cancer cells. Journal of Applied Microbiology. 1999 Nov Fukuoka, Japon; 86: p. 477-486.

Quesada-Moraga E, García-Tóvar E, Valverde-García P, Santiago-Álvarez C. Isolation, geographical diversity and insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* from soils in Spain. Microbiological Research. Volume 159, Issue 1, 30 April 2004, Pages 59-71 Apr; 159(1): p. 59-71.