



**IMPLEMENTACIÓN DEL MODELO PARA CARACTERIZACIÓN DE**  
***Bacillus thuringiensis* serovar *neoleonensis* (T24001)**  
**EN EL CONTEXTO DE CÁNCER DE CUELLO UTERINO**

SILVIA FERNANDA CAMERO HERNANDEZ

**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD**  
**PROGRAMA BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO**  
**BOGOTÁ D.C., 2020**



**IMPLEMENTACIÓN DEL MODELO PARA CARACTERIZACIÓN DE  
*Bacillus thuringiensis* serovar *neoleonensis* (T24001)  
EN EL CONTEXTO DE CÁNCER DE CUELLO UTERINO**

**SILVIA FERNANDA CAMERO HERNANDEZ**

**SILVIO ALEJANDRO LOPEZ PAZOS. Ph.D.**

**Orientador Externo**

**SANDRA MONICA ESTUPIÑAN TORRES. M.Sc.**

**Orientadora Interna**

**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA  
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD  
PROGRAMA BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO  
BOGOTÁ D.C., 2020**



**IMPLEMENTACIÓN DEL MODELO PARA CARACTERIZACIÓN DE**  
***Bacillus thuringiensis* serovar *neoleonensis* (T24001)**  
**EN EL CONTEXTO DE CÁNCER DE CUELLO UTERINO**

**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD**  
**PROGRAMA BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO**  
**BOGOTÁ D.C., 2020**

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios por brindarme la capacidad de estudiar y cumplir mis metas, al darme fuerza para enfrentar las dificultades que se presentaban y darme ánimos para seguir adelante.

A mi madre y hermanas por su amor, trabajo y sacrificio en todos estos años, quienes me apoyaron incondicionalmente y ha estado en los momentos buenos y malos durante toda mi formación tanto personal como profesionalmente.

Al profesor Silvio Alejandro López Pazos por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio, por ayudarme y guiarme durante la realización del proyecto, por su confianza y todas sus enseñanzas, por ser un magnífico investigador y ser una gran persona

A la profesora Ana Muñoz por su gran ayuda y sus enseñanzas, al abrirme las puertas y compartir sus conocimientos sobre cultivo celular.

A la profesora Sandra Mónica Estupiñan por ser mi asesora externa, por su invaluable ayuda y conocimientos en el campo de la investigación.

A la Universidad colegio Mayor de Cundinamarca por guiarme y formarme como profesional con ética y valores. Además de darme la oportunidad de cumplir mis metas y alcanzar mis sueños.

A la Universidad Antonio Nariño, lugar que se utilizó como sitio de estudio de esta investigación, la cual me abrió sus puertas a disposición durante el desarrollo de este proyecto.

A mis amigos quienes me apoyaron durante mi proyecto en las situaciones buenas y malas que se presentaron durante la realización de este proyecto.

## Tabla de Contenido

<b>1. INTRODUCCION</b> .....	11
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	15
<b>2.1. General</b> .....	15
<b>2.2. Específicos</b> .....	15
<b>3. ANTECEDENTES</b> .....	16
<b>4. MARCO TEORICO</b> .....	19
<b>4.1. <i>Bacillus thuringiensis</i></b> .....	19
<b>4.2. Proteínas Cry</b> .....	20
<b>4.3. Mecanismos de acción de las proteínas Cry</b> .....	21
<b>4.4. Toxinas formadoras de poros (MFP)</b> .....	21
<b>4.5. Transducción de Señal</b> .....	22
<b>4.6. Parasporinas</b> .....	23
<b>4.7. Estructura de las Parasporinas</b> .....	23
<b>4.8. Mecanismos de acción parasporinas</b> .....	25
<b>4.9. Cáncer CU</b> .....	26
<b>4.10. Síntomas y signos</b> .....	29
<b>4.11. Diagnóstico</b> .....	29
<b>4.12. Tratamiento</b> .....	31
<b>4.13. Prevención</b> .....	32
<b>4.14. Vacuna contra VPH</b> .....	32
<b>4.15. CCU en Colombia</b> .....	33
<b>4.16. Cultivo celular</b> .....	33
<b>5. Metodología</b> .....	35
<b>5.1. Tipo de investigación</b> .....	35
<b>5.2. Universo, población y muestra</b> .....	35
<b>5.3. Variables e indicadores</b> .....	35

5.4. Técnicas y procedimientos .....	35
6. Resultados.....	39
6.1. Caracterización microscópica y bioquímica de la cepa <i>Bacillus thuringiensis neoleonensis</i> .....	39
6.2. Cuantificación de Proteínas por el Método de Bradford.....	41
6.3. Prueba de sensibilidad con Gentamicina, Ampicilina y Tetraciclina.....	42
6.4. Implementación de cultivo de células de CCU. ....	43
6.5. Viabilidad Celular .....	44
7. Discusión.....	46
8. Conclusiones.....	51
Referencias.....	51



## **IMPLEMENTACIÓN DEL MODELO PARA CARACTERIZACIÓN DE *Bacillus thuringiensis* serovar *neoleonensis* (T24001) EN EL CONTEXTO DE CÁNCER DE CUELLO UTERINO**

### **RESUMEN**

Varias cepas de la bacteria entomopatógena *Bacillus thuringiensis* han sido descritas con actividad citotóxica sobre células cancerosas en cultivo *in vitro*, incluyendo líneas HeLa, MOLT-4, y Jurkat entre otras. Esta actividad se ha asociado a una clase de proteínas denominadas parasporinas (PS), las cuales pertenecen al grupo de proteínas insecticidas Cry. Estas PS generan apoptosis en células cancerígenas. En este proyecto se implementó un modelo *in vitro* para cultivo de células de cáncer de cuello uterino, junto con la caracterización de la cepa *B. thuringiensis* serovar *neoleonensis* (T24001), que tiene actividad citotóxica contra la línea tumoral de células T de leucemia (MOLT-4). Con esto en mente, la cepa de trabajo se caracterizó por microscopia de luz y de contraste de fases, se le realizó prueba de sensibilidad a antibióticos (ampicilina, tetraciclina y gentamicina), y finalmente se extrajo purificó cristales parasporales de *B. thuringiensis* serovar *neoleonensis* (T24001), los cuales se cuantificaron mediante el método de Bradford, luego se determinó presencia de las proteínas correspondientes en electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), y poder visualizar la presencia de posibles PS. Para el cultivo de células de cáncer de cuello uterino se usaron las líneas HeLa y SiHa provenientes de tejido tumoral de cáncer de cuello uterino, con el fin de obtener un modelo estable, constante y reproducible, donde se utilizaron viales que contenían las células en medio de congelación (suero fetal bovino + dimetil sulfuro), las cuales se cultivaron en medio DMEM-High y se incubaron a 37°C en atmosfera de CO<sub>2</sub>. Estas células se observaron desde las 24 horas con microscopio invertido para determinar confluencia celular de 90%, óptima para ensayos de viabilidad celular mediante el ensayo Tripán Blue, encontrando que las células HeLa son más resistentes a la manipulación que las células SiHa, al utilizar concentraciones celulares conocidas desde 5000 células/ml hasta 40000 células/ml en pruebas de cuatro días, que sean útiles para futuros ensayos de

citotoxicidad. Este trabajo aporta al área de determinación de PS como posible agente anticancerígeno gracias a su actividad específica contra células tumorales, y su inocuidad hacia células de tejidos sanas.

**Palabras clave:** *Bacillus thuringiensis neoleonensis*, parasporina, línea celular HeLa, línea celular SIHA, antibiótico.

**Estudiante:** Silvia Fernanda Camero Hernández

**Docentes:** Sandra Mónica Estupiñan Torres(Asesor interno), Silvio Alejandro López Pazos(Asesor externo)

**Institución:** Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca

**Fecha:** 28 de Febrero 2020



## 1. INTRODUCCION

El cáncer de cuello uterino (CCU) es el segundo tipo de cáncer más letal en mujeres de entre los 30 y 59 años de edad en todo el mundo, es más grave en países con escasos recursos, con una frecuencia de 10% del total de casos de cáncer reportados, seguido del cáncer de mama (1). En Colombia, diariamente se diagnostican 12 mujeres como positivas para CCU, y 5 mueren por este tipo de cáncer. Para el año 2016, el número de casos reportados fueron de 425, en el año 2017 el número había aumentado a 1753 casos, y en 2018 se llegó a reportar 2311 casos confirmados. De estos casos, el 70% corresponden al regímenes subsidiado-contributivo, 2.2% en regímenes especiales, y 3% de casos que no han sido reportados, entre ellos las personas que no reportan su caso, y personas no afiliadas a una entidad de salud (2).

El CCU es una enfermedad en donde las células de la mucosa que recubre el cérvix, y que está en continuidad con la vagina, se vuelven malignas y comienzan a crecer de forma anómala y descontrolada (3) (2). Esta enfermedad es de progresión lenta y de fácil diagnóstico, sin embargo existen factores que pueden exponer a la mujer a padecer de este tipo de enfermedad, como lo es el iniciar la vida sexual a una edad temprana, tener su primer parto antes de los 18 años, el uso de anticonceptivos orales, la multiparidad, una mala alimentación, o presentar infecciones crónicas por diferentes agentes, entre ellos el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y la bacteria *Chlamydia trachomatis* (1).

La causa principal, según datos epidemiológicos, para el 80% de las mujeres que desarrollan CCU es la infección por el virus del papiloma humano (VPH) (4). Aunque la mayoría de las exposiciones al VPH resultan sin manifestaciones clínicas, una pequeña fracción de casos se convierte en portadores del virus, que finalmente progresará a pre-cáncer y cáncer (5). Hasta el momento se ha descubierto 100 tipos de VPH, pero solo 23 pueden desencadenar el desarrollo de cáncer, en especial los tipo 16 y 18 los cuales se presentan con una mayor frecuencia en la población, con 70% de casos reportados, seguido de otros tipos de VPH poco frecuentes como el 45, 33, 31, 52, 58 y 35 que representan el 20% de casos donde se desencadenó el desarrollo de CCU (5).

Otra de las causas por las que se puede desarrollar este tipo de cáncer es la alteración de genes que estén involucrados en el ciclo celular, como los proto-oncogenes, genes supresores de tumores, genes reparadores de ADN y la telomerasa (6). Los proto-oncogenes son genes promotores de crecimiento normal, encargados de acelerar la proliferación celular,

y cuando estos presentan mutaciones que genera sobreexpresión, contribuyen a que la célula normal se convierta en cancerosa. Los genes supresores de tumores también controlan el crecimiento y la división celular, y su alteración podría causar la división sin control en la célula. Los genes reparadores de ADN, como su nombre lo indica son los encargados de mantener la doble hélice de ADN de una célula en buen estado, y si se genera mutaciones en este gen, puede causar mutaciones adicionales que hagan que las células se vuelvan cancerosas, y por último se tiene a la telomerasa, una enzima que tiene por una parte funcionalidad de una transcriptasa inversa y una plantilla de ARN, la cual previene el acortamiento crítico de los extremos de los telómeros. La sobreexpresión de esta enzima puede evitar la inducción de senescencia y apoptosis celular, al añadir más repeticiones TTAGGG en los extremos 3' de los cromosomas, por lo que se considera que es un paso decisivo en la evolución de casi todos los tipos de cáncer (7) (8) (9). Por otra parte, la disminución de la longitud de los telómeros, mediada por leucocitos, es una medida de acortamiento de la vida de las células con cáncer, y por ende se reduce su replicación que conlleva al desarrollo del tumor y posteriormente la muerte (7).

El CCU tiene como tratamientos actualmente la radioterapia, cirugías y la quimioterapia. No obstante, esta enfermedad se puede prevenir con la aplicación de la vacuna tetravalente contra el VPH a mujeres a partir de los 10 años de edad, que consiste en una vacuna recombinante que se prepara a partir de proteínas estructurales L1 purificadas, que se unen entre sí para formar cubiertas vacías de un tipo específico de VPH, o partículas similares a virus (VLPs), que protege contra los tipos 16, 18, 6 y 11, los cuales se presentan más frecuentemente en la población (10). Por otra parte, la vacuna recombinante bivalente contra el VPH, está compuesta de VLPs de VPH 16 y 18, y formuladas con un adyuvante AsO<sub>4</sub>, que contiene una combinación de hidróxido de aluminio y un inmunoestimulante MPL (3-*o*-desacil-4'-monofosfotil lípido A), que está aprobado para hombres y mujeres de 9 a 26 años de edad, y es utilizada para prevenir el cáncer de ano, CCU y vagina causado por los tipos de VPH 16 y 18 (11). Otra forma de prevenir el CCU es realizando la citología vaginal, para las mujeres en edad fértil a partir de los 21 años de edad, así no hayan comenzado su vida sexual, sirve para detectar anomalías morfológicas de las células exfoliadas de la unión escamo-columnar del cuello uterino (12).

En Colombia, la tasa de mortalidad por CCU ha disminuido constantemente en los últimos 34 años, dado que para el año 1985 se reportó una tasa de mortalidad de 13,8 por cada 100.000 mujeres, siendo uno de los países, junto con Costa Rica y Chile, con más proporción de muertes por CCU en ese entonces, y para el 2009 la tasa fue de 8 por 100.000

(13). En Bogotá, se realizó un análisis de los casos de incidencia y mortalidad de VPH asociados a CCU, encontrando que para la prevalencia de VPH en lesiones de alto grado y cáncer estaban entre 70 y 90%, y la frecuencia de VPH 16 y 18 estaban entre 52 y 64%, con baja frecuencia en mujeres antes de los 25 años, y aumentaba en mujeres de 45 a 54 años, con descenso a los 75 años de edad (14). Se ha adoptado un esquema de vacunación del Ministerio de Salud y Protección Social en Colombia, y el programa ampliado de inmunización (PAI), con la aplicación de la vacuna tetravalente desde agosto del 2012, sin embargo en zonas rurales dispersas donde se observa condiciones socioeconómicas desfavorables, hay un mayor riesgo de mortalidad dado que su acceso a los servicios de salud es muy limitado, y muchos de los habitantes desconocen de esta enfermedad y cómo prevenirla a tiempo (15).

*Bacillus thuringiensis (Bt)* es una bacteria Gram positiva en forma de bastón de tamaño 1 a 1.2 um de ancho y 3 a 5 um de largo, presenta dos fases principales: la forma vegetativa donde la bacteria crece, y la fase de esporulación formadora de esporas. Se ha encontrado en diferentes ambientes naturales como bosques tropicales y templados, zonas desérticas, sabanas, archipiélagos, frutales, suelos agrícolas, arena y cuevas en los cinco continentes (16). Se descubrió que esta bacteria tiene la capacidad de producir cuerpos de inclusión o "Restkörper" junto a la endospora, y no fue hasta 25 años después que se estudió su capacidad insecticida, a los cuales denominaron "cristal parasporal" (17). Estos cristales proteicos están formados por endotoxinas llamadas Cry (proteínas de cristal) y Cyt (proteínas citolíticas). Las proteínas Cry son el factor de virulencia de *Bt*, ya que una vez larvas de insectos las ingieren, estas proteínas en el intestino del insecto son degradadas a fragmentos altamente tóxicos, debido a las proteasas presentes, y luego se unen como oligómeros, específicamente a los receptores de las membranas de las células epiteliales, causándoles la apertura de poros y dañando la permeabilidad de la membrana celular que permite el intercambio de elementos citoplasmáticos y estomacales terminando en lisis, que como consecuencia resulta en la parálisis del intestino, diarrea, parálisis total y finalmente la muerte (18). Estos cristales tienen efecto insecticida contra los órdenes Lepidóptera, Díptera, Coleóptera, Himenóptera, Homóptera, Ortóptera y Malófaga (16). Dado su toxicidad específica con insectos, y no con organismos vertebrados, las proteínas Cry se han utilizado para desarrollo de plaguicidas en todo el mundo, y se han incorporado a los cultivos transgénicos para el control de plagas. También se ha descubierto que estas proteínas tienen efecto tóxico sobre los parásitos protozoarios como *Trichomonas vaginalis* (19). Sin embargo, algunas cepas de *Bt* producen otro tipo de proteínas no insecticidas, pero que

cristalizan en inclusiones parasporales de forma irregular, llamadas parasporinas (PS) (17). Las PS son un grupo de proteínas cristalinas que no poseen actividad insecticida, pero sí actividad anticancerígena *in vitro* potencial y específica (20). Las PS estudiadas incluyen 18 tipos agrupadas en las clases PS1, PS2, PS3, PS4, PS5 y PS6, que han presentado efecto citotóxico con líneas celulares diferentes, se encuentran como protoxinas y para ser tóxicas primero deben ser solubilizadas a pH alcalino o ácido, y posteriormente ser digeridas por serín-proteasas, como la proteinasa K o la tripsina (21).

La cepa *Bt neoleonensis* T24001, presenta proteínas Cry con baja actividad insecticida contra *Nematodirus spathiger* puesto que produce la proteína Cry6, a diferencia de la cepa *Bt kurstaki* HD-1, que obtuvo mayor porcentaje de mortalidad sobre las larvas, una de las proteínas que causa muerte a nematodos (22). En suelos mexicanos se encontró una cepa de *Bt. neoleonensis* con antígeno flagelar H-24, se realizó estudios bioquímicos de esta bacteria y se observó que posee propiedades similares, a excepción de que no toma la galactosa como fuente de carbono y no hace hemólisis en sangre. Además, produce acetil-meticarbanol, letinasa, hidroliza la arginina, y sintetiza enzimas que degradan celulosa, sacarosa, salicina y esculina. Al observarse la forma de los cristales de *Bt neoleonensis serovar* H-24 se encontró una particular forma de triángulo en estos, que no presentaron actividad insecticida contra seis especies de insectos (23). Mizuki y colaboradores estudiaron la actividad anticancerígena de varias cepas de *Bt* entre ellas serovar *neoleonensis*, encontrando que no presentaba actividad hemolítica ni insecticida, pero sí actividad contra células T de leucemia (MOLT-4) (24). Las proteínas Cry de actividad no insecticida, son producidas por más del 90 % de la población de bacilos aislados de los suelos y los filoplano, afirmando que este bacilo no es un patógeno obligado, y sí un saprofito ambiental (25). Por lo tanto, la investigación de si estas proteínas tienen alguna actividad biológica distinta a la toxicidad por insectos se ha vuelto un objetivo en cancerología, dado que se trata de un nuevo ítem de investigación en cáncer para encontrar mejores tratamientos altamente específicos.

La línea celular de cáncer de cuello uterino (HeLa), fueron extraídas de un tumor maligno que presentaba Henrietta Lacks por el médico George Gey. Esta línea celular es considerada como la primera línea celular inmortal en ser cultivada (26). Se han realizado grandes avances de investigación en el campo de la medicina gracias a que es un modelo de experimentación fácil de trabajar, de crecimiento rápido y resistencia a la apoptosis (27).

De acuerdo a lo dicho anteriormente, surge la pregunta problema ¿es posible establecer un modelo de caracterización de la cepa de *Bt neoleonensis* (T24001) con perspectivas de evaluación en cáncer de cuello uterino? En este estudio, se caracterizará la cepa

microscópica, bioquímicamente, en susceptibilidad a antibióticos, posible síntesis de PS, y establecimiento del cultivo de células HeLa para que puedan ser usadas en pruebas de citotoxicidad (21).

## **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*
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*.

## 1. ANTECEDENTES

En 1901, el científico japonés Shigetane Ishiwata reporto el aislamiento de un bacilo que causaba la muerte de las larvas del gusano de seda *Bombyx mori*, las cuales presentaban un síndrome grave que provocaba su colapso y muerte repentinamente, llamado “enfermedad de sotto”, así que Ishiwata lo nombro *Bacillus sotto* (28) (29). En 1911, el alemán Berliner aisló una bacteria similar a ésta a partir de larvas enfermas de la palomilla de la flor del mediterráneo *Ephestia kuehniella*, y en 1915 la denominó Bt; la describe como un bacilo esporulado, Gram-positivo con flagelos peritricos, él observó que después de terminar su crecimiento vegetativo el bacilo desarrolla además de la espora una inclusión parasporal a la cual designó como "restkorper" o cuerpo de desecho, sugiriendo que estaba formado de material celular que no se requiere para la formación de la espora; también describió que este cuerpo de desecho inicialmente era esférico incrementándose en tamaño hasta llegar a tener una forma romboidal. Esta bacteria y sus inclusiones parasporales compuestas de proteínas Cry han sido la base del desarrollo de biopesticidas y plantas transgénicas para control de plagas en la agricultura comercial por más de 100 años (29).

En 1999, Mizuki y colaboradores estudiaron las proteínas de inclusiones parasporales, aisladas de 1744 cepas de *Bt* que no son hemolíticas, pero que tienen actividad citotóxica sobre células cancerosas humanas. De las 60 cepas que tuvieron actividad hemolítica solo 16 presentaron citotoxicidad significativa contra las células leucémicas de forma selectiva, ya que presento baja o nula actividad citotóxica contra células normales, y se demostró que el tamaño de las inclusiones parasporicas varió notablemente dependiendo de las cepas (28). De estos estudios se observó que la cepa de *Bt* 89-T-34-22 (más tarde designado A1190), produjo proteínas no hemolíticas, pero con actividad citotóxica contra células T de leucemia humana (MOLT-4), pero no con las inclusiones de la cepa *Bt shandongiensis* (30). Las inclusiones parasporales de la cepa de *Bt* designada 89-T-26-17 y la cepa designada 89-T-26-17, las cuales fueron digeridas con proteinasa K, tripsina y quimiotripsina, presentaron citotoxicidad contra células T de leucemia humana, y con células de cáncer de cuello uterino (HeLa), pero no mostro citotoxicidad con células T normales (31). Kim y colaboradores, caracterizaron la citotoxicidad *in vitro* de las proteínas de inclusión parasporal de Bt 90-F-45-14 serovar *dakota* (H15) contra células humanas, las cuales presentaron actividad citocida moderada contra células de cáncer de cuello uterino (HeLa), y con las células T leucémicas humanas fue ocho veces mayor (32).

En 2006, Saioh y colaboradores, describieron la actividad de la PS-4, que tiene preferencia por células T leucémicas humanas. El gen que codifica la PS-4 se clonó a partir de un aislado de *Bt* serovar *shandongiensis*, y se expresó en una cepa recombinante de *Escherichia coli* BL21 (DE3), que formo cuerpos de inclusión intracelular. Al ser solubilizada y activada con proteinasa K mostró fuerte actividad citotóxica contra células T leucémicas humanas, pero no presento los mismos efectos sobre células HeLa (33).

Kitada y colaboradores, en el año 2006, describieron la actividad citotóxica de la PS-2 contra gran variedad de células humanas cultivadas, entre ellas las células cancerosas de hepatocitos humanos (células HepG2). Esta PS-2 se une específicamente a la membrana plasmática del hepatocito, alterando significativamente la morfología del citoesqueleto y del orgánulo, causando un deterioro de forma irreversible, y dejando a las células normales sin afección alguna, lo cual indica que posee una citotoxicidad altamente selectiva para reconocer y matar algunas clases de células cancerosas, sin embargo su mecanismo exacto para inducir la muerte células son desconocidos (19).

Para el 2007, se realizó la caracterización de una nueva cepa de *Bt* denominada M15, aislada de arañas muertas en un huerto de manzanas en Quebec, Canadá, la cual expresa una proteína cristalina Cry31Aa2 que posee actividad única contra células cancerosas humanas, pero no posee actividad insecticida. El tratamiento con quimi tripsina y con proteinasa K no produjo proteínas citotóxicas, pero si lo hizo la tripsina. La acción de la proteína Cry31Aa2 es citocida para algunas células cancerosas humanas de diferentes tejidos, pero no para células normales del mismo tejido, lo que indica que existe un receptor específico de estas toxinas, dado que las células cancerosas están menos diferenciadas que las células normales originales del tejido. Para esto es necesario realizar estudios para determinar si la actividad de la caspasa en la apoptosis está involucrada o no en el mecanismo citocida de la PS sobre las células cancerosas humanas (34).

En 2008, Nadarajah y colaboradores demostraron la potencia y especificidad de las inclusiones parasporales de los aislamientos de *Bt* mosquitocidas (no hemolítico) contra las líneas celulares leucémica (CEM-SS) y HeLa. El modo de muerte inicial se mostró inicialmente apoptótico. Estas proteínas mostraron similitud con Cry24Aa y Cry25Aa de *Bt* serovar *jegathesan*, y Cry15Aa de *Bt* serovar *israelensis* (35).

En 2018 se realizó un estudio en Irán, el cual consistía en el aislamiento, identificación molecular y la identificación de nuevas cepas de *Bt* que fuesen capaces de producir proteínas capaces de destruir células cancerígenas, de las cuales solo tres biotipos de *Bt*: *thuringiensis*, *kurstaki* y *sotto*, que al ser activadas con proteinasa K fueron capaces de generar diferentes

grados de citotoxicidad sobre las líneas celulares células humanas de cáncer de colon (HCT-116) y línea celular linfoblastoide T(CCRF-CEM), al mostrar inflamación celular y formación de ampollas en la superficie o daño en el citoesqueleto de la célula. Se descubrió que en suelos de climas húmedos y templados como los que posee Irán, son un buen reservorio para encontrar cepas de *Bt* con producción de PS (36).

Se aisló de la región de Ghats Occidental (2018), en India, 25 cepas de *Bt* que albergan genes codificantes de PS, a lo que la cepa KAU 41 (aislado de Kerala Agriculture University 41) contenía cristales homogéneos no hemolíticos que mostraban una citotoxicidad específica hacia las células cancerosas. Tras ser tratada con proteasas se generó unos péptidos activos de 29 kDa, que exhibió un aspecto citotóxico dependiendo de su concentración sobre células cancerosas, mostrando características de apoptosis. Se demostró la activación de la vía intrínseca debido a que se sobreexpresaba la proteína APAF1 (factor de activación de la proteasa apoptótica 1), caspasa 3 y 9 a 14.9, 8 y 7.4 veces respectivamente. A concentraciones mayores a 3g/ml se generó la muerte total de las células. Los resultados sugieren que estas proteínas pueden ser utilizadas en el tratamiento de células tumorales cancerígenas dado su alto potencial terapéutico (37).

El objetivo de un estudio realizado en 2019 en Arabia Saudita por el científico Aboul-Soud y colaboradores, fue analizar las toxinas parasporales derivadas de *Bt* para determinar sus actividades citotóxicas contra las líneas celulares cancerosas de colon (HT-29) y cervical (HeLa). Las proteínas parasporales solubilizadas y tripsinizadas de todas las cepas de *Bt* mostraron una citotoxicidad marcada y dependiente de la dosis contra las células cancerosas HeLa pero no contra las células HT-29. La citotoxicidad observada de las proteínas parasporales contra las células HeLa fue específica, ya que no fue evidente contra las células normales del músculo liso del útero. El análisis RT-qPCR reveló la sobreexpresión de caspasa 3 y caspasa 9 a 3.7 y 4.2 veces respectivamente, indicativo del compromiso de la vía intrínseca de la apoptosis (38). Desde que se descubrió *Bt* y su capacidad para producir proteínas que inducen efecto tóxico en líneas celulares cancerígenas, se ha propuesto como principal objetivo en las áreas de investigación relacionadas, la búsqueda de nuevas alternativas de medicamentos capaces de curar el cáncer, sin embargo, todavía falta por conocer varios aspectos de su mecanismo de acción (38).



## 2. MARCO TEORICO

### 2.1. *Bacillus thuringiensis*

Esta bacteria fue aislada por primera vez por el profesor Shigetane Ishiwata a mediados del siglo XX del gusano de seda *Bombyx mori* con el fin de buscar la causa de su enfermedad y muerte. *Bt* es un bacilo Gram positivo, aerobio, móvil con flagelos peritricos, se observa al microscopio como un bacilo grande, recto o curvo, de bordes redondos, de aproximadamente 2 a 5  $\mu\text{m}$  de largo y 1.0  $\mu\text{m}$  de ancho (17). Este microorganismo se puede hallar en diferentes lugares del mundo como desiertos, alimento para animales y hojas de plantas (39). Su aislamiento requiere de un tratamiento térmico para seleccionar esporas, con una etapa de enriquecimiento de acetato, y la selección de antibióticos que permitan aislar la bacteria de interés. Su antígeno flagelar H genera una gran diversidad de reacciones de aglutinación, por lo cual, se ha utilizado para diferenciar la gran variedad de cepas de *Bt* (40).

*Bt* se caracteriza de las otras especies de *Bacillus* por su capacidad de producir inclusiones parasporales durante su fase de esporulación. Estas fases se pueden clasificar en cuatro según el patrón de expresión de sus genes. La primera fase abarca la germinación de las esporas cuando estas se encuentran en un ambiente con nutrientes, aquí la bacteria se adapta a su entorno y expresa sus proteínas para poder metabolizarlos., Luego sigue la fase exponencial, en esta fase la bacteria se reproducirá junto con la producción de exotoxinas conocidas como las proteínas Vip, y estas se dividen en tres grupos Vip1, Vip2 y Vip3 que son letales para los insectos (41). La tercera etapa tiene que ver con la bacteria encontrándose en un ambiente escaso de nutrientes (fase estacionaria). Esta se ve obligada a producir las esporas y junto con estos las inclusiones parasporales, que son delta-endotoxinas, las cuales les da la característica entomopatogénica a la bacteria. Por último la cuarta fase, una vez estén las esporas y los cristales parasporales estos son liberados durante la lisis celular y con ello finalmente la muerte de la bacteria (39).

Además de las proteínas Cry y las proteínas Vip, *Bt* utiliza otros factores de virulencia para poder infectar a su huésped, entre ellos están las enterotoxinas, hemolisinas, fosfolipasas, proteasas, enzimas de degradación, así como las PS descritas recientemente (42). Pero esta bacteria puede vivir en un ambiente saprófito sin ser un patógeno obligado de insectos (43). Meadows propone la hipótesis de que *Bt* puede encontrarse en un medio ambiente como entomopatógeno, como habitante de filoplano y como microorganismo del suelo (40).

*Bt* es una bacteria de interés en el campo de investigación dado su capacidad para producir proteínas que se ha comprobado son tóxicos para gran variedad de insectos del orden Lepidóptera, Díptera, Coleóptera, Malófaga, y Ortóptera (16). Estas proteínas son utilizadas para crear insecticidas que son utilizados en la agricultura para combatir plagas y controlar vectores como los mosquitos portadores de malaria y de enfermedades virales como el dengue y fiebre del Nilo Occidental, y por su origen biológico estos insecticidas son amigables con el medioambiente, además de que su letalidad es específica para invertebrados y no contra mamíferos. Los genes que codifican estas proteínas, o “genes *cry*” pueden ser utilizados en el campo de la ingeniería genética para ser introducidos en otros organismos como plantas, con el fin de conseguir cultivos resistentes a ciertos tipos de plagas y pueda ser más productivo (44). Dado su gran interés por la producción de nuevos insecticidas, hasta la fecha se han aislado cerca de 69 subespecies clasificadas de acuerdo a su serotipo H de antígeno flagelar, y 82 variedades serológicas (29).

## **2.2. Proteínas Cry**

Las toxinas Cry son proteínas producidas durante la esporulación de *Bt*, siendo aproximadamente el 20% a 30% de peso seco de la bacteria, cuando va a ser liberado durante la lisis celular. Estas proteínas son de gran importancia debido a su capacidad tóxica y específica contra invertebrados (45). Aunque se conoce el efecto de estas proteínas desde hace mucho tiempo, la descripción de su mecanismo de acción es reciente (42). El comité de nomenclatura de toxinas de *Bt* denominó a las proteínas Cry como delta-endotoxinas que tienen una similitud de secuencia significativa, con una o más toxinas dentro de la nomenclatura de una proteína de inclusión parasporal de *Bt* con actividad pesticida, o algún efecto tóxico experimentalmente verificable hacia un organismo susceptible (39). Así mismo, clasificaron las proteínas insecticidas de acuerdo a sus secuencias proteicas, en cuatro familias: Las proteínas Cry de tres dominios (Cry-3d) que gracias a su estructura le proporcionan la capacidad tóxica contra insectos de forma específica y eficaz, y están clasificadas por homología de aminoácidos en más de 70 familias con más de 700 tipos diferentes, la familia ETX/MTX, toxinas parecidas a las producidas por *Clostridium epsilon* (ETX) y las toxinas mosquitocidas de *Lysinibacillus sphaericus* (MTX), La familia de las toxinas Bin (binarias), las cuales en conjunto con otras proteínas generan toxicidad pero individualmente no, y la familia de las toxinas Cyt, las cuales al igual que las proteínas Cry generan toxicidad contra insectos pero estas presentan también actividad hemolítica. Recientemente, Mizuki y colaboradores, publicaron la existencia de otros cristales

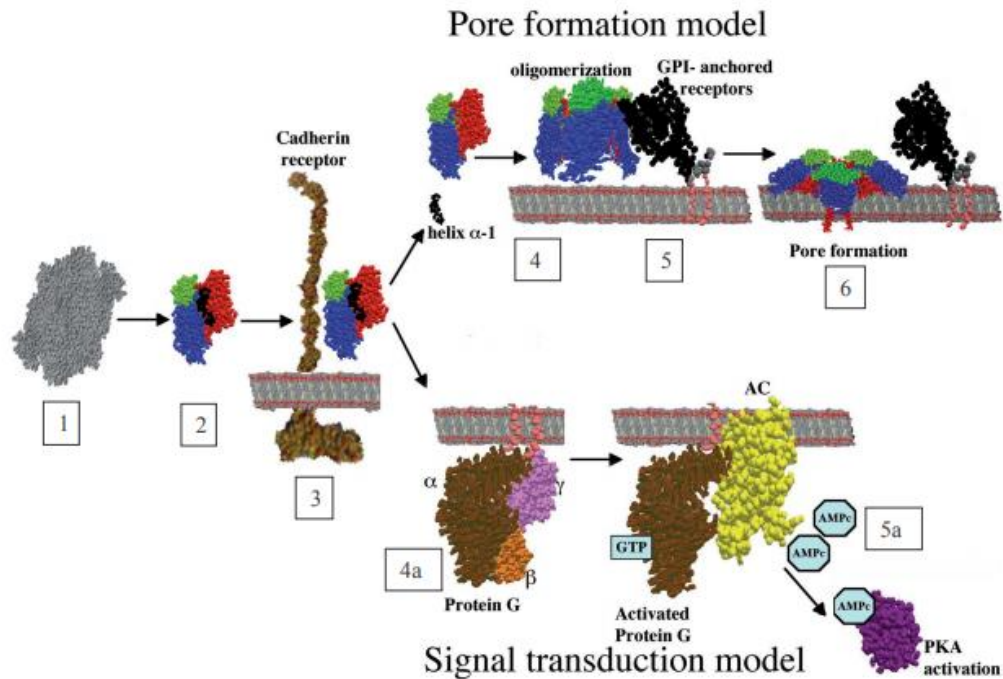
parasporales que están dentro de la familia de las toxinas Cry que no presenta una actividad insecticida ni hemolítica, pero si una actividad citotóxica contra línea de células tumorales (45). Las proteínas Vip que son producidas durante la fase vegetativa de la bacteria, también es un factor de virulencia de *Bt* contra insectos, y se han clasificado en tres grupos Vip1, Vip2 y Vip3 (45).

### **2.3.Mecanismo de acción de las proteínas Cry**

Se ha descrito en la actualidad dos formas por las cuales las toxinas Cry inducen lisis y muerte celular. Dado que su estructura y secuencias son distintas, unas proteínas generan en las células la formación de poros (MFP), que es el mecanismo de acción más frecuente entre este tipo de toxinas, y la otra un modelo de transducción de señal (MTS) (46).

### **2.4.Toxinas formadoras de poros (MFP)**

Las MFP son proteínas capaces de formar poros en la membrana de la célula con el fin de liberar sus nutrientes y generar la lisis celular. Para que genere daño celular en el huésped, el insecto debe ingerir los cristales secretados por *Bt*, los cuales una vez dentro del intestino, al encontrarse en un ambiente con pH alcalino se liberan como protoxinas, que son la forma nativa de la proteína, como se muestra en la Figura 1, estas protoxinas son activadas por serín-proteasas que cortan en lugares específicos que involucran la pérdida del extremo N-terminal de aproximadamente 25 a 30 aminoácidos, y la remoción del extremo C-terminal, generando proteínas de menor tamaño que poseen una alta afinidad con receptores presentes en las microvellosidades del intestino del organismo susceptible. Uno de estos receptores es la caderina, que se ha comprobado que al interactuar con la toxina actúa como interruptor para desencadenar oligomerización y formación del poro. Esta toxina cambia su estructura al perder el dominio 1 durante su unión al receptor (46).



**Figura 1.** Esquema del mecanismo de acción de las proteínas Cry de *Bt*. Se observa dos vías de acción que utilizan las proteínas Cry para inducir a la célula a apoptosis por mediación del receptor caderina (41).

En este proceso también participan unos receptores secundarios como las alcalinofosfatasas (ALP) y aminopeptidasas N (APN). Una vez formado el oligómero y su inserción en la membrana, permite la entrada de iones y agua que hacen que la célula pierda su permeabilidad, provocando un desequilibrio osmótico y por tanto la lisis celular (46).

## 2.5. Transducción de Señal

Otra propuesta de cómo se genera la lisis celular por proteínas Cry consiste en que una vez la toxina se ha unido a la caderina, teniendo en cuenta los pasos mencionados anteriormente, está activa proteínas G dependientes de  $Mg^{+2}$ , la cual provoca la síntesis de adenilciclase que promueve la producción de adenosinmonofosfato cíclico (AMPc) intracelular, y su alta producción activa la proteína kinasa A (PKA) la cual genera la muerte celular (ver Figura 1). Este mecanismo de acción no toma en cuenta las características de las células del huésped y no involucra receptores secundarios, o la formación de poros en la membrana plasmática (46).

## 2.6. Parasporinas

Gracias a los estudios realizados por Mizuki y colaboradores, se encontró que otras cepas de *Bt* producen toxinas diferentes que no tenían propiedades insecticidas ni hemolíticas, pero sí contra líneas tumorales humanas y animales de manera específica, que presentan baja o nula toxicidad contra células de origen de tejidos normales (21). Estas son proteínas que se producen durante la fase estacionaria de *Bt* donde hay esporulación, y son sintetizadas como protoxinas, las cuales deben ser hidrolizadas por proteasas como tripsina o proteinasa K, que corta en lugares específicos del polipéptido dividiéndole en dos o más fragmentos, que son los que generan la toxina altamente específica que atacara a la célula objetivo, que incluyen las células provenientes de tejidos tumorales al unirse a receptores específicos presentes en su membrana, que no los tiene las células normales, causándoles lisis celular al provocar la apoptosis (21). La morfología de los correspondientes cristales difieren según de la cepa de *Bt* que la produce, y pueden clasificarse en bipiramidales, cúbicos, cuadrados aplanados, esféricos, entre otras formas no tan frecuentes (21). Estos cristales parasporales se clasificaron de acuerdo a su homología y secuencias proteicas primarias parecidas a las toxinas Cry de 3 dominios, MTX y Bin. Hasta el momento solo se han clasificado y reportado de forma completa 19 PS en el Gen Bank, y se clasificaron en 6 niveles (PS1 a la PS6) por el "Committee of Parasporin Classification and Nomenclature" (45).

## 2.7. Estructura de las Parasporinas

De su estructura solo se conocen los fragmentos tóxicos de algunas PS, mediante su secuencia aminoacídica y ensayos *in vitro*. Estos fragmentos son obtenidos gracias a que las proteínas se hidrolizan con serín- proteasas como la tripsina, quimiotripsina y proteinasa K, entre otras, las cuales cortan en lugares específicos para obtener fragmentos de diferentes tamaños que resultan ser tóxicos para las células de cáncer de humano y animal (21).

La PS1Aa1 es una protoxina de 81 kDa en su forma nativa, fue la primera en ser descubierta desde la cepa de *Bt* A1190, es parecida a las proteínas Cry por su estructura en tres dominios, y su estructura química contiene cinco bloques conservados. Está proteína se hidroliza en tres fragmentos, de los cuales dos de ellos son tóxicos, uno de 15 kDa y el otro de 65 kDa, que forman un heterodímero difícil de disociar que compone el fragmento tóxico de la PS1Aa1 (47).

Las PS2 en su forma nativa como protoxina presentan un peso de 37 kDa, las cuales al ser cortadas por proteasas genera dos fragmentos tóxicos de aproximadamente 30 kDa y 26

kDa. En su grupo las principales PS2 son PS2Aa1 y PS2Aa2, producidas por las cepas *Bt* A1547 y A1470 respectivamente. No poseen ningún bloque conservado típico de las proteínas Cry, y al analizar su estructura tridimensional está conformada principalmente de bandas beta, que no se asemeja con las proteínas Cry, sino con las proteínas formadoras de poros (TFP) de tipo aerolisinas. Estas proteínas tienen actividad citocida contra líneas celulares como HepG2 y Jurkat pero poca toxicidad contra células HeLa y hepatocitos normales (21). Se conoce su estructura tridimensional gracias a un estudio realizado en el 2008, el cual mediante cristalografía de la PS2 se encontraron los tres dominios conformados por alfa hélices y beta láminas, con dimensiones de 115 x 30 x 29 Å, que todas juntas forma una horquilla beta que le da las características de la toxina aerolisina, que es formadora de poros en las membranas de la célula blanco (48).

La PS3 fue identificada en Japón por Yamashita y colaboradores, desde una cepa de *Bt* A1462. Al ser digerida por la proteinasa K, está se fragmenta en tres partes, de las cuales la fracción más grande con 64 kDa es la toxina. La secuencia de esta proteína es similar a las proteínas Cry insecticidas de *Bt*, dado que posee dominios conservados muy similares de las toxinas Cry1. Es específica contra líneas celulares como las células de leucemia mieloide (HL60) y HepG2 (células de cáncer de hígado) (49).

De las PS4 solo se ha descrito y caracterizado una proteína depositada en el GenBank del National Center for Biotechnology Information (NCBI), que corresponde a la PS4Aa1 producida por la cepa A1470. Está proteína es parecida a la toxina épsilon producida por *C. perfringens*, y su peso en su forma como protoxina es de 30 kDa, pero cuando es degradada por proteasas se genera la toxina de 27 kDa, además de que es la única proteína en ser activada en un ambiente con pH ácido. Su estructura está conformada por beta-hélices y presenta actividad contra líneas de cáncer MOLT-4 (células T humanas de leucemia), CACO-2 (cáncer humano de colon), TCS (cáncer humano de cuello uterino), células Sawano (células de cáncer endometrial) y células HL60 (células con leucemia mieloide) (21). Okumura demostró el mecanismo de acción de PS4 como beta-toxina formadora de poros, al inactivar la síntesis de colesterol en las células gracias al uso de la ciclodextrina (48).

La PS5 es una de las proteínas parasporales proveniente de la cepa *Bt tohokuensis* A1100, su masa molecular es de 33,8 kDa en su forma nativa, y 29,8 kDa al ser cortada por la proteinasa K. Es poco parecida a las proteínas Cry y toxinas aerolisinas de tipo beta-formadoras de poros, o con la toxina épsilon producida por *C. perfringens*. Fue descubierta tras presentar citotoxicidad frente a células T humanas de leucemia (MOLT-4) (21) (49), y se ha estudiado su citotoxicidad en células HeLa y TCS. Sin embargo presenta alta toxicidad en

células normales como las UtSMC, por lo que se debe realizar investigaciones que determinen la función exacta de esta proteína para futuros tratamientos contra el cáncer (45).

Las PS se relacionan entre sí por su parecido en las primeras 50 secuencias de aminoácidos, y tras ser activadas generan toxinas que forman un heterodímero responsable de la citotoxicidad de las células, sin embargo, presentan un gran parecido con las proteínas Cry insecticidas de *Bt*. Para la PS6, su parecido con las toxinas Cry2 es del 56,4%, y presenta mayor citotoxicidad contra células de cáncer de hígado (HepG2) y células de cáncer de cuello uterino (HeLa). Sin embargo de esta PS no se ha estudiado lo suficiente y por ende su mecanismo de acción y efecto citotóxico no se conoce exactamente (21).

## **2.8. Mecanismos de acción de parasporinas**

El mecanismo de acción de las PS se ha caracterizado por su afinidad hacia las células provenientes de tejidos tumorales, las cuales tiene alta especificidad gracias a receptores proteicos presentes en su membrana lipídica que, al unirse, genera la activación del proceso apoptótico en la célula y así causar su lisis y muerte. Sin embargo, dado que su estructura y dominios difieren una de otra PS, el mecanismo de acción varía entre ellas (50). Investigaciones realizadas por Katayama y colaboradores, muestran que la proteína PS1Aa1 no induce ni a la despolarización de la membrana, ni un aumento de la permeabilidad de membrana, que debe realizarse para la formación de poros. En cambio, su acción se ve reflejada al dar entrada a iones de  $Ca^{+2}$  a la célula mediante un receptor específico llamado beclina-1. Este receptor está encargado de los procesos de autofagia y apoptosis, y al ser activado por la PS1 induce al aumento de la concentración de  $Ca^{+2}$  libre intracelular en el citoplasma, y por ende activa la señal apoptótica, disminuyendo la síntesis de proteínas y ADN (51). La PS2 causa citotoxicidad a células tumorales pero no a provenientes de tejido sano, lo cual indica que se une a un receptor específico presente en la membrana lipídica, actuando como una citolisina (50), que al unirse, pasa a ser un oligómero resistente a dodecil sulfato de sodio (SDS), que induce a la permeabilidad de la membrana plasmática. Su estructura es muy similar a la proteínas formadoras de poros como las toxinas aerolisinas y toxinas épsilon producidas por *A. hydrophila* y *C. perfringens* respectivamente (52). Yuich y colaboradores recalcan la importancia de las proteínas ancladas a GPI para que las PS2 puedan actuar en la célula objetivo, su investigación consistió en la utilización de tres líneas celulares de ovario de Hámster chino CHO, la primera de tipo salvaje (CHO K1), la segunda, células 3B2A que sobreexpresa establemente dos GPI anclados, y la última la línea celular

1.46 de células mutante CHO que presentaba defecto en la síntesis de proteínas GPI. Como resultado, las células 3B2A fue la más susceptible a las diferentes concentraciones de PS2, con una diferencia de 20 veces a las células CHO K1 las cuales fueron afectadas mínimamente. Las células que presentaban un defecto en la síntesis de GPI no presentaron cambio perceptible. Se observó oligomerización de la PS2 en las células mediante SDS-PAGE e inmunofluorescencia para corroborar los resultados, puesto que la oligomerización es la prueba de la toxicidad de la PS2, y se comprobó que las células 3B2A efectivamente presentaban oligómeros formados, pero las células 1.46 no presentaron ninguna alteración, por lo que se concluye que la proteína de anclaje a GPI son de suma importancia en la citotoxicidad de la PS2 (52). Por otra parte, para PS4 se observó que es una proteína rica en láminas Beta, que compartían forma con las proteínas Cry. Esto sugiere que esta proteína también es capaz de formar poros en la membrana de las células susceptibles, al formar poros de diámetro 1 a 2 nm, pero no se parece al tipo de MFP de aerolisinas ya que es un dextrano de 70 kDa y no le permite entrar por este foro tan pequeño. Para PS4 solo se encontró la formación de oligómeros en células de cáncer de humano, y no en células provenientes de tejidos sanos, estudiando la salida de LDL citoplasmática al haber lisis celular, que aumentó en células CACO-2 y MOLT-4 cuando se administraba PS4, pero células HeLa no presentaron fuga de LDH por lo que se considera que es resistente a este tipo de PS (50).

## **2.9. Cáncer de cuello uterino**

El CCU es una enfermedad progresiva que comienza con una lesión intraepitelial de la mucosa cervical que no afecta a la membrana basal, y que evoluciona a neoplasia invasora que se diferencia por su morfología celular, características clínicas y pronóstico (53). Esto ocurre en las células del epitelio escamoso del cérvix, o cuello uterino, cuando presenta en su ciclo de vida un desorden que conlleva a su multiplicación excesiva de manera incontrolable, causando en la persona lo que se llama lesión intraepitelial o precancerosa, lo cual conlleva a múltiples enfermedades que lo acompañan y cursos clínicos muy variables. El progreso de este cáncer es muy variable de persona a persona y no tratarlo puede causar la muerte de manera inmediata (54), debido a que no toda lesión intraepitelial evoluciona a cáncer invasor, dado que este puede involucionar espontáneamente, por lo que puede persistir siempre como una lesión y su tratamiento oportuno puede ayudar a curarlo de manera definitiva. Sin embargo, el desarrollo de este cáncer depende del tiempo de persistencia y edad. A edades tempranas de alrededor de 25 años las lesiones intraepiteliales de bajo grado son más



frecuentes, mientras que las lesiones de alto grado aparecen después en edades de entre 30 años, y a edades más avanzadas (45 años en adelante) se presenta el cáncer invasor (53).

Múltiples factores pueden llevar al desarrollo de este tipo de CCU: malos hábitos de salud como el tabaquismo, el cual afecta al cuello uterino al haber aumento del moco cervical por la nicotina, tener relaciones sexuales a temprana edad antes de los 20 años, múltiples parejas, infecciones de transmisión sexual, como por *C. trachomatis*, VIH, entre otras, las cuales juegan un papel importante en el desarrollo de una neoplasia, por predisposición genética, por embarazo precoz en donde las células del cuello uterino aún son inmaduras, por múltiples partos debido al traumatismo durante el parto, anticonceptivos orales, estado inmunológico débil, por deficiencia de nutrientes, y situación socioeconómica baja (55) (56).

Uno de los principales actores en el desarrollo de CCU es el VPH, dado que en la mayoría de casos (el 75% de prevalencia esta en edades de entre 20 y 40 años), los pacientes con CCU presentan positivo para ADN del VPH. Sin embargo, sólo una minoría de mujeres con VPH desarrolla cáncer, puesto que el VPH por sí solo no puede generar en las células los cambios necesarios para que se desarrolle lesiones malignas. Estudios sugieren que también se necesita que exista una predisposición genética que sea susceptible a este tipo de infección y pueda desencadenar el desarrollo de CCU (57). Esta infección es frecuente en jóvenes que comienzan su actividad sexual, sin embargo, las infecciones persistentes y el precáncer se establece después de los 5 a 10 años, y esto no ocurre sino en el 10% de las personas que presentaron este tipo de infección. El carcinoma se desarrolla después de varios años en mujeres con precáncer de aproximadamente 35 a 55 años. Esto significa que el CCU es de desarrollo lento, y por ende es muy previsible si detecta en fases tempranas (58). Comienza cuando hay en la mujer una infección persistente por uno o más tipos de virus de alto riesgo entre ellos el VPH 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 52, 58, 59, 67, 68 y 70, siendo el 16 y el 18 más frecuentes (59). Este virus necesita la existencia de una microlesión o erosión presente en la membrana basal del epitelio cervical para tener acceso a las células basales, ya que estas células son poco diferenciadas, y atraviesa la membrana utilizando un receptor llamado  $\alpha 6$ -Integrina que se encuentra en la superficie de la célula, para así poder insertar su material genético y allí permanece en forma episomal. Una vez encuentra las condiciones adecuadas, el virus expresa las proteínas ORF (macros de lectura abiertos) E1, E4, E5, E2 que regula E6 y E7 (60), que son proteínas implicadas en la replicación y la regulación viral, con capacidad carcinogénica. Su replicación se da a niveles muy bajos dentro de la célula que actúa como reservorio (61). Una vez la célula basal comienza a diferenciarse, el virus estimula su replicación, lo cual produce la acumulación de viriones dentro del núcleo, llegando a haber

más de 1000 copias del genoma viral por célula, con la síntesis de proteínas tardías L1 y L2, responsables de la estructura como la cápside viral. Este proceso puede desencadenarse debido a una inmunosupresión que pueda estar presentándose para que el virus se comience a replicar (55).

El origen de la transformación de las células ocurre cuando la proteína E7 se une a la proteína pRb (proteína encargada del control del ciclo celular) para inhibirla, esta proteína pRb en condiciones normales forma un complejo con la proteína de transcripción E2F (proteína que promueve la expresión de numerosos genes involucrados en la progresión de la fase G1 a la fase S del ciclo celular) formando un complejo pRb/E2F para mantenerlo secuestrado durante la fase G1 del ciclo celular. Al unirse E7 a pRb, deja libre a E2F, motivándolo a generar la expresión de numerosos genes para entrar en fase S, muchos de estos son ciclinas A y E y las cinasas dependientes de ciclina (CDK2) (59). Mientras que E6 inhibe la acción de p53 (proteína encargada de la muerte celular programada, apoptosis), esto hace que los genes TP53 y pRb presenten resistencia a la apoptosis, su crecimiento se descontrola por el daño al ADN, y finalmente se desarrolla de una enfermedad persistente (60).

Los pacientes inmunocompetentes son capaces de eliminar y controlar la infección por VPH gracias a la inmunidad innata, la respuesta celular y la creación de anticuerpos principalmente contra las proteínas de la cápside L1 y L2. Sin embargo, el VPH puede evadir la respuesta inmune, puesto que su maquinaria le permite crear estrategias para evadirlo y que, al ubicarse en el núcleo de las células basales como parte de su material genético, estas mueren de manera natural al diferenciarse y no generan necrosis, señales de peligro como la inflamación que produce citoquinas necesarias para las células presentadoras de antígenos. Además de que las proteínas virales que se producen son tan pocas que no pueden ser detectadas por el sistema inmune, ya que no genera viremia en el individuo (62).

Las lesiones por VPH se clasifican según el programa nacional de diagnóstico precoz del CCU en NIC I o grado de riesgo desde bajo, NIC II o moderado y NIC III-CIS para lesiones intraepiteliales y carcinoma epidermodeo invasivo. Las lesiones NIC I hacen referencia a los cambios de las células superficiales del cuello uterino, las cuales pueden desaparecer de forma natural y si no desaparecen y no se tratan, estas pueden avanzar al siguiente grado de riesgo alto NIC II, el cual consiste en el cambio de células intermedias, aproximadamente el tercio de las células del epitelio. Cerca de un tercio de pacientes pasan a desarrollar cáncer o NIC III-CIS, donde se observa que todas las capas, hasta las más profundas del epitelio del cuello uterino, han sufrido un cambio significativo por VPH (63).

Otros cánceres causados por VPH están el cáncer de vulva, vagina, pene, ano, boca y garganta, dado que estas zonas están más expuestas a este tipo de virus debido a su forma de transmisión por relaciones sexuales (61).

### **3.10. Síntomas y signos**

El desarrollo del CCU es un proceso lento de varios años, donde la persona puede ser asintomática, pero cuando la enfermedad está en desarrollo es posible encontrarse con síntomas característicos del CCU: el sangrado vaginal anormal o dolor durante las relaciones sexuales, en periodos anormales que pueden ser muy abundantes y con duración prolongada, o después de la menopausia, flujo vaginal continuo, que puede ser pálido, acuoso, rosado, marrón, con sangre o de olor fétido. Ya cuando la paciente cursa por una enfermedad de CCU avanzada sus síntomas se agravan y puede presentar dolor de espalda, fatiga, sangrado vaginal profuso puesto que invade la vejiga y el recto directamente causando síntomas de estreñimiento, hematuria, fístula y obstrucción uretral, incluso hidronefrosis, dolor pélvico, pérdida de peso y fracturas óseas (64) (65). Sin embargo, los cambios que presente un paciente para que desarrolle un CCU no son muy visibles, y es necesario la implementación de pruebas diagnósticas que faciliten la búsqueda de esta enfermedad, como las citologías vaginales en donde un profesional de la salud puede detectar la anormalidad morfológica de las células y así realizar exámenes que le faciliten su visualización del progreso y la gravedad en la que se encuentra, como la radiografía de tórax, tomografía computarizada, cistoscopia, pielografía intravenosa (PIV) y resonancia magnética. También se hace exploración física del paciente que presenta ganglios inflamados en la región de la ingle, los ovarios o parte baja del vientre (64).

### **3.11. Diagnóstico**

Gracias a la anatomía del cuello uterino, es fácil realizar un examen físico y detectar a tiempo posibles alteraciones mediante de un estudio citológico e histológico, y con esto realizar un diagnóstico precoz seguido de un tratamiento oportuno y eficaz de las lesiones cervicales. El éxito de que un paciente se cure depende de un diagnóstico capaz de detectar los casos verdaderos que presenten lesiones cervicales, y los que no presenten alteración alguna que son los pacientes sanos, y para esto es necesario realizar un tamizaje que consiste

en la aplicación de pruebas diagnósticas a poblaciones sanas, con factores de riesgo en común, como la edad y género (56) (63).

La citología es un examen que se realiza con el fin de detectar anomalías morfológicas en las células exfoliadas de la unión escamocolumnar examinadas provenientes de la descamación de la superficie epitelial, de líquidos corporales o por aspiración con aguja. Esta prueba es utilizada para buscar indicios de posibles lesiones precancerosas y malignas, y su implementación juiciosa ha ayudado a disminuir la mortalidad en casi un 70%. También proporciona información sobre el estado hormonal de la paciente en presencia de microorganismos. Cabe resaltar que es una prueba de bajo costo, muy específica para detectar lesiones que pueden ser tratadas a tiempo, sin embargo, el procedimiento por el cual se realiza este examen resulta muy embarazoso para muchos pacientes, por lo cual es muy difícil implementarlo en todas las culturas (66). Este procedimiento, un médico o enfermero introduce en la vagina un espejo de metal o plástico, el cual ayuda a abrir las paredes de la vagina y deja observar mejor el cuello uterino, donde se encuentran las células epiteliales de interés, para así recolectarlas con la ayuda de un cepillo o espátula. Estas muestras son fijadas y procesadas para su posterior interpretación con la tinción de Papanicolaou, o también conocida como “Pap”, que es una tinción policromática que permite visualizar el contraste de núcleo y citoplasma de las células mediante el uso de diferentes soluciones que de forma secuencial y por tiempos determinados permite hidratar la células y prepararlas para la tinción para que se tiñen sus componentes celulares y así poder ser visualizadas al microscopio (66). La tinción de Papanicolaou permite el diagnóstico precoz de lesiones cervicales y es muy fácil de realizar a bajo costo, puesto que cuenta con una alta especificidad del 99,8%, con mayor detección de verdaderos negativos y una sensibilidad de 79,9% para detectar verdaderos positivos (67). Este examen se realiza en mujeres que hayan comenzado su vida sexual o a partir de los 21 años de edad, y se realiza cada tres años en caso de resultados negativos. Para casos positivos se debe seguir con la biopsia dirigida por colposcopia (63).

Una técnica empleada para el diagnóstico del CCU es la colposcopia, la cual fue creada por Hinselmann en 1925, esta permite observar la vista estereoscópica de la superficie del cuello uterino mediante el colposcopio, con el fin de ubicar lesiones y efectuar la biopsia de manera precisa. Esta técnica supera la citología y la biopsia a ciegas ya que indica el lugar exacto donde se encuentra una lesión, y así poder realizar un diagnóstico más acertado (68).

La prueba de ADN-VPV consiste en la detección de ADN de 13 tipos de VPV de alto riesgo, mediante la extracción de una muestra utilizando un cepillo especialmente diseñado el

cual se guarda en un tubo que contiene un líquido. La toma de muestra es similar a la citología vaginal y consiste en detectar la presencia o ausencia de este virus en mujeres de entre los 30 a 65 años. Si el resultado de la prueba da negativo, la paciente debe realizarse el examen cada cinco años para detectar de manera precoz posibles infecciones futuras. En caso de que el resultado sea positivo se debe realizar un examen citológico donde se observe la morfología de las células en busca de lesiones precancerosas, para sí comenzar con el tratamiento indicado por el profesional de salud (63).

La inspección visual con ácido acético (IVA) es una técnica de fácil uso que no necesita de máquinas especializadas, y puede realizarse junto con la citología vaginal y la prueba de ADN-VPH. Consiste en la aplicación de ácido acético durante un minuto. Donde se considerará una prueba positiva el observar zonas blancas alrededor de la zona de transformación que son características de las células precancerosas o cáncer invasivo en su estadio temprano. Está prueba es de visualización, por lo que se considera subjetiva y debe realizarse exámenes adicionales que corroboren los resultados obtenidos, dado que esta prueba no es tan efectiva en mujeres que cursan la menopausia, puesto que la zona de transformación se retira hacia dentro del canal cervical. Se considera una prueba de detección primaria ya que en lugares donde los recursos son poco accesibles esta prueba puede ser utilizada en vez del colposcopio, para retirar mediante el tratamiento con crioterapia la zona afectada de la paciente. Otra prueba es la visualización con yodo lugol, que es similar a la IVA, sin embargo sus datos no son confiables por su baja sensibilidad y especificidad (69).

### **3.12. Tratamiento**

Los pacientes que reciben tratamiento oportunamente tienen altas posibilidades de recuperarse y sobrevivir (70). Un médico debe saber el tratamiento correcto que consiga erradicar toda neoplasia intraepitelial cervical (NIC) que este en el epitelio cervical, y para esto es necesario considerar el grado de la neoplasia y la longitud total de la lesión (70). Actualmente la quimioradioterapia definitiva (TRC) es el método estándar que se utiliza para tratar el CCU localmente avanzado, seguido de procedimientos que involucran métodos quirúrgicos para extraer el tumor del paciente (71). Los tratamientos se dividen según el procedimiento utilizado, el primero consiste en realizar una escisión del tejido de células anormales con un bisturí o láser, entre ellos existe la escisión electro-quirúrgica por asa

(LEEP), en el cual se usa cables en forma de asa que se calientan eléctricamente para extirpar el área afectada, y el procedimiento de conización que extrae tejido en forma de cono utilizando láser o bisturí (69) (63). El segundo tratamiento es por medios ablativos donde las células anormales se vaporizan o destruyen sin extraer parte del tejido. Entre ellos está la electrocauterización, la cual mediante calor controlado logra destruir las células anormales del cuello uterino, y la otra técnica llamada Crioterapia utiliza una sonda metálica enfriada con óxido nitroso, o dióxido de carbono, que circula dentro de la sonda para que congele el tejido donde se encuentre la lesión y así poder extraerlo (70) .

### **3.13. Prevención**

En Colombia se creó un plan diseñado para las niñas a partir de los 9 años hasta el grado 11 de prevención primaria, el programa Ampliado de Inmunización (PAI) que cuenta con la vacuna tetravalente contra el VPH (13). Otras formas de prevenir esta enfermedad son las de tener en cuenta los factores de riesgo por los cuales una mujer puede padecer de CCU, y evitar tener malos hábitos de salud que incentivan a padecer este tipo de cáncer (12).

### **3.14. Vacuna contra VPH.**

La vacuna tiene tres dosis, la primera se realiza cualquier día, la segunda dosis a los 6 meses después de aplicada la primera dosis, y la tercera dosis a los 5 años después de la primera dosis. Este esquema debe ser cumplido para garantizar que el paciente haya generado anticuerpos contra el VPH y sean efectivos en caso de infección. La vacuna no presenta efecto secundario alguno, pero se puede presentar síntomas por la aplicación que son fáciles de tratar como el dolor, hinchazón, enrojecimiento en el lugar de aplicación, y desmayo, por lo que se recomienda que la persona esté sentada y este en observación por al menos 15 minutos (13). Existen dos vacunas que se están implementando en la actualidad, la vacuna bivalente contra los serotipos de mayor frecuencia 16 y 18 y la vacuna tetravalente frente a los serotipos 6, 11, 16 y 18 (72). La vacuna bivalente con 20 ug, está elaborada a partir de partículas similares al virus (VPLs) compuestas por proteínas L1 análogas a los VPH, expresión proteica: baculovirus, y como adyuvante: AS04. Está vacuna es aplicada a niños a partir de los 9 años con el fin de prevenir lesiones genitales pre malignas (cervicales, vulvares y vaginales) (72). La vacuna tetravalente, de 6 y 18 con 20 ug y 11 a 16 con 40 ug, está elaborada con proteínas L1 similares a las proteínas (VPLs) de VPH, expresión proteica de levadura y como adyuvante: sales de aluminio. Esta vacuna ayuda a prevenir infecciones por

virus VPH de serotipo 16 y 18 para prevenir cáncer de ano, cuello uterino, vulva y vagina, y para los serotipos 6 y 11 que producen verrugas genitales. Su implementación se hace a partir de los 9 años con el fin de prevenir lesiones tempranas por VPH, y está disponible tanto para hombres como mujeres desde los 9 años a los 26 años de edad (72).

### **3.15. CCU en Colombia**

El CCU es el segundo cáncer más frecuente en toda América latina y su mortalidad alcanza a 37.500 mujeres para el 2012, constituyendo un gran problema de salud pública. En Colombia, los casos nuevos aumentaron desde el periodo de 2007 a 2011 de mujeres que desarrollaron CCU con 4.462 por año, esto es equivalente a una tasa del 19,3% por cada 100.000 mujeres. Para el año 2012 hubo en total un 63% de casos de mujeres con CCU *in situ*, estos valores se midieron de acuerdo a los datos registrados tanto en régimen contributivo como subsidiado. Los casos que no se reportan corresponden a poblaciones vulnerables con menores recursos, aislados, poca educación entre otras causas (73). Los casos reportados en América Latina alcanzaron el 8,7% de defunciones por cada 100.000 mujeres, y comparado con América del norte que presenta 12.500 casos, seguido de Centroamérica con 15.600 casos, América del Sur lo supera con 47.900 casos siendo la segunda neoplasia más frecuente en América Latina. Esto puede ser causa de los bajos recursos con los que disponen estos países que están asociados a enfermedades transmisibles, y a la mortalidad materno-infantil donde la magnitud de muerte de mujeres alcanza el 22% en edades de 15 a 59 años. Está enfermedad requiere de una información preventiva la cual ayude a la población, entre ellos a niños y adolescentes los cuales son más vulnerables, a entender el porqué es importante realizarse los exámenes de citología vaginal, y aplicarse la vacuna contra el VPH que ayudan a detectar a tiempo esta enfermedad que es curable (65).

### **3.16. Cultivo celular**

El cultivo celular es un modelo de experimentación que permite estudiar *in vitro* el comportamiento intracelular, los flujos metabólicos, interacciones con el medioambiente, interacciones célula-célula, y morfología de un tipo específico de células en un medio que permite el control de nutrientes y condiciones ambientales (concentraciones de O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>) adecuados para que favorezcan su división, crecimiento y multiplicación. Se obtiene a partir de un primer subcultivo de un cultivo primario que posee las mismas características de las células del tejido u órgano *in vivo*, y puede ser de origen normal o de tipo tumoral, los cuales

se diferencia por número de cromosomas y metabolismo, como la expresión de proteínas, y forma de comportarse frente a diferentes tipos de medicamentos (74) (75). Se utilizan en varios campos de la investigación, como en el área de la biotecnología para crear nuevas moléculas de interés industrial utilizando las propiedades de las células, en campos de la medicina como la ingeniería de tejidos, etc. (76).

Los cultivos de células cancerosas presentan aspectos diferentes a los tejidos normales, los cuales les permite incluso crecer sin la necesidad de adherirse a una superficie para proliferar. Estas células se pueden crear a partir de células de tejido que puede ser modificado con un tipo de virus o sustancias químicas mutagénicas. El uso de cultivos celulares es de gran importancia en el campo de investigación debido a que es un método reproducible que permite la obtención de limitadas células de un mismo tejido por subcultivos de 60 a 70 pases, en un corto tiempo, y además pueden conservarse en nitrógeno líquido o refrigerarse a  $-70^{\circ}\text{C}$  (74). Sin embargo estas células presentan cambios genéticos a medida que van proliferando, que las hace diferentes a las células progenitoras de los tejidos iniciales (76). El tipo de medio utilizado varía dependiendo la línea celular que se desea cultivar, y para esto se debe tener en cuenta las necesidades de cada una para sobrevivir *in vitro*, entre estas el tipo de nutrientes, las condiciones ambientales (pH,  $\text{CO}_2$  y  $\text{O}_2$ ), factores de crecimiento, antibiótico, y vitaminas entre otros que son esenciales para su crecimiento y proliferación (74).

### **3.17. Cultivo de células HeLa**

El 8 de febrero de 1981 en el Hospital Johns Hopkins en Baltimore, Maryland, el doctor George Gey realizó el primer cultivo celular utilizando la muestra de células provenientes de un cáncer de cuello uterino glandular muy agresivo de una paciente joven de raza negra llamada Henrietta Lacks, de la cual se tomó las dos primeras letras de su nombre para llamar HeLa a la línea celular, que se convirtió en un modelo clave para la investigación del cáncer e investigación de Biomédica, con fines de observar las vías bioquímicas que tomaban estas células al reaccionar con diferentes sustancias. Esta línea es derivada de un cáncer de alto grado o etapa alta por infección con VPH-18, que han adquirido los cambios fenotípicos y genotípicos necesarios para poder replicarse *in vitro*. Además el genoma de HeLa ha sido muy estable después de años de cultivo continuo. Su utilización ayudó con la lucha contra la poliomielitis, ya que el virus del polio crecía en abundancia dentro de las células HeLa, permitiendo la creación de la primera vacuna contra el polio (26).



### **3.16. Cultivo celular SIHA**

Son células epiteliales tumorales provenientes de cáncer de cuello uterino de una mujer de 55 años de edad proveniente de Asia, estas células contienen material genético de VPH-16, y en grado 2 de carcinoma (77).

## **3. METODOLOGÍA**

### **3.1. Tipo de investigación**

El presente proyecto de investigación se desarrolló de forma Experimental-cualitativa, en donde se tendrá en cuenta los aspectos exploratorio, descriptivo, explicativo y experimental, con el fin de caracterizar la cepa de *Bt neoleonensis* e implementación del cultivo de células de cáncer de cuello uterino.

### **3.2. Universo, población y muestra**

**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.

### **3.3. 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.

### **3.4. Técnicas y procedimientos**

#### **Cultivo de *Bacillus thuringiensis neoleonensis***

Para la presente investigación, se evaluó la cepa de *Bt neoleonensis* T24001, obtenida del Instituto Pasteur (Francia). Para su cultivo y mantenimiento se sembró en medio tripticosa soya y se incubó a 37°C por 24 horas. Luego se observó la morfología con coloración de Gram y Schaeffer-Foulton. Para la coloración de Gram se realizó un frotis tomando una colonia de la cepa después de que creciera a 37°C durante 24 horas. Para la coloración se agregó cristal violeta, lugol, alcohol de Gram y fucsina acida con una duración de un minuto

cada una, y su posterior lavado con abundante agua, luego se dejó secar y se observó al microscopio a un aumento de 10x y 100x. Para la coloración de Schaeffer-Foulton se realizó un frotis de una caja con una cepa de *Bt. neoleonensis* con un mes de duración, con el fin de que produjera esporas y cristales. Primero se agregó el colorante verde de malaquita y se calentó la lámina durante 10 minutos, luego se lavó con abundante agua el colorante y se agregó fucsina acida, finalmente se lavó y seco. Se observó al microscopio con aumento de 10x y 100x.

#### **Microscopia de contraste de fases**

Se realizó frotis en fresco de una colonia de *Bt neoleonensis* de crecimiento de 24 horas y de un mes de duración. Para su observación se utilizó el microscopio de contraste de fases (Nixon).

#### **Lavado de biomasa y solubilización de proteínas cristales de Bt.**

A un cultivo esporulado, previamente visto al microscopio para asegurarse de la producción de cristales sea mayor al 90% de esporulación, se recolectó toda la biomasa en medio líquido tripticasa soya y se realizó de 3 a 4 lavados en 1,5ml de agua destilada estéril y 5 ul de PMFS 100 mM, y se centrifugó a 8000 rpm por 15 minutos. Luego se pasó el sobrenadante a otro falcon y se le agrego 3ml de buffer carbonatado, DTT 2mM y PMFS 100 mM. Después se incubo durante 2,5 horas a 37°C en constante movimiento y en oscuridad. Finalmente, se centrifugo a 10000 rpm por 25 minutos y se separó el sobrenadante. Las proteínas obtenidas se almacenaron a -20°C.

#### **Antibiograma**

Para hallar la sensibilidad que presentan *Bt neoleonensis* a los agentes antimicrobianos *in vitro*, se utilizó el método de dilución en agar, enfrentando la bacteria sembrada por agotamiento en medio solido tripticasa soya con antibiótico. Para ello, se partió de un cultivo de 24 horas con la bacteria crecida en medio tripticasa soya, bajo temperatura de 37°C. La lectura se interpretó observando crecimiento de la bacteria, considerando sensible aquellas bacterias que no crecían y resistentes a las que por el contrario presentarían colonias en el agar. Se realizaron dos repeticiones por cada antibiótico, y se realizó triplicado por cada concentración de antibiótico.

#### **Cuantificación de proteínas parasporales y totales.**

Con base al Método de Bradford (78), se realizó la cuantificación de proteínas con 1 ml de reactivo de Bradford y 100 ul de muestra, luego se tomó 3 lecturas seguidas en espectrofotómetro a una Absorbancia de 595 nm a temperatura ambiente. Para el patrón se utilizó como proteína estándar la albumina de suero fetal bovino (BSA) con concentración 0,5 mg/ml, estas se diluyeron en H<sub>2</sub>O hasta completar 100ul y se agregó 1ml de reactivo Bradford como se muestra en la tabla a continuación:

**Tabla 1.** Concentraciones de Patrón de albumina de suero fetal bovino (BSA) (78). La preparación de los patrones se realizó con albumina estándar (0,5mg/ml), agua destilada estéril, y reactivo Bradford.

Concentración de Patrón de albumina de suero fetal bovino(BSA)			
	Albumina Estándar (0,5mg/ml)	H <sub>2</sub> O	Reactivo Bradford
Blanco	0ul	100ul	1ml
1	25ul	75ul	1ml
2	50ul	50ul	1ml
3	75ul	25ul	1ml
4	100ul	0ul	1ml

### **Cultivo Celular**

Para fines de este proyecto, se necesita un medio de cultivo DMEM enriquecido con glucosa, el cual debe tener aminoácidos no esenciales, vitaminas como la l-glutamina, sales minerales, piruvato, antibiótico, el cual se utilizó penicilina y estreptomina, que inhibe el crecimiento o la contaminación por bacterias, un indicador de pH Rojo fenol, y suero fetal bovino (SFB) al 10%, que aporta los factores de crecimiento. Primero se utiliza 5 ml de medio DMEM suplementado con aminoácidos no esenciales, antibiótico, suero fetal bovino (SFB), antibiótico (penicilina o estreptomina) tubo falcon estéril. Se pone en baño maría el vial con las células previamente preservadas a menos 20°C, o a menos 70°C, e inmediatamente después de descongeladas se vierten en el tubo falcon con 5 ml de medio DMEM. Se mezcla y se lleva a centrifugar a 5 minutos por 1200 rpm. Luego se bota el sobrenadante y se resuspenden las células. A una caja de cultivo se adiciona 5ml de medio y se agrega las células del tubo falcon resuspendidas.

### **Viabilidad**

Para observar viabilidad se toma 20 ul de azul de metileno y 20 ul de medio de falcon con las células, se mezcla y se pone una gota en la cámara de Newbauer.

Porcentaje de células vivas= (# células vivas/# Células vivas + #células muertas)\*100

Concentración= #Células vivas \* FD \* 10000/4

Dónde:

Células vivas: color blanco refractantes

Células muertas: color azul

### **Cambio de medio**

Se saca el medio de la incubadora y se observa las células al microscopio. En cámara de flujo se decanta el medio de cultivo, se lava con PBS la caja y se decanta. Finalmente se agrega 5 ml de medio DMEM, y se pone a incubar nuevamente las células en la incubadora.

### **Pase de células a otra caja de cultivo nueva.**

Primero se observa la confluencia de las células que debe ser mayor al 90%. Se decanta el medio de la caja y se lava con PBS. Se agrega 2ml de tripsina a la caja y se pone a incubar por 5 minutos a 37°C. Luego se agrega 5ml de medio DMEM y se mezcla. Se pasa 100 ul de la caja de cultivo a otra caja de cultivo nueva con 5ml de medio DMEM. Se pone a incubar a 37°C por 24 horas.

### **Conservación de las células**

Primero se observa la confluencia de las células que debe ser mayor al 90%. Se decanta el medio de la caja y se lava con PBS. Se agrega 2 ml de tripsina a la caja y se pone a incubar por 5 minutos a 37°C. Luego se agrega 5ml de medio DMEM y se mezcla. Se toma todo el contenido de la caja y se pasa a un falcon estéril. Se centrifuga por 5 minutos a 1200 rpm. Después se decanta el sobrenadante y se resuspende el botón. Previamente en un tubo eppendorf estéril se agrega 100ul de dimetil sulfuro (10%) y 900 ul de SFB (90%). Se toma el botón del falcon, y se adiciona al tubo eppendorf mezclándolo suavemente. Se crioconserva en nitrógeno líquido, o a menos 20°C, o a menos 70°C.

### **Determinación de la Viabilidad Celular con Tripán Blue**

Primero se obtuvo un cultivo de células con 48 horas de incubación previa, estas se tripsinizaron y resuspendieron en un falcon de 50 ml. Luego se observó a la cámara de Neubauer el número de células presentes en cada cuadrícula. El resultado obtenido se multiplica por el factor de dilución y por el número de aumento. Luego se calcula el número de células por 1 ml y se obtiene finalmente la concentración inicial de las células. A esta concentración se realizan diferentes diluciones (5000, 10000, 15000, 20000, 25000, 30000, 35000 y 40000 por cada mililitro). En una placa de 96 pocillos se adicionan 100ul de células, de concentración conocida, por triplicado. Estas células se dejan incubar de 8 a 24 horas en incubadora con CO<sub>2</sub> a 37°C. Una vez se observe células adheridas al sustrato, estas se tripsinizan con 10ul de tripsina y se espera 5 minutos en la incubadora a 37°C. Una vez se observe células desprendidas se toma 20ul de células de un pocillo y 20ul de azul de Tripán para luego contar las células vivas en la cámara de Neubauer. Las células contadas multiplicadas por la dilución y el factor de dilución representan la concentración aproximada de las células presentes en el pocillo.

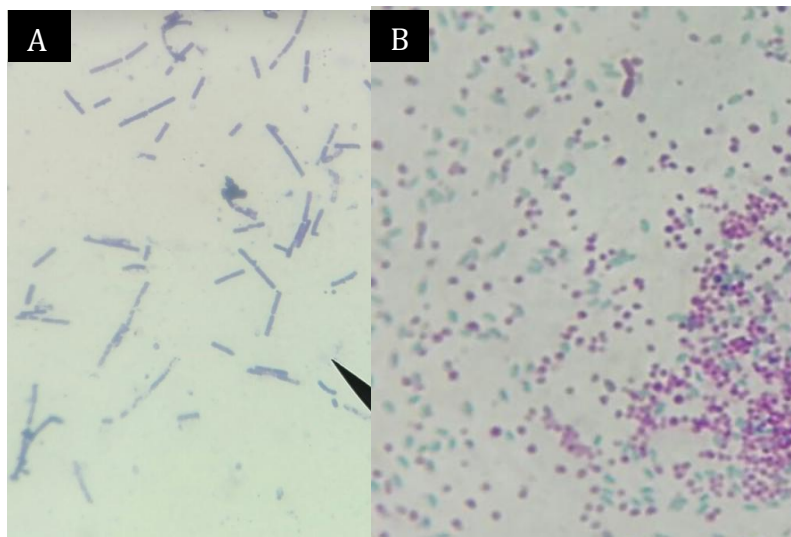
## **4. RESULTADOS**

### **4.1. Caracterización microscópica y bioquímica de la cepa *Bacillus thuringiensis neoleonensis*.**

El crecimiento de *Bt neoleonensis* después de 24 horas de incubación a 37°C presentó unas colonias color blanco, aspecto cremoso, liso y abundante. Con la coloración de Gram se observó bacilos Gram positivos largos, grandes y gruesos, con bordes redondos, agrupados en cadena (Figura 2). En la coloración de Schaeffer fulton se puede observar las esporas (verde), los cristales (fucsia) y los bacilos (fucsia). Esta coloración se realizó después de un mes, dado que así se consigue que la bacteria entre y permanezca en la fase estacionaria de crecimiento y comience a esporular, y posteriormente generar cristales parasporales.

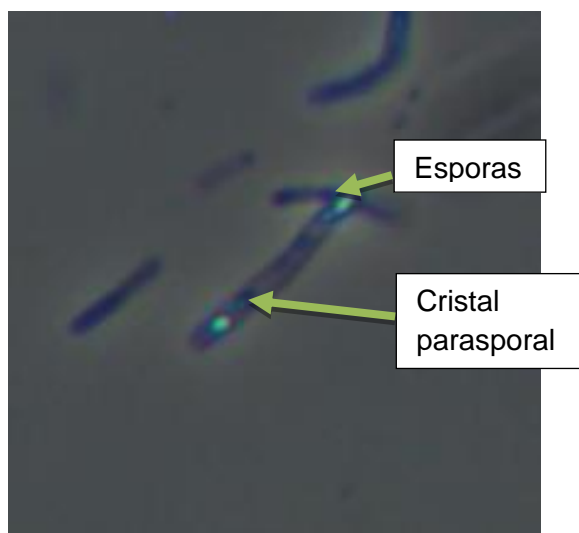


**Figura 2.** *Bt. neoleonensis* en agar tripticasa soya. Se observa colonias blancas de aspecto cremoso, liso y abundante.



**Figura 3 .A.** Coloración de Gram de *Bt. neoleonensis* **B.** Coloración con Schaeffer fulton de *Bt. neoleonensis* donde se observa las esporas (verde) junto con los cristales (fucsia).

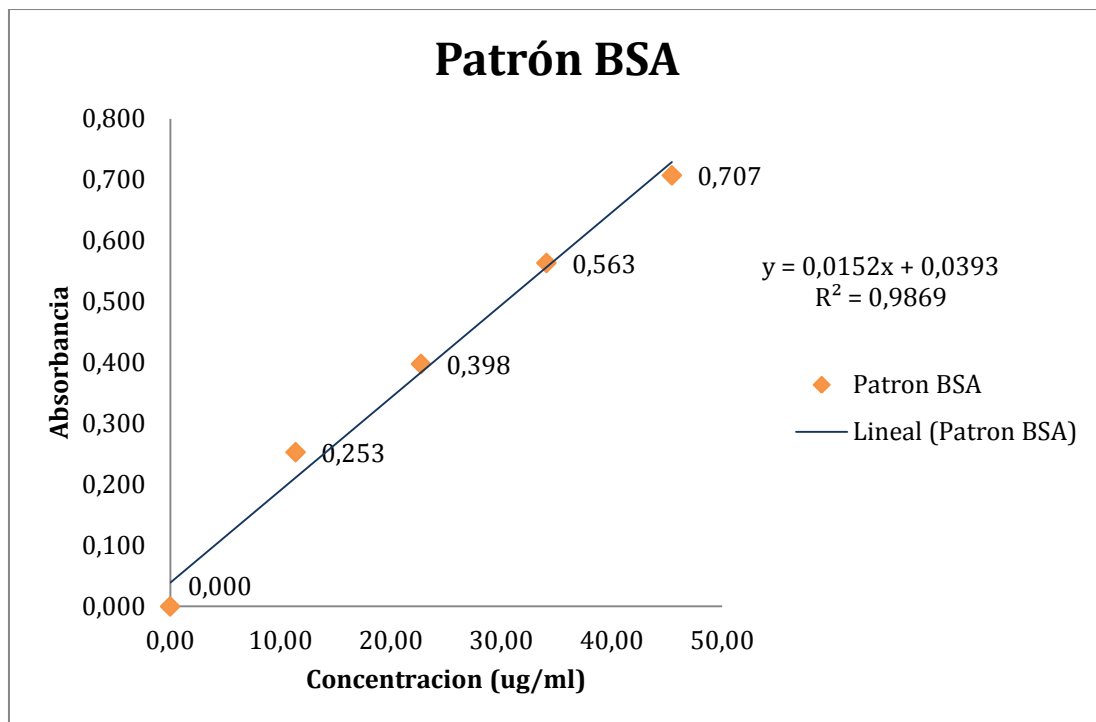
Para observar los cristales y las esporas de *Bt neoleonensis* en microscopio de contraste de fases, las cepas crecieron en agar tripticasa soya a 37°C durante 24 horas, y luego fueron almacenadas durante 1 mes a temperatura ambiente hasta que el cultivo alcanzó la esporulación. Luego se montaron en láminas en fresco para su posterior observación al microscopio (Figura 3).



**Figura 4.** *Bt* serovar *neoleonensis* visto por microscopio de contraste de fases. Se observa espora y cristales dentro de un bacilo característico de *Bt*.

#### **Cuantificación de Proteínas por el Método de Bradford**

Para la cuantificación de las proteínas extraídas mediante los métodos de extracción de proteínas totales y lavado de biomasa y solubilización de cristales, se cuantifico mediante el método de Bradford, dado que es un colorante que se une a la proteína y permite que esta sea leída a una absorbancia de 595 nm. Para esto, se realizó una curva patrón (Figura 5) utilizando como proteína estándar BSA de concentración conocida (0,5mg/ml), de la cual se obtuvo una ecuación  $y = 0,0152x + 0,0393$  y  $R^2 = 0,9869$ , cercano a lo cual indica que la relación de las variables es alto. La concentración de las proteínas totales y concentración de cristales parasporales de *Bt. neoleonensis* se obtuvieron de acuerdo a la curva patrón obtenida, para las cuales la concentración de cristales parasporales 22,74 ug/ml.

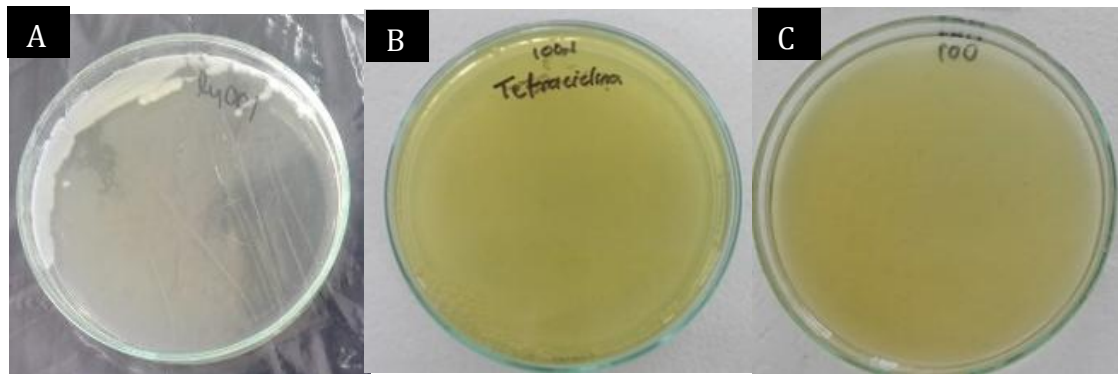


**Figura 5.** Curva de patrón de calibración con proteína BSA por Método Bradford a una absorbancia de 595 nm. Se observa patrón de absorbancia vs concentración de BSA estándar de concentración conocida.

#### 4.2. Prueba de sensibilidad con gentamicina, ampicilina y tetraciclina

En agar tripticasa soya se agregó diferentes concentraciones de antibiótico: 0.4-100 ug/ml (ampicilina, tetraciclina y gentamicina) y posteriormente se realizó la siembra por aislamiento de la cepa de *Bt neoleonensis*. Después, se incubó por 24 horas a 37°C. Se consideró como sensible las cajas que no presentaban crecimiento, y como resistente, la presencia de colonias en el medio con antibiótico. Para *Bt. neoleonensis*, presento resistencia a ampicilina, puesto que presento crecimiento en agar con concentraciones desde 0,4ug/ml. Por el contrario no presento crecimiento alguno con tetraciclina y gentamicina, siendo sensible para estos antibióticos.

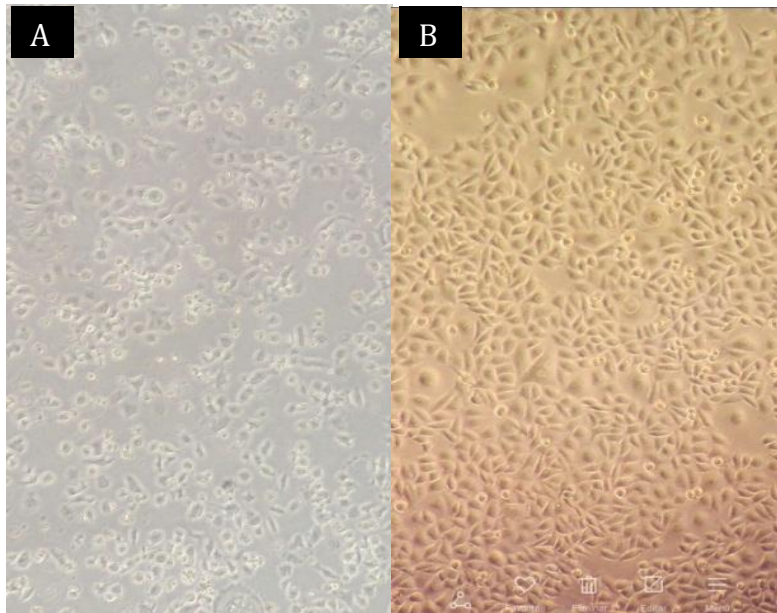




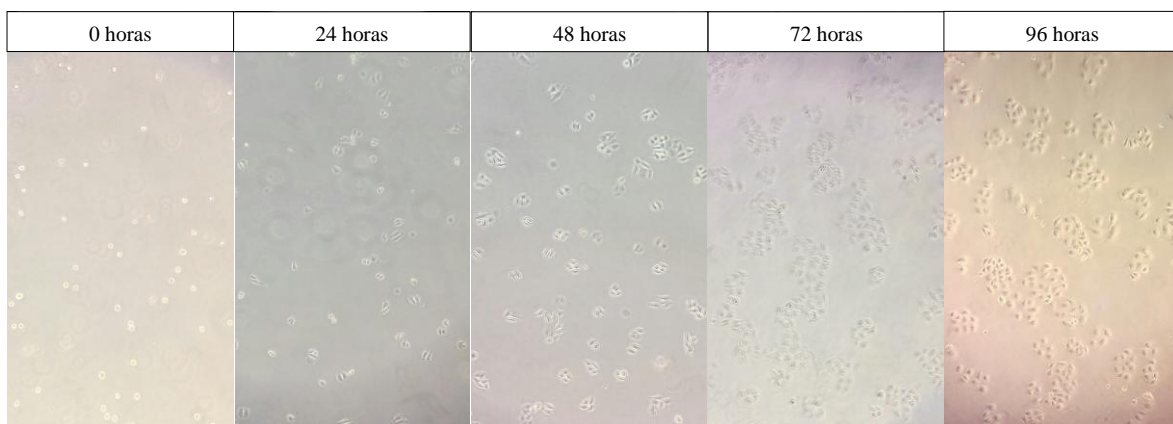
**Figura 7.** Prueba de sensibilidad a antibióticos con 100ug/ml. **A.** Ampicilina **B.** Tetraciclina **C.** Gentamicina. Crecimiento de *Bt neoleonensis* en medio triptica casa soya con antibiótico 100ug/ml donde se puede apreciar la resistencia a ampicilina y es sensible frente a tetraciclina y gentamicina.

#### **4.3. Implementación de cultivo de células de CCU.**

Para cultivo celular, se realizó una siembra a partir de crioviales con concentración celular de  $1 \times 10^6$  células/ml, los cuales fueron conservados en nitrógeno líquido. Estos crioviales se sembraron en cajas de cultivo de 25 ml, y se observó por una semana. Su viabilidad se calculó mediante el método de Tripan blue, el cual permite diferenciar las células vivas de las células muertas, hasta obtener una confluencia del 90% de viabilidad. Se observó que las células HeLa y las SiHa, en medio DMED con 4.5 mg/ml de glucosa, 10% de SFB y L-glutamina 1X, presentaban crecimiento exponencial a las 72 horas, con una confluencia de 90% a las 96 horas en cajas de cultivo celular.



**Figura 8. A.** Células SiHa y **B.** Células HeLa vistas con aumento de 10x. Células con confluencia mayor al 90% en medio DMEM high incubadas a 37°C y CO<sub>2</sub> al 5%.



**Figura 9.** Crecimiento de células HeLa durante cinco días, observado bajo microscopio invertido desde primer día de incubación la hora 0, hasta las 96 horas de incubación.

#### 4.4. Viabilidad Celular

Para el ensayo de viabilidad se partió de un cultivo de células con una confluencia mayor del 90%, el cual permite obtener una concentración máxima de células, con las cuales se realizó diluciones en células/mL de 5000, 10000, 15000, 20000, 25000, 30000, 35000 y 40000, partiendo de una concentración inicial de 1 millón de células/mL aproximadamente.

Esto se calculó mediante conteo de células vivas presentes en un mL de medio, utilizando la fórmula para hallar la concentración celular en una caja de cultivo, utilizando la cámara de Neubauer. Se analizó la viabilidad celular durante cuatro días, estas células se cultivaron en medio DMEM con 10% de SFB, en un ambiente con 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C en placa de 96 pozos. Igualmente para hallar la concentración presente en cada pozo, se realizó un lavado con PBS para extraer los sobrantes de medio DMEM, luego se agregó 50ul de tripsina para separar las células de la placa y así permitir la liberación de células para que puedan ser contadas.

Para las concentraciones de células HeLa con 10000 células/ml, se observó su fase de crecimiento exponencial a las 48 horas, y fase estacionaria a las 72 horas, diferente a las células con concentración de 15000, 20000, 25000, 30000, 35000 y 40000 células/ml, las cuales estuvieron en fase de crecimiento exponencial durante los 4 días. En los pocillos con concentración de 5000 células/ml se presentó un descenso de crecimiento de las células a las 48 horas mostrando muerte celular a las 72 horas. Para las células SiHa se realizó el mismo procedimiento obteniéndose una menor cantidad de células por pozo, dado el bajo porcentaje de viabilidad que presentaron durante los cuatro días del ensayo. Se observó un crecimiento deficiente con concentraciones mínimas de 5000, con muerte celular a las 48 horas. A las 10000 células/ml, el crecimiento descendió a las 72 horas. En concentraciones mayores de 20000, 25000, 30000, 35000 y 40000 células/ml, el crecimiento celular fue constante pero descendió al tercer día o cuarto día de incubación (Tabla 2) (Sección de anexos).

**Tabla 2.** Viabilidad celular por ensayo con Tripán blue de células HeLa y SiHa, a partir de diluciones en serie partiendo de un tubo con concentración inicial de un millón de células aproximadamente. Se contaron las células por cámara de Neubauer y se utilizó la fórmula de concentración para calcular el número total de células en cada pozo, teniendo en cuenta solo células vivas.

<b>Viabilidad celular por ensayo con Tripán Blue</b>								
<b>Dilución</b>	<b>Células HeLa</b>				<b>Células SiHa</b>			
	<b>24 horas</b>	<b>48 horas</b>	<b>72 horas</b>	<b>96 horas</b>	<b>24 horas</b>	<b>48 horas</b>	<b>72 horas</b>	<b>96 horas</b>
<b>20ul</b>	3333,3	5000	1666,7	0	7500	0	0	0
<b>40ul</b>	5000	8333,3	11666,7	11666,7	11000	10000	7500	7500
<b>60ul</b>	6666,7	11666,7	15000	30000	25000	17500	25000	7500

<b>80ul</b>	10000	13333,3	28333,3	36666,7	32000	25000	17500	5000
<b>100ul</b>	15000	20000	60000	56666,7	32500	25000	22500	20400
<b>120ul</b>	36666,7	51666,7	108333,3	175000	42500	32500	32500	17500
<b>140ul</b>	38333,3	83333,3	183333,3	365000	58500	40000	45000	27500
<b>160ul</b>	43333,3	138333,3	156666,7	198333,3	61000	40000	52500	25000

## 5. DISCUSIÓN

El CCU constituye un problema de salud pública importante que se presenta en mujeres desde los 40 a los 55 años de edad, si no se detecta a tiempo puede convertirse en un problema difícil de controlar a la hora de diagnosticar y tratar, principalmente en países con bajos ingresos económicos. Muchos estudios se han realizado en este tipo de cáncer, entre ellos la creación de nuevas alternativas terapéuticas utilizando microorganismos con propiedades únicas como *Bt* el cual durante su fase de esporulación, produce proteínas que forman cristales parasporales, que tienen actividad citotóxica frente a células procedentes de tejido canceroso. Para el presente trabajo, se analizó las características de *Bt neoleonensis* y el modelo a utilizar que sea más apto en cuanto a producibilidad de resultados, y manejo accesible, para evaluar el porcentaje de citotoxicidad y mecanismo de acción de dichas proteínas, entre otros estudios.

Las investigaciones relacionadas con *Bt neoleonensis* que se ha reportado hasta la actualidad son relativamente escasos. Su origen de aislamiento es variable dado que se ha aislado de diferentes lugares entre ellos del suelo, del filoplano y del agua dulce. Mizuki y colaboradores aislaron la cepa del sedimento marino en México (79), Quesada-Moranga aislaron una cepa relacionada a este serovar desde lugares ubicados en España, por lo cual se puede decir que esta cepa puede vivir en cualquier lugar que ofrezca el ecosistema necesario para su supervivencia (80).

La microscopía de contraste de fases de *Bt neoleonensis* mostró la formación de cristales parasporales y esporas conjuntamente dentro de un bacilo, forma característica de *Bt*. Rodríguez y colaboradores reportaron en 1990 que los cristales de *Bt neoleonensis* presentaban una particular forma triangular al verse en microscopía electrónica (23), Bulla y colaboradores correlacionaron la forma de los cristales producidos por *Bt* (ya sea bipiramidal, cuboidal, plana romboide, o un compuesto con dos o más tipos de cristal), y la composición

con la bioactividad contra los insectos objetivo. Sin embargo *Bt neoleonensis* no presenta actividad insecticida frente a seis especies de insectos analizadas (81).

La sensibilidad de *Bt neoleonensis* a ciertos tratamientos con antibióticos, se realizó bajo el método de dilución en agar sólido, utilizando ampicilina, gentamicina y tetraciclina. Estos antibióticos se escogieron con el fin de determinar el patrón de susceptibilidad de *Bt*, mediante el método de dilución en agar sólido, el cual es útil para diferenciarlo de otros géneros de *Bacillus* (*B. cereus* y *Lysinibacillus sphaericus*) mediante la sensibilidad que presente frente a ciertos antibióticos. *Bt neoleonensis* presentó resistencia a la ampicilina hasta 100 ug/ml y sensibilidad a gentamicina y tetraciclina con 0.4 ug/ml de concentración, datos similares se encontraron con otras subespecies de *Bt* como var *kenyae*, *kurstaki*, *aizawai*, *monterrey*, y *mexicanaensis*, por método de difusión en agar, determinado mediante la medición del halo de inhibición en cada cepa (82). El conocimiento de la susceptibilidad de la cepa de interés para crear medios de cultivo es de gran importancia tanto a nivel industrial como agrícola, dado que permite el aislamiento y la purificación de la cepa, otorgándole condiciones químicas, físicas y nutricionales necesarias para un crecimiento abundante y moderado, y al mismo tiempo, inhibiendo el crecimiento de microorganismos contaminantes. En industria, se necesita de grandes volúmenes de microorganismos para realizar diversas transformaciones que le permitan a la bacteria poder replicarse a gran escala. Los requisitos para que alguna bacteria sea candidata para su producción masiva es que cuente con la producción de sustancias de interés en periodos cortos de tiempo, sea genéticamente constantes, de rápido crecimiento y fácil mantenimiento en la planta industrial (83).

Un estudio realizado en España, encontró que para cepas de *Bt neoleonensis* encontradas en el Archipiélago Balear, el perfil proteico se encontraba entre los rangos de 40 y 45 pb, en cuanto a la Península Ibérica, el perfil de la cepa aislada cambiaba su peso molecular dando rangos de entre 69 y 75 pb, por lo cual esta subespecie variaba su perfil proteico dependiendo el lugar del que fuera aislado, a diferencia de otras subespecies como *Bt konkukian* el cual presentó el mismo perfil proteico en las tres regiones geográficas donde se realizaron los aislamientos para la investigación. Se reveló mediante el análisis de SDS-PAGE que la mayoría de cepas (67%) que producen cristales de 130-140 kDa eran tóxicas para lepidópteros como *S. littoralis*. Sin embargo, *Bt neoleonensis* no fue parte de las cepas que presentó una actividad significativa contra los insectos utilizados en el estudio (80). Por otro lado, *Bt neoleonensis* presenta actividad nematocida frente a huevos y larvas de *Nematodirus spathiger*, gracias a la producción de la proteína Cry6, una proteína de las que se sabe solo dos cepas de *Bt* la producen. Otro factor importante es la concentración de proteínas que se

obtenga de *Bt* es fundamental ya que la concentración y el porcentaje de toxicidad son directamente proporcionales (84). En este trabajo se logró purificar 22.74 ug/mL, es una concentración adecuada para realizar bioensayos ya que en general se utilizan 1 ug/mL como concentración de trabajo.

El modelo de experimentación *in vitro* utilizando la línea celular HeLa para investigar sobre el cáncer ha venido siendo la mejor opción para entender y realizar miles de experimentos a lo largo de la historia. En este estudio se utiliza como modelo las células HeLa y células SiHa a fin de entender la actividad citotóxica de las proteínas parasporales de *Bt neoleonensis*. Muchos estudios realizados hasta el momento, como el descubrimiento de las PS y su mecanismo de acción, fue gracias al uso de las líneas celulares procedentes de diferentes tipos de cáncer, entre ellos la actividad anticancerígena que presentaba la PS2Aa1 producida por *Bt* cepa A1547 sobre líneas celulares HepG2, MCF-7 y PC-3, la formación de poros de la PS4 en células de MOLT-4, Jurkat, HeLa y HepG2, donde se puede ver claramente el cambio de morfología, permitiendo el seguimiento de las señales involucradas en la apoptosis (85).

Las condiciones empleadas para el medio de cultivo utilizado en las dos líneas celulares fue el mismo, con el fin de obtener resultados comparables entre sí, esto incluye incubación a 37°C en CO<sub>2</sub> al 5%, en medio DMEM, el cual contiene SFB al 10%, antibiótico (penicilina y estreptomycin) L-glutamina 100X, aminoácidos no esenciales y vitaminas ofreciendo un ambiente enriquecido para su óptimo crecimiento (27). Otros estudios similares trabajaron en condiciones similares utilizando diferentes medios de cultivo entre ellos RPMI1640 suplementado con suero bovino fetal al 10% y kanamicina (86). Los cultivos de células generalmente se cultivan en medio DMEM, RPMI 1640,  $\alpha$ -MEM, Ham'F-12 y Medium 199, pero cada medio influye de manera diferente sobre las líneas celulares en cuanto a la proliferación celular, viabilidad celular y la diferenciación celular, gracias a los diferentes componentes de los que están hechos. DMEM puede venir con glucosa en diferentes concentraciones, DMEM low glucose con 1 g/L y DMEM High glucose con 4.5 g/L (para este estudio se utilizó High DMEM) además presenta un concentración de calcio de 1,8 mM y fosfato de 1 mM (87). Estos medios pueden ser enriquecidos o modificados para que las células perduren durante más tiempo vivas, esto con el fin de obtener un mayor tiempo de observación durante la investigación, como la adición de varios elementos adicionales entre ellos suero de pollo y caldo de fosfato de soya los cuales se observó que ayudaron en la prolongación de vida de las células para observar el virus de la poliomielitis a concentraciones muy bajas (88). En un medio de cultivo, niveles altos de calcio puede ayudar

en el aumento de la proliferación celular, sin embargo un bajo nivel de calcio no afecta significativamente su crecimiento. La glucosa, por el contrario si afecta la proliferación celular, dependiendo la concentración utilizada, puesto que si se utiliza concentraciones bajas de glucosa, aumenta de forma positiva la proliferación celular, en cambio concentraciones elevadas de este monosacárido puede generar estrés debido al daño ocurrido en la célula (87). Y mantener las células en ausencia de glucosa puede causar apoptosis por medio de la activación de caspasas (89). El uso de SFB es muy común en los medios de cultivo dado que aporta quelantes de nutrientes lábiles o insolubles en agua, hormonas, factores de crecimiento e inhibidores de proteasas, sin embargo su uso es cuestionable puesto que posee varias desventajas en cuanto a variaciones en su composición y a su fácil contaminación con microorganismos del exterior, que se puede prestar a malas interpretaciones en los ensayos. El uso de aminoácidos es indispensable para las células, en especial la L-glutamina, un aminoácido esencial que aporta a la célula nitrógeno para sintetizar NAD, NADH y nucleótidos para su metabolismo secundario, no obstante debe aplicarse al medio antes de usar debido a que es inestable y se degrada, convirtiéndose en sustancias que no pueden ser utilizadas por la célula (90).

HeLa es uno de los modelos celulares *in vitro* más fáciles de utilizar, y muy reproducibles. El manejo adecuado permite el pase continuo de células, además su crecimiento es muy rápido, dado que al tercer día después de haber sido cultivada, las células ya se han recuperado y están en proceso de replicación. La determinación de patrones de viabilidad celular de células de CCU proporciona información sobre la interacción de células vivas y funcionales existentes en una población determinada. Por lo tanto la determinación de la viabilidad celular se convierte en un marcador predictivo del comportamiento y las funciones de un tejido tumoral de forma *in vitro*. Existen diversos métodos de determinación de viabilidad celular que se pueden realizar en el laboratorio entre ellos el ensayo de viabilidad Tripán Blue, ensayo MTT, ensayos utilizando biosensores de fluorescencia, ensayos morfológicos, evaluación de la integridad de la membrana celular, entre otros (91). El mantenimiento de un cultivo celular requiere de varios elementos fundamentales como el tipo de medio de cultivo, la temperatura, la humedad, la combinación de gases y el manejo adecuado para evitar posibles contaminaciones con microorganismos, por lo cual se debe observar diariamente al microscopio para tener un seguimiento adecuado de las células y asegurarse de que estén sanas. Sin embargo cuando una caja de cultivo es sacada de la incubadora, las células se exponen a un estrés mecánico debido al cambio de ambiente y al tiempo en el que están sometidas al exterior, impidiendo el adecuado crecimiento de las

células o el posible cambio de fenotipo. Por lo tanto, la manipulación de las células en los pozos durante la realización de procedimientos que requieran tiempo para su ejecución, puede ser un factor de alteración en el crecimiento celular, debido a que se somete a las células a un largo periodo fuera de las condiciones ideales que ofrece la incubadora. Se realizó dos métodos para medir la viabilidad celular de HeLa y SiHa, estos son el ensayo con Tripán blue y MTT, métodos utilizados también para ensayos de citotoxicidad debido a que son simples, rápidas, eficientes, económicas, reproducibles, que permiten la obtención de resultados seguros (92). Para el ensayo con Tripán blue se utilizó la cámara de Neubauer para determinar la concentración de células presentes en cada pozo, de la cual solo se requirió 20ul de muestra de cada pozo, luego de que esta haya sido lavada con PBS y tripsinizadas. Los resultados obtenidos fueron por triplicado, manteniendo las mismas condiciones de temperatura, humedad, CO<sub>2</sub>, y medio de cultivo. Se encontró que la concentración de células por pozo influía en el crecimiento de las células, por lo cual se debe buscar un punto de equilibrio en donde las células presentes tengan los nutrientes y el espacio necesarios para poder replicarse y proliferar. Esto se observa claramente en las concentraciones de las dos líneas celulares (HeLa y SiHa) de entre 10000 y 40000 células/ml, donde se observa crecimiento celular constante, y decae al haber escases de nutrientes en los últimos días de ensayo. Sin embargo esto no ocurrió en pozos con concentración de 5000 células/ml debido a que las células se encontraban muy dispersas unas de otras debido a la baja concentración, esto impide la comunicación que debe existir entre células, por consiguiente la muerte celular. Estas señales entre células adyacentes ejercen su influencia en la célula receptora mediante activación de vías de transducción para que la célula active los factores de transcripción necesarios para las funciones celulares (93). Proteínas como las conexinas presentes en células HeLa juegan un papel importante en la interacción célula a célula, dado que permite su sincronización eléctrica, migración y transferencia de materiales celulares (94). Muchos estudios ha descrito el papel importante de la comunicación entre células de cáncer, una comunicación intracelular humoral y mediada por contacto celular, involucradas en diversas funciones celulares. Para las células tumorales, estas comunicaciones son dadas por los oncogenes. En un organismo multicelular, el crecimiento de un tumor canceroso es en parte a la comunicación homóloga entre una célula sana o una cancerosa y heteróloga entre células de sanas y precancerosas (95).



## 6. CONCLUSIONES

- En este trabajo se identificó la presencia de cristales de la cepa *Bt neoleonensis*, estos fueron purificados y cuantificados obteniéndose 22.74 ug/mL. Además, se encontró que la cepa es sensible a tetraciclina y gentamicina.
- Se cultivaron las líneas celulares HeLa y SiHa, las células HeLa tuvieron mayor capacidad de supervivencia porque a partir de  $1 \times 10^6$  células/mL se obtuvo una confluencia de aproximadamente 90% a los 4 días del ensayo.
- 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.
- Este trabajo aporta 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.

## 7. RECOMENDACIONES

Se recomienda realizar la prueba de SDS-PAGE para verificar síntesis de PS en la cepa *Bt neoleonensis*.

Se recomienda realizar pruebas de citotoxicidad con los cristales purificados de *Bt neoleonensis*

## REFERENCIAS

1. Salazar A, Lima MA, de Azevedo Souza VL, de Lourdes M. El cáncer de cuello de útero: un problema social mundial. *Revista Cubana de Enfermería*. 2012; 28(1): p. 63-37.
2. Martínez Gómez M. INFORME DE EVENTO CÁNCER DE MAMA Y CUELLO UTERINO. Instituto Nacional de Salud; 2018.
3. Organización mundial de la salud. [Online].; 2015 [cited 2019 06 09. Available from: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/women-s-health>.
4. Muñoz N, Bravo LE. Epidemiology of cervical cancer in Colombia. *Colombia Médica*. 2012 Sep; 43(4).
5. Heather C. Diseases associated with human papillomavirus infection. *VIROLOGY*. 2013 Oct; 445(1): p. 21-34.
6. Isacaz N. Cambios genéticos y factores de riesgo del cáncer. Elsevier. 2018 Aug 03.
7. Orozco Flórez VM, Caicedo Montaña CA. ROL DE LA TELOMERASA EN LA CARCINOGENESIS Y EN EL ENVEJECIMIENTO PREMATURO. *Rev. Medica.Sanitas*. 2016 Mar 07; 19(1): p. 36-43.
8. Ávila Mora C, Sansarí Baro JT, Pavón Gómez V. Genes en el cáncer de cuello uterino. *Scielo*. 2013 Mar; 17(1).
9. Soca Miguel P, Almaguer Herrera A, Ponce de León D, Sales Márquez H, Pérez Rodríguez H. El cáncer una enfermedad genética. *Correo Científico Médico de Holguín*. 2007; 11(3).
10. Vacunas contra el virus del papiloma humano. 2009 Apr 10: p. 117-132.
11. Vacunación contra el Virus Papiloma humano - VPH en Colombia, para la prevención del cáncer de cuello uterino y verrugas genitales. Ministerio de Salud y protección Social. ;: p. 1-5.
12. Varela Martínez S. Citología Cervical. *Rev Med Hondur*. 2005; 73(1): p. 131-136.
13. Restrepo HE GJRELJ. Epidemiología y control del cancer del cuello uterino en America Latina y el Caribe. *Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana (OSP)*. 1987 Jun; 102(6).
14. La Hoz-Restrepo D AGNNJCPL. Evaluación de la Carga de Enfermedad por el Virus del Papiloma Humano en Bogotá. *Revista de Salud Pública. SCIELO*. 2009; 11: p. 454-67.
15. Secular trends of HPV genotypes in invasive cervical cancer in Cali, Colombia 1950–1999. 2016 Jun: p. 173-178.
16. Portela-Dussán DD, Chaparro-Giraldo A, López-Pazos SA. La biotecnología de *Bacillus thuringiensis*. 2013 Dec: p. 87-95.
17. Ibrahim MA, Griko , Junker , Bulla LA. *Bacillus thuringiensis* A genomics and proteomics perspective. *BioengineeredBugs*. 2010 Feb; 1(1): p. 31-50.
18. Sauka , Benintende G. *Bacillus thuringiensis*: generalidades. *Revista Argentina de Microbiología*. 2008; 40: p. 124-140.
19. Kitada S, Abe Y, Hiroyasu S, Kusaka Y, Matsuo Y, Katayama H, et al. Cytocidal Actions of Parasporin-2, an Anti-tumor Crystal Toxin from *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Biological Chemistry*. 2006 Sep 8; 281(36): p. 26350-26360.

20. Aboul-Soud MAM, Al-Amri MZ, Kumar , Al-Sheikh YA, Ashour AE, El-Kersh TA. Specific Cytotoxic Effects of Parasporal Crystal Proteins Isolated from Native Saudi Arabian *Bacillus thuringiensis* Strains against Cervical Cancer Cells. *molecules*. 2019 Jan 31; 24(3): p. 506.
21. García Díaz R. ESTADO DEL ARTE DE LA ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA DE PROTEÍNAS PARASPORINAS DEL *Bacillus thuringiensis*. Universidad Nacional de Colombia. 2017;; p. 10-11.
22. Ochoa Silvera AA, Mujica Lengua FR. Actividad Letal in vitro del Extracto Proteico Total de *Bacillus thuringiensis* sobre Huevos y Larva (L3) Infecciosas de *Nematodirus Spathiger*. *Rev. investig. vet.* 2015; 26(3).
23. 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.
24. HADJ BOUAZZA S. PRODUCTION DE P ARASPORINE BACTÉRIENNE À ACTIVITÉ ANTICANCÉREUSE DANS DES MILIEUX DE GRADE PHARMACEUTIQUE. Francia: UNIVERSITÉ DU QUÉBEC; 2016 Apr.
25. Ohba M, Mizuki E, Uemori A. Parasporin, a New Anticancer Protein Group from *Bacillus thuringiensis*. *Anticancer Research*. 2009 Jan; 29(1): p. 427-433.
26. Masters JR. HeLa cells 50 years on: the good, the bad and the ugly. *Nature Reviews Cancer*. 2002 Apr; 2(4): p. 315-319.
27. Carrera Páez LC, Pirajan Quintero ID, Urrea Suarez MC, Gómez Jimenez M, Monroy Cano LA, Sanchez Mora RM. Comparación del cultivo celular de HeLa y HEP-2. *NOVA*. 2015 Jun; 13(23).
28. 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.
29. A Ibrahim M, Griko N, Junker , A Bulla. *Bacillus thuringiensis*. *Bioeng Bugs*. 2010 Feb; 1(1): p. 31-50.
30. Lee DW, Akao T, Yamashita S, Katayama H, Maeda M, Saitoh H, et al. Noninsecticidal Parasporal Proteins of a *Bacillus thuringiensis* Serovar *shandongensis* Isolate Exhibit a Preferential Cytotoxicity against Human Leukemic T Cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2000 Apr 20;; p. 218-223.
31. Yamashita S, Akao T, Mizuki E, Saitoh H, Higuchi K, Parque Y, et al. Characterization of the anti-cancer-cell parasporal proteins of a *Bacillus thuringiensis* isolate. *Canadian Journal of microbiology*. 2000 Oct; 46(10): p. 913-9.
32. Kim S, Yamashita S, Akao T, Saitoh H, Higuchi K, Parque Y, et al. In vitro cytotoxicity of non-cyt inclusion proteins of a *Bacillus thuringiensis* isolate against human cells, including cancer cells. *Journal of applied microbiology*. 2000 Jun; 89(1): p. 16-23.
33. Saitoh H, Okumura S, Ishikawa T, Akao T, Mizuki E, Ohba M. Investigation of a novel

- Bacillus thuringiensis* gene encoding a parasporal protein, parasporin-4, that preferentially kills human leukemic T cells. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2006 Dec 7; 70(12).
34. Jung Y, Mizuki E, Akao T, Cote J. Isolation and characterization of a novel *Bacillus thuringiensis* strain expressing a novel crystal protein with cytotoxic activity against human cancer cells. *Journal of Applied Microbiology*. 2007 Feb 16; 103(1).
  35. Nadarajah V, Ting D, Chan K, Mohamed S, Kanakeswary K, Lee H. Selective cytotoxic activity against leukemic cell lines from mosquitocidal *Bacillus thuringiensis* parasporal inclusions. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 2008 Mar; 39(2): p. 235-45.
  36. Moazamian E, Bahador N, Azarpira N, Rasouli M. Anti-cancer Parasporin Toxins of New *Bacillus thuringiensis* Against Human Colon (HCT-116) and Blood (CCRF-CEM) Cancer Cell Lines. *Curr Microbiol*. 2018 Aug; 75(8): p. 1090-1098.
  37. Chubicka T, Girija D, Deepa K, Salini S, Meera N, Raghavamenon A, et al. Una parasporina de *Bacillus thuringiensis* nativa de la India peninsular induce la apoptosis en las células cancerosas a través de la vía intrínseca. *J Biosci*. 2018 Jun; 43(2): p. 407-416.
  38. Aboul-Soud M, Al-Amri M, Kumar A, Al-Sheikh Y, Ashour A, El-Kersh T. Specific Cytotoxic Effects of Parasporal Crystal Proteins Isolated from Native Saudi Arabian *Bacillus thuringiensis* Strains against Cervical Cancer Cells. *Molecules*. 2019 Jan 31; 24(3).
  39. Realpe M, Montoya D, Orduz S. RESEÑA BIBLIOGRÁFICA BACILLUS THURINGIENSIS: LEGADO PARA EL SIGLO XXI. REVISTA COLOMBIANA DE BIOTECNOLOGIA. 1998;: p. 11-27.
  40. Schnepf E, Crickmore N, Van Rie J, Lereclus D, Baum J, Feitelson J, et al. *Bacillus thuringiensis* and Its Pesticidal Crystal Proteins. AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY. 1998; 62(3): p. 775-806.
  41. Soberón M, Bravo A. *Bacillus thuringiensis* y sus toxinas insecticidas. Instituto de Biotecnología. ;: p. 510-3.
  42. Vilas-Bôas GT, Alvarez RC, dos Santos CA, Vilas-Boas LA. Factores de Virulência de *Bacillus thuringiensis* Berliner: O Que Existe Além das Proteínas Cry? *EntomoBrasilis*. 2012 Apr; 5(1): p. 1-10.
  43. OHBA M, MIZUKI , UEMORI. Parasporin, a New Anticancer Protein Group from *Bacillus thuringiensis*. *ANTICANCER RESEARCH*. 2009;(29): p. 427-434.
  44. Flores Cervantes A, Ayala Jimenez H, Ruiz Padilla A, Puga Morfin B, Andrade Urzúa MF, Delgado Virgen F. Aislamiento, identificación y evaluación de la actividad bioinsecticida de una cepa de *Bacillus thuringiensis* nativa del estado de Colima. *Memorias del Congreso Internacional de Investigación Academia Jorunals en Tecnologías Estratégicas Colima 2016*. 2016 Oct.
  45. Velasquez LF, Rojas D, Ceron J. Proteínas de *Bacillus thuringiensis* con actividad citotóxica: Parasporinas. *Colombiana Biotecnología*. 2018 Nov; 20(2): p. 89-100.
  46. Del Toro de Leon G. Caracterización del espectro de acción de la toxina Cry1AbMod, activa contra insectos resistentes, y su comparación con la toxina convencional Cry1Ab

- de *Bacillus thuringiensis*. 2010: p. 10-13.
47. ESPINO VÁZQUEZ AN. CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA DE PARASPORINAS EN CEPAS NATIVAS DE *Bacillus thuringiensis*. 2014: p. 11-14.
  48. DEL CARMEN RETA ALDABA F. PREDICCIÓN in silico DE LOS DOMINIOS ESTRUCTURALES DE LAS TOXINAS DE PS2Aa1 Y PS4Aa1 IMPLICADOS EN EL MODO DE ACCIÓN HACIA CÉLULAS HUMANAS ANORMALES. 2017: p. 4-6.
  49. da Costa Lamar D. EXPRESSÃO DE PROTEÍNA PARASPORINA 2 (PS2) DE *BACILLUS THURINGIENSIS* EM CÉLULAS DE INSETO E ANÁLISE DE SUA TOXICIDADE PARA CÉLULAS TUMORAIS E DE INSETOS. 2016: p. 30-37.
  50. Okumura S, Saitoh H, Ishikawa T, Inouye K, Mizuki E. Mode of action of parasporin-4, a cytotoxic protein from *Bacillus thuringiensis*. Elsevier. 2010 Jul; 1808: p. 1493-1501.
  51. Akiba T, Okomura S. Parasporins 1 and 2: Their structure and activity. Elsevier. 2017 Jan; 142: p. 44-49.
  52. ABE Y, INOUE H, ASHIDA H, MAEDA Y, KINOSHITA T, KITADA S. Glycan region of GPI anchored-protein is required for cytotoxic oligomerization of an anticancer parasporin-2, Cry46Aa1 protein, from *Bacillus thuringiensis* strain A1547. *Journal of Invertebrate Pathology*. 2017 Jan; 142: p. 71-81.
  53. R. RdM. Manual nacional de normas y procedimientos para la prevención y el control del cáncer de cuello uterino. In Manual nacional de normas y procedimientos para la prevención y el control del cáncer de cuello uterino. 2010: p. 16-54.
  54. Sanabria Negrín JG, Fernández Montequín ZC, de la Caridad Cruz Hernández I, Oriolo Pérez L, Llanuch Lara M. El cáncer cervicouterino y las lesiones precursoras: revisión bibliográfica. *Rev Ciencias Médicas*. 2011 Dec; 15(4).
  55. Diestro Tejeda D, Serrano Velasco M, Gómez-Pastrana Nieto F. Cáncer de cuello uterino. Estado actual de las vacunas frente al virus del papiloma humano (VPH). *Oncología*. 2007; 30(2).
  56. Lau Serrano D, Millán Vega MM, Fajardo Tornés Y, Sánchez Alarcón C. Lesiones preinvasivas del cuello uterino. *Rev Cubana Obstet Ginecol*. 2012 Sep; 38(3).
  57. Chunbo H, Xiangmin L, Cong Huang B, Rueda R, Davis Cheng Wang JS. A Human Papillomavirus-Independent Cervical Cancer Animal Model Reveals Unconventional Mechanisms of Cervical Carcinogenesis. *Cell reports*. 2019 Mar; 26(10): p. 2636-2650.
  58. SCHIFFMAN M, CASTEL P, JERONIMO J, RODRIGUEZ A, WACHOLDER S. Human papillomavirus and cervical cancer. *The lancet*. 2007 Sep; 370(9590): p. 890-907.
  59. Vallejo-Ruiz V, Velázquez-Márquez , Sánchez-Alonso , Santos-López G, Reyes-Leyva J. La oncoproteína E7 del virus de papiloma humano y su papel en la transformación celular. *Rev Med Inst Mex Seguro*. 2015 May.
  60. Raúl Arévalo A, Arévalo Salazar DE, Villarroel Subieta CJ. EL CÁNCER DE CUELLO UTERINO. *Rev. Méd. La Paz*. 2017; 23(2).
  61. Sanabria Negrín JG. Virus del Papiloma humano. 2009 Sep;: p. 1-23.
  62. RINCO O, RENE PAREJA L, JARAMILLO S, ARISTIZABAL B. VIRUS DEL

PAPILOMA HUMANO, RESPUESTA INMUNE Y CANCER CERVICAL: UNA RELACION COMPLEJA. REV. COLOMBIANA DE OBSTETRICIA Y GINECOLOGIA. 2007 Aug 17; 58(3): p. 202-212.

63. Social MdSyP. Guía de Práctica Clínica para la detección y manejo de lesiones precancerosas de cuello uterino; 2014.
64. Gomez A. sites.google. [Online].; 2011 [cited 2019 09 30. Available from: <https://sites.google.com/a/sanmartinpasto.com/s1120113/home/signos>.
65. Marañón Cardonne T, Mastrapa Cantillo K, Flores Barroso Y, Vaillant Lora L, Landazuri Llago S. Prevención y control del cáncer de cuello uterino. ccm. 2017 Mar; 21(1).
66. Varela Martínez S. Citología Cervical. Rev. Medica Honduras. 2005 Aug; 73(3): p. 131-136.
67. de Araujo Pinho A, Iwama de Mattos MC. Validade da citologia cervicovaginal na detecção de lesões pré-neoplásicas e neoplásicas de colo de útero. Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial. 2002 Apr 25;; p. 225-235.
68. Rengifo E. NIC: Colposcopia y biopsia dirigida en el diagnóstico de lesiones iniciales del cuello uterino. Revista Peruana de Ginecología y Obstetricia. 2015 Jun; 44(2): p. 92-96.
69. PATH. Detección y tratamiento de lesiones precancerosas. [Online]. [cited 2019 09 30. Available from: <http://www.rho.org/aps/learn-screening.htm>.
70. Sellors J, Sankaranarayanan R. La colposcopia y el tratamiento de la neoplasia intraepitelial cervical:Manual para principiantes; 2003.
71. Boldrini , Chiloiro G, Pesce , Romano , Teodoli , Placidi , et al. Hybrid MRI guided radiotherapy in locally advanced cervical cancer: Case report of an innovative personalized therapeutic approach. Clinical and Translational Radiation Oncology. 2019;; p. 27-29.
72. Hamborsky J, Kroger , Wolfe C. EPIDEMIOLOGY AND PREVENTION OF VACCINE PREVENTABLE DISEASES. 2015: p. 1-7.
73. Cano-Giraldo S, Caro-Delgadillo FV, Lafaurie-Villamil MM. VIVIR CON CÁNCER DE CUELLO UTERINO IN SITU: EXPERIENCIAS DE MUJERES ATENDIDAS EN UN HOSPITAL DE RISARALDA, COLOMBIA, 2016. ESTUDIO CUALITATIVO. Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología. 2017 Jun; 68(2): p. 112-119.
74. Martínez-Carpio PA, Navarro Moreno MÁ. El cultivo celular en la investigación básica del cáncer de mama. Revista Oncologica. 2003; 5(4): p. 184-91.
75. Tavira Montalván CA, Ortega García , Dávila González , Estrada Mondaca S, Meneses Acosta A. Alcances y perspectivas del cultivo de células animales en la biotecnología farmacéutica. Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas. 2009 Dec; 40(4): p. 35-46.
76. Segretín ME. Los cultivos celulares y sus aplicaciones I (cultivos de células animales). ArgenBio. ;: p. 1-6.
77. SiHa (ATCC® HTB-35™). [Online]. [cited 2020 02 13. Available from: <https://www.atcc.org/Products/All/HTB-35.aspx>.
78. Fernández Reyes E, Galván Cejudo A. Métodos para la cuantificación de proteínas. : p. 1-

4.

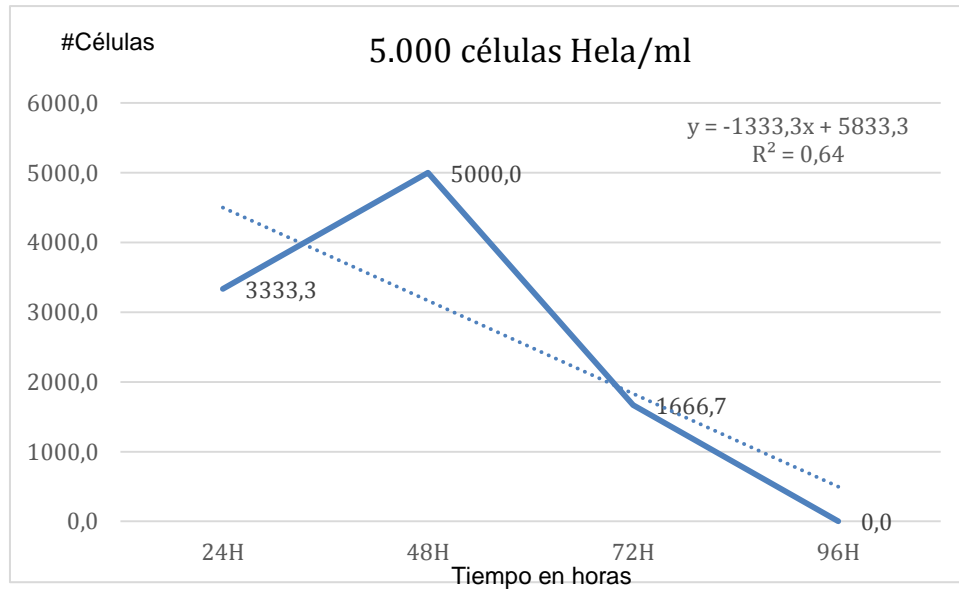
79. Minoru M, Eiichi M, Yukinobu N, Toshitake H, Michio O. Recovery of *Bacillus thuringiensis* from Marine Sediments of Japan. *CURRENT MICROBIOLOGY*. 2000 Jan; 40: p. 418–422.
80. Quesada-Moraga E, García-Tóvar E, Valverde-García P, Santiago-Álvarez C. Isolation, geographical diversity and insecticidal 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.
81. Shisa N, Wasano N, Ohgushi A, Lee D, Ohba. Extremely high frequency of common flagellar antigens between *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus*. *FEMS Microbiology Letters*, Volume 213, Issue 1, July 2002, Pages 93–96. 2002 Jul; 213(1).
82. RENÉ CUELLAR GÓMEZ. PRODUCCIÓN DE CEPAS DE *BACILLUS THURINGIENSIS* CON ACTIVIDAD. 1996: p. 18-22.
83. Calderon MDPH. eduteka. [Online].; 2012 [cited 2020 02 13. Available from: <http://eduteka.icesi.edu.co/proyectos.php/1/5046>.
84. Vazquez Pineda A, Bravo-de-la-Parra A, Mendoza-de-Gives P, Liébano-Hernández E, Hernández-Linares I, Yáñez-Pérez N, et al. Uso de productos derivados de *Bacillus thuringiensis* como alternativa de control en nematodos de importancia veterinaria. *Revisión. Rev. mex. de cienc. pecuarias*. 2012 Mar; 3(1).
85. Brasseur K, Auger P, Asselin E, Parent S, Côté J, Sirois M. Parasporin-2 from a New *Bacillus thuringiensis* 4R2 Strain Induces Caspases Activation and Apoptosis in Human Cancer Cells. *PLoS One*. 2015 Aug 11; 10(8).
86. E. M, M. , T. A, S. , H. S, YS S. Unique activity associated with non-insecticidal *Bacillus thuringiensis* parasporal inclusions: in vitro cell-killing action on human cancer cells. *Journal of Applied Microbiology* 1999, 86, 477–486. 1999 Nov 05; 86: p. 477-486.
87. Xiaohong W, Minkui , Yanfen , Xin Z, Fuhua. Effects of DMEM and RPMI 1640 on the biological behavior of dog periosteum-derived cells. *Cytotechnology*1. 2009 Jun 4; 59(2): p. 103-111.
88. Ginsberg HS GEJJW. Tryptose phosphate broth as supplementary factor for maintenance of HeLa cell tissue cultures. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. 1995 May; 89(1): p. 66-70.
89. Caro Maldonado A. Mecanismos celulares de la muerte celular inducida por privación de la glucosa. Tesis Doctoral..
90. Meenakshi A. Medios de cultivo celular: una revisión. *Labome*. 2018 May 24.
91. Martin Piedra MA. Evaluacion de los perfiles de viabilidad celular de células madre de la pulpa dental y de la gelatina de Wharton como control de calidad para su uso en Ingeniería Tisular. tesis. Universidad de Granada ; 2014.
92. ESCOBAR M L, RIVERA , ARISTIZÁBAL G FA. ESTUDIO COMPARATIVO DE LOS MÉTODOS DE RESAZURINA Y MTT EN ESTUDIOS DE CITOTOXICIDAD EN LÍNEAS CELULARES TUMORALES HUMANA. 2010; 17(1): p. 68-74.

93. Jeffrey W C, Dan L. L. Harrison principios de la Medicina Interna. 19th ed.
94. Rimkute L, Jotautis V, Marandykina A, Sveikatiene R, Antanaviciute I, Arvydas S. El papel de las conexinas neuronales en la movilidad de las células HeLa y la comunicación intercelular a través de tubos de túnel. 2012 Jan 13; 17(3).
95. H. Yamasaki MM, YO,M,K. Comunicación intercelular y carcinogénesis. 1995; 333(1 y 2): p. 181-188.

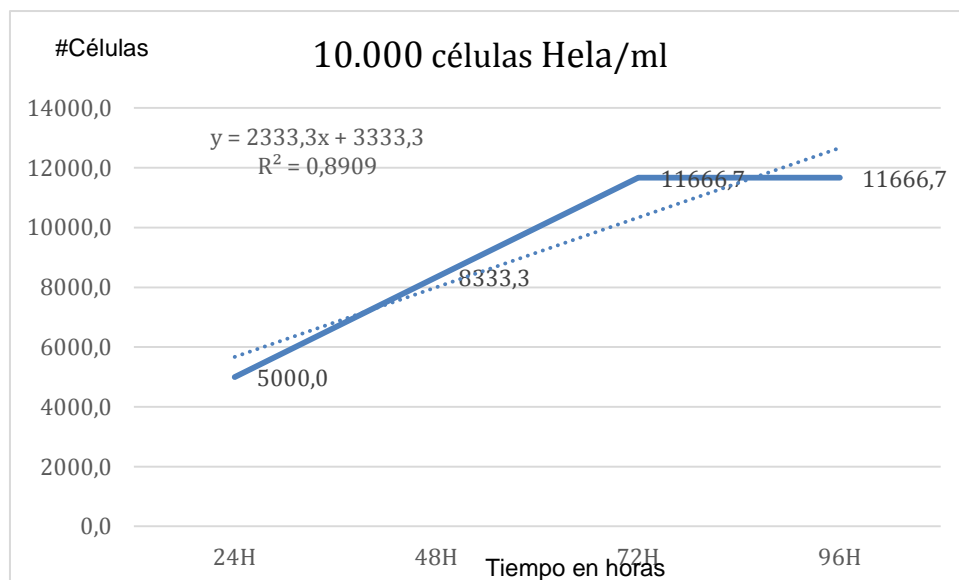


## ANEXOS

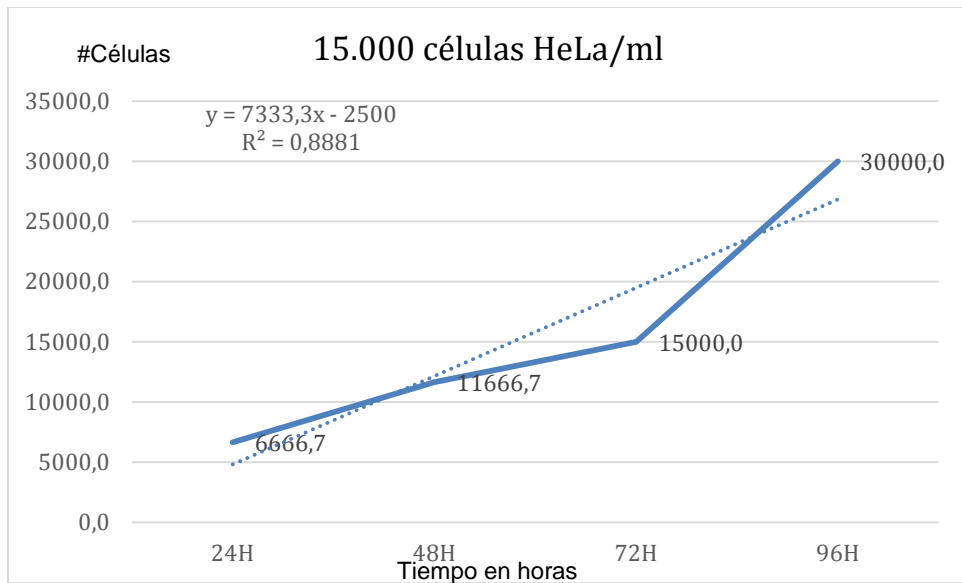
Curvas de viabilidad celular de células HeLa y SiHa.



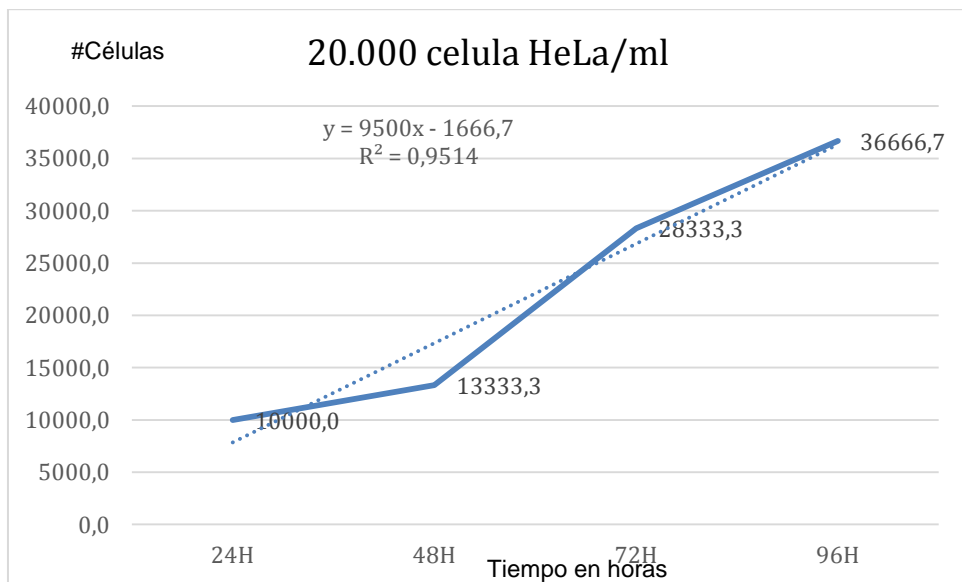
Células HeLa con concentración de 5000 células/ml por triplicado. Se observa decaimiento de crecimiento celular a las 72 horas finalizando con una confluencia del 0%.



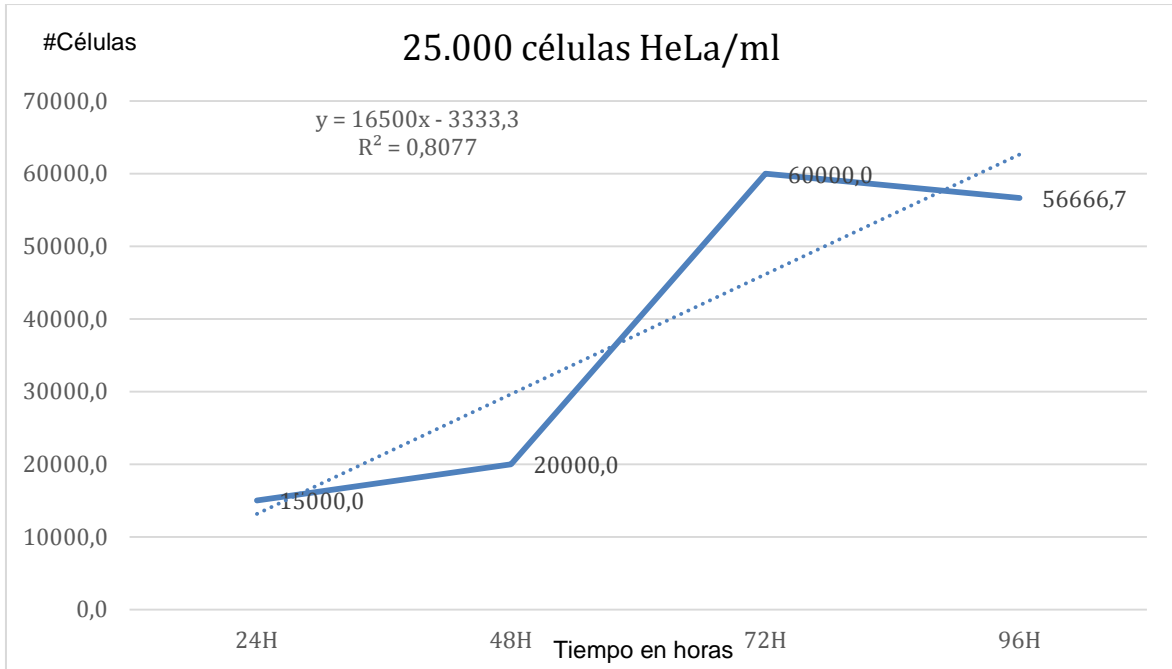
Células HeLa de concentración 10000 células/ ml. Se observa un pico de crecimiento durante los primeros 3 días llegando a fase estacionaria al cuarto día.



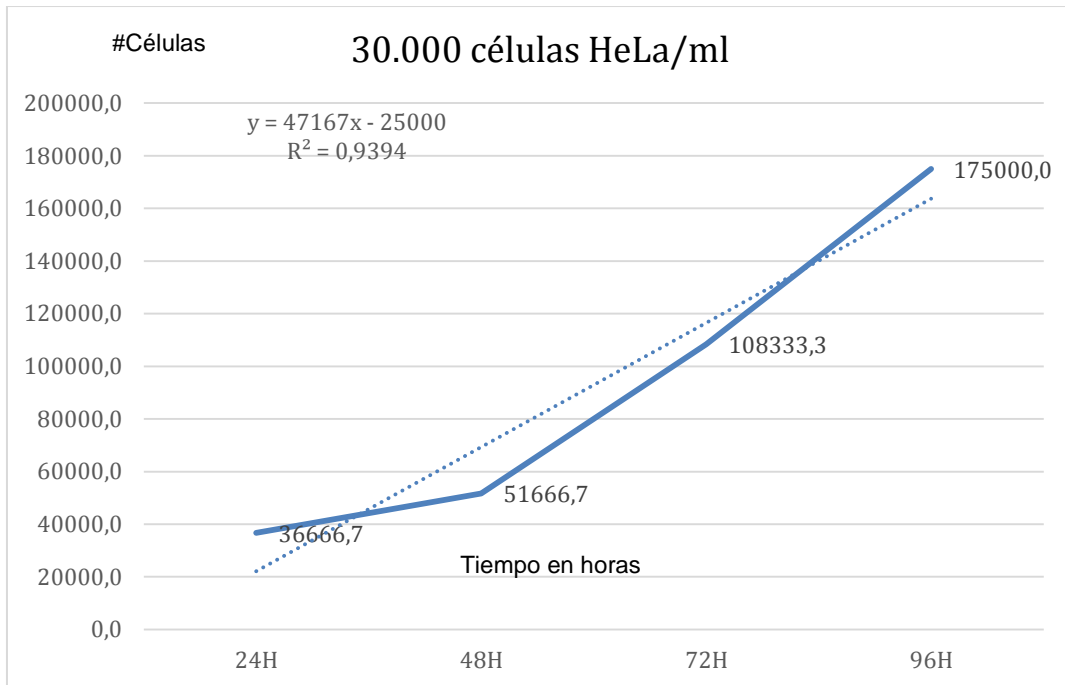
Células HeLa de concentración 15000 células/ ml. Se observa crecimiento lento de la línea celular con un pico máximo al 5 día de incubación



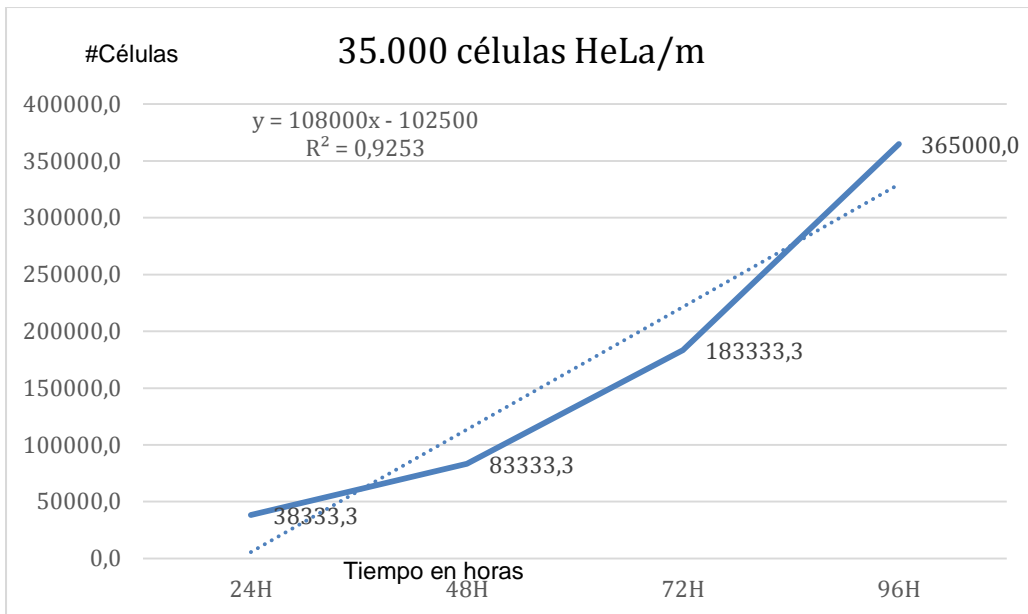
Células HeLa de concentración 20000 células/ml. Se observa crecimiento lento durante los 4 días de incubación.



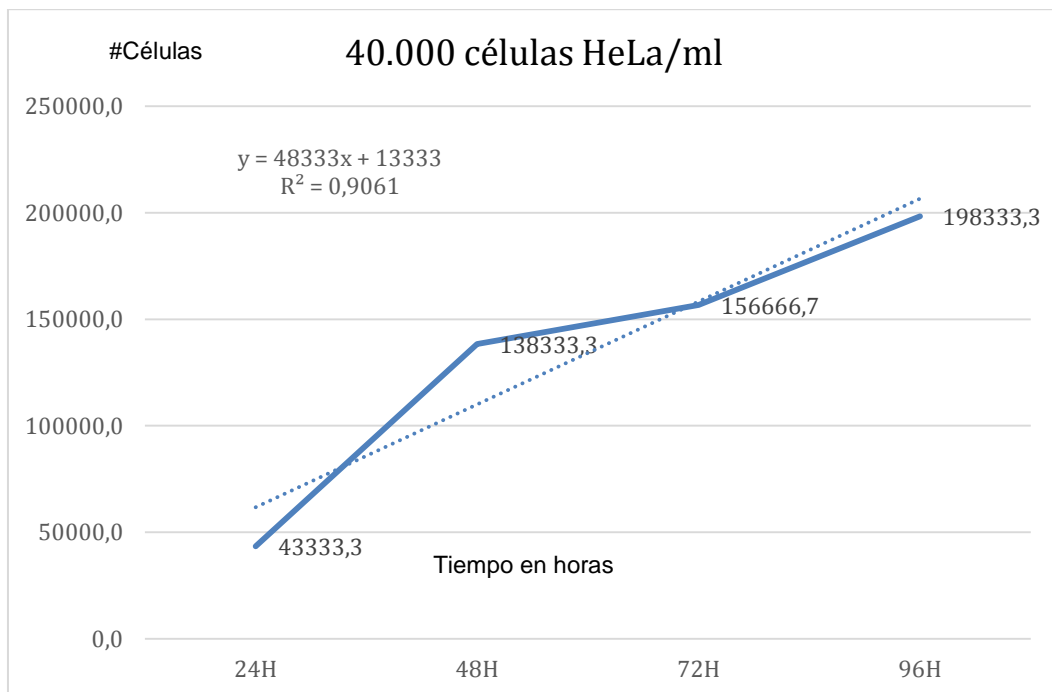
Células HeLa de concentración 25000células/ml. Se aprecia pico máximo de crecimiento a las 72 horas de incubación.



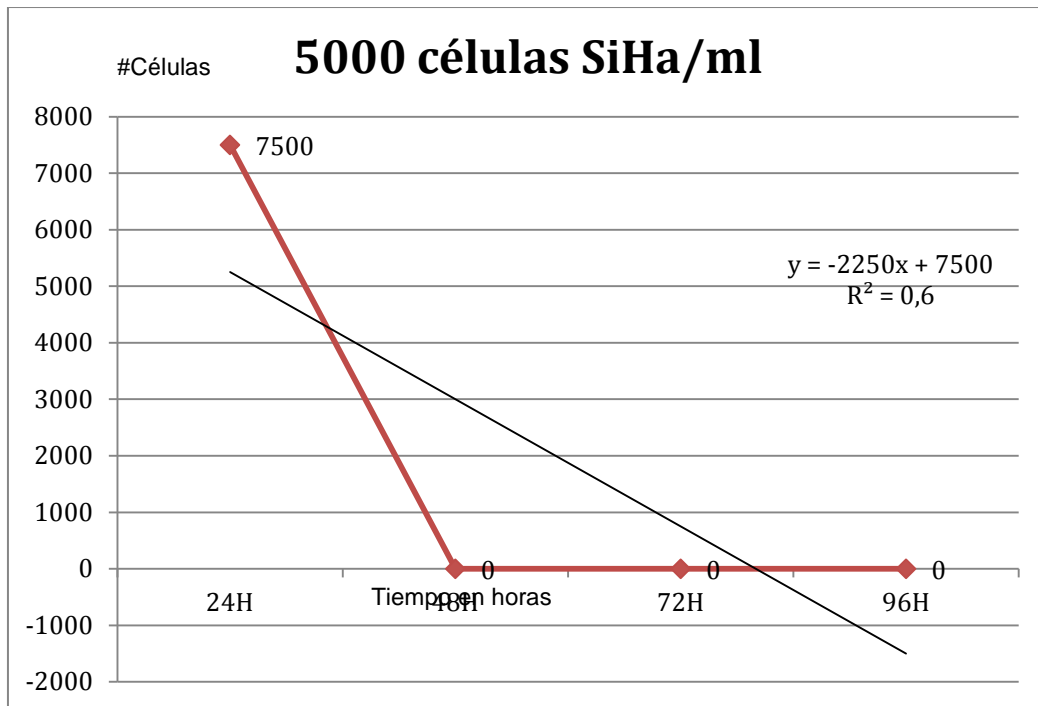
Células HeLa de concentración 30000células/ml. Crecimiento exponencial desde las 48 horas de incubación



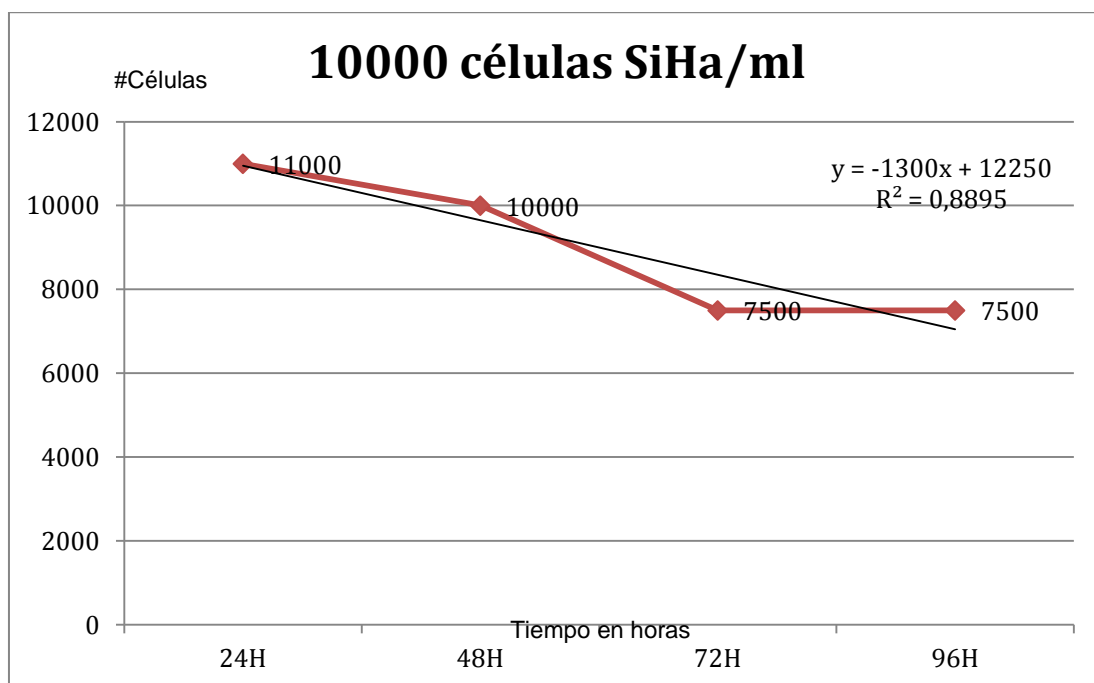
Células HeLa de concentración 35000 células/ml. Se observa crecimiento rápido de células a partir de las 24 horas de incubación, llegando a 365000células/ml a las 96 horas.



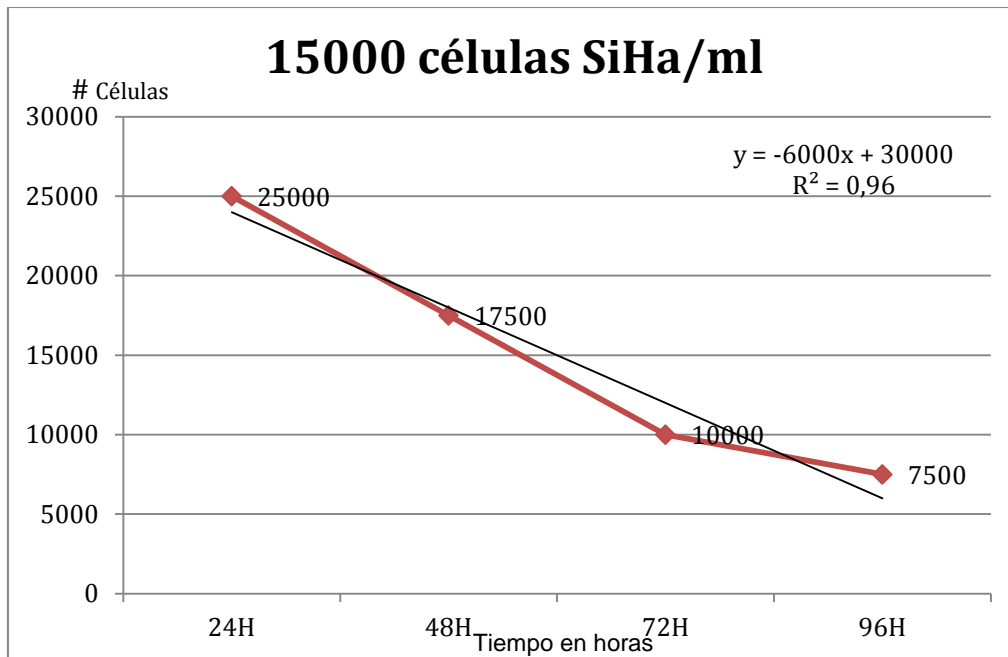
Crecimiento de células HeLa con concentración de 40000células/ml. Se observa crecimiento exponencial desde las 24 horas de incubación, con un máximo de 198333 células a las 96 horas.



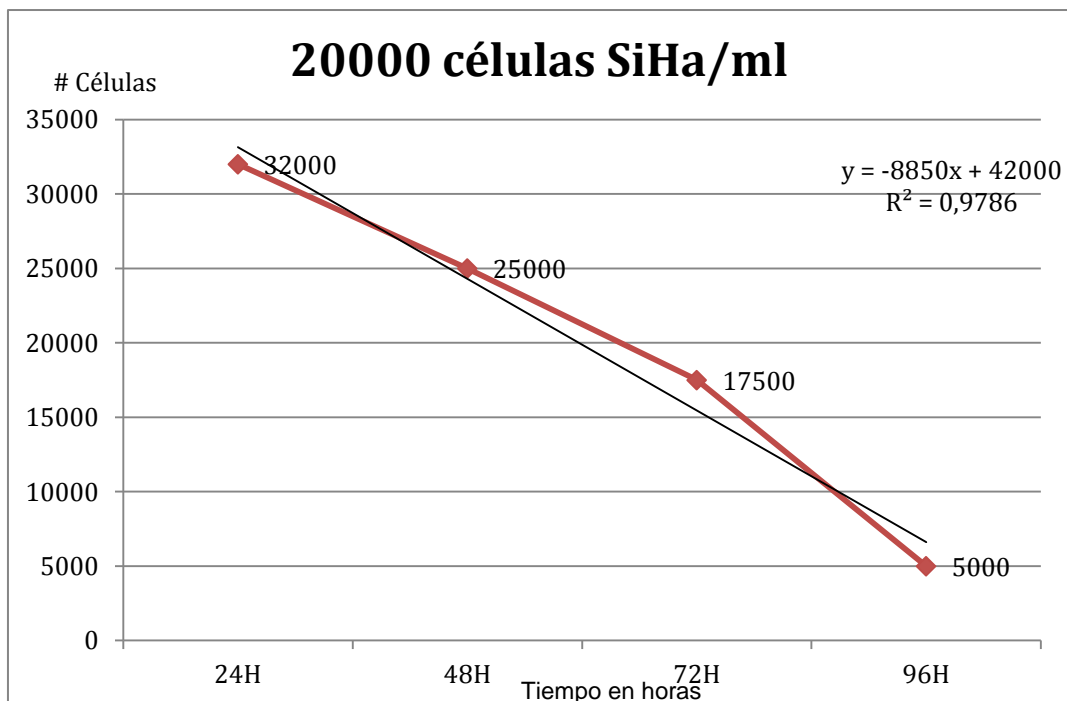
Crecimiento de células SiHa con concentración de 5000 células/ml. Se observa muerte celular a las 48 horas de incubación.



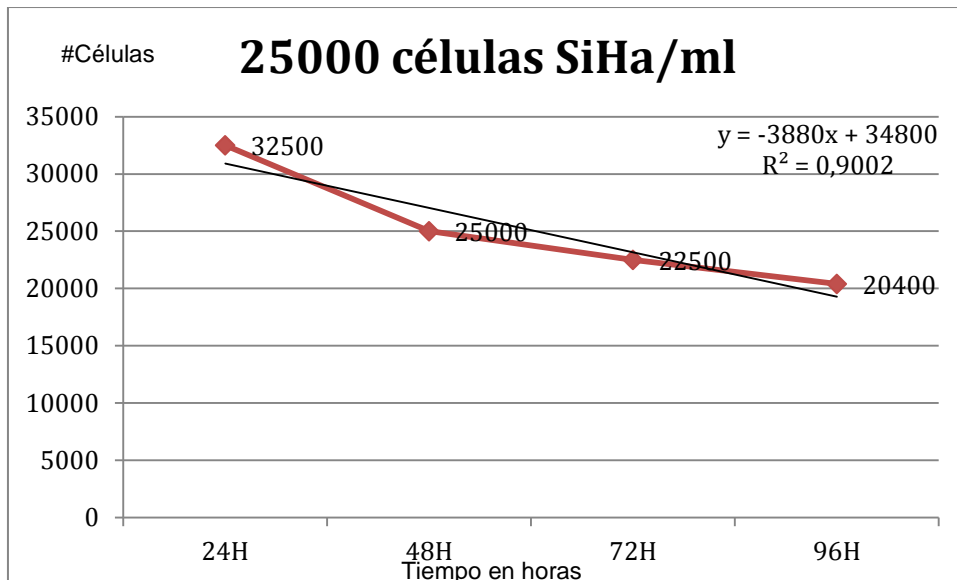
Crecimiento de células SiHa con concentración de 10000 células/ml. Se observa descenso de viabilidad celular a partir de las 72 horas.



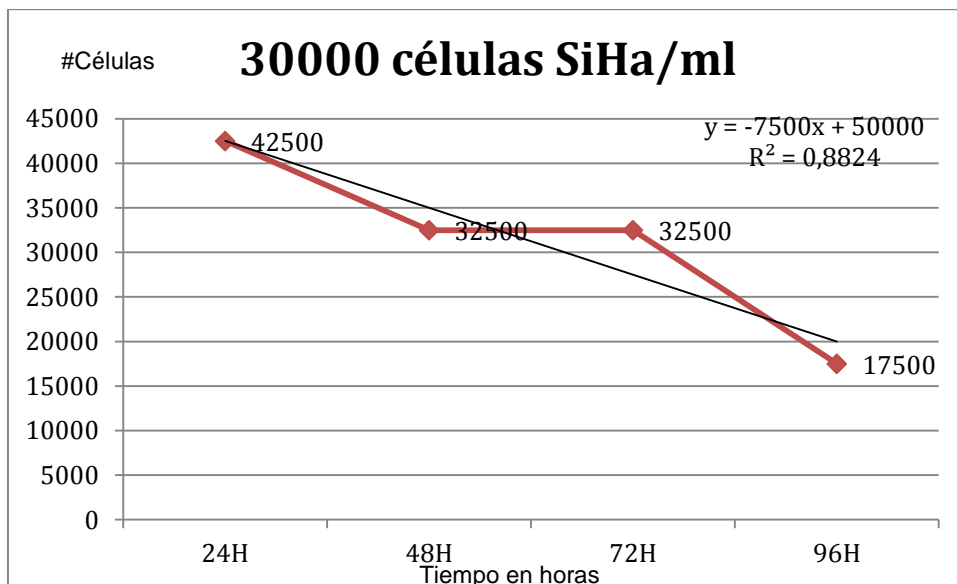
Crecimiento de células SiHa con concentración de 15000 células/ml. El crecimiento de las células desciende desde las 48 horas de incubación.



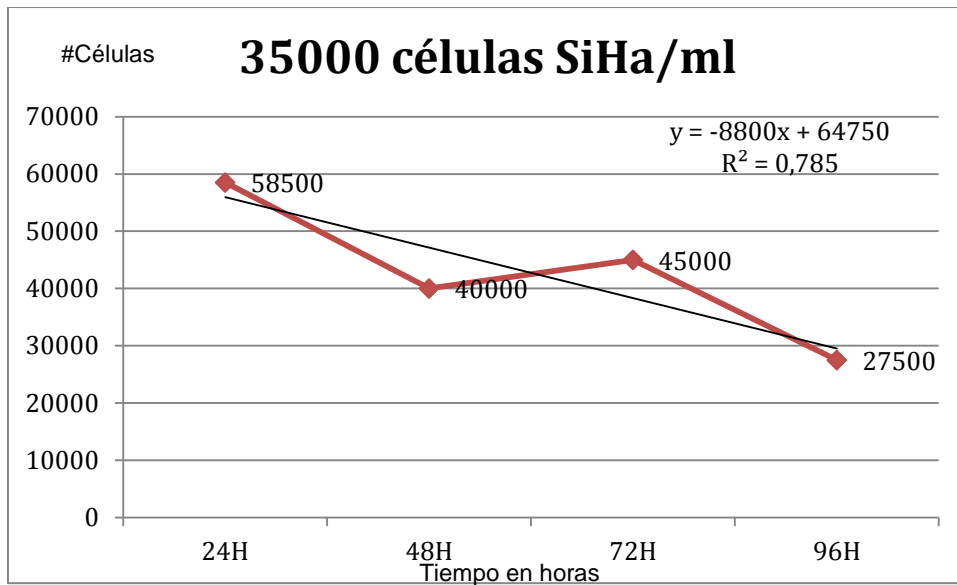
Crecimiento de células SiHa con concentración de 20000 células/ml. Crecimiento en descenso después de 48 horas.



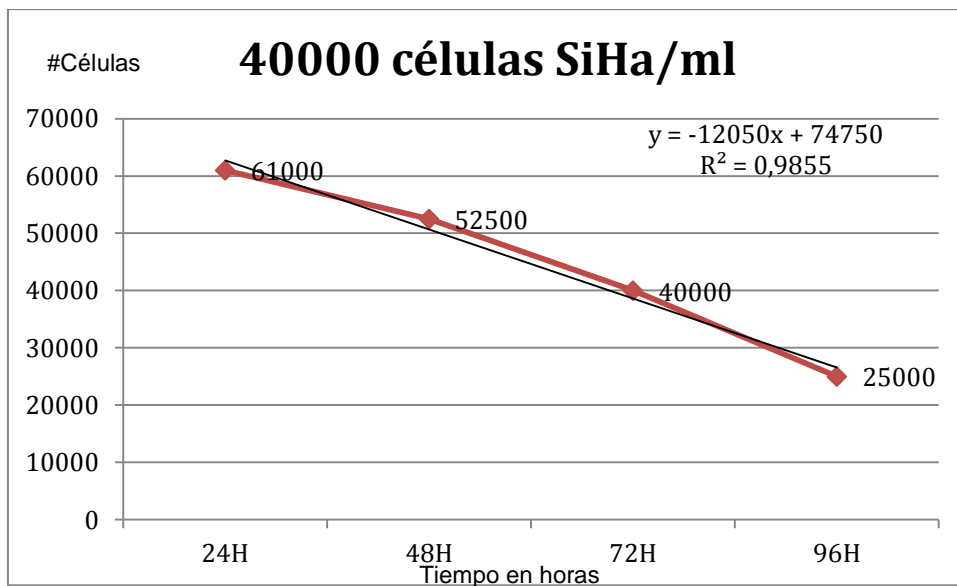
Crecimiento de células SiHa con concentración de 25000 células/ml. No se observa cambio alguno en el número de células por pozo durante los días de observación



Crecimiento de células SiHa con concentración de 30000 células/ml. Descenso de crecimiento celular después de las 72 horas de incubación.



Crecimiento de células SiHa con concentración de 35000 células/ml. Crecimiento variable de las células en diferentes pozos con misma concentración.



Crecimiento de células SiHa con concentración de 40000 células/ml. Descenso de crecimiento celular a las 48 horas de incubación.