

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



TESIS

**ANÁLISIS DE CÉLULAS HT-29 EN PRESENCIA DE FACTORES
EXTRACELULARES DE PROBIÓTICOS A TRAVÉS DE MICROSCOPIA
ELECTRÓNICA DE BARRIDO Y MICROSCOPIA DE FUERZA ATÓMICA**

**POR
MARIANA SALDAÑA FALCÓN**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ACENTUACIÓN EN MICROBIOLOGÍA
GENERAL**

ENERO, 2017

**ANÁLISIS DE CÉLULAS HT-29 EN PRESENCIA DE FACTORES
EXTRACELULARES DE PROBIÓTICOS A TRAVÉS DE MICROSCOPIA
ELECTRÓNICA DE BARRIDO Y MICROSCOPIA DE FUERZA ATÓMICA**

Comité de Tesis

Dra. María Porfiria Barrón González

Presidente

Dra. Patricia Tamez Guerra

Secretario

Dra. María Eufemia Morales Rubio

Vocal

Dr. Ramón Gerardo Rodríguez Garza

Vocal

Dra. Licet Villarreal Treviño

Vocal

Enero, 2017

**ANÁLISIS DE CÉLULAS HT-29 EN PRESENCIA DE FACTORES
EXTRACELULARES DE PROBIÓTICOS A TRAVÉS DE MICROSCOPIA
ELECTRÓNICA DE BARRIDO Y MICROSCOPIA DE FUERZA ATÓMICA**

Dirección de Tesis

Dra. María Porfiria Barrón González

Director

Dr. Jorge Luis Menchaca Arredondo

Director externo

Enero, 2017

AGRADECIMIENTOS

Dios tu amor y bondad no tienen fin, me lo has demostrado en todo momento acompañándome en cada paso tomando de mi mano.

A mi Abuela por alentarme entre sueños, sé que siempre estás aquí. Te extraño tanto

A mis Padres, que no tengo palabras para agradecer tanto amor, tanta dedicación y tanta paciencia. Por ustedes soy la mujer que soy, jamás me cansaré de agradecerles

A mi Hermanita, gracias por ser Tú

A mi Dra. María Porfiria Barrón González, gracias por tanta enseñanza, apoyo, confianza y comprensión, fue un placer trabajar a su lado, aprender de la mejor y dejarme ser parte de su equipo de trabajo. La llevo en mi corazón

Agradezco a la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL) y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por permitirme realizar este trabajo de Maestría

A los Doctores Mario Morales Vallarta, Patricia Tamez Guerra, Ricardo Gómez Flores, Bióloga Enriqueta Monreal, Dr. Humberto Carlos Hernández por permitirme trabajar a su lado, enseñarme y aconsejarme.

Dr. Jorge Luis Menchaca Arredondo, el mejor Físico con alma de Biólogo, fue un placer trabajar con usted. Usted me enseñó que no tengo límites.

A mis hermanas de la misma locura, mis amigas de CASA, gracias por siempre estar aquí.

A mis amigos de corazón, piezas claves de que me encuentre finalizando esta etapa: Adriana, Irene y Daniel. Compañeros de laboratorio, gracias por hacer cada momento difícil, cada desvelada, cada salida tarde tan divertido, gracias por las tardes de pizza. A los queridos Físicos, gracias por esas tardadas tardes y noches esperando ver esas maravillosas células. A mis amigos que escucharon una y otra vez mis historias de laboratorio. A la Dra. Adriana Elizondo y mis amigas CTN, gracias por cada palabra motivadora.

DEDICATORIAS

A mi Dios

A mi Abuela

Mis padres Jorge y Laura, espero que estén orgullosos, este trabajo es para ustedes

A mi pequeña Hermana, Laura

A mi Dra. María Porfiria Barrón González, esto va por las dos.

Mayo y Patitas

“Mientras Viva lo Haré por Ellos”

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS	IX
ÍNDICE DE FIGURAS.....	X
LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS	XIV
1. R E S U M E N.....	1
1.1 ABSTRACT	2
2. INTRODUCCIÓN	1
3. ANTECEDENTES.....	4
3.1 Generalidades	4
3.2 Relación bacterias ácido lácticas (BAL) y cáncer de colon	8
3.3 Microbiota intestinal.....	9
3.4 Metástasis	12
3.5 Tratamientos contra el cáncer.....	18
3.5.1 Elección del tratamiento.....	18
3.6 Tratamiento de elección para cáncer de colon.....	21
3.7 Microscopía	24
3.7.1 Microscopía electrónica de barrido (MEB o SEM).....	24
3.7.2 Microscopía de fuerza atómica (MFA o AFM).....	28
4. JUSTIFICACIÓN	39
5. HIPÓTESIS.....	40
6. OBJETIVOS	40

6.1 GENERAL.....	40
6.2 ESPECÍFICOS.....	40
7. MATERIAL Y MÉTODOS	41
7.1 Material biológico.....	41
7.2 Material químico.....	41
7.2.1 Preparación de soluciones y medios de cultivo	42
7.3 Probióticos	43
7.3.1 Mantenimiento	43
7.3.2 Cinética de crecimiento	43
7.3.3 Obtención de factores extracelulares de probióticos (FEP).....	45
7.3.4 Obtención del Liofilizado de los factores extracelulares de probióticos (LFEP)	46
7.4 Línea celular	47
7.5 Obtención de fibroblastos a partir de un modelo murino	48
7.6 Bioensayos	49
7.7 Estrategias/sustratos de adhesión celular.....	50
7.8 Microscopía	53
7.8.1 Microscopía electrónica de barrido (MEB / SEM).....	53
7.8.2 Microscopía de fuerza atómica (MFA o AFM).....	53
7.8.2.1 Adaptación de una esfera de vidrio a la punta del cantiléver	59
7.9 Análisis estadístico	60
8. RESULTADOS	61
8.1 Cinética de crecimiento y determinación de UFC.....	61
8.2 Unidades formadoras de colonias (UFC)	62
8.3 Liofilizados de factores extracelulares (LFE).....	63

8.4 Bioensayo	65
8.4.1 Actividad biológica de los LFE sobre HT-29	65
8.5 Observación y análisis de HT-29 al microscopio electrónico de barrido (MEB o SEM).....	71
8.5.1 Observación al MEB de células HT-29	71
8.5.2. Observación al MEB de células HT-29 en presencia de LFE- <i>L. acidophilus</i>	75
8.5.3. Observación al MEB de células HT-29 en presencia de LFE- <i>L. casei</i> ...	77
8.5.4. Análisis morfométrico de HT-29 en presencia de LFE- <i>L. casei</i> y LFE- <i>L. acidophilus</i>	78
8.6. Análisis de HT-29 al microscopio de fuerza atómica (MFA)	81
8.6.1. Evaluación del mejor sustrato para adhesión celular.....	81
8.7 Análisis morfológicos al AFM de HT-29 en presencia de LFE- <i>L. casei</i>	86
8.7.1 Análisis morfométrico	86
9. DISCUSIONES.....	97
10. CONCLUSIONES	120
11. PERSPECTIVAS	121
12. BIBLIOGRAFÍA.....	125
13. RESUMEN BIOGRÁFICO	142

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Descripción	Página
1	Incidencia y mortandad por cáncer de colon a nivel internacional y nacional.....	4
2	Proteínas que intervienen en la migración, invasión y metástasis de células de cáncer colorrectal.....	17
3	Modos de operación del AFM.....	32
4	Ventajas y desventajas de los modos de operación del AFM.....	32
5	Compilación de bioensayos realizados para la búsqueda de sustrato el cual permita la adhesión célula-sustrato y ser analizadas al AFM.....	38
6	Lista de reactivos empleados en los bioensayos.....	41
7	Listado de preparación de soluciones y medios de cultivo.....	42
8	Características de los LFE de probióticos.....	64
9	Rendimiento de células HT-29 en presencia de liofilizados de factores extracelulares de probióticos.....	65
10	Rendimiento de HT-29 en presencia de los LFEP y doxorubicina-HCl.....	69
11	Comparación del diámetro celular y longitud de protrusiones..	80
12	Comparación de crecimiento y adhesión de células HT-29 sobre diversos sustratos.....	82
13	Comparación de parámetros morfométricos de las células HT-29 control y en presencia de los LFE- <i>L. casei</i>	94

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Descripción	Página
1	Protusiones en células de cáncer de mama.....	12
2	Comparación de la presencia y distribución de lamellipodios y filopodios en una célula en desplazamiento.....	15
3	Podosomas e Invadopodios. Comparación de la actividad, composición y distribución de podosomas e invadopodios en células invasivas.....	17
4	Imagen del microscopio electrónico de barrido (MEB o SEM).....	25
5	Diagrama esquemático de un microscopio de fuerza atómica, con el sistema de detección mediante láser y fotodiodos.....	30
6	Configuración típica del microscopio de fuerza atómica.....	30
7	Procedimiento general para determinar unidades formadoras de colonias (UFC).....	45
8	Procedimiento general de liofilizado de factores extracelulares de probiótico.....	46
9	Procedimiento general para la obtención de fibroblastos de modelo murino.....	48
10	Procedimiento general del bioensayo para evaluar la actividad de los LFE-probióticos sobre la línea celular HT-29.....	49
11	Representación esquemática del escaneo de la punta del AFM en modo contacto.....	55
12	Representación esquemática del escaneo de la punta del AFM en modo no contacto.....	56
13	Representación esquemática de obtención de las curvas Fuerza-Distancia por microscopía de fuerza atómica.....	57

Continuación

14	Cinética de crecimiento de las bacterias probióticas.....	62
15	Comparación del rendimiento de UFC de probióticos.....	63
16	Aspecto macroscópico del liofilizados de factores extracelulares de probióticos.....	64
17	Análisis comparativa de la absorbancia de HT-29 en presencia de LFEP.....	67
18	Observación de la línea celular HT-29 en presencia de varios tratamientos.....	68
19	Comparación del rendimiento celular de HT-29 en presencia de LFE de probióticos.....	70
20	Micrografía de células HT-29 mediante Microscopía Electrónica de Barrido 1000X.....	71
21	Micrografía de células HT-29 mediante Microscopía Electrónica de 2000X.....	72
22	Micrografía de células HT-29 mediante Microscopia Electrónica de Barrido 4000X.....	73
23	Micrografía de células HT-29 mediante Microscopia Electrónica de Barrido 16000X.....	74
24	Micrografía de células HT-29 + LFE- <i>L.acidophilus</i> mediante Microscopia Electrónica de Barrido 400X.....	75
25	Micrografía de células HT-29 + LFE- <i>L.acidophilus</i> mediante Microscopia Electrónica de Barrido 1600X.....	76
26	Micrografía de células HT-29 + LFE <i>L. casei</i> mediante Microscopia Electrónica de Barrido 800X.....	77
27	Análisis de comparación de las dimensiones de diámetro de células HT-29.....	78

Continuación....

28	Análisis comparativo entre la longitud de las protrusiones de HT-29.....	79
29	Análisis comparativo de los parámetros morfométricos de HT 29.....	80
30	Adhesión celular.....	81
31	Observación de células HT-29 al AFM.....	83
32	Análisis de las células HT-29 analizadas con la punta aguzada del cantiléver.....	84
33	Esfera de vidrio adherida a la punta afilada al cantiléver.....	84
34	Adhesión celular. Células HT-29.....	85
35	Análisis de comparación de las dimensiones de alto y ancho de las células de HT-29 control.....	86
36	Análisis de comparación de las dimensiones de alto y ancho de las células HT-29 tratadas con LFE- <i>L. casei</i>	87
37	Análisis morfométricos de altura en HT-29 y HT-29 con LFE- <i>L. casei</i>	88
38	Análisis morfométricos correspondiente al ancho en HT-29 y HT-29 en presencia del tratamiento LFE- <i>L. casei</i>	89
39	Caracterización de las propiedades nanomecánicas mediante la técnica de nanoindentación basada en espectroscopía de fuerzas por AFM.....	90
40	Caracterización y análisis morfométrico de HT-29 en presencia del tratamiento de LFE- <i>L. casei</i> por AFM.....	91
41	Análisis comparativo de los valores de Modulo de Young....	92
42	Análisis comparativo de los valores de adhesión.....	93
43	Comparación de los parámetros morfométricos.....	95

Continuación.....

44	Comparación topológica de células.....	96
45	Células de cáncer de boca al MEB.....	106
46	Micrografías al MEB de células entéricas.....	112

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

PLGA	Ácido láctico, ácido glicólico
TCA	Ácido Tricloroacético
HAEC	Células mesoteliales aorticas humanas
CA	Cripta aberrante
CCR	Cáncer colorrectal
TC	Cultivo celular
FAO	Organización para la alimentación y agricultura
FCA	Formación de Cripta Aberrante
FE	Factores extracelulares
k	Constante de fuerza del cantiléver
D	Deflexión del cantiléver
DMSO	Dimetilsulfóxido
SDS	Dodecilsulfato sódico
F	Fuerza
KDa	Kilodaltones
μm	Micrómetros
μg	Microgramos
MEB	Microcopio electrónico de barrido
ESEM	Microscopios electrónicos de barrido ambiental
LV-SEM	Microscopio electrónico de bajo vacío
TEM	Microscopio electrónico de transmisión
FMM	Microscopio de modulación fuerza
AFM	Microscopio/Microscopía de Fuerza Atómica
nA	Nanoamperes
nm	Nanómetros
Np	Nanopartículas
Rq	Rugosidad

1. RESUMEN

El cáncer colorrectal es un importante problema de salud debido a su frecuencia de aparición y mortalidad. Es una patología que crece exponencialmente en México y el mundo debido a malos hábitos dietéticos, entre otros factores. Existen reportes que demuestran que al administrarse probióticos en cantidades adecuadas sobre patologías en humanos, tales como carcinogénesis, mutagénesis y tumores, estos ejercen un efecto benéfico en la salud del huésped, y pueden llegar a impedir o retrasar la aparición de ciertos tipos de cáncer. El campo de la mecánica celular del cáncer, tiene relación con la forma celular, la motilidad y la adhesión celular. Las diferencias entre la célula normal y células malignas es el cambio en la elasticidad de la célula en correlación con la adhesión celular mediante microscopía de fuerza atómica (AFM), el cual ha demostrado ser una poderosa herramienta para el estudio de los aspectos morfológicos de las estructuras celulares con resolución a escala nanométrica, así mismo permite realizar el análisis reológico de las células vivas; por otra parte, otra de las herramientas microscópicas empleadas en este trabajo fue el Microscopio Electrónico de Barrido (MEB) el cual crea una imagen ampliada 200,000 veces o más de la superficie de un objeto. Un problema importante en el tratamiento del cáncer es la metástasis. Las técnicas actuales desarrolladas para las mediciones de la deformidad de células individuales del cáncer ha generado una mayor comprensión de las propiedades mecánicas que intervienen en la transformación maligna y que la progresión del cáncer se caracteriza por la interrupción y/o reorganización del citoesqueleto. Por lo tanto, la determinación de la rigidez de células en el contexto de la progresión del cáncer permitirá una detección más eficaz de los cambios relacionados con el cáncer. En este trabajo, investigamos la diferencia bajo tratamiento con factores extracelulares de probióticos (*L. casei*, *L. acidophilus*, *L. plantarum* y *B. longum*) a diferentes concentraciones (26, 13, 7 y 3.5 mg/mL) en la línea celular HT-29 y como control negativo la doxorubicina-HCl. Donde *L. casei*, *L. plantarum* y *B. longum* no tuvieron diferencia significativa entre ellas pero comparada contra el control químico hubo un mayor efecto citotóxico donde la inhibición de crecimiento de la línea celular HT-29 fue marcada. Así como también se realizaron análisis mediante varias microscopias (AFM y MEB) que nos permitieron observar el daño mecánico estructural sobre la línea celular, de igual forma nos muestran que la progresión del cáncer se caracteriza por la interrupción y/o reorganización del citoesqueleto esto mediante la observación de alteraciones en las protrusiones celulares tipo filopodio, lamellipodia y invadopodios / podosomes. Los resultados nos permiten concluir que los LFE tienen actividad citotóxica y causan daño mecánico a la línea celular HT-29 cáncer de colon humano

1.1 ABSTRACT

Colorectal cancer is a major health problem because of its high frequency of occurrence and mortality. It is a pathology that grows exponentially in Mexico and the world due to the adoption of poor dietary habits and keeping harmful habits. It has been reported that when administered amount probiotics in adequate on pathologies in humans, such as carcinogenicity, mutagenicity and tumors exert a beneficial effect on the health of the host, they may even prevent or delay the onset of certain cancers. The field of mechanical cell cancer, is related to cell shape, motility and adhesion and also the behavior of the main components of the cytoskeleton. The differences between normal cells and malignant cells is the change in the elasticity of the cell correlates with cell adhesion and cytoskeleton organization by atomic force microscopy (AFM), which has proven to be a powerful tool for studying morphological aspects of cellular structures with resolution at the nanometer scale and rheological analysis of living cells and Scanning Electron Microscope (SEM) which creates an enlarged image of the surface of an object that can magnify objects 200,000 times or more . The most important problem for treatment of cancer is a metastasis. Current techniques developed for measurements of deformity of individual cancer cells has generated a better understanding of the mechanical properties involved in malignant transformation and cancer progression is characterized by disruption and / or cytoskeletal reorganization. Therefore, determining the stiffness of cells in the context of cancer progression enable more effective detection of cancer-related changes. In this paper, we investigate the difference in treatment with extracellular factors probiotics (*L. casei*, *L. acidophilus*, *L. plantarum* and *B. longum*) at different concentrations (26, 13, 7 and 3.5 mg / mL) in the cell line HT-29 as a negative control and Doxorubicin HCl. Where *L. casei*, *L. plantarum* and *B. longum* had no significant difference between them but compared with chemical control, there was a greater cytotoxic effect where inhibition of growth of HT-29 cell line was marked. As well as analyzes were also performed using several microscopies (AFM and SEM) that allowed us to observe the structural mechanical damage on the cell line, similarly show that cancer progression is characterized by disruption and / or reorganization of the cytoskeleton, accompanied several molecular alterations affecting the mechanical properties of cells, comprising forming structures driven actin polymerization known as filopodia, lamellipodia and invadopodia / podosomes. The results allow us to conclude that the LFE have cytotoxic activity and cause mechanical damage to the cell line HT-29 human colon cancer

2. INTRODUCCIÓN

El cáncer colorrectal (CCR) es el cáncer más común del tracto gastrointestinal, es considerado un importante problema de salud debido a su alta frecuencia y mortalidad. En la actualidad constituye la tercer neoplasia más frecuente tanto en varones como en mujeres mayores de 40 años (Rex *et al.* 2004), pero es más frecuente a partir de los 60 años, afectando a un 6% de la población (Jemal *et al.* 2002). En México, representa la segunda causa de muerte por cáncer, a pesar de ser una neoplasia ubicada en pacientes de edad avanzada, cada día se detectan casos en personas más jóvenes (Erazo 2008). La etiología del CCR es compleja; incluye factores ambientales y genéticos. Los factores ambientales incluyen el tipo, calidad y cantidad de la dieta, estilo de vida y uso de terapia de restitución hormonal. Los factores genéticos incluyen predisposición hereditaria, síndromes de poliposis familiar, síndromes no polipósicos familiares, otras causas familiares y causas no familiares (Morgan *et al.* 2008). Actualmente se sabe que en el caso del CCR el principal factor involucrado es la dieta (Forman *et al.* 2004; Armstrong y Doll 1975; Willet 2001).

En la búsqueda de controlar esta patología y conferir beneficio de salud al huésped se ha demostrado que al administrar cantidades adecuadas de probióticos, se reduce la actividad de las enzimas procancerígenas (Screefumar y Hosono 2000). En cuanto a la relación de

probióticos y cáncer, algunos datos indican que los microorganismos probióticos pueden impedir o retrasar la aparición de ciertos tipos de cáncer como el carcinoma de colon (FAO/OMS 2002). Se han reportado propiedades antimutagénicas y efecto benéfico en el tratamiento de cáncer colorrectal en modelo murino (Fotiadis *et al.* 2008; Wollowski *et al.* 2001; Gupta y Garg 2009).

Por otra parte, para el estudio de las células se han desarrollado diferentes técnicas y herramientas para el cultivo, observación y estudio de las células, lo que ha permitido un gran avance en el conocimiento de estrategias para comprender el comportamiento de las células sanas y la transformación a células malignas. Se han desarrollado diversos tipos de microscopios como herramientas de estudio para las células, entre los cuales se han destacado: el microscopio óptico, microscopio electrónico de transmisión, el microscopio electrónico de barrido, el microscopio confocal, microscopio de fluorescencia y una de las microscopias de reciente incursión es el Microscopio de Fuerza Atómica (AFM por sus siglas en inglés).

El microscopio de fuerza atómica (AFM) permite escanear la superficie de un material con una punta afilada para proyectar la imagen con las características de la superficie de la muestra dentro del diámetro situado en el extremo libre del cantiléver que se acerca a la superficie deseada de la muestra. Las fuerzas entre la punta y la superficie de la muestra hace que el cantiléver se desvíe sobre un detector de medidas, donde registra los datos y genera un mapa de la topografía de la superficie (Agrawal *et al.* 2005).

Otra herramienta muy útil para analizar este tipo de células es el Microscopio Electrónico de Barrido (MEB o SEM por sus siglas en inglés Scanning Electron Microscope), el cual crea una imagen ampliada de la superficie de un objeto. Su funcionamiento se basa en recorrer la muestra con un haz muy concentrado de electrones. A medida que el haz de electrones barre la muestra, se presenta toda la imagen de la misma en el monitor. El SEM puede ampliar los objetos 200,000 veces o más.

Por lo anterior, este trabajo se enfocó a evaluar la actividad de los factores extracelulares de probióticos sobre la línea celular HT-29 y analizar las alteraciones morfológicas y morfométricas a través del SEM y AFM respectivamente.

3. ANTECEDENTES

3.1 Generalidades

El cáncer colorrectal (CCR) es el cáncer más común del tracto gastrointestinal, la tercera causa más común de cáncer y la cuarta causa de muerte por cáncer en el mundo (Morgan *et al.* 2008). Es una de las neoplasias que se presentan con mayor frecuencia a partir de los 50 años de edad. En la Tabla 1 se muestra la información referente a la incidencia y mortalidad por cáncer de colon a nivel nacional e internacional.

Tabla 1

Incidencia y mortandad por cáncer de colon a nivel internacional y nacional

Alcance	Género	Incidencia (Número)	%	Lugar	Mortandad (Número)	%	Lugar
Internacional	♀	571,204	9.4	2	288,654	8.6	3
	♂	663,904	10.0	3	320,397	7.6	4
	Total	1 235,108	9.8	3	609,051	8.0	4
Nacional	♀	3,158	5.7	5	1,192	3.6	8
	♂	3,189	5.0	5	2,017	5.3	6
	Total	6,347	5.35	5	3,209	4.45	7

Información tomada de la Gaceta Mexicana Sociedad Mexicana de Oncología.

El cáncer colorrectal pasó a ser la sexta enfermedad tumoral del sistema digestivo más frecuente y la de mayor incidencia, actualmente se han descubierto casos en personas de 40, 30 y hasta 20 años, cuando antes la mayor incidencia se ubicaba entre 60 y 65 años de edad (Erazo 2008).

En México en el 2012 se observó el porcentaje de defunciones en la población de 20 años y más, por principales tumores malignos según el sexo; población adulta femenina presentó cáncer de mama 13.8 %, cervicouterino 19.4%, estómago 7.0%, bronquios y pulmón 6.4%, hígado y de vías biliares intrahepáticas 5.5% y colon 4.3%; mientras que en varones adultos el principal tipo de cáncer causante de defunciones fue el de próstata, bronquios y pulmón 12.8%, estómago 8.6%, hígado y de vías biliares intrahepáticas 5.3%, colon 5.3% y mama 0.1% (INEGI 2012). Se trata de una patología que crece exponencialmente en México y el mundo debido a la adopción de malos hábitos dietéticos y el mantenimiento de costumbres perjudiciales (Tirado y Mohar 2008).

De acuerdo a diversos estudios científicos, se sabe que el principal factor involucrado es la dieta y recientemente se ha visto asociado a personas que fuman. Es por eso que los componentes de la dieta que no son digeridos en la parte superior del tracto intestinal y los glicanos endógenos (mucinas, glicoesfingolípidos, etc.) constituyen los principales nutrientes para la flora que reside en la parte distal del intestino delgado y en el colon. La mayor parte del conocimiento existente sobre los mecanismos de acción y efectos derivados del metabolismo de polisacáridos se ha obtenido con uno de los principales anaerobios intestinales: *Bacteroides thetaiotaomicron*. No obstante, el análisis del genoma

de *Bifidobacterium longum* ha puesto de manifiesto la presencia de un alto porcentaje de proteínas implicadas en el metabolismo de polisacáridos y glicanos del huésped, indicativas de su adaptación a este nicho ecológico y de su estrecha interacción con el huésped (Vasiljevic y Shah 2008).

La manipulación de la composición de la microbiota intestinal a través de la dieta constituye una alternativa idónea para fomentar las propiedades funcionales derivadas de aquella en beneficio del huésped, con fines preventivos y terapéuticos. Por ello, existe un creciente interés en el diseño de alimentos o suplementos funcionales que favorezcan el desarrollo de la flora deseable. Las estrategias desarrolladas se basan en la administración de cepas seleccionadas (probióticos), de ingredientes alimentarios no digeribles (prebióticos) que favorezcan el desarrollo específico de la flora deseable, y de simbióticos, definidos como combinaciones de probióticos y prebióticos.

Los probióticos en cantidades adecuadas, son capaces de ejercer un efecto beneficioso sobre el huésped, más allá de su inherente valor nutritivo, son mayoritariamente bacterias de origen intestinal o utilizadas de forma tradicional en fermentaciones alimentarias pertenecientes a los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*. Su administración se suele realizar mediante su incorporación a alimentos funcionales, principalmente derivados lácteos (Fioramonti *et al.* 2003; Gillor *et al.* 2008; Sanz *et al.* 2004).

A los probióticos actualmente se les atribuye un gran número de acciones beneficiosas sobre la salud (reducción de las infecciones gastrointestinales y urogenitales, modulación

de la respuesta inmune, regulación del tránsito intestinal, etc.); sin embargo, se posee una información muy limitada sobre las funciones que desempeñan en el metabolismo de nutrientes (Sanz *et al.* 2004).

La mucosa del tracto gastrointestinal es la segunda superficie más extensa del organismo (250 m²) y constituye la principal zona de contacto y defensa frente a agentes externos como bacterias, virus, toxinas y alérgenos. La flora o microbiota que la coloniza constituye un complejo ecosistema integrado por más de 400 especies bacterianas, que coexisten en equilibrio dinámico con el huésped. La densidad microbiana en las zonas proximal y media del intestino delgado es relativamente baja, pero aumenta en gran medida en la parte distal de éste (10⁸ bacterias/mL) y en el colon (10¹¹-10¹² bacterias/g). El número de bacterias alcanza valores diez veces superiores al de células del organismo, lo que constituye colectivamente un órgano activo, cuyo metabolismo influye de forma decisiva en el mantenimiento de la homeostasis del individuo.

La flora microbiana comienza a adquirirse después del nacimiento, y tanto la velocidad de colonización como el tipo de microorganismos tienen gran repercusión en el desarrollo del sistema inmunológico, la regulación de la permeabilidad y el mantenimiento del equilibrio intestinal.

Dicho proceso se considera determinante de la susceptibilidad a las infecciones microbianas y de la sensibilidad a los antígenos o alérgenos de la dieta, especialmente durante los primeros años de vida. Inicialmente, existe un predominio de microorganismos

aerobios o anaerobios facultativos (*Enterobacter*, *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, etc.) que consumen el oxígeno y favorecen el establecimiento posterior de una flora integrada en mayor medida por bacterias anaerobias estrictas (*Bifidobacterium sp.*, *Bacteroides sp.*, *Eubacterium sp.*, *Clostridium sp.*, etc). La microbiota intestinal beneficiosa, representada principalmente por los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, contribuye de forma significativa al estado de salud del huésped, por sus funciones como: a) Metabólicas: interviniendo en la asimilación de nutrientes de la dieta y glicanos endógenos, b) Protectoras: contribuyendo al efecto barrera y al desplazamiento de microorganismos patógenos y c) Tróficas: interviniendo en la modulación del sistema inmune y en el desarrollo y la proliferación celular (Sanz *et al.* 2004; Isolauri *et al.* 2004).

3.2 Relación bacterias ácido lácticas (BAL) y cáncer de colon

Se ha demostrado que la ingesta de probióticos aumenta la concentración de bacterias benéficas para la salud del huésped y reduce la de bacterias nocivas. En varios trabajos se ha reportado que en experimentos realizados con ratas, la administración de probióticos ha mostrado una disminución en la incidencia de aparición de lesiones precancerosas en el colon. Muchas investigaciones con sistemas *in vitro* e *in vivo* proveen considerables evidencias de que los probióticos tienen la habilidad de reducir el riesgo de cáncer de colon.

La OMS ha llegado a recomendar el uso de terapia probiótica (también denominado “tratamiento de interferencia microbiana”) como alternativa al tratamiento antibiótico siempre que sea posible (Screefumar y Hosono 2000; OMS 2008).

En su revisión sobre la prevención de cáncer de colon por probióticos, Brady *et al.* 2000; recogen un total de 24 observaciones sobre probióticos y tumores de colon, incluyendo datos de principios de los 80, que describen la reducción de la tumorigénesis experimentalmente inducida en ratas, por derivados lácteos fermentados por bacterias del ácido láctico. Además, también concluyen que existen una serie de estudios, en modelos animales, probando una relación inversa entre el consumo de probióticos y aparición de criptas aberrantes o el desarrollo de tumores en el colon, así como evidencias sobre el sinergismo antitumoral del consumo de probióticos y prebióticos (fuctooligosacáridos).

3.3 Microbiota intestinal

La microbiota intestinal constituye un complejo ecosistema integrado por más de 400 especies bacterianas. La microbiota comienza a adquirirse después del nacimiento, y tanto la velocidad de colonización como el tipo de microorganismos tienen gran repercusión en el desarrollo del sistema inmune, la regulación de la permeabilidad y el mantenimiento del equilibrio intestinal. Dicho proceso se considera determinante de la susceptibilidad a las infecciones microbianas y de la sensibilidad a los antígenos o alérgenos de la dieta, especialmente durante los primeros años de vida.

Inicialmente, existe un predominio de microorganismos aerobios o anaerobios facultativos (*Enterobacteriaceae* y *Lactobacillus*) que son desplazados posteriormente por bacterias anaerobias estrictas (*Bifidobacterium*, *Bacteroides*, *Eubacterium*, etc.) hasta que se establece una flora prácticamente definitiva.

La composición de la microbiota fecal depende, no obstante, de diversos factores, especialmente del tipo de lactancia. La menor incidencia de infecciones gastrointestinales así como de otras enfermedades en niños alimentados con lactancia materna se ha relacionado con su influencia en la composición de la microbiota intestinal, dominada hasta en un 91% por el género *Bifidobacterium*. Por el contrario, el intestino de niños alimentados con fórmulas infantiles está colonizado por una microbiota más heterogénea (*Enterobacteriaceae*, *Bacteroides*, *Clostridium*, *Streptococcus*, etc.).

El tracto gastrointestinal constituye una de las principales zonas de contacto con agentes ambientales potencialmente nocivos (bacterias, virus, toxinas y alérgenos) y desempeña una función primordial en la defensa del organismo frente a éstos. Su función protectora depende de los componentes estructurales y funcionales de la mucosa intestinal, del sistema inmune asociado y de sus interacciones con la microbiota intestinal residente y en tránsito.

La acidificación del medio constituye una barrera protectora, ya que ocurre un proceso fermentativo que inhibe el desarrollo y la colonización de patógenos, así como la producción de elementos tóxicos derivados de su metabolismo (amonio, compuestos fenólicos, aminas, etc). Por otro lado, el ácido butírico constituye la principal fuente de energía para los colonocitos, estimulando la proliferación celular y regulando la apoptosis y la composición del *mucus*. De este modo, contribuyen globalmente a estabilizar la función barrera del intestino (Tonello 2012).

Esto se desprende del conocimiento de que los elementos que constituyen la microbiota intestinal pueden producir sustancias carcinógenas como las nitrosaminas. Por consiguiente, la administración de lactobacilos y bífidobacterias podría teóricamente modificar la microbiota, dando lugar a una reducción de los niveles de enzimas pro-carcinogénicas como la nitroreductasa, azoreductasa (Mennickent y Green 2009), β -glucuronidasa y sustancias carcinógenas (Hosada *et al.* 1996).

Algunos estudios realizados en ratas, han reportado una baja incidencia de lesiones precancerosas (focos de criptas aberrantes o FCA) en el colon al administrar probióticos como tratamiento (Burns y Rowland 2000). Matsumoto y Benno 2004; realizaron un estudio con voluntarios humanos, demostrando que el consumo de yogurt conteniendo *Bifidobacterium lactis* LKM512 incrementa el contenido fecal de la espermidina y disminuye la mutagenicidad de las heces; los autores especulan que la espermidina producida por estas bacterias podría jugar un papel como estabilizador del DNA celular, al que protegerían de los efectos genotóxicos de los carcinógenos. Los ácidos grasos de cadena corta también son candidatos, en especial el butírico, por sus efectos protectores sobre los enterocitos (Wong *et al.* 2006).

Una de las situaciones clínicas reseñadas como susceptibles de ser mejoradas por la ingestión de probióticos es la aparición de carcinoma de colon. Este tumor se inicia por acción de carcinógenos químicos mutágenos, y se le reconoce un desarrollo gradual, por etapas que abarcan desde lesiones pretumorales (epitelio hiperplásico), pasando por varias formas de adenomas, hasta llegar al carcinoma invasor y metastásico, estando cada etapa

definida por la activación de oncogenes o la inactivación de diversos genes supresores (Ruiz *et al.* 1992).

3.4 Metástasis

La metástasis, es la propagación de las células tumorales a partir de un tumor primario a un sitio secundario en el cuerpo humano, este proceso representa uno de los acontecimientos patológicos más importantes en el desarrollo e implantación de cualquier tipo de cáncer. Cada uno de estos pasos requiere un programa molecular distinto. Por tanto, las propiedades del citoesqueleto de las células de difusión tumorales juegan papeles esenciales, que se inicia por la protrusión de la membrana celular (figura 1).

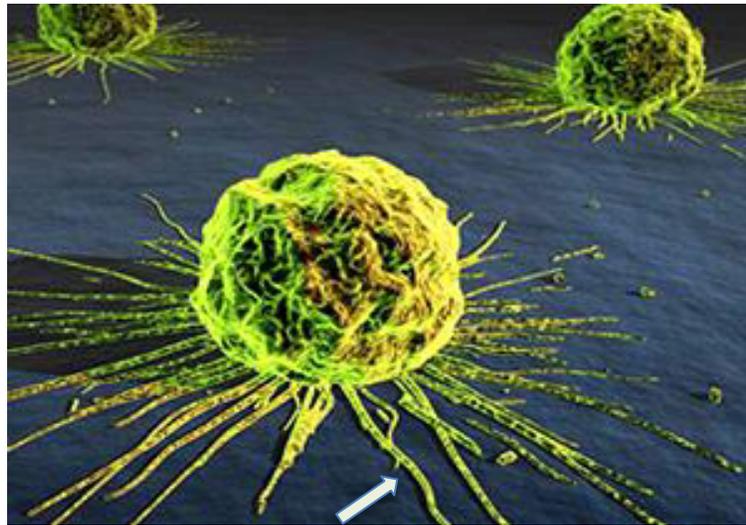


Figura 1. Protrusiones (flecha) en células de cáncer de mama.

Para desprenderse del tumor primario e invadir el tejido circundante, las células tumorales tienen que romper contactos célula-célula, remodelar sitios de adhesión célula-matriz, y seguir un camino de quimio-atrayentes a través de la matriz extracelular, extraído por proteinasas secretadas. Este fenómeno temporal y reversible se conoce como la transición epitelial-mesenquimal (EMT), un proceso que está actualmente en el centro de atención de investigación migratoria de las células del cáncer más la evidencia de la identificación de la EMT en diversos tipos de cáncer en humanos. La migración de la célula es la suma de los procesos de múltiples pasos iniciados por la formación de protuberancias de la membrana en respuesta a estímulos migratorios y quimiotácticos. Las células metastásicas pueden invadir en ausencia de EMT (transición epitelial-mesenquimal) y tienen un amplio repertorio para la invasión, incluyendo la invasión tipo ameboide o la invasión de células colectiva.

Todo esto ha llevado a nuevos conocimientos sobre la investigación EMT con un enfoque específico en la remodelación del citoesqueleto de actina y la formación de estructuras invasoras durante EMT y la invasión de las células tumorales. Este proceso de EMT, además de cambiar su repertorio adhesivo, las células cancerosas emplean procesos de desarrollo para obtener propiedades migratorias e invasivas que implican una reorganización del citoesqueleto (especialmente de la reorganización de la actina y la formación de protuberancias de membrana requeridos para el crecimiento invasivo impulsado por la polimerización de actina (Yilmaz y Christofori 2009; Yamaguchi y Condeelis 2007).

Aun así, muchos tumores invasores agresivos no presentan una firma molecular de la EMT, lo que sugiere que la EMT no pueden estar involucrados en todo tipo de invasión de células individuales y que algunos tumores pueden someterse a una parcial o incompleta EMT. Los procesos moleculares que subyacen a tales cambios celulares son todavía poco conocidos, y los diversos orgánulos migratorios, involucrados, los cuales incluyen: lamellipodia, filopodios (figura 2), invadopodios y podosomes (figura 3), los cuales se describen a continuación:

Filopodios: son proyecciones similares a dedos delgados consistentes en paquetes, los filamentos de actina reticuladas y que también se observan en la parte delantera de migración de las células. Aunque se proponen filopodios para detectar señales externas para establecer la dirección de la migración celular, la función exacta de filopodios sigue sin entenderse.

Lamellipodia: son salientes de membrana laminares planas formadas en el borde de ataque de las células que migran. Se cree generalmente que lamellipodia tiene un papel importante en la conducción de la migración celular por fijación al sustrato y la generación de la fuerza para tirar del cuerpo celular hacia adelante. De acuerdo con esto, las células de carcinoma que se arrastra en la matriz extracelular.

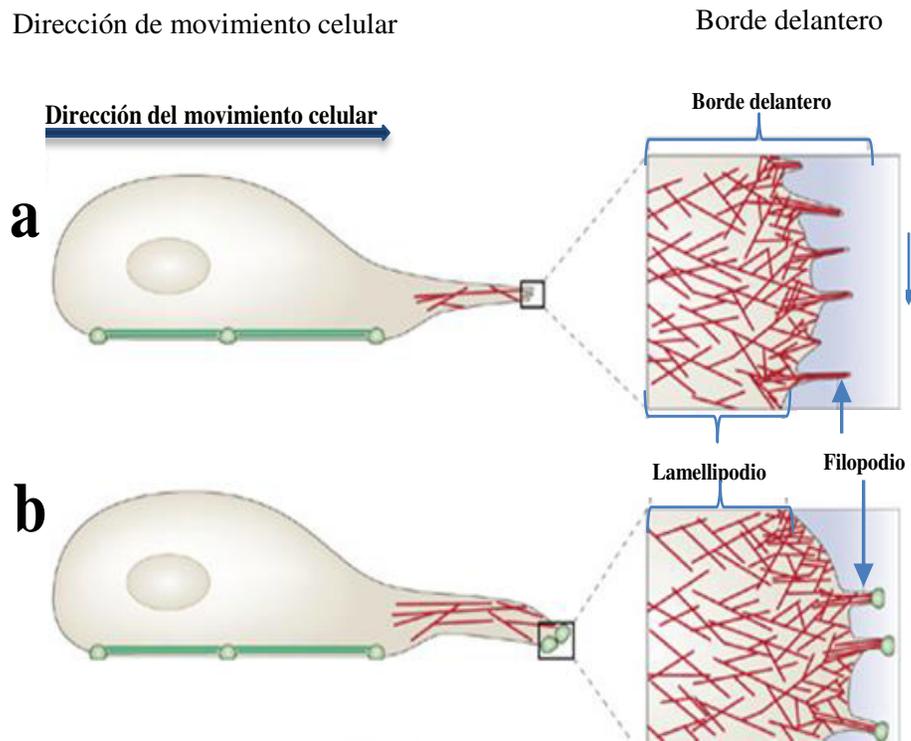


Figura 2.-Comparación de la presencia y distribución de lamellipodias y filopodios en una célula en desplazamiento.

Invadopodios: son protrusiones de membrana ventral con una actividad de degradación de ECM formado por células cancerosas altamente invasivos en sustratos fisiológicos. Invadopodios se compone de una variedad de proteínas, tales como actina y proteínas reguladoras de actina, moléculas de adhesión, la remodelación de la membrana, proteínas de señalización, y enzimas de degradación de la matriz. En la figura 3, se observan las células de carcinoma parecen utilizar protuberancias tipo invadopodios migrar e invadir a través de estroma tumoral y en los vasos sanguíneos en el proceso de metástasis (Yilmaz y Christofori 2009)

Podosomes: son similares a invadopodios en su apariencia y la composición molecular. Se encuentran en células de origen monocítico, como los macrófagos, células dendríticas, y osteoclastos. La formación de podosomes (a veces de forma intercambiable llamado invadopodios) es inducida por la transformación oncogénica de fibroblastos por v-Src, lo que sugiere la importancia de estas estructuras en la invasión y la motilidad celular oncogénica (figura 3).

Por otra parte varias líneas de evidencia indican que proteínas de la familia WASP (proteínas reguladoras que activan el complejo ARP 2/3) integran múltiples señales ascendentes para inducir la polimerización de actina a través del complejo Arp2/3, un activador de la nucleación de filamentos de actina y la ramificación y son necesarias para la actividad de protrusión celular asociada con la migración celular y la invasión. Por otra parte, la expresión de proteínas de la familia WASP y el complejo Arp2/3 se ha asociado con fenotipos malignos de células cancerosas, lo que indica la importancia de estas proteínas en la migración celular y la invasión del cáncer (ver Tabla 2) (Yamaguchi y Condeelis 2007).

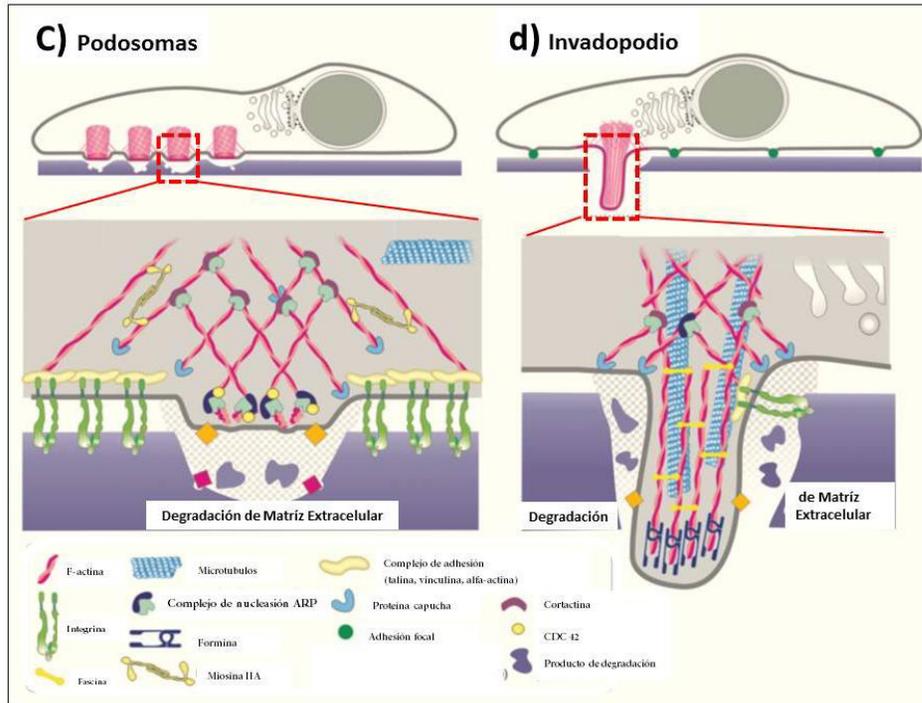


Figura 3.- Podosomas e invadopodios. Comparación de la actividad, composición y distribución de podosomas e invadopodios en células invasivas. (Imagen tomada y modificada de Spuul *et al.* 2014).

Tabla 2

Proteínas que intervienen en la migración, invasión y metástasis de células de cáncer colorrectal

Proteína	Protrusiones implicadas en la formación de:
N-WASP	Invadopodios Filopodia
Complejo Arp2/3	Invadopodios Filopodia
Cortactina	Invadopodios Filopodia

Cuadro tomado y modificado de Yamaguchi y Condeelis 2007.

3.5 Tratamientos contra el cáncer

3.5.1 Elección del tratamiento

Tras realizar las pruebas que confirman el diagnóstico se determina el tratamiento. Como en muchos otros tipos de cáncer, el de colon requiere una terapia multidisciplinar para ofrecer al paciente las mayores tasas de recuperación. Se decidirá cuál es el tratamiento adecuado en función del estado del paciente, dónde está ubicado el tumor y la fase en la que se encuentra el cáncer. Además, el especialista valorará si el paciente sufre otras enfermedades que puedan entorpecer el tratamiento. Todo esto implica que cada paciente recibirá un tratamiento que se adapte a sus circunstancias particulares. Los tratamientos más comunes son la quimioterapia(a), inmunoterapia (b), radioterapia(c) y la cirugía (d).

A) Quimioterapia

Es el tratamiento por el que se administran fármacos con el objetivo de destruir las células cancerosas. Se realiza insertando un tubo en una vena (catéter) por el que se inyectan los fármacos a través de un sistema de bombeo. Suele administrarse tras la operación quirúrgica. Los medicamentos que se usan con más frecuencia para el cáncer colorrectal son:

- La incorporación del 5-Fluoruracilo (5FU) la biomodulación con diferentes fármacos destacando el ácido folínico, y el desarrollo de infusiones prolongadas. El 5-fluorouracilo (5FU) se ha mantenido como el fármaco más importante en el tratamiento del cáncer colorrectal. En sus inicios, se utilizó como monoterapia y, en la actualidad, se aplica de manera combinada con otros citostáticos.
- La introducción de irinotecan y oxaliplatino.

- La capecitabina o UFT han demostrado similar eficacia en el control de la enfermedad y sobrevida global.

La clasificación de tipos de quimioterapias de acuerdo a la forma de administrar los tratamientos son:

Adyuvante: Es la quimioterapia que se administra generalmente después de un tratamiento principal como es la cirugía, para disminuir la incidencia de diseminación a distancia del cáncer. La identificación de una población de pacientes que son candidatos a tratamiento adyuvante se basa en los datos disponibles sobre su riesgo de recurrencia tras un solo tratamiento local. Actualmente, la quimioterapia adyuvante se considera el estándar de tratamiento para muchos tipos de tumores, incluyendo el cáncer de mama o el cáncer de colon.

Neoadyuvante: Es la quimioterapia que se inicia antes de cualquier tratamiento quirúrgico o de radioterapia con la finalidad de evaluar la efectividad *in vivo* del tratamiento. La quimioterapia neoadyuvante disminuye el estadio tumoral pudiendo mejorar los resultados de la cirugía y de la radioterapia y en algunas ocasiones la respuesta obtenida al llegar a la cirugía, es factor pronóstico. La quimioterapia neoadyuvante se utiliza en el tratamiento del cáncer de canal anal, vejiga, mama, esófago, laringe, cáncer de pulmón no microcítico y sarcoma óseo.

De inducción o conversión: La quimioterapia para enfermedad avanzada que se utiliza antes de cualquier otro tipo de tratamiento local, con intención de reducir la cantidad de enfermedad o lograr convertir la enfermedad en operable, cuando inicialmente no lo era (por ejemplo, quimioterapia de conversión o inducción en cáncer de colon con enfermedad

metastásica limitada al hígado, con metástasis irresecables de entrada, pero que se busca con la quimioterapia una reducción del tamaño y/o número de las metástasis para convertirlas en operables).

Radioquimioterapia concomitante: También llamada quimioradioterapia, que se administra de forma concurrente o a la vez con la radioterapia con el fin de potenciar el efecto de la radiación o de actuar espacialmente con ella, es decir potenciar el efecto local de la radiación y actuar de forma sistémica con la quimioterapia.

Paliativa: en tumores que no se vayan a intervenir quirúrgicamente por existir metástasis a distancia y cuando la finalidad del tratamiento no sea curativa (Brighton y Wood 2005).

De acuerdo con Brighton y Wood 2005, los efectos secundarios indeseables por el uso de fármacos anti-cancerígenos, dependen del agente quimioterápico y los efectos más frecuentes son: alopecia, náuseas y vómitos, diarrea o estreñimiento, anemia, inmunosupresión y hemorragias, entre otros.

B) Inmunoterapia

Consiste en estimular o restaurar las propias defensas inmunitarias del organismo. Para ello se emplean productos naturales o elaborados en el laboratorio.

C) Radioterapia

Consiste en aplicar radiación de alta energía sobre la zona afectada con el fin de destruir las células cancerosas. Sólo afecta a la zona en tratamiento y puede aplicarse antes de la cirugía (para reducir el tumor y poder extraerlo más fácilmente) o después de la cirugía (para terminar de destruir las células cancerosas que pudieran haber quedado).

D) Cirugía

Mediante una operación en quirófano, se extrae la parte afectada por el cáncer. La cirugía se utiliza en todas las etapas de la enfermedad. De hecho, en el estadio A, es el tratamiento recomendado ya que en el resto de los estadios los especialistas aconsejan aplicar la cirugía en combinación con otros tratamientos. En esta en fase inicial se pueden extraer un pólipo mediante colonoscopia para examinarlo y, según los resultados, se extirpará el cáncer y una parte circundante de tejido sano y se extirparán los ganglios de la zona. Otra posibilidad es, tras extirpar parte del colon, realizar una apertura desde el colon hacia el exterior (colostomía), en cuyo caso la persona tendrá que usar una bolsa especial de uso externo donde se recogerán las heces. La colostomía puede ser transitoria o permanente. La principal modalidad terapéutica para el cáncer de colon es la cirugía, la cual consiste en la resección en bloque del tumor y su drenaje linfático, con márgenes adecuados tanto longitudinal como circunferencial, con esto se pretende lograr la curación de los casos iniciales en etapas I y II hasta en el 70% de los casos. Los tipos de manejo quirúrgico van a depender de la ubicación del tumor primario (Brighton y Wood 2005).

3.6 Tratamiento de elección para cáncer de colon

En el desarrollo de tratamientos para el cáncer se han desarrollado muchos fármacos con potencial para combatir la proliferación de células cancerosas. Los tratamientos actuales para el cáncer se basan principalmente, en la cirugía, la radiación y la quimioterapia, cada día se detectan casos en personas más jóvenes, de esto se desprende la gran importancia de realizar un diagnóstico oportuno, lo que representa un gran reto en el conocimiento de

la patología y actualización en el manejo adecuado, con la finalidad de aumentar la sobrevida y mejorar, en lo posible, la calidad de vida.

Thor *et al.* 2011, realizaron experimentos con doxorubicina HCl (adriamicina) como control negativo de la proliferación celular HT-29, donde la línea celular mostró ser sensible al antineoplásico de manera *in vitro*

A) Mecanismo de acción de la doxorubicina. La doxorubicina (Adriamycin®, Rubex® and Doxil®) es un antibiótico antraciclino que ejerce sus efectos sobre las células cancerosas por medio de dos mecanismos diferentes:

- Intercalación: en su rol como un agente intercalante este fármaco encaja entre las bases de ADN y bloquea la síntesis del ADN y su transcripción.
- Inhibición de las enzimas: este agente inhibe la actividad de una enzima, la topoisomerasa II. Esto lleva a rompimientos en el ADN genómico.

Sin embargo, ambos mecanismos resultan en la disrupción del ADN que termina en la muerte celular.

B) Uso farmacéutico. La doxorubicina es usada para una gran variedad de cánceres y solo algunos tipos de cánceres no responden a este medicamento. Estos tipos de cánceres incluyen el cáncer del colon, melanoma, las leucemias crónicas, y el cáncer renal. Los padecimientos para los cuales la doxorubicina es usada incluyen: Linfoma de Hodgkin y No Hodgkin, cáncer del seno, cáncer de los ovarios, cáncer de los testículos, leucemia aguda, sarcoma de los tejidos suaves, cáncer del pulmón, cáncer de la vejiga urinaria, cáncer gástrico, cáncer de las tiroides,

hepatoma, tumor de Wilm y neuroblastoma. La doxorubicina es administrada intravenosamente. En una formulación nueva, Doxil®, el fármaco se encuentra rodeado por una "burbuja" (membrana) lipídica. Esta formulación intenta reducir la toxicidad del medicamento al prevenir sus efectos en los tejidos no cancerosos.

C) Efectos adversos: Efectos secundarios comunes incluyen: "Revocación de la radiación" (daño a la piel de tratamientos previos con la radiación pueden surgir de nuevo), mielosupresión (disminución en el conteo de células sanguíneas), mayor riesgo de infección y sangramiento, pérdida de apetito, estomatitis, alopecia (pérdida del cabello), náusea y vómito, llagas en la boca, defectos de nacimiento, toxicidad al hígado y arritmia aguda.

La toxicidad cardíaca se vuelve relevante en dosis altas. Si se encuentra presente, la cardiomiopatía puede llevar a fallo congestivo irreversible del corazón. Debido a esta razón, los pacientes deben de informar a sus doctores sobre cualquier condición o complicación cardíaca. Infusiones lentas intravenosas pueden reducir la toxicidad al corazón (al disminuir la concentración sanguínea de este fármaco). Sin embargo, este método es problemático porque dura entre 48-96 horas.

Los medicamentos nuevos obtenidos por síntesis química y/o derivados de plantas no tienen el efecto esperado en la clínica, esto debido a la complejidad de la enfermedad, de ahí la gran importancia del conocimiento de las propiedades mecánicas de las células y otros tejidos biológicos que ayuden a la comprensión de cómo funcionan las interacciones

mecánicas que afectan a la célula mediante análisis de alta resolución (Dimitriadis *et al.* 2002; Schlaepfer y Mendoza 2010).

3.7 Microscopía

3.7.1 Microscopía Electrónica de Barrido (MEB o SEM)

El desarrollo de la microscopía óptica o de luz fue evolucionando de manera importante desde su aparición a principios del siglo XVII, y manteniéndose como pilar fundamental del conocimiento de aquello invisible a la vista del ser humano; sin embargo, su límite de resolución de aproximadamente un micrómetro 10^{-6} m, ya no fue posible mejorarlo debido al factor limitante de la longitud de onda de la luz (450-640 nm). Fue hasta el año de 1931 cuando se alcanzó a obtener, con la ayuda de otra generación de microscopios, una resolución 1000 veces mayor que la de un microscopio óptico; a ésta generación se le conoce como Microscopía electrónica y fueron los físicos Max Knoll y Ernst Ruska en Alemania, quienes dieron a conocer el Microscopio electrónico de transmisión (TEM, por sus siglas en inglés). Posteriormente, en el año 1938, Manfred von Ardenne construyó el primer Microscopio electrónico de barrido (SEM, por sus siglas en inglés) y comercialmente distribuido hasta 1965. (<http://www.revista.unam.mx/vol.6/num7/art70/int70.htm>).

La microscopía electrónica de barrido o SEM se basa en el principio de la microscopía óptica, en la que se sustituye el haz de luz por un haz de electrones. Lo que permite obtener una resolución de 100 \AA , resolución muy superior a cualquier microscopio óptico.

Su funcionamiento consiste en hacer incidir un haz de electrones sobre la muestra. Tradicionalmente la muestra debería de estar recubierta de una capa muy fina de oro o carbón, lo que le otorga propiedades conductoras. En el microscopio electrónico de barrido, un campo magnético permite enfocar los rayos catódicos (electrones) y obtener una imagen tridimensional, por el examen de la superficie de las muestras, permitiendo la observación y la caracterización de materiales orgánicos e inorgánicos, proporciona aumentos de 200,000 diámetros (Dykstra 2011).

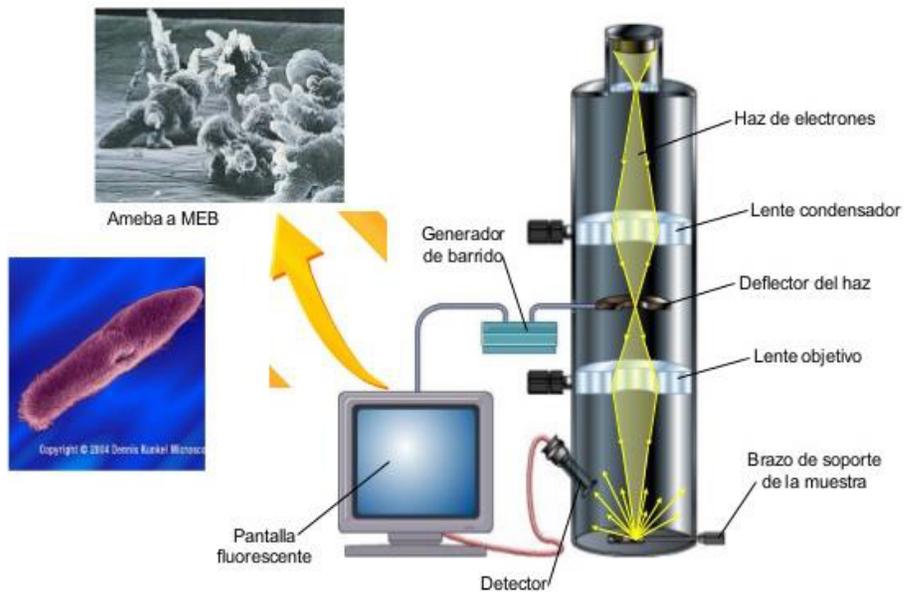


Figura 4.- Imagen del Microscopio electrónico de Barrido (MEB o SEM)

<http://www.ecured.cu/Microscopio> electrónico de barrido.

A) Funcionamiento

La muestra es colocada en un pequeño espacio, al cual se le hace vacío después de cerrada la puerta. La puerta tiene tres palancas que el operador usa para: subir y bajar la muestra, rotar la muestra y acercarla o alejarla. Un haz delgado de electrones, es producido en la parte superior del microscopio por medio del calentamiento de un filamento metálico (10-30 KV). El rayo de electrones primarios sigue un recorrido a través de la columna de vacío del microscopio, esto, con el propósito, de evitar la dispersión de los electrones. El trayecto del haz de electrones es enseguida modificado por un conjunto de bobinas deflectoras que lo hacen recorrer la muestra punto por punto y a lo largo de líneas paralelas (barrido), y a su vez atraviesa las lentes condensadoras o electromagnéticas que le permiten ser reenfocado o centrado hacia la muestra. Posteriormente, el diámetro del haz de electrones puede ser modificado al pasar por las lentes objetivas que controlan la cantidad de electrones dentro de este. Cuando los electrones primarios golpean la muestra, son emitidos electrones secundarios por el propio espécimen. Estos electrones secundarios son atraídos por un colector donde se aceleran y se dirigen al escintilador, donde la energía cinética es convertida en puntos de mayor o de menor luminosidad, es decir, en luz visible. Esta luz es dirigida a un amplificador donde se convierte en señal eléctrica, la cual pasa a una pantalla de observación donde la imagen es formada línea por línea y punto por punto. Los circuitos que dirigen las bobinas de barrido (que obligan al haz a barrer la muestra), son las mismas que dirigen la parte de colección de electrones y que producirán la imagen.

B) Resolución del Equipo

El MEB tiene una resolución de 10 nm y una profundidad de foco de 10 μm , mucho menor que el microscopio electrónico de transmisión. La ventaja del MEB es que proporciona imágenes tridimensionales, ya que éste específicamente examina la superficie de las estructuras.

C) Aplicaciones

Las aplicaciones del MEB en ciencias biológicas incluye obtención de imágenes 3D, caracterización estructural, estudio de características morfológicas y topográficas, estudio de enfermedades del tallo piloso, estudio de formación de biofilms, interacción de microorganismos con células eucariotas, entre otros (Renau y Faura 1994).

Pese al gran potencial del Microscopio Electrónico de Barrido, la técnica cuenta con algunas limitaciones como:

- El ensayo debe realizarse en condiciones de alto vacío lo que impide analizar muestras que no sean estables a baja presión.
- No pueden ensayarse muestras húmedas, contaminadas o que puedan desprender gases bajo presión.
- Las muestras deben metalizarse antes del ensayo.

En 1938, construyó el primer Microscopio Electrónico de Barrido (MEB); posteriormente, en Inglaterra, se construyó el primer MEB ambiental, con el cual se pueden observar muestras hidratadas. Los nuevos microscopios electrónicos de barrido (ESEM, Environmental Scanning Electron Microscope) tienen la capacidad de trabajar con bajo vacío (hasta 20 torr), aumentando notablemente el campo de aplicación, llegando a extremos de poder estudiar en esas condiciones muestras con un 100% de humedad relativa.

En consecuencia, los microscopios electrónicos de barrido ambientales (ESEM), pueden trabajar presión atmosférica (Torr). La ventaja de las modalidades Bajo vacío y Ambiental es que se pueden analizar muestras sin necesidad de preparación previa, como el metalizado o secado por punto crítico, aunque la calidad de resolución es menor que en el modo Alto vacío. Así mismo la Microscopía electrónica de barrido ambiental (ESEM), en lugar de presión al alto vacío, emplea vapor de agua, aire, oxígeno, helio o nitrógeno, dependiendo de las necesidades de la muestra.

3.7.2 Microscopía de fuerza atómica (AFM)

El AFM es un instrumento mecano-óptico capaz de detectar fuerzas del orden de los piconewtons y de registrar continuamente la topografía de una cierta muestra mediante una sonda o punta afilada de forma piramidal o cónica. La sonda va acoplada a un listón o palanca microscópica muy flexible de sólo unos 200 μm . Es una de las técnicas llamadas SPM (Scanning Probe Microscopes). La técnica SPM proporciona imágenes tridimensionales en tiempo real, permitiendo monitorear un área localizada para obtener

las propiedades físicas de los materiales simultáneamente. Todos los SPM's tienen 5 elementos fundamentales: la punta, el escáner, el detector, el sistema de control electrónico y el sistema de aislamiento de vibración (Binnig *et al.* 1992).

A diferencia de otras microscopías, ésta no tiene un funcionamiento mediante fenómenos ópticos. La resolución de los microscopios ópticos está determinada por la difracción de la luz y típicamente es de ≈ 200 nm. La microscopía electrónica con electrones de alta energía permite aumentar la resolución, pero requiere que la muestra se examine en alto vacío. Los SPM generan imágenes “sintiendo/tocando” más que “mirando” la muestra. Se basan en medir cambios en la magnitud de la interacción entre una punta (probe) y la superficie de la muestra (figuras 5 y 6).

El AFM monitorea la superficie de la muestra con una punta de radio de curvatura de 20 a 60 nm que se localiza al final de un *cantiléver* que está compuesto por una punta de una cerámica piezoeléctrica (Si_3N_4 o Si), un láser, un detector de luz constituido por 4 fotodiodos uno al lado del otro. La fuerza atómica, evidente cuando el cantilever está muy próximo a la superficie de la muestra, se detecta a través de la torsión de aquél. Las fuerzas entre la punta y la muestra provocan la deflexión del cantiléver, simultáneamente un detector mide esta deflexión a medida que la punta se desplaza sobre la superficie de la muestra generando una micrografía de la superficie (figuras 5 y 6) (Reséndiz y Castrellón 2005). La deflexión se mide usando un sistema de láser-fotodiodo. Un fotodiodo, cuya área activa se divide en cuatro cuadrantes, registra el rayo láser reflejado desde el extremo del voladizo. En el caso de las células rígidas - la profundidad de indentación es más

pequeño, pero el cambio de la posición sobre un fotodiodo de cuadrante es más grande (Lekka 2012).

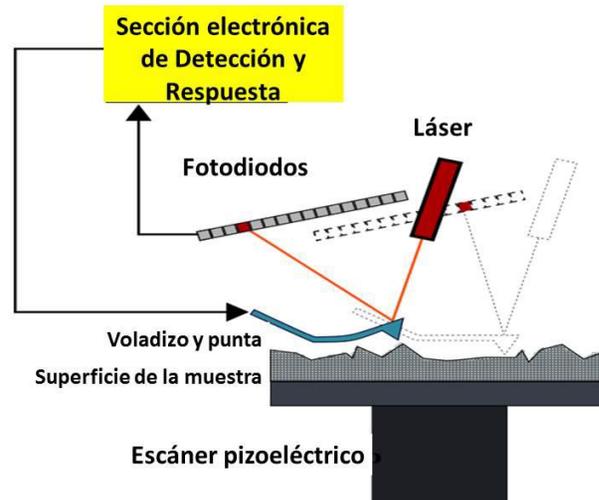


Figura 5.- Diagrama esquemático de un Microscopio de Fuerza Atómica, con el sistema de detección mediante láser y fotodiodos.

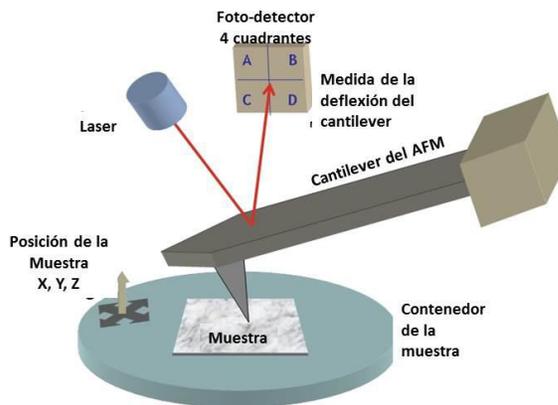


Figura 6.- Configuración típica del microscopio de fuerza atómica (AFM): Deflexión del voladizo, se mide por lo que refleja un haz de láser en la parte trasera del voladizo mientras que es escaneado sobre la superficie de la muestra. <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=1389346>.

A) Fundamentos

- Fuerzas de interacción: El acercamiento de la sonda a la muestra sigue el comportamiento de un potencial tipo Lenard-Jones
- Efecto piezoeléctrico: En ciertos cristales que contienen moléculas polares, las tensiones mecánicas aplicadas producen una polarización de las moléculas. La formación del dipolo genera una diferencia de potencial que puede usarse para producir una corriente eléctrica.
- Tipos de Fuerza que mide: Las interacciones que predominan a cortas distancias entre la punta y la muestra son de tipo de Van der Waals. A corta distancia predominan las fuerzas repulsivas y larga distancia las atractivas.

B) Modos de Operación: Dependiendo de la distancia a la que se posiciona la punta existen modos de operación:

El Microscopio de Fuerza Atómica utiliza múltiples modos de operación de acuerdo a las características físicas de la muestra y de las propiedades a medir (Tabla 3 y 4).

En la última década la microscopía de fuerza atómica (AFM) ha demostrado ser una poderosa herramienta para el estudio de aspectos morfológicos de las estructuras celulares con resolución nanométrica y el análisis reológico de las células vivas. Hasta ahora, una amplia gama de tipos de células han sido estudiados con AFM, tales como células epiteliales, *in vitro*, si no *in vivo* con una precisión y reproducibilidad muy alta.

Tabla 3

Modos de operación del microscopio de fuerza atómica (Reséndiz y Castellón, 2005).

	DESCRIPCIÓN
Contacto	Mide la topografía de la muestra deslizando la punta sobre su superficie. (contacto continuo entre punta y muestra)
Imagen de Fase	Proporciona una imagen contrastada generada por las diferencias de adhesión en la superficie de la muestra.
Fuerza Constante	Permite distinguir zonas con diferente comportamiento mecánico
No Contacto	Mide la topografía de acuerdo a las fuerzas de Van der Waals que existen entre la superficie de la muestra y la punta.
Fuerza Magnética	Mide el gradiente de fuerza magnética sobre la superficie de la muestra
Fuerza Eléctrica	Mide el gradiente de fuerza eléctrica sobre la superficie de la muestra.
Potencial de Superficie	Mide el gradiente de campo eléctrico sobre la superficie de muestra.
Modo Lift	Técnica que utiliza dos modos de operación usando la información topográfica para mantener la punta a una altura constante sobre la superficie.
Modulación de Fuerza	Mide la elasticidad/suavidad relativa de la superficie de las muestras.
Fuerza Lateral	Mide la fuerza de fricción entre la punta y la superficie de las muestras.
Microscopía de Tunelamiento	Mide la topografía de superficie de la muestra utilizando la corriente de tunelamiento.
Microscopía Electroquímica	Mide la estructura de la superficie y las propiedades de los materiales conductores inmersos en soluciones electrolíticas
Litografía	Se emplea una punta especial para grabar información sobre la superficie de la muestra
Contacto intermitente	Señal sinusoidal, haciendo oscilar a la punta a su frecuencia de resonancia.
Tapping	También llamado contacto intermitente, mide la topografía de la muestra tocando intermitentemente su superficie.
Contraste de Fase	Efecto de la interacción de la punta con los distintos constituyentes de la muestra, está relacionada con los constituyentes (fases) del material bajo observación.

Tabla 4

Ventajas y desventajas de los modos de operación del microscopio de fuerza atómica

MODO DE TRABAJO	VENTAJA	DESVENTAJA
Contacto	<ul style="list-style-type: none"> Alta velocidad de barrido Resolución atómica Cambios bruscos en topografía 	<ul style="list-style-type: none"> Fuerzas laterales ⇒ posible distorsión de imagen Posible aparición de fuerzas normales fuertes Combinación de fuerzas anteriores ⇒ puede disminuir resolución espacial y dañar muestras blandas
Contacto Intermitente	<ul style="list-style-type: none"> Mayor resolución lateral (1–5 nm) Fuerzas más débiles producen menor daño de muestra 	<ul style="list-style-type: none"> Ligeramente menor velocidad de barrido que el modo contacto.
No contacto	<ul style="list-style-type: none"> Ausencia de fuerzas aplicadas sobre la muestra 	<ul style="list-style-type: none"> Menor resolución lateral Menor velocidad de barrido Útil para muestras hidrofóbicas

Así como, células endoteliales, osteoblastos, fibroblastos, cardiomiocitos y células de levadura. También recientemente, empleado en el estudio de difusión de membrana y los movimientos de gránulos de plaquetas humanas activadas, con 4% de paraformaldehído-fijo, los astrocitos mostraron una red fibrilar del cerebro medio que es un impedimento de crecimiento neurítico (Gudur 2011).

Información sobre los procesos celulares se pueden derivar de las propiedades mecánicas de las células vivas por medio de la operación del AFM de modo que las fuerzas puede aplicarse y medirse directamente en las células vivas en condiciones líquidas, en las curvas es posible calcular la topografía de la células en fuerzas de carga diferentes, así como el módulo de elasticidad longitudinal o módulo de Young (E).

La mecánica celular juega un papel importante en muchos eventos fisiológicos celulares tales como la diferenciación celular (Fishkind y Wang 1995), la migración celular (Lim *et al.* 2006), y la capacidad deformable de la célula (Dartsch *et al.* 1994). Las desviaciones de los valores normales de las propiedades biomecánicas de células socavarán no sólo la integridad física de las células, sino también a sus funciones biológicas.

La detección de cambios en la elasticidad de células, medida por AFM, se ha utilizado para distinguir las células metastásicas de las células benignas, identificando así los estados de enfermedad en el cáncer (Cross *et al.* 2008 y Faria *et al.* 2008). Además, el

AFM se ha utilizado para detectar los cambios patológicos de las células del cartílago en la osteoartritis (Stolz 2009).

En la caracterización de la elasticidad de células correlacionadas con la morfología celular por AFM, utilizaron células mesoteliales aórticas humanas (HAECs) basados en la información de la altura de la célula. Se evaluaron la elasticidad de (HAECs) sobre diferentes sustratos. Los resultados mostraron que la elasticidad de HAECs sobre el sustrato más suave también tiene un valor más alto en comparación con aquellos en el sustrato duro.

En otros estudios han intentado encontrar una correlación de elasticidad celular con las funciones de las células y las enfermedades humanas, ya que los cambios en las propiedades de los tejidos fisiopatológicos pueden manifestarse en el nivel celular. El AFM puede ser empleado potencialmente como una herramienta de diagnóstico para la detección de estados de enfermedad humanos con bastante alta eficiencia y precisión, ya que puede detectar células alteradas en diferentes estados de la enfermedad. Las alteraciones en la deformabilidad celular de las células individuales se han identificado como un indicador útil de cambios relacionados con el cáncer (Lekka *et al.* 2011; Reséndiz y Castrellón 2005).

La investigación de la biomecánica a niveles celulares y moleculares de algunas enfermedades humanas no sólo ha llevado a un mejor esclarecimiento de los mecanismos detrás de progresión de la enfermedad, ya que las células enfermas se diferencian

físicamente de los sanos, sino que también ha proporcionado importantes conocimientos en la lucha contra estas enfermedades (Lee y Chwee 2007).

El análisis al AFM permite la investigación directa del efecto de estímulos extracelulares y de diferentes fármacos sobre las células vivas. Debido a la precisión de la aplicación de fuerzas a las células con una interrupción mínima, AFM puede medir fácilmente la tensión y propiedades elásticas de las células vivas durante los procesos fisiológicos y en respuesta a los fármacos anti-citoesqueleto (Agrawal *et al.* 2005).

Cross *et al.* 2008, realizaron un estudio donde analizaron las propiedades biomecánicas inherentes al cáncer metastásico, células normales y células mesoteliales, mediante AFM, donde se encontró que la rigidez (módulo de Young) de células humanas de cáncer metastásico fue de 70% más suave que las células reactivas benignas mesoteliales, lo que significa que las células normales o no tumorigénicas o cánceres no malignas se caracterizan por el módulo de Young mayor que en comparación a las células de cáncer. Además el uso de AFM para investigar los fenómenos biofísicos de células de efusión tomadas directamente de los pacientes para elucidar el papel de las influencias morfológicas sobre la rigidez celular.

Otra investigación de la biomecánica a nivel celular y molecular que se ha llevado a cabo es la interacción celular durante el desarrollo de la malaria. Donde se observó que la deformación de los glóbulos rojos en pacientes con anemia de células falciformes que se

someten a tratamiento con hidroxurea durante al menos seis meses es casi idéntica a la de glóbulos rojos sanos.

Esto sugiere que la elasticidad celular también puede ser utilizado como una indicador potencial de drogas-respuesta para monitorear la efectividad de los fármacos utilizados en el tratamiento de enfermedades (Ballas *et al.* 1989; Lee *et al.* 2004).

Uno de los resultados fisiopatológico de cáncer, es que las células afectadas son más deformable que las células no malignas. Actualmente, hay poca comprensión de cómo los cambios en las propiedades biomecánicas de las células cancerosas y los tumores pueden contribuir a la metástasis del cáncer.

Una de las ventajas clave de la AFM es su capacidad inherente para llevar a cabo mediciones en tiempo real sobre las muestras biológicas en sus condiciones fisiológicas. Lekka *et al.* 1999 utilizaron el AFM, para determinar la elasticidad de las células epiteliales de la vejiga humana normales y cancerosas; se encontraron con el módulo de Young de las células cancerosas para ser aproximadamente una décima parte la de las células sanas, es decir las células cancerosas son menos rigidez. La comparación directa de varias líneas celulares cancerosas (próstata PC-3, LNCaP y Du145, mama: MCF7 y T47D) con el contraparte normal mostró significativamente menor valor del módulo de Young para los anteriores. Además, se observaron amplias distribuciones de sus valores para las células normales de la próstata y de mama.

Otra investigación realizada se centra en el seguimiento de los cambios dinámicos topográficos de la membrana celular de las células de cáncer de ovario (SKOV-3) durante un período de 24 horas debido a la interacción de la carga no específica, dirigida, y drogas poli PLGA (ácido láctico, ácido glicólico) PLGA-Nanopartículas (Np) mediante AFM. Donde se demostró que la célula cambió su rugosidad debido a la interacción de las PLAG-Np.

Un estudio realizado por Lekka *et al.* 2011 en el cual se midió la elasticidad de ciertos tejidos cancerosos utilizando como indicador de elasticidad el Módulo de Young, ésta determinación de la rigidez de células en el contexto de la progresión del cáncer permitirá una detección más eficaz de los cambios relacionados con el cáncer. Ya que en este trabajo se encontró que en el caso de las células rígidas - la profundidad de indentación es más pequeño, pero el cambio de la posición sobre un fotodiodo de cuadrante es más grande.

Una de las principales necesidades para llevar a cabo el escaneo de las células cancerosas, es contar con una metodología que permita la adhesión de las células a un sustrato para lograr la adhesión celular para poder realizar el análisis al AFM, al respecto se han realizado varios estudios los cuales se resumen en la Tabla 5.

Tabla 5

Compilación de bioensayos realizados para la búsqueda de un sustrato que permita la adhesión célula-sustrato y ser analizadas al AFM

	Sustrato aplicado	Autor(es)
AFM for nanoscale microbe analysis	Recubrimiento de la punta (biotinilado BSA, alcanotioles sobre oro)	Dufrêne F. 2008
Direct measurement of <i>Mycobacterium</i> -fibronectin interactions	Punta tratada con Fibronectina	Verbelen y Dufrêne 2009
Nanoscopic characterization of the membrane surface of the HeLa cancer cells in the presence of the gold nanoparticles: an AFM study	Substrato de Oro	Tapia <i>et al.</i> 2009
Study of Cancer Cells Used Atomic Force Microscopy	PLL 0.1%	Tomankova <i>et al.</i> 2007
Albumin-derived nanocarriers: substrates for enhanced cell adhesive ligand display and cell motility.	Albumina	Sharma <i>et al.</i> 2006
Differential effect of curcumin on the nanomechanics of normal and cancerous mammalian cells	Matriz de colágeno	Saab <i>et al.</i> 2013
Atomic force microscopy: A tip for diagnosing cancer	Placas de plástico	Lekka 2012
Cancer cell recognition – Mechanical phenotype	Cubre objetos de vidrio	Lekka <i>et al.</i> 2012

Como en todos los sistemas, algunos de los problemas que limitan el uso del microscopio de fuerza atómica en la medición de módulos de elasticidad de materiales blandos a escalas microscópicas, en el cual se emplea tradicionalmente puntas afiladas. Este problema puede resolverse mediante el uso de micro-esferas como sondas (Dimitriadis *et al.* 2002).

4. JUSTIFICACIÓN

El cáncer colorrectal es un importante problema de salud debido a su alta frecuencia de aparición y mortalidad. Se trata de una patología que crece exponencialmente en México y el mundo debido a la adopción de malos hábitos dietéticos y el mantenimiento de costumbres perjudiciales, entre otros factores. Se ha reportado el efecto benéfico de los probióticos sobre patologías en humanos, tales como carcinogénesis, mutagénesis y tumores. Los probióticos son microorganismos vivos que al administrarse en cantidades adecuadas ejercen un efecto benéfico para la salud del huésped. Hay algunos datos iniciales que indican que los microorganismos probióticos pueden impedir o retrasar la aparición de ciertos tipos de cáncer. El campo de la mecánica celular, especialmente en la investigación del cáncer, tiene relación con la morfología celular, la motilidad y la adhesión y también el comportamiento de los principales componentes del citoesqueleto. La investigación realizada, ofrecerá información importante que permita conocer la actividad de los liofilizados de factores extracelulares de probióticos sobre las células de cáncer de colon HT-29 y se podrá determinar las alteraciones topológicas celulares empleando el microscopio electrónico de barrido, así como caracterizar los cambios morfométricos (rugosidad, adherencia, volumen) empleando el Microscopía de Fuerza Atómica.

5. HIPÓTESIS

Mediante el análisis al microscopio de fuerza atómica (AFM) y microscopio electrónico de barrido (MEB o SEM) es posible determinar parámetros morfométricos y topológicos específicos para las células HT-29 en presencia de factores extracelulares de probióticos.

6. OBJETIVOS

6.1 GENERAL

Determinar el comportamiento morfométrico de las células HT-29 al microscopio de fuerza atómica y la topología celular al microscopio electrónico de barrido en presencia de factores extracelulares de probióticos.

6.2 ESPECÍFICOS

- Establecer cinéticas de crecimiento de probióticos (*Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum* y *Bifidobacterium longum*) empleando el medio MPT.
- Obtener el liofilizado de los factores extracelulares de *L. casei*, *L. acidophilus*, *L. plantarum* y *B. longum*.
- Determinar la actividad biológica de los factores extracelulares de *L. casei*, *L. acidophilus*, *L. plantarum* y *B. longum* a cuatro concentraciones sobre la línea células HT-29.
- Caracterizar al AFM los parámetros morfométricos de HT-29 en presencia de factores extracelulares de probióticos.
- Analizar la topografía de las células HT-29 en presencia de factores extracelulares de probióticos al microscopio electrónico de barrido.

7. MATERIAL Y MÉTODOS

7.1 Material biológico

Las bacterias clasificadas como probióticos que se emplearon en este trabajo fueron:

- *Lactobacillus plantarum* (Cepa ATCC 8014)
- *Lactobacillus casei* (Cepa ATCC 334)
- *Lactobacillus acidophilus* (Cepa ATCC 4356)
- *Bifidobacterium longum* (Cepa ATCC 15707)
- Línea celular HT-29 se obtuvo de la ATCC (American Type Culture Collection, 1994).
- Suero fetal bovino (se obtuvo del catálogo de la ATCC, al igual que el medio AIM-V), así como los antibióticos empleados (penicilina-estreptomicina) y el DMSO (Dimetil-sulfoxido).

7.2 Material químico

Los reactivos que se utilizarán en el desarrollo del trabajo son descritos en la Tabla 6

Tabla 6

Lista de reactivos empleados en los bioensayos

Casa comercial	Reactivo
Bioxon de México	Peptona de caseína, Extracto de levadura y D (+) glucosa
Control Técnico y Representaciones S.A. de C.V.	N-Lauroylsarcosine (Sodium N-dodecanoyl-N-methylglycinate)
PRAXAIR de México	Bióxido de carbono (99.9% pureza).
Productos Químicos Monterrey, S.A. de C.V.	Fosfato de potasio monobásico, Hidróxido de sodio, Ácido clorhídrico, Cloruro de sodio y Citrato férrico de amonio.
Sigma Chemical Company (St. Louis Mo, USA)	Ácido ascórbico, L-cisteína y Fosfato de potasio dibásico L-cisteína.

7.2.1 Preparación de soluciones y medios de cultivo

En la Tabla 7, se enlistan las soluciones y medios de cultivo empleados en el desarrollo de este trabajo.

Tabla 7

Listado de preparación de soluciones y medios de cultivo

Solución	Descripción
Ácido clorhídrico (0.1N)	Se afora hasta 50 mL con agua bidestilada desionizada 0.41 mL de HCl concentrado (12N).
Buffer PBS	Se disuelve 8.00g de NaCl, 0.20 de KCl, 1.44g de KH ₂ PO ₄ , en 100mL de agua bidestilada desionizada, se ajusta a pH 7.4 y se mantuvo en refrigeración en un frasco ámbar a 4°C, hasta su empleo.
Citrato férrico de amonio (1%)	Se disuelve 0.1g de citrato férrico de amonio en (CA) 10 mL de agua bidestilada
Hidróxido de sodio (10N)	Se disuelven 40g de hidróxido de sodio (NaOH) en 100mL de agua bidestilada desionizada.
Solución salina (0.85%)	Se disuelven 0.85g de cloruro de sodio (NaCl) en 100mL de agua bidestilada desionizada y se ajustó a pH7.0. Se esteriliza en autoclave por 15 min a 15Lb de presión a 121°C. Se mantiene en refrigeración a 4°C, hasta su empleo.
Solución de penicilina-estreptomicina	Solución concentrada de penicilina: a un frasco ampula de 1x10 ⁶ U de Penicilina G sódica cristalina, se le inyecta con aguja y jeringa estéril 5.0mL de agua bidestilada desionizada para disolver la penicilina. Solución patrón de penicilina-estreptomicina: a un frasco ampula de sulfato de estreptomicina, se le añade bajo condiciones de esterilidad, la solución concentrada de penicilina y se mezcla. Solución de trabajo de penicilina-estreptomicina (100X): se transfiere asépticamente toda la solución patrón de penicilina-estreptomicina del frasco ampula a una probeta estéril de 25mL y se afora a 20mL con agua bidestilada desionizada estéril. Se almacena a 4°C en alícuotas de 5mL en tubos cónicos de 50mL que se cubren con papel aluminio.
AIM-V	Sigma-Aldrich St. Louis, MO, USA
Suero fetal bovino	Sigma-Aldrich St. Louis, MO, USA,

7.3 Probióticos

Preparación de medio de cultivo de probióticos: Medio MPT-caldo y MPT-agar se preparó de acuerdo a las indicaciones mencionadas por Barrón *et al.* 2008.

7.3.1 Mantenimiento

Las cepas de probióticos se mantuvieron en refrigeración a 4°C en MPT-caldo, cada cepa se activó tomando 500µL y se suspendió en 5mL de caldo para probióticos, se incubaron por 24-48h a 37°C. Para la activación de cada cepa se tomaron bajo condiciones de esterilidad 0.5mL y se colocaron en tubos borosilicato de 13x100mm conteniendo 5mL de MPT-caldo, se incubaron a 37°C por 18 h, posteriormente bajo condiciones de esterilidad se tomó una asada de cada cultivo y se resembró por estría en tres tubos de borosilicato de 13x100mm conteniendo 5mL de medio agar-MPT semisólido, se incubaron a 37°C por 24 h, enseguida se guardaron a 4°C por no más de seis meses.

7.3.2 Cinética de crecimiento

La cinética de crecimiento de los probióticos se realizó empleando dos métodos: método turbidimétrico y el método de recuento bacteriano en placa.

- a) Método turbidimétrico: Se dispuso para cada de una de las cepas de probióticos, nueve tubos con tapón de rosca conteniendo 5mL de MPT-caldo y frente al mechero, se inocularon con 500µL de cultivo de cada uno de los probióticos, e inmediatamente se tomó la primera lectura. Posteriormente se incubaron en un baño de agua a 37°C y cada hora se realizaron las lecturas de absorbancia empleando un espectrofotómetro

(Spectronic Genesis®) a una longitud de onda de 635nm durante un lapso de 24h, se registraron y se graficaron los valores obtenidos.

b) Método de recuento bacteriano en placa (RBP): Se reactivaron las bacterias probióticas, tomando una asada de una colonia del cultivo en medio MPT-agar y se depositaron en tres tubos de 13x100mm conteniendo 5mL del medio MPT-caldo, se incubaron a 37°C durante 24h, transcurrido este tiempo se inocularon tres tubos de 13x100mm con 5mL de medio MPT con un inóculo al 1% y se incubaron a 37°C por 24 h, después se inoculó 1% de cultivo en otros tres tubos de 13x100mm con 5mL de medio MPT-caldo con un inóculo de 1% y se incubaron a 37°C por 14h, transcurrido este tiempo se determinaron las unidades formadoras de colonias (UFC)/mL empleando el método de dilución en placa; para realizar esta determinación se realizaron diluciones de 10^{-1} hasta 10^{-15} . A partir de las últimas diez diluciones se transfirieron 1 mL a una caja Petri enseguida se agregaron 15mL de medio MPT-agar, inmediatamente se agitó la placa suavemente para distribuir homogéneamente el inóculo a través del medio de cultivo, se dejó solidificar, posteriormente se incubó a 37°C por 18 a 24h, después de este tiempo se contaron las colonias para determinar las unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL) (figura 7).

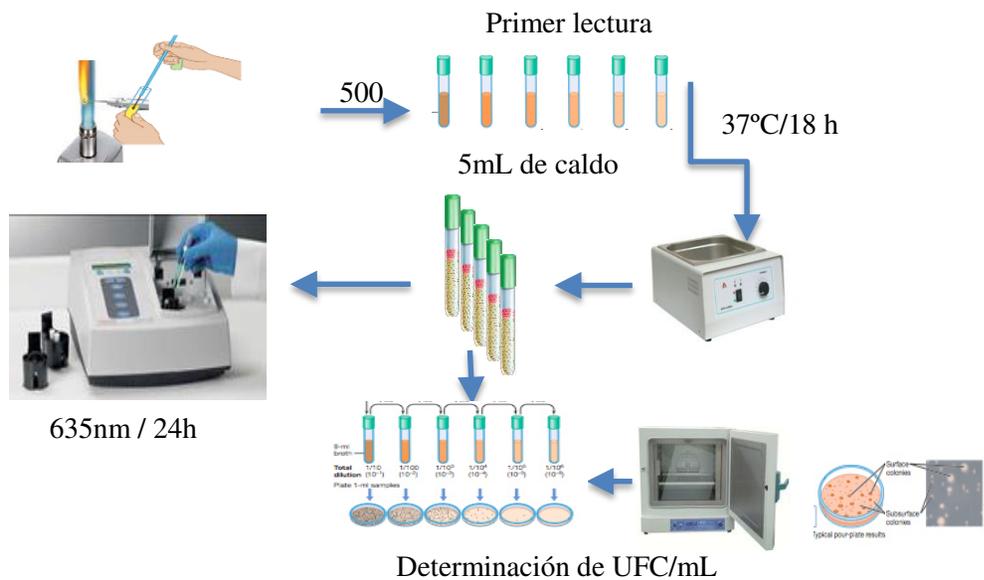


Figura 7. Procedimiento general para determinar Unidades Formadoras de Colonias (UFC).

7.3.3 Obtención de factores extracelulares de probióticos (FEP)

Los cultivos de probióticos se reactivaron antes de iniciar cada bioensayo. A un litro de medio MPT-caldo se le inocularon 1% de cultivo de cada uno de los probióticos (incubado por 24h a 37°C dependiendo de cada cepa) se incubaron a 37°C por 48h. El cultivo se colocó en frascos especiales y se centrifugó a 2500rpm por 10 min, se separó el sobrenadante y se centrifugó nuevamente; este paso se repitió hasta que ya no se observó precipitado alguno; el sobrenadante se esterilizó por filtración con filtros Millipore de 0.22µm y enseguida se le realizó la prueba de esterilidad, tomando una alícuota y colocándola en medio MPT-caldo para probióticos, se incubó a 37°C por 48h y una vez aprobada la prueba de esterilidad, el sobrenadante obtenido constituye los factores extracelulares de los probióticos (FEP).

7.3.4 Obtención del Liofilizado de los factores extracelulares de probióticos (LFEP)

El sobrenadante filtrado se congeló por 24 h a -20°C y posteriormente se llevó la muestra de los factores extracelulares de *L. casei*, *L. plantarum*, *L. acidophilus* y *B. longum* a un liofilizador. El liofilizado que se obtuvo se colocó en un frasco de vidrio estéril y se almacenó a -20°C hasta su empleo (figura 8).

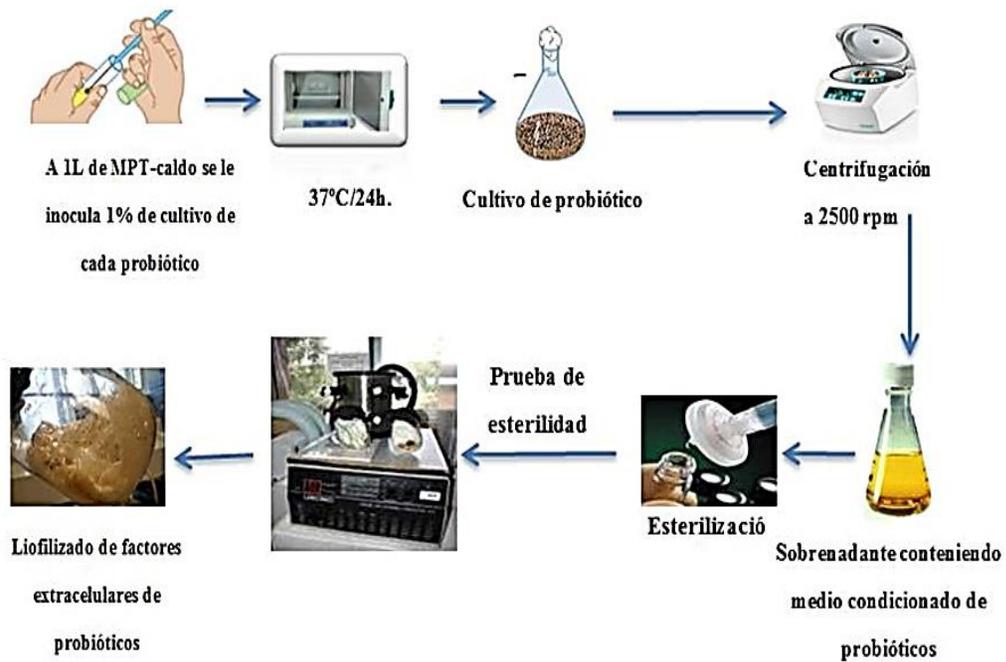


Figura 8. Procedimiento general de la obtención de liofilizados factores extracelulares de probióticos (LFEP).

7.4 Línea celular

La línea celular HT-29 (Human Tumor) se obtuvo de la ATCC (American Type Culture Collection). Las células fueron adaptadas a crecimiento *in vitro* empleando el medio AIM-V

- A. Mantenimiento *in vitro*:** Las células HT-29 se mantuvieron en el medio AIM-V (Sigma-Aldrich St. Louis, MO, USA) suplementado con 10% de suero fetal bovino (Sigma-Aldrich St. Louis, MO, USA), 2mM glutamina (GibcoBRL, Gran Island, NY, USA) y antibióticos (0.5% de solución penicilina-estreptomicina, 0.1% de fungizona Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Las células se incubaron a 37°C en una atmósfera húmeda, conteniendo un 5% de CO₂ en frascos Celltreat de 25cm³ (Corning, New York, USA).
- B. Congelación de la línea celular:** Para asegurar la disponibilidad de la línea HT-29, se congelaron muestras (stocks) de aproximadamente 2x10⁷ células/mL, para lo cual las células se concentraron mediante centrifugación a 1800 rpm durante 10min, se eliminó el sobrenadante y el concentrado celular se resuspendió en una solución de 70% medio de cultivo AIM-V, 20% suero fetal bovino (SFB) y 10% DMSO como anticongelante que impide la formación de cristales de agua en el interior de las células manteniendo la integridad celular, y se dispuso 1mL por criotubo (Corning), éste material se almacenó a -80°C durante una semana y después se guardó en un tanque de nitrógeno líquido hasta el momento que se requirió.

7.5 Obtención de fibroblastos a partir de un modelo murino

Se empleó un ratón BALB/C hembra, libre de algún tipo de enfermedad, adquirido en el Bioterio de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León. Para el diseño del experimento se tomaron en cuenta las recomendaciones y los principios bioéticos para el uso de animales de acuerdo con NOM-062-ZOO-1999.

Se realizó la disección del ratón y se dispuso de su intestino grueso, el intestino se colocó en una placa Petri para realizar el lavado de tejido con BSP (3 veces) y posterior a esto se llevó a cabo una disgregación enzimática con tripsina, enjuagado con H₂O desionizada. En seguida del enjuagado se realizó la fijación con glutaraldehído 2.5% que al secarse se llevó directamente a observar bajo del Microscopio de Fuerza Atómica (figura 9).

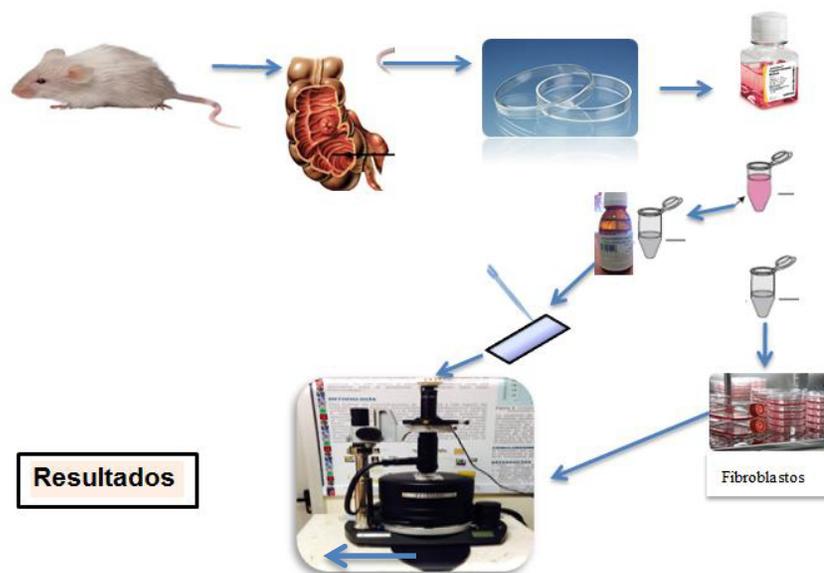


Figura 9.- Procedimiento general para la obtención de fibroblastos de modelo murino.

7.6 Bioensayos

Para el ensayo de la actividad antitumoral se utilizó una placa-A de 96 pocillos, asignándose 18 pozos para cada LFE-probiótico a evaluar, y de igual manera para el control positivo y el control negativo (doxorubicina-HCl). En cada pozo se colocaron 160 μ L de medio de cultivo AIM-V conteniendo las células HT-29. Se incubaron a 37°C en una atmósfera húmeda de 5% de CO₂ y 95% de aire, por 24 h. A la placa 1 se le agregaron las diferentes diluciones de los factores extracelulares de cada probiótico, en este caso se emplearon las dosis de 26, 13, 7 y 3.5 mg/mL. Se incubó la placa por 24 h, enseguida se agregó el reactivo MTT y se leyó al espectroscopio la absorbancia a una longitud de onda de 570 nm, considerando que un tono morado representa que las células vivas redujeron el MTT y la ausencia del color indica ausencia o menor actividad celular. Cada ensayo se realizó en tres eventos independientes por triplicado (figura 10).

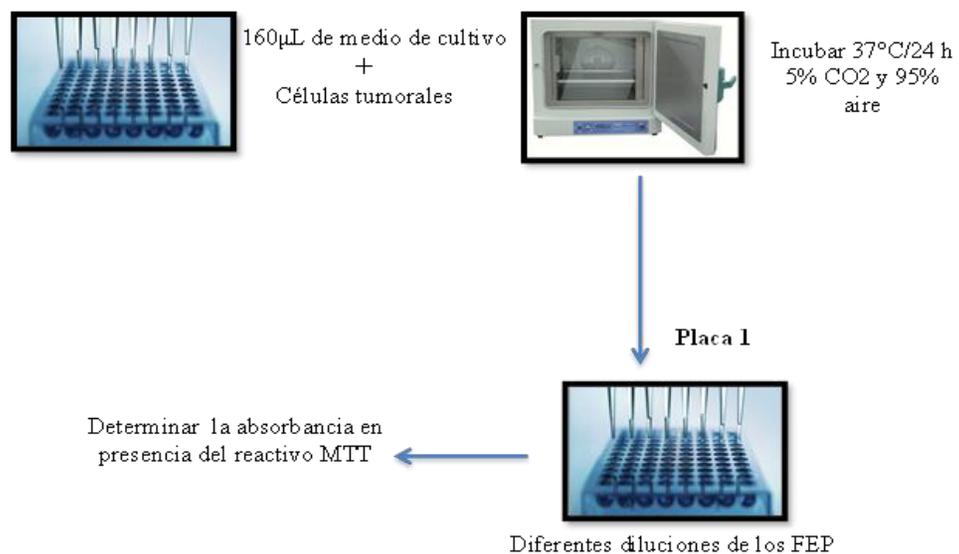


Figura 10.- Procedimiento general del bioensayo para evaluar la actividad de los LFE-probióticos sobre la línea celular HT-29.

7.7 Estrategias/sustratos de adhesión celular

Se diseñaron estrategias de adhesión celular en frascos de cultivo para observar al AFM, ya que al momento de querer observar las células se veía como la punta del cantilever las desprendía haciendo imposible el escaneo célula. Por lo cual se trabajaron diez estrategias para tratar de adherir las células a la base o sustrato y poder observarlas al AFM. Las estrategias fueron:

- a) Placa: Se cortaron las bases de las placas de cultivo con un cutter esterilizado y caliente de aproximadamente 3 cm de largo x 0.5cm de ancho, con ayuda de pinzas estériles se colocaron dentro de placas de cultivo con 5 mL de medio AIM-V suplementado con 10 % de SFB y se añadieron 2×10^4 células sobre las laminillas cortadas. Se incubaron por 48 h, posterior a su periodo de incubación se observó al microscopio óptico y microscopio de fuerza atómica.
- b) Polietilenimina: Del mismo modo se utilizaron laminillas de placas cortadas, se cubrió la superficie con polietilenimina, se dejó secar y con ayuda de unas pinzas estériles se colocaron dentro de los frascos de cultivo. Una vez dentro de la placa de cultivo, se colocaron 2×10^4 células añadiendo 5 mL de medio de cultivo AIM-V suplementado con 10 % de SFB. Se incubaron por 48 h, posterior a su periodo de incubación se observó al microscopio óptico y microscopio de fuerza atómica.
- c) Ciclo de lavado: Se cortaron portaobjetos (3cm de largo x 0.5 cm de ancho) para luego lavarlos con agua- detergente, se enjuagaron con agua de la llave (3 veces), se dejaron secar, posteriormente se colocaron en cloro 1% por 24h, después se enjuagaron con agua desionizada (3 veces), se colocaron en HCl 1% por 24h, después se enjuagaron con agua desionizada (3 veces), se dejaron secar y una vez

con ayuda de pinzas estériles se colocaron dentro de los frascos de cultivo. Una vez dentro de la placa de cultivo, se colocaron 2×10^4 células y se añadieron 5 mL de medio de cultivo AIM-V suplementado con 10 % de SFB. Se incubaron por 48 h, posterior a su periodo de incubación se observó al microscopio óptico y microscopio de fuerza atómica.

- d) Poli-L-lisina: Se cubrió el frasco de cultivo con la poli-L-lisina (0.1 %), una vez seco se agregaron 2×10^4 células y se añadieron 5 mL de medio de cultivo AIM-V suplementado con 10 % de SFB. Se incubaron por 48 h, posterior a su periodo de incubación se observó al microscopio óptico y microscopio de fuerza atómica.
- e) Poli-L-lisina + ciclo de lavado: Como se describió anteriormente en el ciclo de lavado, esos mismos portaobjetos se les cubrió con Poli-L-lisina (0.1%) se dejaron secar y posterior a eso con ayuda de pinzas estériles se colocaron dentro de los frascos de cultivo. Una vez dentro de la placa de cultivo, 2×10^4 células y se añadieron 5 mL de medio de cultivo AIM-V suplementado con 10 % de SFB. Se incubaron por 48 h, posterior a su periodo de incubación se observó al microscopio óptico para observar su crecimiento y adhesión, posterior a esto se dispuso de los portaobjetos con ayuda de unas pinzas estériles y se colocaron en placas de Petri (60 x 15mm) con 3-5 mL de medio AIM-V para observar al microscopio de fuerza atómica.
- f) Mica: Se colocó la mica en una placa de Petri (60 x15 mm) y se agregaron 2×10^4 células y se añadieron 5 mL de medio de cultivo AIM-V suplementado con 10 % de SFB. Se incubaron por 48 h, posterior a su periodo de incubación se observó al microscopio óptico y microscopio de fuerza atómica.

- g) Etanol: Se cortaron portaobjetos (3cm de largo x 0.5 cm de ancho) para luego limpiarlos con etanol se dejaron secar y con ayuda de pinzas estériles se colocaron dentro de los frascos de cultivo. Una vez dentro de la placa de cultivo, se colocaron 2×10^4 células y se añadieron 5 mL de medio de cultivo AIM-V suplementado con 10 % de SFB. Se incubaron por 48 h, posterior a su periodo de incubación se observó al microscopio óptico y microscopio de fuerza atómica.
- h) Citospray: Se cortaron portaobjetos (3cm de largo x 0.5 cm de ancho) y se atomizaron con citospray (fijador para citología exfoliativa) se dejaron secar (1-2 min) y con ayuda de pinzas estériles se colocaron dentro de los frascos de cultivo. Una vez dentro de la placa de cultivo, se colocaron 2×10^4 células y se añadieron 5 mL de medio de cultivo AIM-V suplementado con 10 % de SFB. Se incubaron por 48 h, posterior a su periodo de incubación se observó al microscopio óptico y microscopio de fuerza atómica.
- i) Albumina Sérica Bovina al 50 %: Se recubrieron placas de Petri (60 x 15mm) con albumina, se dejaron secar (1-3min), se colocaron 2×10^4 células y se añadieron 5 mL de medio de cultivo AIM-V suplementado con 10 % de SFB. Se incubaron por 48 h, posterior a su periodo de incubación se observó al microscopio óptico para observar crecimiento y adhesión celular; y en caso de observar adherencia se procedió a observar al microscopio de fuerza atómica.
- j) Laminillas silanizadas: Se utilizaron portaobjetos Dako, Flex IHC Microscope Slides y se cortaron por la mitad y se colocaron en placas Petri (60 x 15mm) y se sembraron 2×10^4 células y se añadieron 5 mL de medio de cultivo AIM-V suplementado con 10 % de SFB. Se incubaron por 48 h, posterior a su periodo de

incubación se observó al microscopio óptico para observar crecimiento y adhesión celular; en caso de presentarse adherencia celular se observó al microscopio de fuerza atómica.

7.8 Microscopía

7.8.1 Microscopía electrónica de barrido (MEB / SEM)

- a) Preparación de la muestra: Las células HT-29 (control y obtenidas de cada uno de los tratamientos: LFE-*L. casei*, LFE-*L. acidophilus*, LFE - *L. plantarum* y LFE-*B. longum*) se depositaron en una placa de Petri, se incubaron por 48 h, se fijaron con glutaraldehído 2.5% y se enjuagaron tres veces con agua destilada, posteriormente se observaron al Microscopio Electrónico de Barrido.
- b) Modo de operación del Microscopio: Las muestras se depositaron sobre una cinta de carbono de doble cara sin recubrimiento. Las condiciones bajo las cuales se observaron las muestras fueron: 2000X, 1000X y 500X, 15 KV, a bajo vacío para evitar sobrecarga de electrones secundarios sobre la muestra. Se tomaron 2 micrografías por muestra en una misma zona.

7.8.2 Microscopía de fuerza atómica (AFM)

- a) Preparación de la muestra: Para la preparación de la muestra, estas se depositaron en una placa de Petri conteniendo el medio de cultivo AIM-V y suplementadas con suero al 10%, las cuales se incubaron por 48 h a 37°C en condiciones de CO₂ al 5%, posteriormente se observaron al Microscopio de Fuerza Atómica.

b) Modos de operación: Los modos básicos de operación del AFM, consiste en colocar la punta y ajuste de la señal del láser. La punta se coloca en el soporte con la ayuda de unas pinzas, deslizándola por la ranura del soporte, enseguida se coloca el soporte con la punta dentro de la cabeza del AFM y se procede al ajuste de la señal del láser. Para el alineamiento del láser se hace uso de un microscopio monocular, para observar la posición del haz del láser sobre el cantiléver de la sonda de medida. Con ayuda de los dos tornillos del cabezal del AFM, se coloca el haz del láser encima del sustrato. A continuación, posicionamos el haz en el borde del sustrato moviendo para ello el tornillo correspondiente al eje X. Con el tornillo de ajuste del eje Y se busca el centro del cantiléver de la sonda de medida. Finalmente con los dos tornillos de ajuste en los ejes X y Y terminamos de posicionar la señal del láser en el centro del cantiléver, observando en todo momento en la intensidad de la señal que le llega al fotodetector. Si la intensidad de la señal es baja, esta se puede aumentar variando ligeramente la inclinación del espejo que se encuentra dentro del cabezal del microscopio hasta conseguir una intensidad adecuada (la intensidad debe de ser mayor a 10 nA).

Para observar las muestras al AFM se diseñó una punta redondeada de vidrio (esfera de vidrio en la punta) para poder escanear las imágenes. Posteriormente una gota de muestra se colocó en el portamuestras del microscopio, éste se introduce en la celda y se observaron en AFM Scanning Probe Microscope. Los análisis se realizaron con ayuda de los softwares Nanoscope IIIa de Digital

Instruments Veeco Metrology Group y WSxM Program de Nanotec (Ricci y Braga, 2004).

c) Modo contacto: Cuando el AFM se encuentra en modo de contacto, la punta está físicamente en contacto con la superficie de la muestra al realizar el barrido. Utilizando este modo es posible obtener imágenes de altura y de amplitud (o deflexión) del cantiléver. Las imágenes de altura son un mapa de pixeles de diferentes colores, donde cada color se relaciona con una altura diferente. La apariencia de la imagen muchas veces es muy diferente a la que se tendría en un Microscopio óptico (MO) o un Microscopio Electrónico de Barrido (SEM), razón por la cuál es muy común transformar estas imágenes de altura a una imagen 3-D. Las imágenes de amplitud son el equivalente a un mapa del declive de la muestra (figura 11).

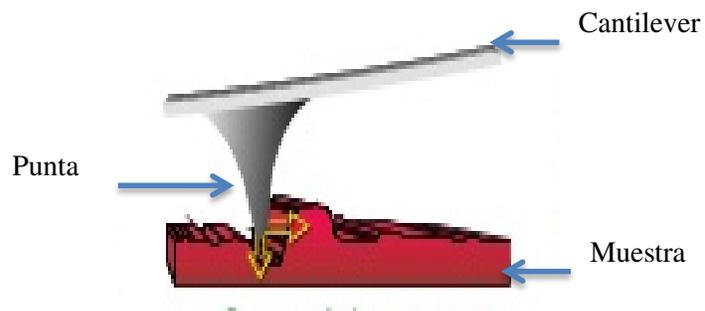


Figura 11.- Representación esquemática del escaneo de la punta del AFM en modo contacto.

d) Modo de No contacto (NC): Al utilizar el modo de no contacto la punta del cantiléver oscila cerca de la superficie (con amplitudes de oscilación menores a 10nm) y con una frecuencia de resonancia de algunos Hertz, es decir, se mantiene la amplitud de oscilación constante y, a partir de esto, se obtiene la imagen. Mediante esta técnica es posible la obtención de imágenes de cambio de fase (además de imágenes de altura y de amplitud), la cual está relacionada con los cambios en la fase de oscilación del cantiléver debido a la interacción de la punta con la muestra, haciendo posible diferenciar entre la homogeneidad de la dureza de la muestra (figura 12).

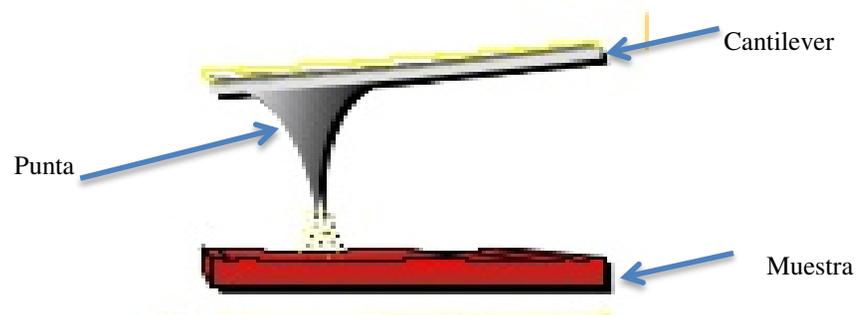


Figura 12.- Representación esquemática del escaneo de la punta del AFM en modo no contacto.

Para obtener las curvas-fuerza distancia se llevó a cabo una nanoindentación al penetrar la punta del cantiléver en la muestra, de esta manera la profundidad a la cual la punta se introduce depende de varios factores, como son: fuerza de desprendimiento, fuerza aplicada sobre la punta, interacciones entre la muestra y la punta y dureza relativa (figura 13).

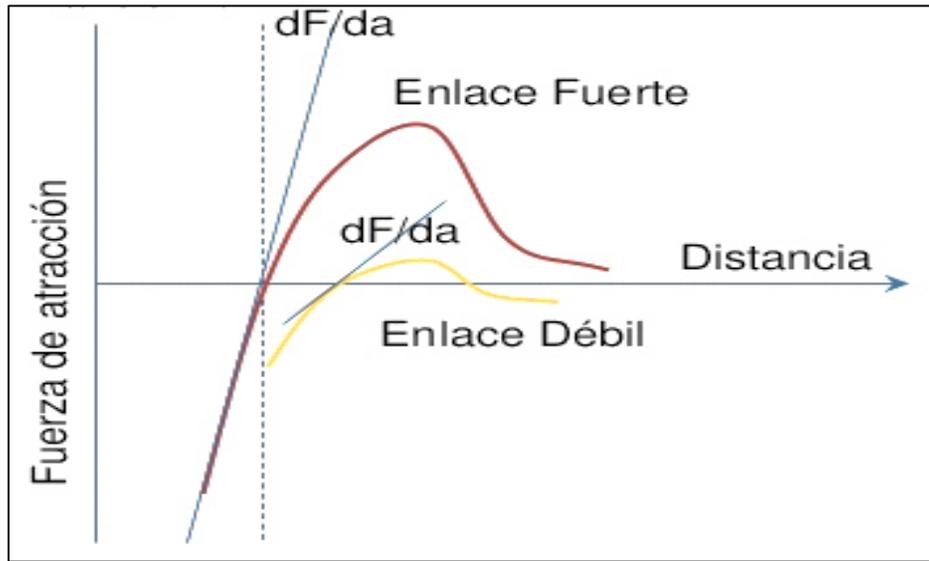


Figura 13. Representación esquemática de obtención de las curvas Fuerza-Distancia por Microscopía de Fuerza Atómica (Adaptado de Ortega *et al.* 2014).

- e) Módulo elástico o modo elástico: Para la obtención del módulo elástico de la muestra, se utilizaron las curvas de fuerza-distancia obtenidas en experimentos de nanoindentación, las cuales son ajustadas utilizando el modelo de Hertz, el cual es el modelo más apropiado y más utilizado en sistemas celulares.
- f) Trabajo de adhesión: El trabajo de adhesión es la fuerza necesaria ejercida por la punta de nitruro de silicio (o la punta con la esfera de vidrio) para poder desprenderse de la superficie celular (Fuerza de desprendimiento). Este parámetro también se obtuvo a partir de las curvas de fuerza-distancia obtenidas de nanoindentación.

g) Rugosidad: Para la obtención de la rugosidad de la muestra se analizaron las imágenes de altura obtenidas en modo de tapping. Los datos se obtuvieron utilizando el software Nanoscope sobre un área determinada de la imagen, obteniendo así la rugosidad (R_q) (Ricci y Braga, 2004).

h) Nanoidentación: La prueba de indentación es un método que consiste esencialmente en someter a deformación controlada un material cuyas propiedades mecánicas, como el módulo de elasticidad y la dureza no se conocen. La nanoidentación, es una prueba de indentación en la cual las escalas de deformación están en el orden de los nanómetros (10^{-9} m). La dureza de un material puede ser evaluada de manera directa a partir de las características de la huella de indentación, como la profundidad o el área; además, otras propiedades como el módulo elástico y las propiedades viscoelásticas, también pueden ser obtenidas con pruebas de indentación.

Es posible utilizar las características instrumentales de un sistema de Microscopía de Fuerza Atómica, para producir de manera indirecta nanodeformación en materiales biológicos, a través de un modo de operación denominado espectroscopía de fuerzas. La espectroscopía de fuerzas (FS) consiste en adquirir una curva de fuerza en función de la distancia $F(z)$ entre la punta del AFM y la superficie bajo análisis en un único punto de la muestra por vez, es decir, no se ejecuta el escaneo o barrido, por esta razón el resultado es una curva y no una imagen. La ventaja asociada radica en que inmediatamente después de la adquisición de la curva, se puede volver al modo de imagen por barrido y obtener

una imagen de alta resolución en el punto exacto en donde fue tomada (Arroyave 2008).

- i) Adhesión celular: La adhesión puede ser definido como "el cambio de energía libre a las áreas unitarias separadas de dos medios de contacto hasta el infinito en el vacío o en un tercer medio. En general, la atención tiene que ser tomado con la adhesión plazo, ya que también se utiliza para definir una fuerza - la fuerza de adherencia, como por ejemplo en el microscopio de modulación fuerza (FMM). En condiciones ambientales, la principal fuente de la adhesión es la formación de un puente capilar entre la punta y la muestra. En el aire, la mayoría de las muestras tienen varios nanómetros de agua adsorbida a la superficie; esta capa de agua asciende hasta la punta y forma un "puente" entre la punta y la muestra. Al tirar de la punta de ese puente requiere una gran fuerza para superar la tensión superficial. En el líquido, la fuerza adhesiva depende de las energías interfaciales entre la punta y las superficies de la muestra, y la solución; la variación de la solución se puede cambiar así la fuerza de adherencia. La fuerza de descarga es considerada como la fuerza de adhesión, que se encuentra en el rango de unos pocos nanonewton a decenas de nanonewton (Sedin *et al.* 2000).

7.8.2.1 Adaptación de una esfera de vidrio a la punta del cantiléver

Fue necesario fabricar una punta esférica de vidrio a la punta del cantiléver para poder escanear las células sin romperlas o arrastrarlas.

Para pegar la punta esférica del vidrio al cantiléver fue necesario añadir una pequeña gota de pegamento HUH plus endfest 300 (2-k- epoxidikleber) a la

punta, siendo cuidadosos de que no fuera demasiado pegamento, posteriormente a eso se retiró la punta del pegamento rápidamente, una vez que la punta tenía el pegamento, se observó al AFM las esferas de vidrio a las cuales se podían pegar; una vez identificada nuestra esfera, se hizo bajar el cantiléver (con la punta ya con pegamento) para tocar la esfera y que esta quedara pegada a la punta con ayuda del pegamento. Siendo muy cuidadosos de que la esfera se colocara exactamente en la punta del cantilever, una vez pegada la punta con la esfera de vidrio se dispuso a escanear las células con esta nueva punta para no causarles daño alguno.

7.9 Análisis estadístico

Para determinar el efecto de los factores extracelulares de probióticos sobre el crecimiento de las líneas celulares HT-29 se realizaron experimentos independientes por triplicado. Se promediaron los rendimientos máximos que se obtuvieron durante los diferentes experimentos y se compararon con el cultivo control mediante el análisis de varianza con una $p < 0.05$ y con una posterior comparación múltiple de medias, así como también un análisis Probit para determinar la concentración mínima inhibitoria, todo esto mediante el paquete estadístico SPSS para Windows® versión 2000.

8. RESULTADOS

8.1 Cinética de crecimiento y determinación de UFC

En la figura 14 se observa la gráfica correspondiente a la cinética de crecimiento de *L. casei*, *L. plantarum*, *L. acidophilus* y *B. longum* por el método turbidimétrico a 635 nm. La fase de adaptación ocurrió a partir la segunda hora de incubación, en las cuatro cepas de bacterias probióticos el comportamiento fue similar. Para *L. casei*, *L. plantarum* y *B. longum* la fase exponencial fue a partir de la segunda hora hasta la novena hora, y después se presentó la fase estacionaria. Para *L. acidophilus* la fase exponencial fue a partir de la tercera hora hasta la séptima hora; esta cepa fue la que más rápido llegó a su fase estacionaria y obtuvo una lectura de absorbancia menor de 1.2 nm; y *L. casei*, *L. plantarum* y *B. longum*, la lectura de absorbancia para su fase estacionaria fue de 1.6nm, entre las cuatro cepas probióticas no hubo diferencia significativa.

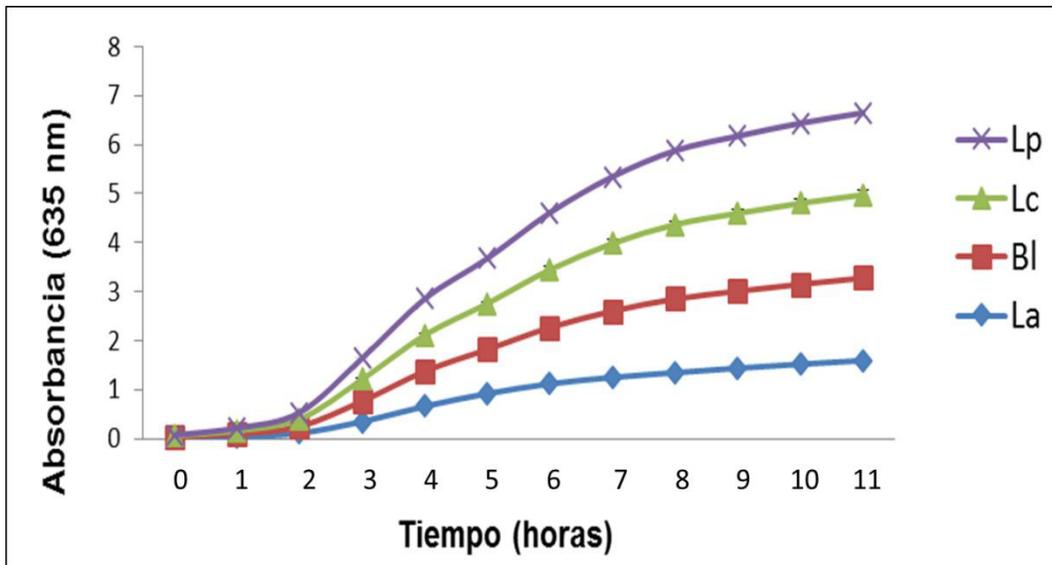


Figura 14.- Cinética de crecimiento de probióticos. Cada línea corresponde a la lectura de tres eventos independientes por triplicado, correspondientes a *L. acidophilus* (línea azul), *B. longum* (línea roja), *L. casei* (línea verde) y *L. plantarum* (línea morada), se observa mayor absorbancia por parte de esta última.

8.2 Unidades Formadoras de Colonias (UFC)

Después de 12 horas de incubación a 37°C, se realizó el recuento bacteriano en placa (RBP) para determinar las unidades formadoras de colonia (UFC). En la figura 15 se muestran los resultados de las UFC de *L. casei*, *L. plantarum*, *L. acidophilus* y *B. longum*. Entre las cuatro cepas hubo una marcada diferencia significativa, siendo *L. acidophilus* la que mostró mayor número de UFC (652.66×10^9) seguido por *L. plantarum* (89.33×10^9), *B. longum* (59×10^9) y *L. casei* con el menor número (35.33×10^9).

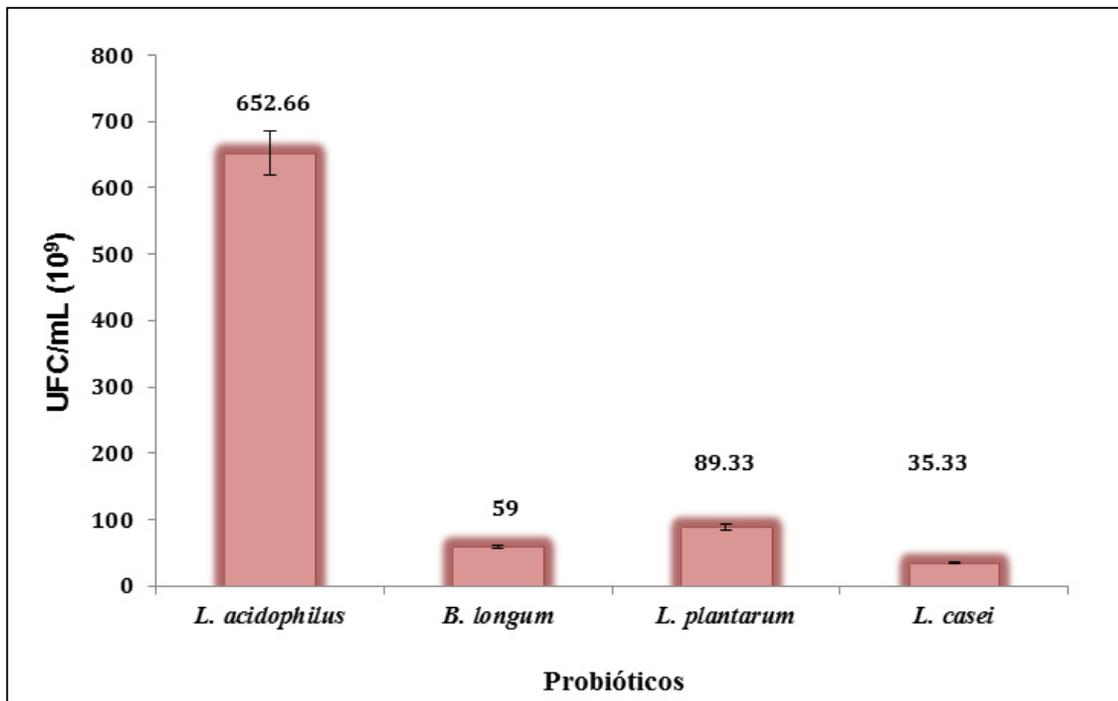


Figura 15.- Comparación del rendimiento de UFC/mL de probióticos. De las cuatro cepas evaluadas, *L. acidophilus* mostró el mayor número de UFC, en tanto que *L. plantarum*, *B. longum* y *L. casei*, mostraron rendimientos semejantes entre sí.

8.3 Liofilizados de factores extracelulares (LFE)

Las características de los LFE de *L. casei*, *L. plantarum*, *L. acidophilus* y *B. longum* se describen en la Tabla 8 y se observan en las figura 16. En los LFE, de las cuatro cepas probióticas, hubo un promedio de pH de 4, siendo el liofilizado de *L. casei* el que presentó el menor pH de 4.36, esta misma cepa fue la que obtuvo un color más oscuro, textura granulada y un mayor rendimiento de 20g/L. El liofilizado de *L. plantarum* presentó un pH de 4.37, coloración ámbar, textura pegajosa y rendimiento de 14 g/L. El liofilizado de *L. acidophilus* tuvo un pH de 4.70, el cual fue mayor que las otras cepas; color anaranjado con textura granulada y rendimiento de 12g/L.

En tanto que *B. longum* presentó un pH de 4.46, coloración marrón, textura pegajosa y rendimiento de 12g/L. Las cepas de *L. acidophilus* y *B. longum* fueron los que presentaron menor rendimiento (Tabla 8).

Tabla 8

Características de los Liofilizados de Factores Extracelulares (LFE) de probióticos

Característica	LFE- <i>L. casei</i>	LFE- <i>L. plantarum</i>	LFE- <i>L. acidophilus</i>	LFE- <i>B. longum</i>
pH	4.36	4.37	4.70	4.46
Color	Café	Ámbar	Ámbar	Marrón
Textura	Granulado	Pegajoso	Granulado	Pegajoso
Rendimiento g/L	20	14	1 figura	12

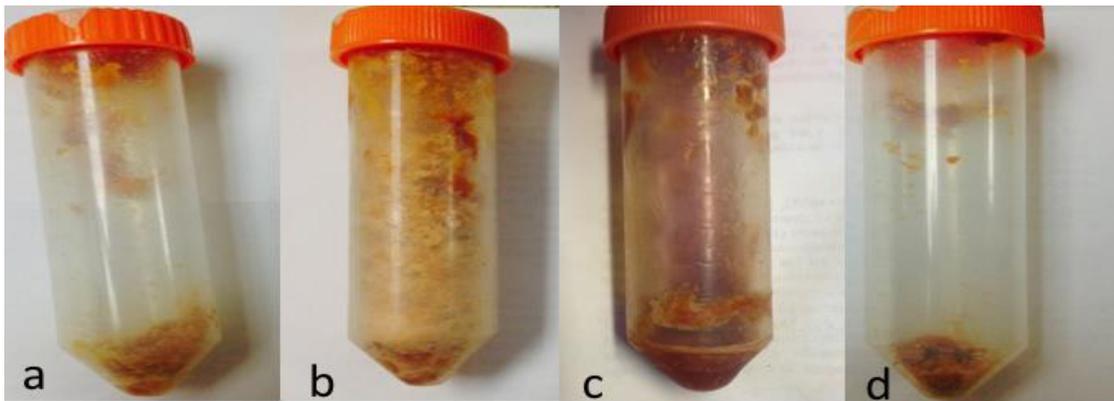


Figura 16.- Aspecto macroscópico de LFE de probióticos. LFE obtenidos a partir de de cultivos de: a) *L. casei*, b) *L. acidophilus*, c) *B. longum* y d) *L. plantarum*.

8.4 Bioensayo

8.4.1 Actividad biológica de los LFE sobre HT-29

En la Tabla 9 se muestra el rendimiento celular de las células HT-29 cultivadas en presencia de los cuatro LFE de las cepas probióticas, evaluadas a cuatro dosis de cada uno de los LFE. Los bioensayos se realizaron en tres eventos independientes por triplicado.

Tabla 9
Rendimiento de células HT-29 en presencia de LFE de probióticos

[mg/mL]	Absorbancia (570 nm)					
	LFE- <i>L. acidophilus</i> *	LFE- <i>B. longum</i> **	LFE- <i>L. plantarum</i> **	LFE- <i>L. casei</i> **	Control (+)	Control (-)
26.0	0.0672	0.0734	0.0716	0.0747	0.3677	0.11
13.0	0.0789	0.0930	0.1141	0.1070		
7.0	0.1910	0.3931	0.2177	0.2728		
3.5	0.2949	0.2856	0.4571	0.3698		

*Diferencia significativa contra el grupo control

** Diferencia significativa contra el grupo control, pero igualdad entre tratamientos

De acuerdo con los resultados obtenidos, el control positivo (HT-29) presentó una absorbancia de 0.3677 nm y el control negativo doxorrubicina-HCl [0.025 mg/ml] presentó una absorbancia de 0.11nm. Con respecto a los tratamientos, se observó que el liofilizado que inhibió el crecimiento de HT-29 fue el LFE- *L. acidophilus* a las cuatro dosis evaluadas (26, 13, 7 y 3.5 g/mL), desde la menor dosis evaluada presentó una absorbancia de 0.0672 nm, la cual es menor en comparación con el control–HT-29.

Las dosis de LFE a 13 y 26 mg/mL presentaron menor absorbancia que el control negativo (doxorubicina-HCl).

Sin embargo, también los liofilizados de los factores extracelulares de *L. plantarum*, *L. casei* y *B. longum* a las dosis de 13 y 26 mg/mL inhibieron significativamente el rendimiento, la absorbancia con respecto al control positivo. Pero a la dosis de 7 mg/mL sólo los LFE de *L. plantarum* y *L. casei* inhibieron significativamente la absorbancia con respecto a HT-29, a la dosis más pequeña de 3.5 mg/mL, tanto los LFE-*L. acidophilus*, LFE-*B. longum* presentaron menor absorbancia que el cultivo de HT-29 (figura 17 y Tabla 9). Comparando la absorbancia que presentó HT-29 en presencia doxorubicina-HCl y de los LFEP a las dosis de 13 y 26 mg/mL, se observó que la absorbancia de HT-29 en presencia de estos tratamientos no presenta diferencia significativa. Ya que los cuatro LFEP a la dosis de 26 mg/mL presentaron menor absorbancia que doxorubicina-HCl y a la dosis de 13 mg/mL los LFE de *L. casei* y *B. longum* presentaron menor absorbancia, y el LFE-*L. plantarum* presentó absorbancia semejante al control negativo, la doxorubicina-HCl.

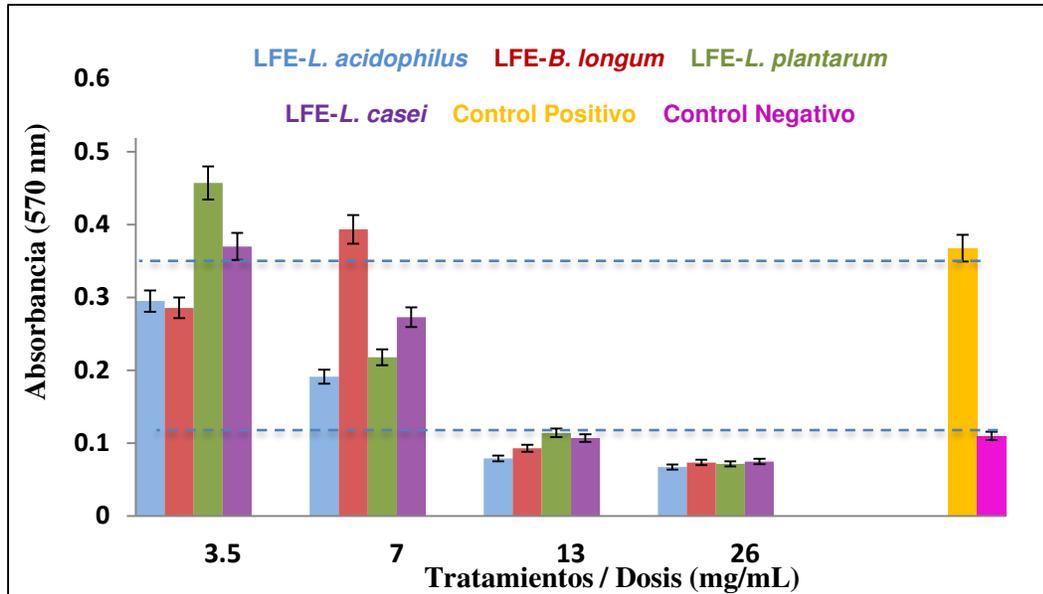


Figura 17.- Análisis comparativa de la absorbancia de HT-29 en presencia de LFEP. HT-29 control presentó una absorbancia de 0.3677 y de los cuatro tratamientos evaluados, el LFE- *L. acidophilus* inhibió el crecimiento.

En la figura 18 se observa el aspecto de los cuatro cultivos celulares con periodo de incubación de 48 h. a) el cultivo confluyente de la línea celular HT-29 con la formación de cúmulos de forma irregular, con respecto a los cultivos de HT-29 cultivados en presencia de los tratamiento de los liofilizados de factores extracelulares de probióticos (LFEP) se observó que: b) HT-29 en presencia de los LFE-*L. casei* mostraron menor rendimiento celular sin la formación de acúmulos y cambio en la morfología celular, ya que las células se observan alargadas (flecha roja). c) HT-29 en presencia de los LFE - *L. acidophilus* se observó poco crecimiento celular pero con formación de pocos acúmulos (flecha roja). d) HT-29 cultivada en presencia de doxorrubicina-HCl 10% se observa una disminución notable en la cantidad de células y cambio en la morfología de la célula.

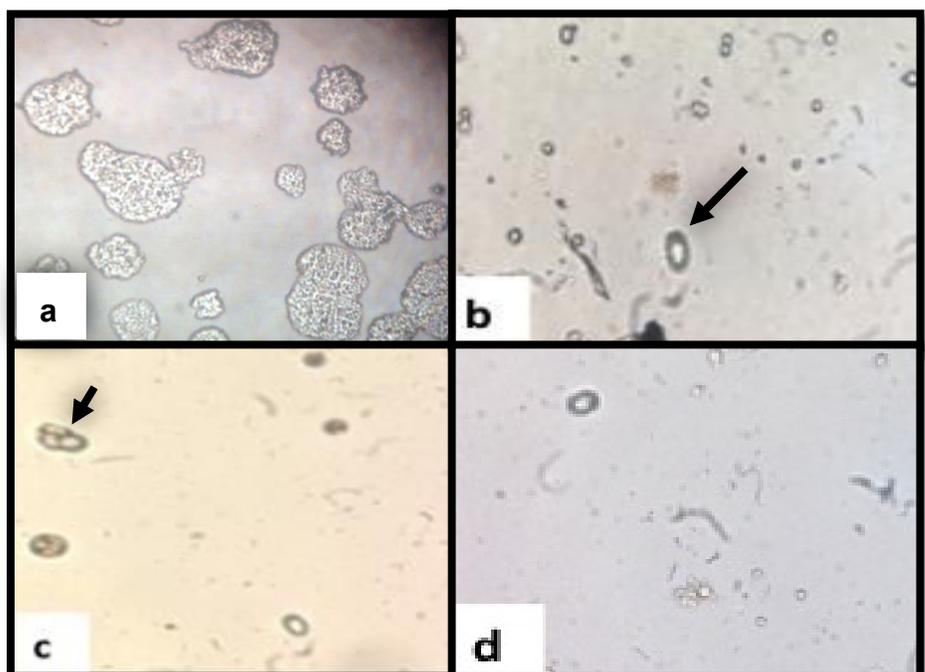


Figura 18.- Observación al microscopio óptico de las células HT-29 cultivadas en presencia de: a) control, b) LFE-*L. casei*, c)LFE- *L. acidophilus* y d) doxorubicina-HCl (Aumento real 400 X).

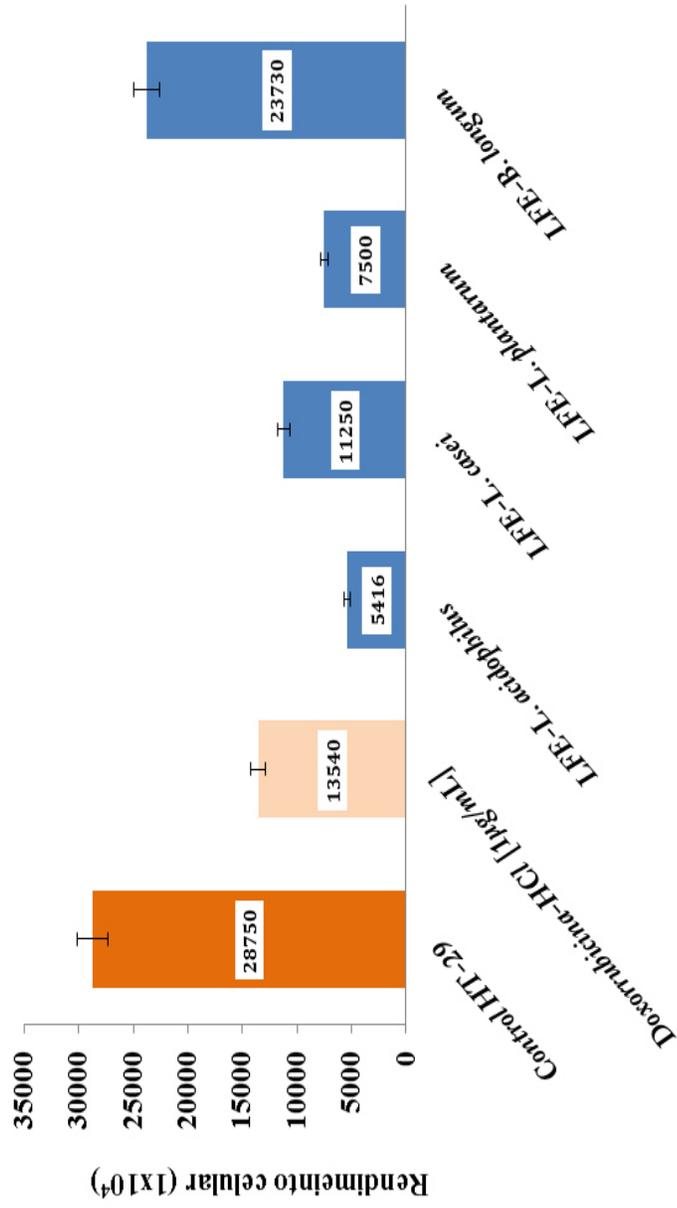
En la Tabla 10 y figura 19 se muestra el rendimiento celular de HT-29 cultivada en presencia de cuatro tratamientos de liofilizados de factores extracelulares (LFE) de probióticos correspondientes a *L. acidophilus*, *L. plantarum*, *B. longum* y *L. casei* [13 mg/mL], siendo el LFE-*L. acidophilus* el que presentó menor rendimiento celular y se empleó como testigo la droga doxorubicina-HCl. Los LFE de *Lactobacillus* presentaron mayor inhibición celular con respecto al LFE de *B. longum*.

Tabla 10

Rendimiento de HT-29 en presencia de los LFEP y doxorubicina-HCl

Tratamientos	Rendimiento celular
HT-29	28,750 x10 ⁴
LFE- <i>L. acidophilus</i>	5,416 x10 ⁴
LFE- <i>L. casei</i>	11,250 x10 ⁴
LFE- <i>L. plantarum</i>	7,500 x10 ⁴
LFE- <i>B. longum</i>	23,730 x10 ⁴
Doxorrubicina-HCl [1μg/mL]	13,540 x10 ⁴

En los resultados que se muestran en la figura 19 se aprecia que los liofilizados de los factores extracelulares de lactobacillus (LFE-lactobacillus) inhiben significativamente comparado con el control (HT-29) e incluso presentan mayor inhibición que la doxorubicina HCl [1μg/mL], sin embargo el LFE-*B. longum* inhibe el rendimiento celular significativamente comparado con el control, pero en menor proporción que los LFE-lactobacillus y de la doxorubicina-HCl. El liofilizado de *L. acidophilus* presenta mayor inhibición del rendimiento celular de HT-29.



Tratamientos

Figura 19.- Rendimiento celular. Comparación del rendimiento celular de HT-29 en presencia de LFE de probióticos.

8.5 Observación y análisis de HT-29 al Microscopio Electrónico de Barrido (MEB o SEM)

8.5.1 Observación al MEB de células HT-29

En las figuras 20, 21 y 22 se muestra la micrografía correspondiente al análisis topológico de las células HT-29, estas micrografías se observan a una magnificación de 1000X, 2000X y 4000X respectivamente donde se observan células polimorfas y presentan un promedio de $9.5\mu\text{m}$ de diámetro, estas células presentan lamellopodios o invadopodios (protrusiones) que representan una extensión del citoesqueleto y la membrana celular, el promedio de extensión o longitud de estas extensiones es de $30.6\mu\text{m}$ (óvalo amarillo), lo cual representa que éste lamellopodio es 2.78 veces más extenso que el cuerpo de la célula. Estos lamellopodios permiten adherir las células al sustrato.

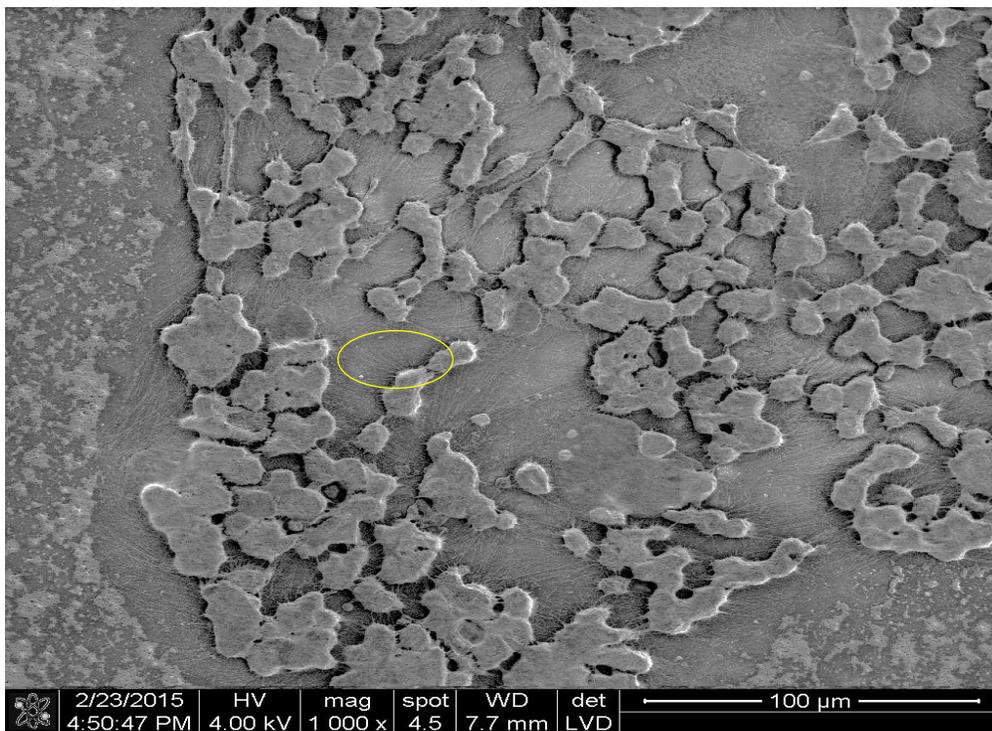


Figura 20.- Micrografía de células HT-29 al MEB (1000X). Aspecto microscópico empleando Microscopía

En la figura 21 se observan la misma muestra anterior, pero observada a un aumento de 2,000 X, la topología de la célula muestra que estas se encuentran unidas a través de una membrana continua (flecha amarilla) y de aspecto irregular o rugoso, además se aprecian las extensiones de membrana (protrusiones) (flecha roja).

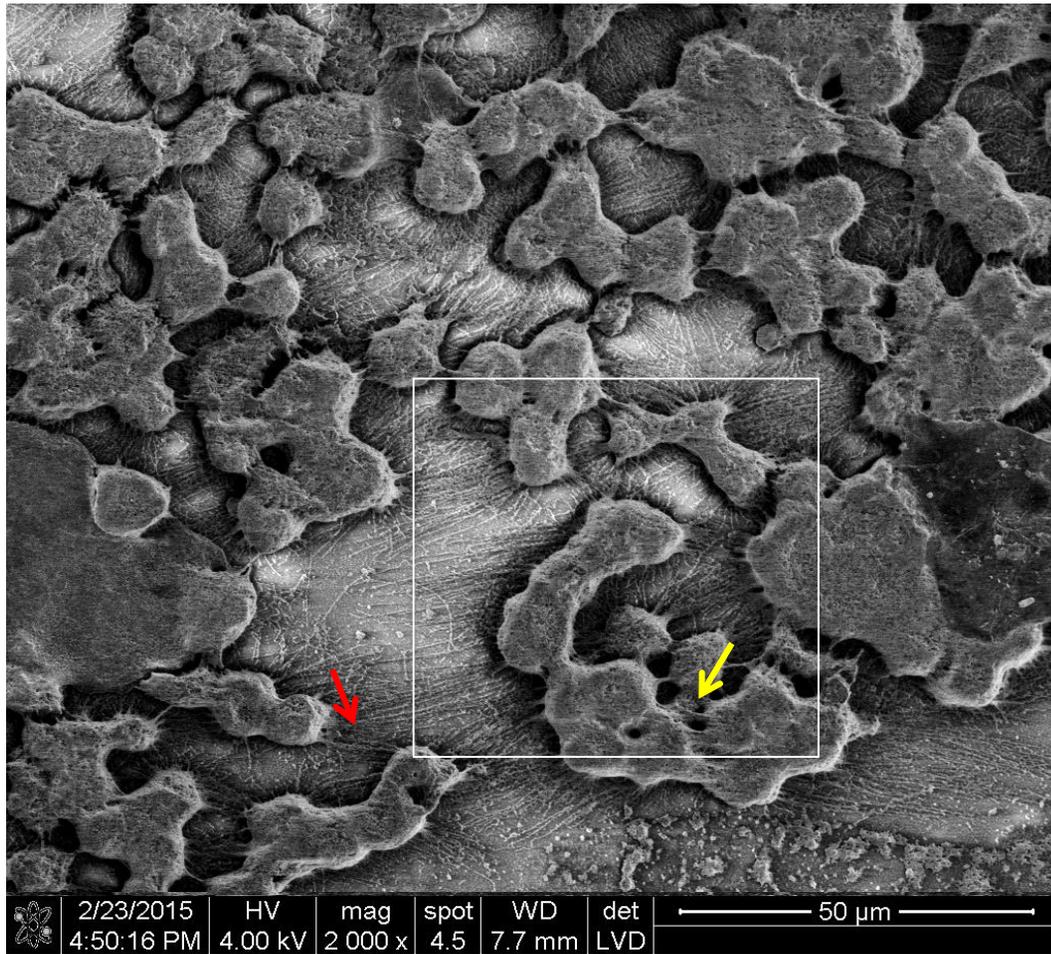


Fig. 21 Micrografía de células HT-29 mediante MEB (2000X). Análisis topográfico de acúmulos y protrusiones de HT-29 control.

En la figura 22 se muestra el análisis topográfico del recuadro blanco de la figura 21, el análisis topográfico al microscopio electrónico de barrido, se realizó el análisis a 4,000 aumentos, este acercamiento permite observar a mayor definición las protrusiones membranosas (flecha roja) las cuales permiten adherir las células al sustrato, además la topografía celular, nos permite apreciar la matriz extracelular (flecha amarilla) continua entre las células que forman los acúmulos (flecha azul).

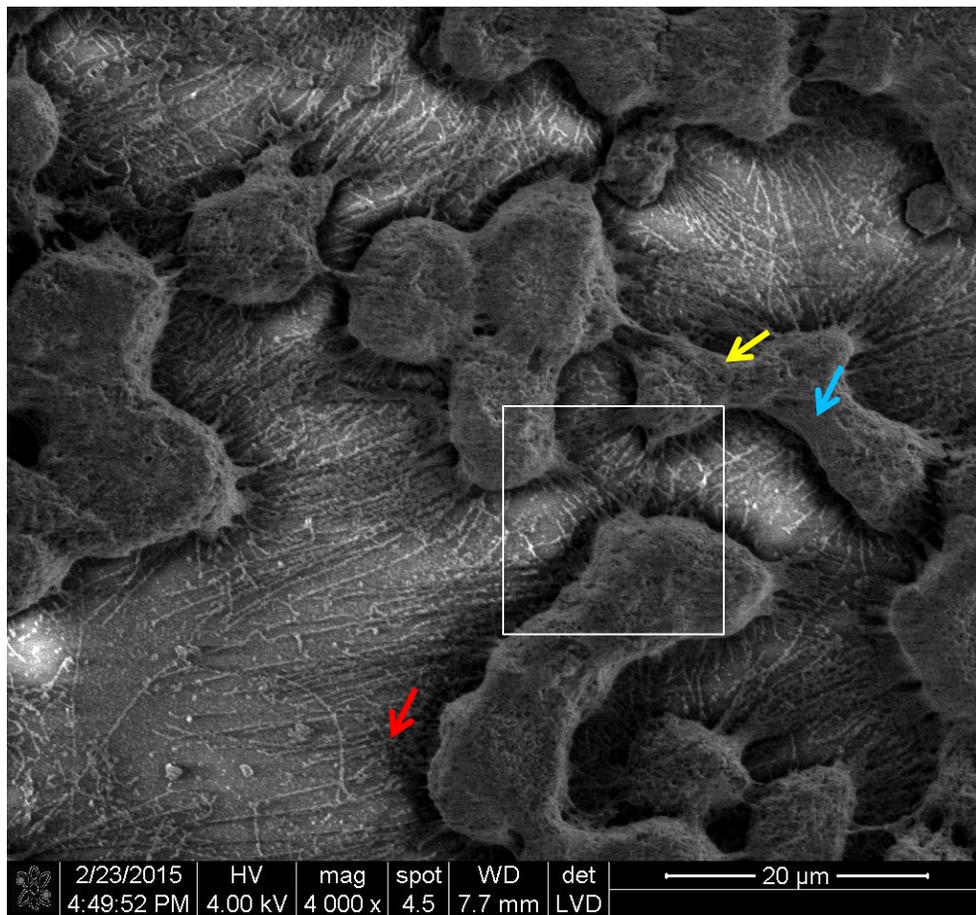


Figura 22.- Micrografía de células HT-29 mediante MEB (4000X). En la micrografía se aprecia la topografía celular, observando gran cantidad de largas protrusiones o lamelopodios llegando a organizarse como una red.

En la figura 23 muestra el acercamiento (1600x), correspondiente al acercamiento del recuadro blanco de la figura 22, el acercamiento se realizó sobre una sólo célula de HT-29, donde son notables las protrusiones de membrana (invadipodios o lamellopodia) flechas azules. Este acercamiento a la célula nos permite tener una visualización más clara de las protrusiones membranales las cuales se observan como una red que cubre a la célula, esto con el fin de ayudarla a migrar.

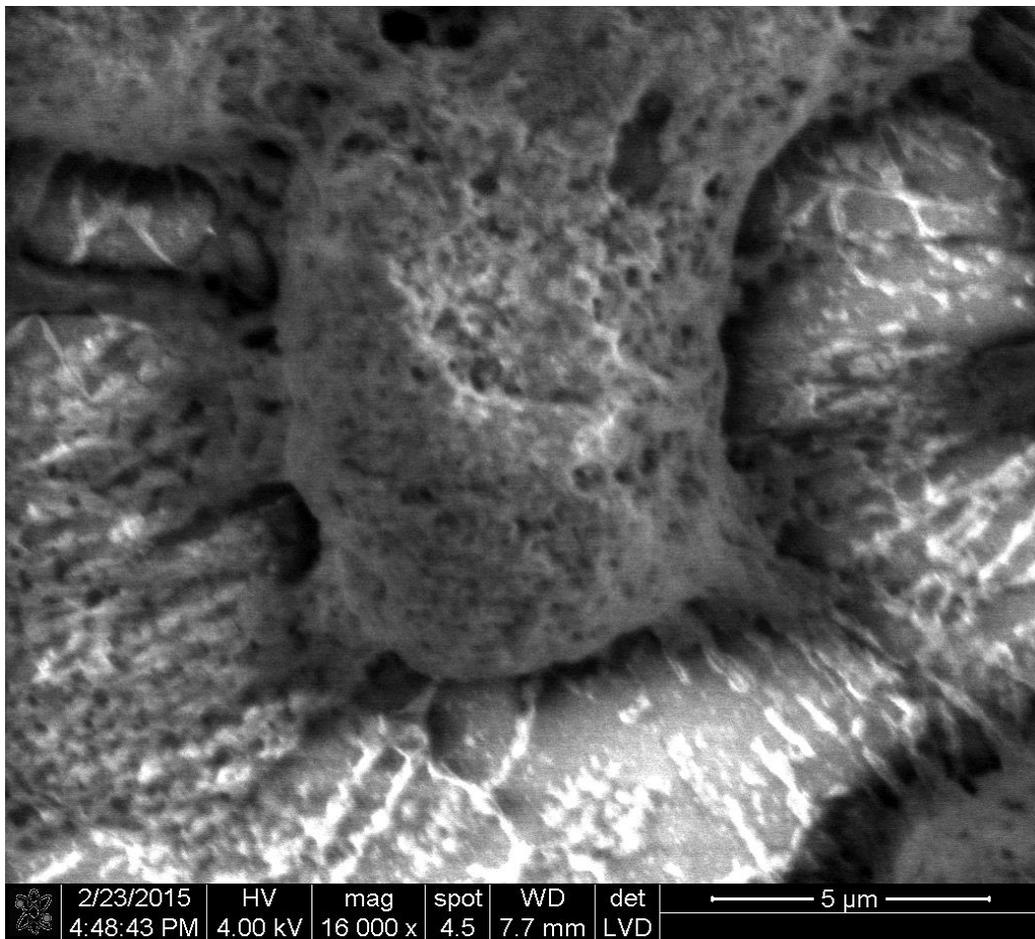


Figura 23. Micrografía de células HT-29 mediante Microscopia Electrónica de Barrido (16000X). En la imagen se observa una célula y una red membranosa que la cubre, además se observan protrusiones a partir de la misma.

8.5.2. Observación al MEB de células HT-29 en presencia de LFE-*L. acidophilus*

En las figuras 24 y 25 se observan las micrografías correspondientes a el análisis de células HT- 29 + LFE-*L. acidophilus* a diferentes magnificaciones de 400X, 1600X y 3000X respectivamente se pueden observar que las células no tienen una forma específica clasificándolas como polimorfas, el diámetro promedio de estas células es 11.9 μ m (Tabla 11). En la Figura 24 se muestra la micrografía con una magnificación de 400x, la cual corresponde a un agregados de células HT-29 tratadas con LFE-*L. acidophilus* [13mg/mL], estas células presentan muy escasas extensiones membranales o protrusiones, y son de aspecto polimorfas; sin embargo conservan la red membranosa continua sobre las células (flecha azul).

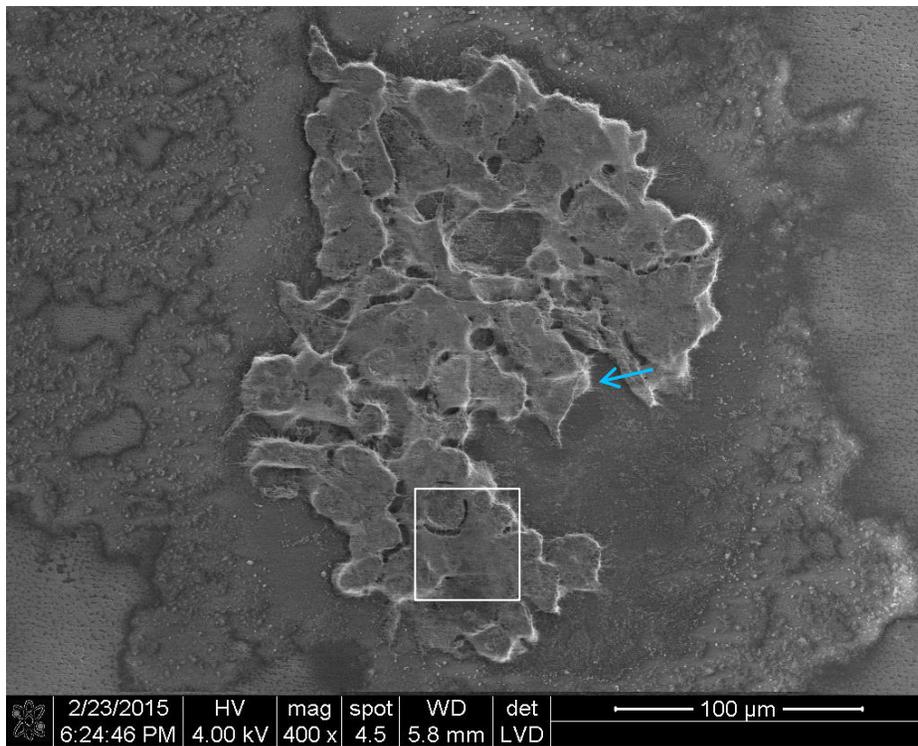


Figura 24.- Micrografía al MEB (400X). Observación de células HT-29 tratadas con LFE- *L. acidophilus*.

En la figura 25 se observan la micrografía electrónica al MEB, correspondiente al recuadro blanco de la figura 24, esta micrografía muestra un acercamiento de 1,600X, en la cual se aprecian la red continua membranosa entre las células (flecha azul) células de HT-29 tratadas con LFE-*L. acidophilus*, donde se aprecian muy claramente las protrusiones de membrana que se extienden desde la célula hasta fuera del cumulo.

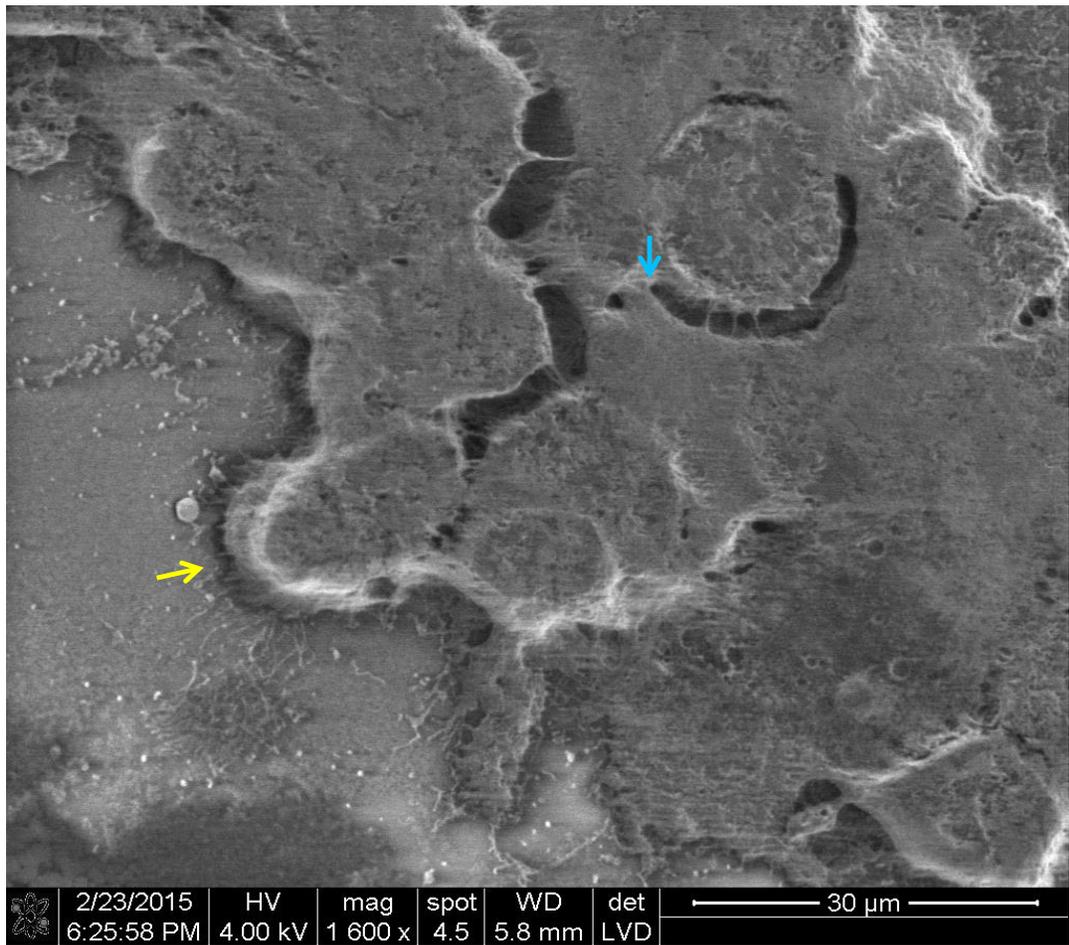


Figura 25.- Micrografía de células HT-29 tratadas con LFE *L. acidophilus* al MEB (1600X).

En la flecha azul se observa una continua red membranosa que une a las células, y estas células presentan escasas protrusiones (flecha amarilla).

8.5.3. Observación al MEB de células HT-29 en presencia de LFE-*L. casei*

En la figura 26 se muestra la micrografía correspondiente al análisis topológico de las células HT-29 tratadas con LFE-*L. casei*, esta micrografía se observa a una magnificación de 800X. Se aprecian acúmulos de células, las cuales se encuentran unidas a través de una red membranosa continua (flecha azul) y de aspecto irregular o polimorfas, presentan un promedio de 16.3 μm de diámetro y la elongación de protrusiones de membrana conocidos como lamellopodios o invadopodios (flecha amarilla) un promedio de 13.6 μm (Tabla 11).

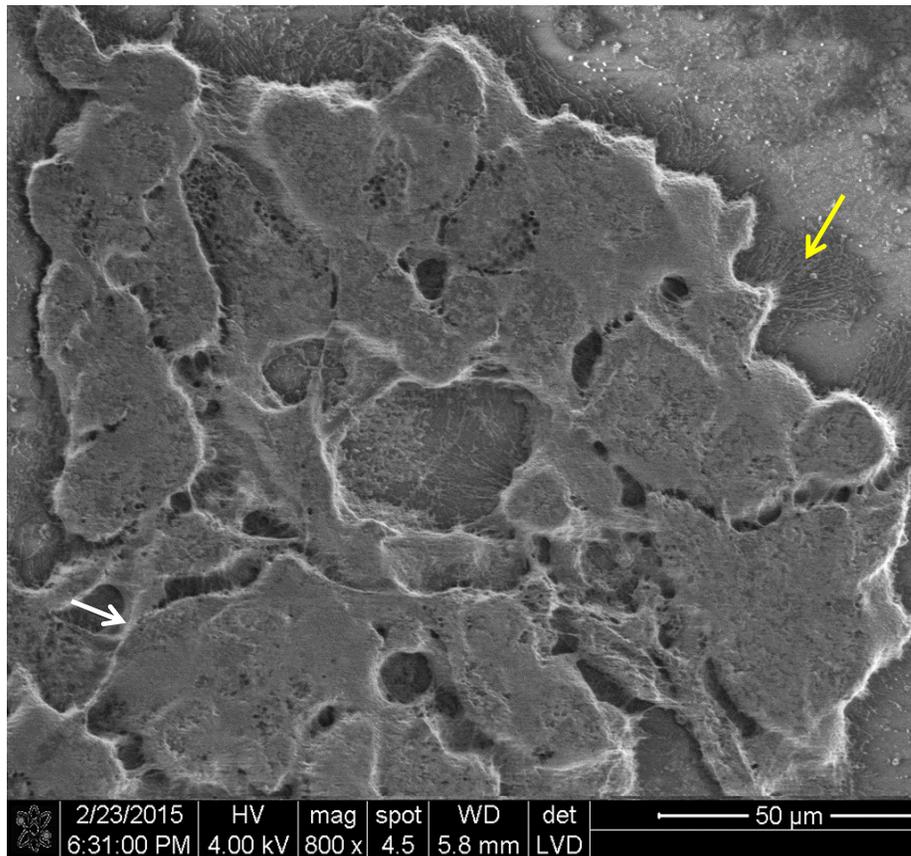


Figura 26.- Micrografía de células HT-29 tratadas con LFE-*L. casei* mediante MEB (800X). Se observan escasas protrusiones membranas (flecha amarilla), la topografía es rugosa y se aprecia una membrana continua entre las células (flecha blanca).

8.5.4 Análisis morfométrico de HT-29 cultivada en presencia de LFE-*L. casei* y LFE-*L. acidophilus*

En la Tabla 11 y figura 27, se muestra el análisis comparativo del diámetro de las células HT-29 observadas al microscopio electrónico de barrido, se realizó el análisis de las células HT-29(célula de cáncer de colon), HT-29 en presencia de LFE de *L. casei* y en presencia de LFE de *L. acidophilus*. Se observa que la célula HT-29 sin tratamiento muestra un diámetro de 9.3 μm , pero presenta un diámetro de 11.9 μm al ser cultivada en presencia del LFE-*L. acidophilus*, bajo este tratamiento el diámetro de las células se incrementó 28%; sin embargo al ser cultivada en HT-29 en presencia de LFE-*L. casei* se observó un diámetro promedio de 16.3 μm , es decir que la célula presentó un aumento en el diámetro de 75% con respecto al control (figuras 27, 28 y 29). En ambos tratamientos se observa marcada diferencia significativa con respecto al control.

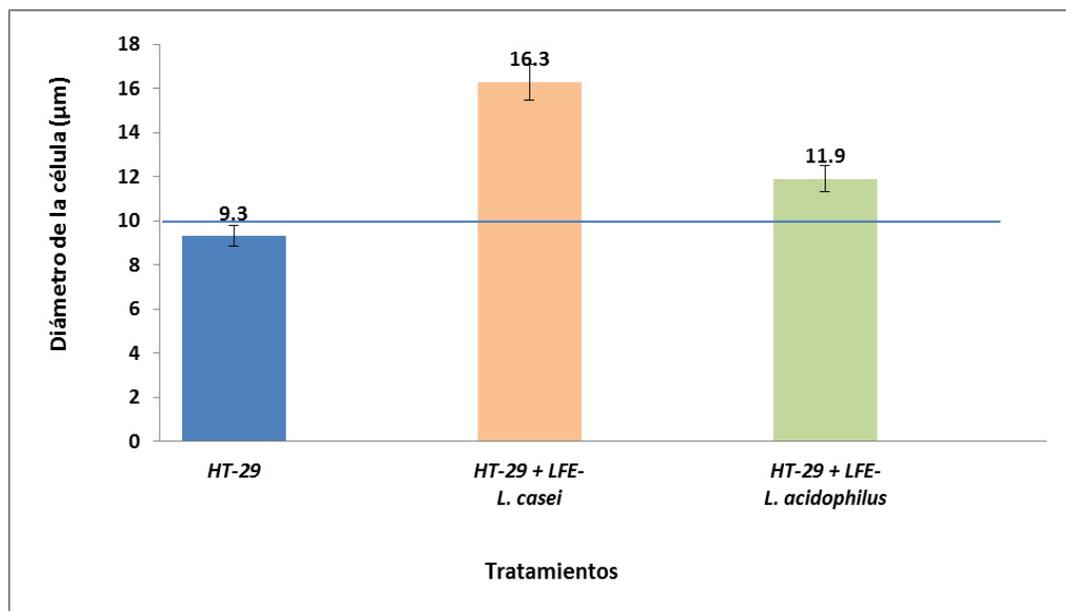


Figura 27.- Comparación del diámetro que presentan las células HT-29 sin tratamiento (barra azul), estas mismas células cultivadas en presencia del LFE-*L. casei* (barra naranja), y en presencia del LFE- *L. acidophilus* (barra verde).

Así mismo, en la Tabla 11 y figura 28, se muestra el análisis comparativo entre las protrusiones o elongaciones citoplasmáticas que presentan las células HT-29 sin tratamiento alguno (barra azul), en presencia del tratamiento LFE-*L. casei* (barra naranja) y en presencia del LFE-*L. acidophilus* (barra verde). El análisis de estos datos nos indican que en las células HT-29 que fueron sometidas al tratamiento con LFE-*L. casei* la longitud de las protrusiones disminuyeron 47.3%, en tanto que la longitud de las protrusiones de las células HT-29 que fueron tratadas con LFE-*L. acidophilus* sólo disminuyeron un 2%, este último tratamiento no mostró diferencia significativa con respecto al control, pero con respecto al tratamiento de LFE-*L. casei* sí mostró marcada diferencia significativa.

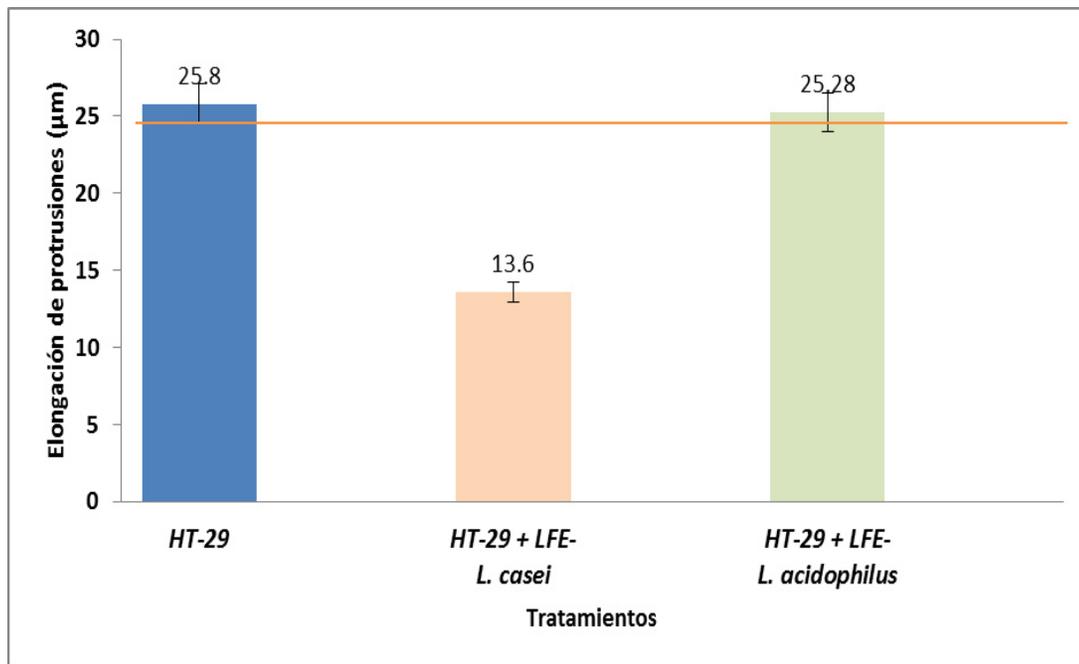


Figura 28.- Análisis comparativo entre la longitud de las protrusiones de HT-29 control (barra azul), y en presencia del LFE-*L. casei* (barra naranja) y en presencia del tratamiento de LFE-*L. acidophilus* (barra verde).

Tabla 11

Comparación del diámetro celular y longitud de protrusiones

Célula	Diámetro celular (μm)	Elongación de Protrusiones (μm)
HT-29	9.3	25.8
HT-29 + LFE - <i>L. casei</i>	16.3	13.6
HT-29 + LFE - <i>L. acidophilus</i>	11.9	25.28

En la figura 29 se muestra el análisis correlativo entre los tratamientos de LFE-*L. casei* y el LFE-*L. acidophilus* y el impacto de estos en las alteraciones morfométricas de las células HT-29, se observa que en presencia del LFE-*L. casei* la célula incrementa su diámetro en 75%, pero la elongación de las protrusiones disminuyen 47.3%, HT-29 en presencia del LFE-*L. acidophilus* muestra un patrón muy semejante al control, para los dos parámetros analizados, el tratamiento con LFE-*L. casei* presenta marcada diferencia significativa con respecto al control.

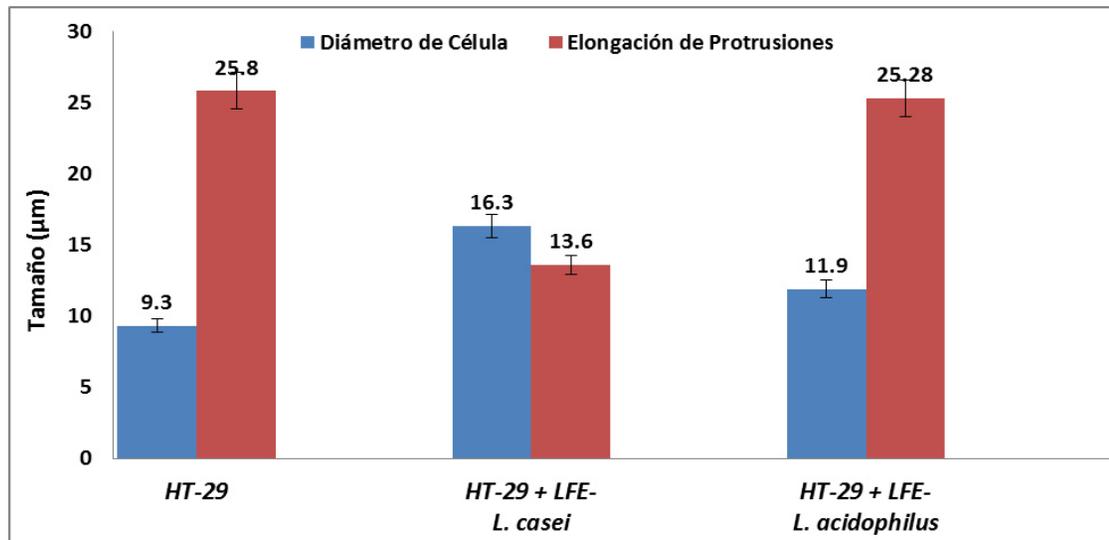


Figura 29. Análisis comparativo de los parámetros morfométricos de HT-29, con respecto a los tratamientos del LFE-*L. casei* y el LFE-*L. acidophilus*.

8.6. Análisis de HT-29 al Microscopio de Fuerza Atómica (MFA)

8.6.1. Evaluación del mejor sustrato para adhesión celular

En la Tabla 12 se observan los resultados de diversos bioensayos para determinar el mejor sustrato para promover la adherencia celular de HT-29, con el propósito de poder realizar el análisis al AFM y poder realizar en los siguientes bioensayos los análisis morfométricos de HT-29 frente a diversos tratamientos. En la Tabla 12 se muestra el comportamiento de HT-29 cultivado sobre diferentes tratamientos y sustratos, con respecto al crecimiento del cultivo de HT-29 se observa abundante crecimiento cuando se empleó el frasco comercial y la albumina sérica bovina (figuras 30), se observó moderado crecimiento en portaobjetos tratados con Poli-L-Lisina + ciclo de lavado y en portaobjetos lavados con etanol al 95%. Se observan escasas células en portaobjetos tratados con Poli-L-Lisina, portaobjetos sometidos a ciclo de lavado y portaobjetos tratados con citospray.

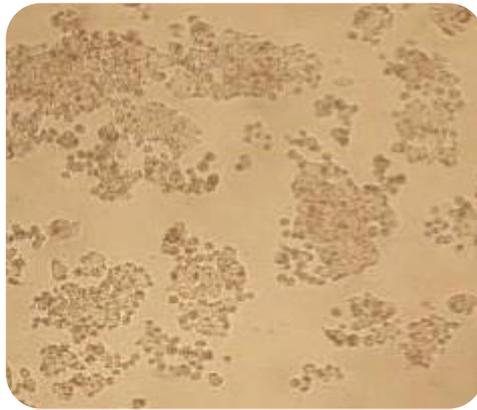


Figura 30.- Adhesión celular. Células HT-29 adheridas al portaobjetos tratado con albumina sérica bovina (400X)

Tabla 12

Comparación de crecimiento y adhesión de células HT-29 sobre diversos sustratos

Sustratos	Observación de crecimiento y adherencia de HT-29 al microscopio		
	Crecimiento	Óptico	MFA
Frasco comercial o Placa comercial tratada con TC (Tissue Culture)**	Sí (abundante)	Sí	No
Mica	No	No	No
Portaobjetos			
a) lavados con etanol [95%]	Sí (moderado)	Sí	No
a) silanizados	No	No	No
a) sometidos a Ciclo de lavado	Sí (escaso)	Sí	No
a) tratado con albumina sérica bovina al 50%	Sí (abundante)	Sí	Sí*
a) tratado con citospray	Sí (escaso)	Sí	No
a) tratados con Polietilimina	No	No	No
a) tratados con Poli-L-Lisina	Sí (escaso)	Sí	No
a) tratados con Poli-L-Lisina + Ciclo de lavado	Sí (moderado)	Sí	Sí*

*Al momento de realizar el escaneo las células se desprendieron
 ** Según especificaciones del fabricante

De los tratamientos que presentaron crecimiento de HT-29, se observó la adhesión de las células al sustrato, y se realizó la observación empleando el microscopio de fuerza atómica, sin embargo solamente las células que crecieron en el portaobjetos tratados con Poli-L-Lisina + ciclo de lavado y portaobjetos tratados con albumina sérica bovina mostraron adhesión.

Al someter las células HT-29 al análisis morfomecánico empleando el AFM, fue necesario escanear la muestra empleando la punta del cantiléver, pero debido a que la punta del cantiléver es muy aguzada (puntiaguda) esto le ocasiona daño físico a la célula, ya que se observó el desprendimiento o arraste de la célula HT-29 así como el rompimiento celular (figuras 31 y 32), lo cual resulta totalmente inconveniente para los fines de esta investigación.

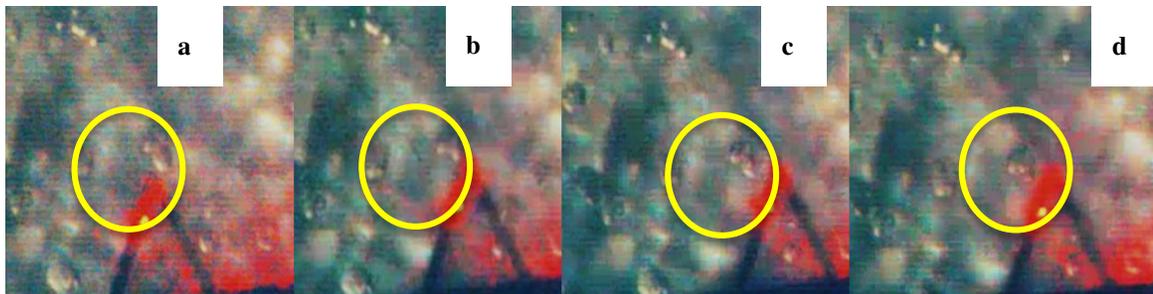


Figura 31.- Observación de células HT-29 al AFM. Célula de HT-29 escaneada mediante AFM, con punta afilada mostrando el daño que causa a la célula conforme se lleva a cabo el análisis morfomecánico. **a)** célula observada al tiempo 0 del escaneo, íntegra y adherida. **b)** se observa la célula adherida aún al sustrato durante el escaneo y sin presentar algún daño. **c)** durante el escaneo con la punta aguzada la célula empieza a perder su forma y es arrastrada por la punta y **d)** durante el escaneo la célula se encuentra gran parte desprendida y dañada por la punta aguzada del cantiléver (flecha azul).

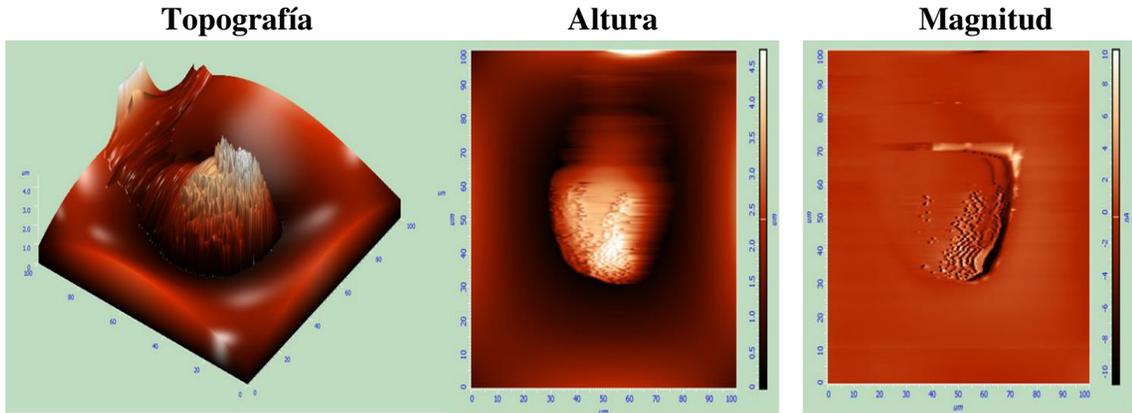


Figura 32.- Análisis de las células HT-29 analizadas con la punta aguzada del cantiléver, en la imagen correspondiente a la topografía, altura y magnitud, se observa el escaneo incompleto debido a que la célula fue arrastrada durante el escaneo, por lo que los tres análisis quedan incompletos (el campo analizado corresponde a 100 μm).

Debido a que las células HT-29 adheridas al sustrato al momento de ser escaneadas sufrieron daño mecánico por la punta aguzada del cantiléver, fue necesario adherir una esfera de vidrio a la punta para evitar el daño mecánico a la célula, esta esfera mide de 30 a 60 μm (flecha azul). El diseño de la punta con la esfera de vidrio adherida se muestra en la figura 33.

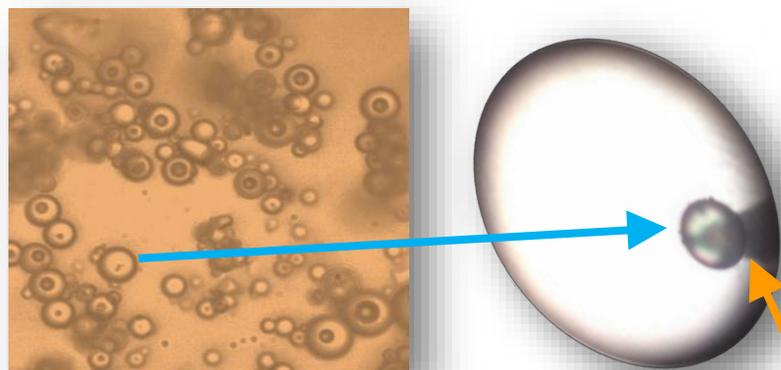


Figura 33. Se observa la esfera de vidrio (flecha azul) adherida a la punta afilada unida al cantilever (flecha naranja).

Al realizar la modificación de la punta del cantiléver y para corroborar la eficiencia de la punta modificada con la esfera de vidrio, se realizó la observación de células HT-29 al Microscopio de fuerza atómica. En el análisis topográfico demuestra la eficiencia de la punta modificada, ya que se logra apreciar el cuerpo celular y nos indica que la célula presenta una altura de $5.0\ \mu\text{m}$ (a), y en (b) se observa la imagen en 3D de la misma célula observada mediante el programa NOVA-MDT-SPM-Software-1.1.0.1921 (figura 34).

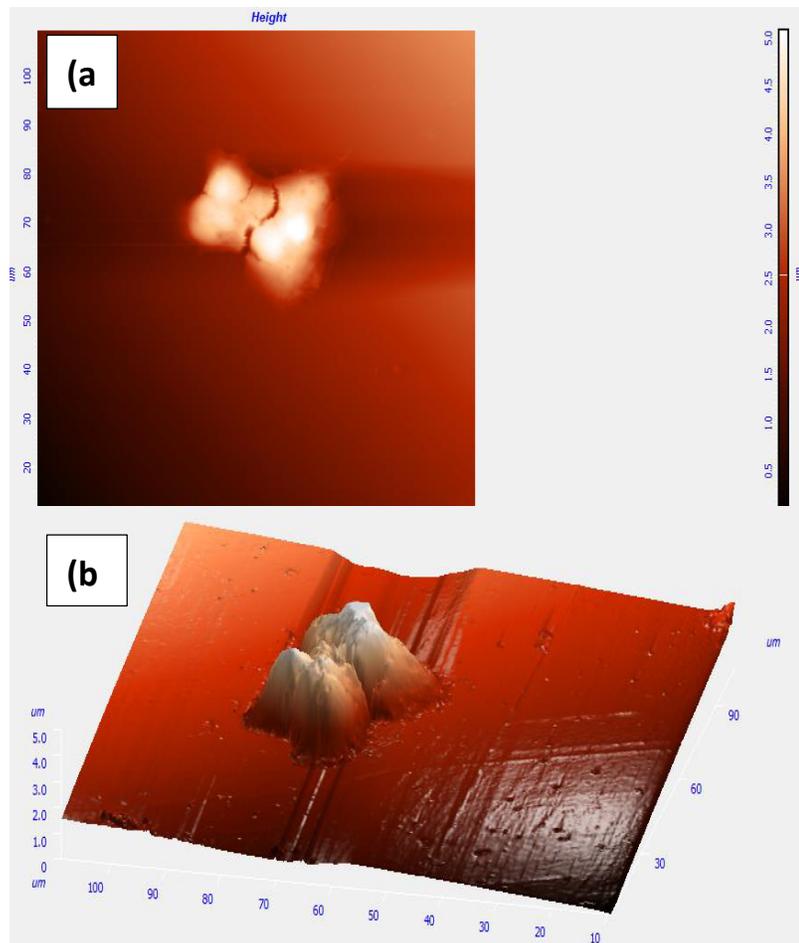


Figura 34.- Adhesión celular. Células HT-29 adheridas al portaobjetos analizadas al microscopio de fuerza atómica empleando la punta modificada. La imagen (a) corresponde a una imagen de altura y (b) muestra una imagen de la misma célula en 3D.

8.7 Análisis morfológicos al AFM de HT-29 en presencia de LFE-*L. casei*

8.7.1 Análisis morfométrico

En la figura 35, se presenta imágenes de perfil de ancho y altura realizado a la imagen obtenida al microscopio de fuerza atómica, y analizada mediante el programa WSxM 5.0 Develop 8.1, en el análisis realizado a las células HT-29, se observó que éstas presentaron un ancho de $19.58\mu\text{m}$ y una altura $5.475\mu\text{m}$ en promedio.

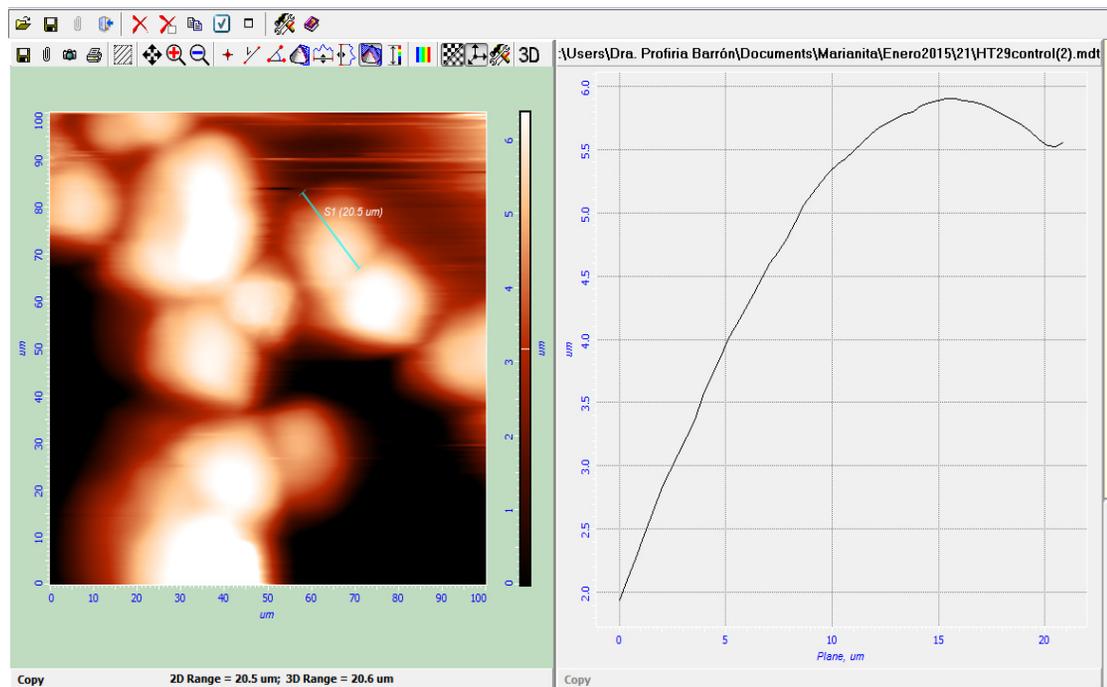


Figura 35.- Análisis de comparación de las dimensiones de alto y ancho de las células de HT-29 control.

En la figura 36, se presenta imágenes de perfil de ancho y altura realizado a las células HT-29 tratadas con LFE-*L. casei*, a las imágenes obtenida al microscopio de fuerza atómica fue analizada mediante el programa WSxM 5.0 Develop 8.1, los datos obtenidos indican que estas células presentan un ancho de 28.93 μm y una altura 3.5 μm en promedio.

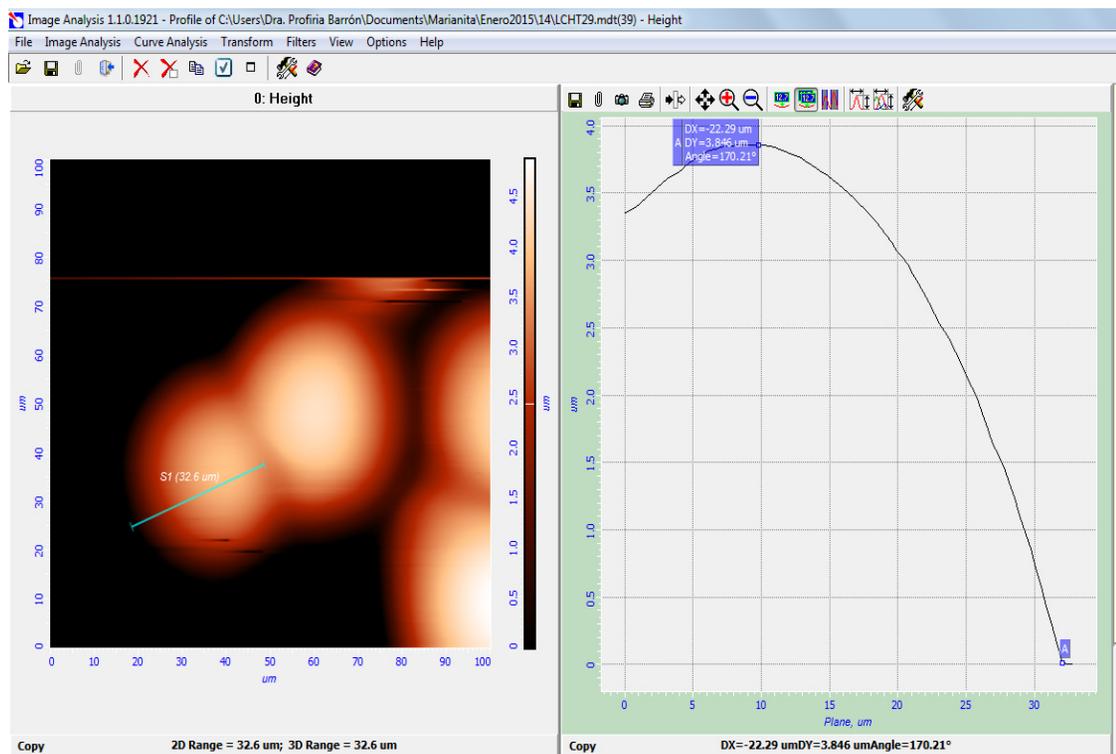


Figura 36.- Análisis de comparación de las dimensiones de alto y ancho de las células HT-29 tratadas con LFE-*L. casei* y observadas al microscopio de fuerza atómica.

a) Análisis de altura

En la figura 37 se muestra el análisis de altura realizado a las micrografías obtenidas al Microscopio de Fuerza Atómica correspondientes a el control de células HT- 29 y las células HT-29 en presencia de LFE- *L. casei*. El análisis a las células control de HT- 29 presentaron una altura promedio de: 5.5 μm y las células de HT-29 en presencia de LFE- *L. casei* presentó una altura de 3.5 μm , lo cual representa una disminución de 36.36% con respecto a el control (figura 43).

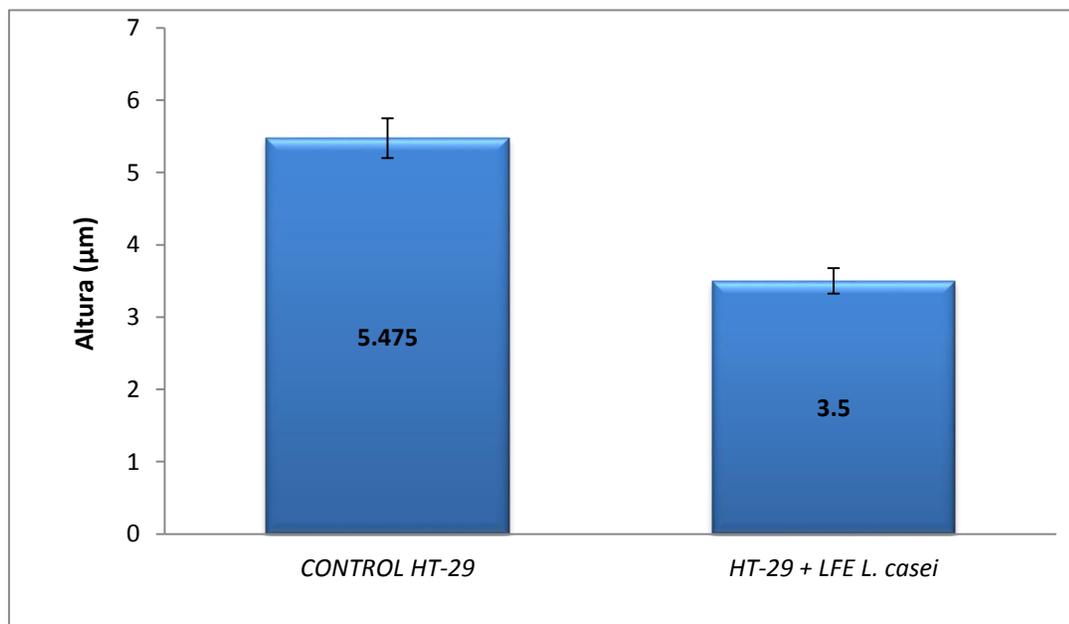


Figura 37.- Análisis morfométricos de altura en HT-29 y HT-29 con LFE-*L. casei*.

b) Análisis del ancho

En la figura 38 se muestra el análisis morfométrico correspondiente al ancho de las células HT-29 (control) y las células HT-29 en presencia con LFE- *L. casei*. El análisis las células control HT-29 presentan 19.58 μm de ancho y las célula HT-29 en presencia de LFE- *L. casei* muestra un promedio de 28.93 μm de ancho, estos valores indican que HT-29 en presencia con LFE- *L. casei* incrementa este parámetro morfométrico 47.75 % (figura 43).

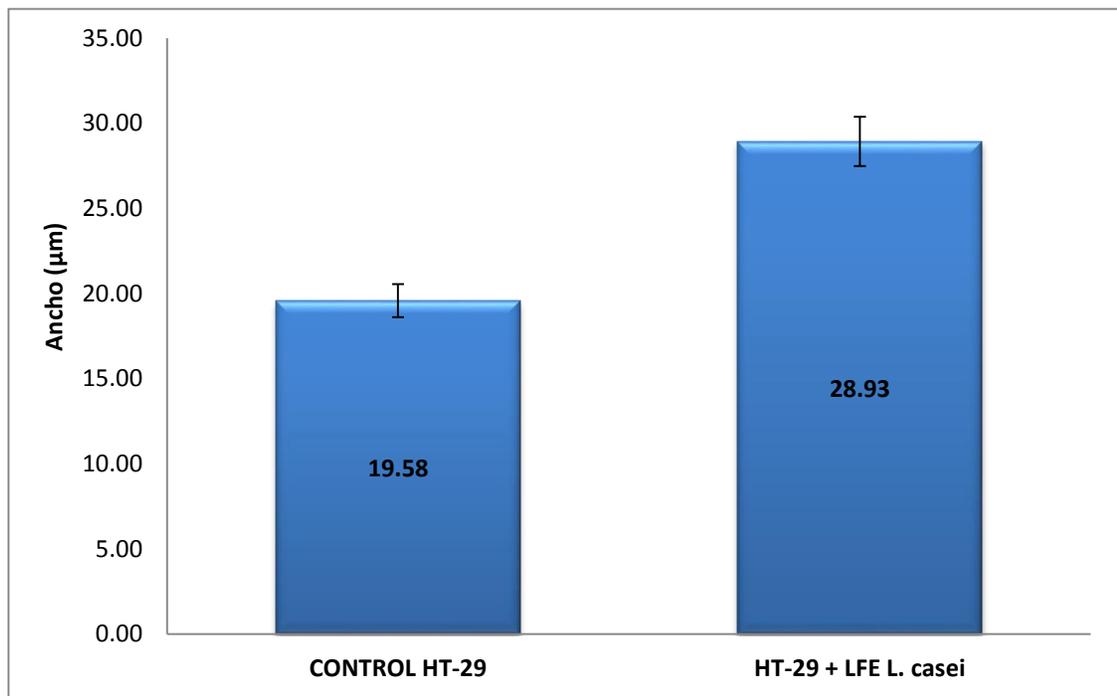


Figura 38.- Análisis morfométricos correspondiente al ancho en HT-29 y HT-29 en presencia del tratamiento LFE-*L. casei*.

c) Análisis de elasticidad o Modulo de Young

La figura 39, muestra en imagen la topografía que representa el análisis realizado empleando la técnica de espectroscopía de fuerzas para producir una nanodeformación controlada de células HT-29 y para células HT-29 tratadas con LFE-*L. casei* (figura 40). Para el estudio y la caracterización de las propiedades nanomecánicas, se realizaron 25 puntos de contacto sobre la estructura celular. Los datos obtenidos fueron analizados y exportados al programa IGOR Pro 6.10A, para cuantificar la fuerza de interacción ejercida por el cantiléver, en función de la distancia de separación entre la punta y la línea celular a través de la representación gráfica de una curva de fuerza-distancia (a) (ver figura 43).

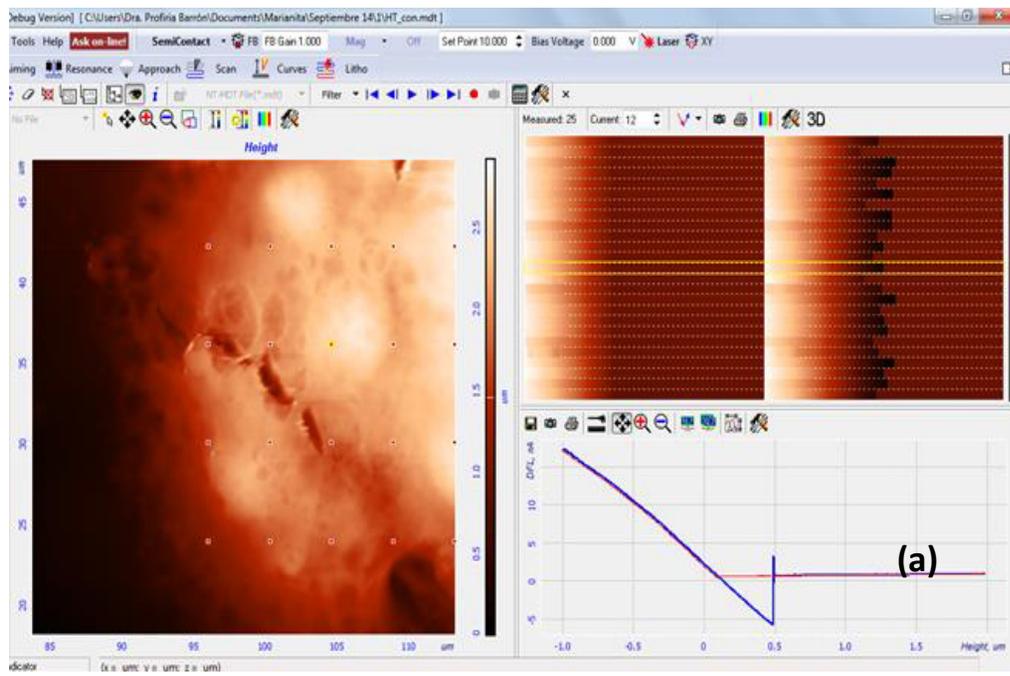


Figura 39.- Caracterización de las propiedades nanomecánicas de HT-29 mediante la técnica de noindentación basada en espectroscopía de fuerzas por AFM .

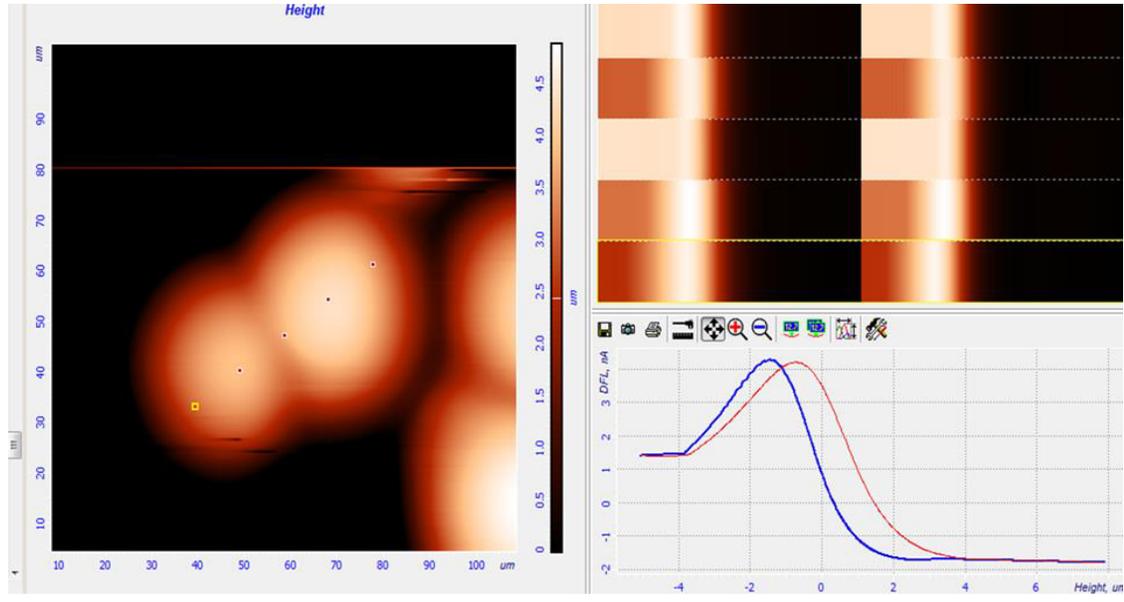


Figura 40. Caracterización y análisis morfométrico de HT-29 en presencia del tratamiento de LFE-*L. casei* por AFM.

Al realizar la medida de elasticidad o determinación del Módulo de Young (fuerza necesaria para deformar una superficie) en las células HT-29 y con el tratamiento antes mencionado, se observa que el control (células HT-29) mostraron un valor de 0.57 kPa, en cambio al tratar las células con LFE-*L. casei* se obtuvo un valor de 3.60kPa, estos resultados indican que al tratar las células HT-29 con los factores extracelulares de probióticos, las células se vuelven más rígidas; observando que hay marcada diferencia significativa entre el tratamiento de LFE-*L. casei* y el control. Estos resultados indican que se requiere aplicar mayor fuerza para deformar la célula (figura 41 y 43).

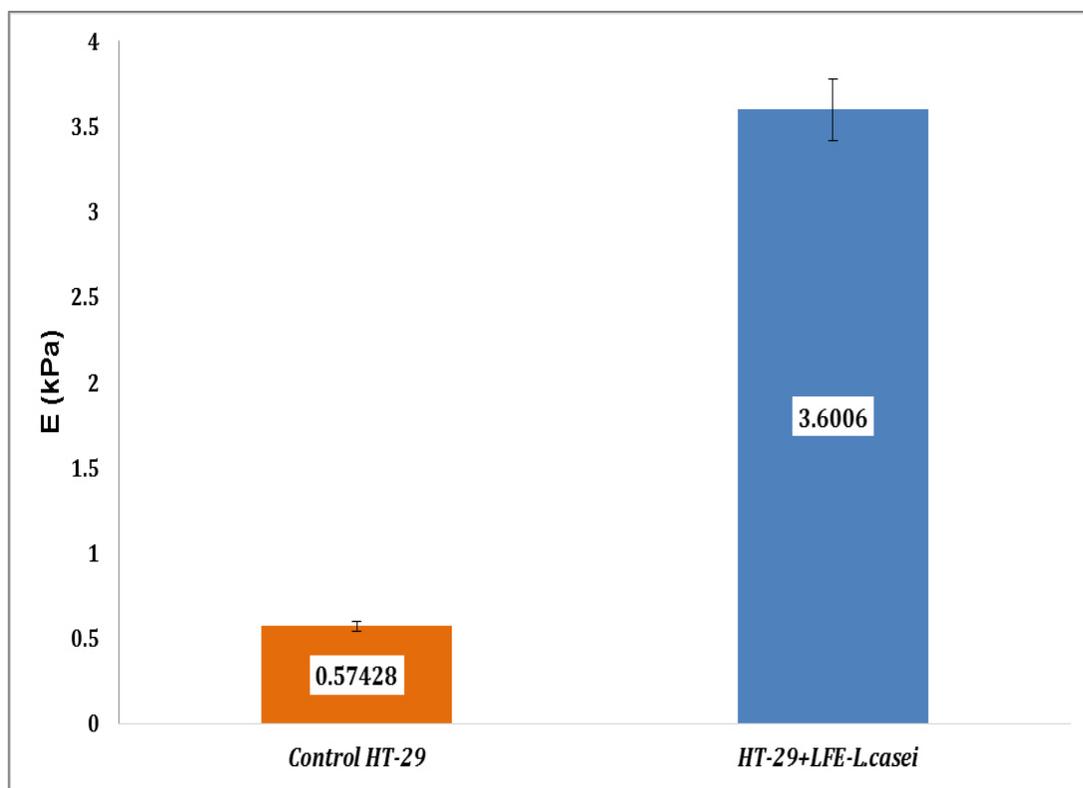


Figura 41.- Análisis comparativo de los valores de Modulo de Young del control HT-29 y células HT-29 en presencia de LFE-*L.casei*

d) Análisis de adhesión

En la figura 42 se muestra el análisis comparativo de los valores de adhesión obtenidos al someter a HT-29 al tratamiento del liofilizado de factores extracelulares de *L. casei* (LFE-*L. casei*), de acuerdo a los valores obtenidos, estos se pueden interpretar como que la punta del cantilever realiza menos trabajo o esfuerzo para despegarse de las células HT-29 control, se observa que el trabajo o esfuerzo para que la punta del cantilever se despegue de la célula que estuvo en tratamiento con LFE-*L. casei* fue significativamente mayor con respecto al control (ver figura 43).

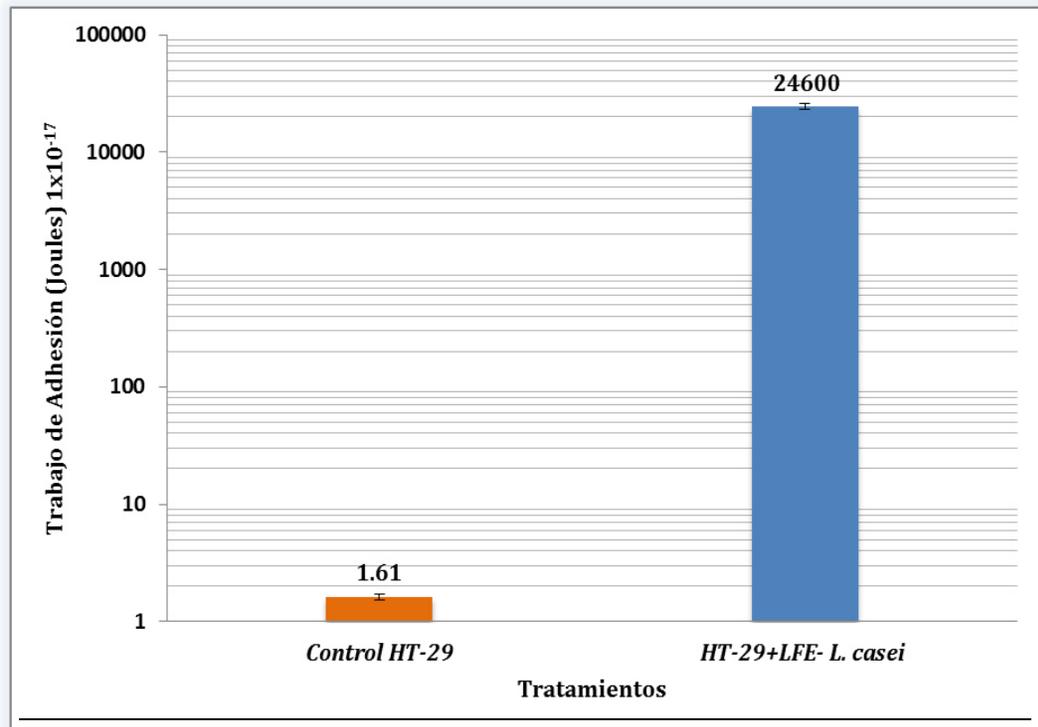


Figura 42.- Análisis comparativo de los valores de adhesión del cultivo control HT-29, y en presencia de LFE-*L. casei*.

En la Tabla 13 se muestra una compilación de los parámetros analizados al MFA de la célula HT-29 y a esta misma línea celular cultivada en presencia del LFE-*L. casei*, los datos compilados corresponden a la comparación de los siguientes parámetros: altura, ancho, adhesión celular y elasticidad/rugosidad celular, los valores obtenidos de dicho análisis se muestran en la figura 43.

Tabla 13

Comparación de parámetros morfométricos de las células HT-29 control y en presencia de LFE-*L. casei*

Tratamiento	Célula HT-29 (control)	Célula HT-29 + LFE-<i>L. casei</i> (Tratamiento)
Parámetro a medir		
Altura (μm)	5.475	3.50
Ancho (μm)	19.58	28.93
Adhesión (Joules 1x10⁻¹⁷)	1.61	24600.00
Elasticidad/ rugosidad (kPa)	0.57	3.60

Los datos que se muestran en la figura 43, permite describir con certeza que la célula HT-29 de cáncer de colon presenta una altura promedio de 5.475μm, ancho promedio de 19.58 μm, presenta una adhesión celular de 1.61 Joules 1x10⁻¹⁷ y presenta una elasticidad/rugosidad promedio de 0.57kPa; al comparar estos parámetros con la célula HT-29 cultivada en presencia de LFE-*L. casei* presenta una altura promedio de 3.5μm, ancho promedio de 28.93 μm, presenta una adhesión celular de 24600 Joules 1x10⁻¹⁷ y presenta una elasticidad/rugosidad promedio de 3.60 kPa. Al hacer la comparación y análisis podemos describir a la célula HT-29 con respecto a la célula tratada con LFE-*L. casei* como una célula más alta, menos ancha, con muy poca adhesión celular y con menor elasticidad, en todos los parámetros evaluados se observa marcada diferencia significativa, el parámetro con menor diferencia es el ancho, y el parámetro donde se aprecia mayor impacto del tratamiento corresponde a la adhesión celular.

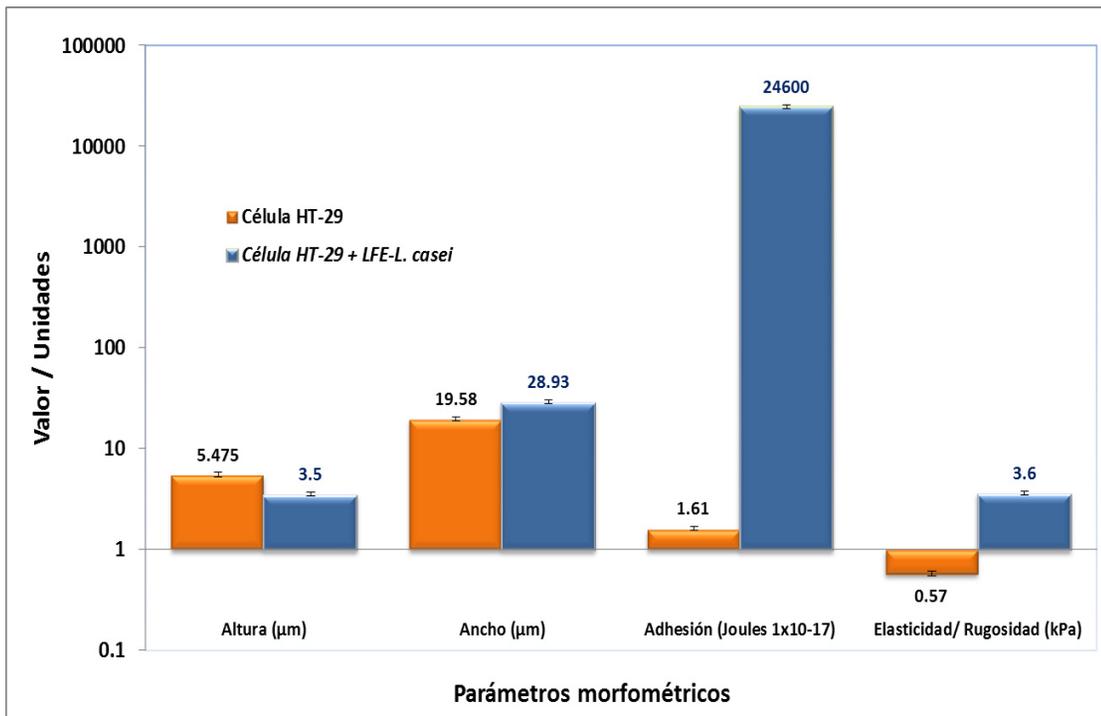


Figura 43.- Comparación de los parámetros morfométricos. Se observan los valores obtenidos analizar el valor de altura, ancho, adhesión y elasticidad, de la célula HT-29 control y en presencia del tratamiento LFE-*L. casei*.

En la figura 44 se observa el aspecto topológico de tres muestras de células, en (a) se observa el aspecto topológico correspondiente a dos células HT-29, la superficie de ésta célula es irregular y con gran cantidad de material amorfo a los lados de la célula, lo cual puede corresponder a la matriz extracelular. La imagen (b) corresponde a la topología de cuatro las células HT-29 cultivadas en presencia del LFE-*L. casei* en estas células se observa la superficie homogénea o “lisa” y en la imagen (c) se observa un conglomerado de colonocitos de ratón sin fijar y sin tratamiento previo, los cuales presentan un aspecto esférico y topología “lisa” semejantes a la imagen de (b).

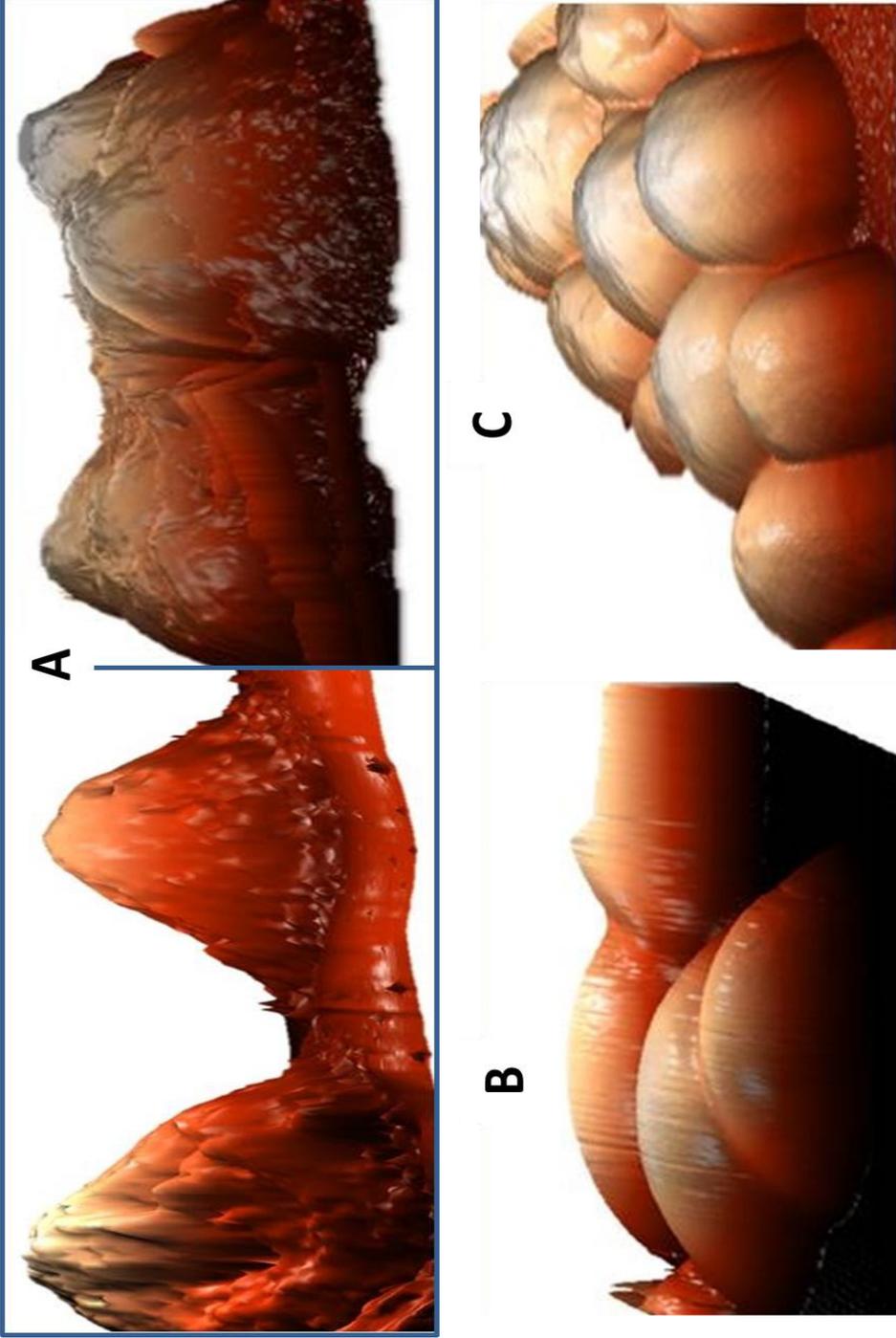


Figura 44.-Comparación topológica de células. En la imagen (a) se observa el aspecto topológico que presenta las células HT-

29, en (b) se observa el aspecto de las células HT-29 cultivadas en presencia del LFE-*L. casei* y en (c) se observa el aspecto de colonocitos de ratón.

9. DISCUSIONES

El cáncer de colon es considerado una patología sistémica incapacitante, de acuerdo con estimaciones reportadas por la Organización Mundial de la Salud (OMS 2002) y en México por los reportes que se tienen al respecto (INEGI 2012), esta afección tiene mayor reporte en varones, observando gran incremento a partir de los 40 años de vida, lo cual concuerda con reportes realizados por Rex *et al* en el 2004, con respecto a la variación que sufre la microbiota intestinal a partir de dicha edad.

La variación en la microbiota intestinal puede estar determinada por factores intrínsecos y extrínsecos, uno de los factores determinante en la composición de esta microbiota se debe al tipo de prebióticos con los cuales se estimula la proliferación de la microbiota en los individuos (Tonello 2012), el individuo suministra dichos prebióticos a partir de la dieta que consume. La microbiota intestinal confiere diversos beneficios al microambiente a nivel de intestino delgado e intestino grueso, siendo de los beneficios más notables, el estimular la placas de Peyer para inducir la producción de inmunoglobulinas A (Devlin 2004). Esta IgA es la clase predominante de anticuerpo en las secreciones seromucosas del organismo como saliva, lágrimas, calostro, leche y secreciones respiratorias, gastrointestinales y genitourinarias.

En sangre, se encuentra como una molécula monomérica, pero en las mucosas se encuentra en forma dimérica (IgA secretora). Actúan como la defensa inicial contra los patógenos invasores (virus y bacterias) antes de que penetren en el plasma; identifican los antígenos patógenos e impiden que se instalen en las mucosas.

Avances en la investigación de la relación del sistema inmune y la microbiota intestinal, y que nos permite dar respuesta a la pregunta ¿Cómo las bacterias de la microbiota intestinal disminuyen o previenen el riesgo de cáncer o tumores?, de acuerdo con Lee *et al.* 2016; esta relación microbiota intestinal-inmunidad, se puede explicar debido a que los probióticos modulan la composición de la microbiota intestinal, lo que a su vez conlleva una alteración de la diferenciación de los linfocitos T colaboradores, células del sistema inmune que juegan un papel muy activo en el crecimiento del tumor y estos linfocitos T colaboradores Th17 secretan citoquinas que promueven la angiogénesis o formación de los vasos sanguíneos, necesarios para que el tumor consiga los nutrientes necesarios para su crecimiento. Es durante esta actividad en que los probióticos, en primer lugar, reducen la migración de linfocitos Th17 desde el intestino y los vasos sanguíneos periféricos al tumor. Asimismo, y en segundo lugar, los probióticos también promueven el crecimiento en la microbiota intestinal de bacterias que, como las pertenecientes a los géneros ‘Prevotella’ y ‘Oscillibacter’, secretan metabolitos que anulan los efectos de las citoquinas, por lo que el tumor no puede recibir más nutrientes, deja de crecer y acaba, aun parcialmente, consumiéndose.

Otra de las actividades muy importantes a nivel de colon de la microbiota intestinal consiste en realizar actividad de biosíntesis simbiótica, ya que el conjunto de

microorganismos presentes a nivel de colon intervienen en la transformación de los polisacáridos complejos de la dieta, que el intestino humano no puede digerir ni absorber, en monosacáridos y ácidos grasos de cadena corta (AGCC), principalmente acético, propiónico y butírico. Los dos primeros se absorben a la circulación portal y el tercero es empleado por los colonocitos como fuente de energía. Los AGCC pueden ser transportados al hígado para ser usados en la síntesis lipídica; de hecho, se estima que las calorías derivadas de esta digestión bacteriana constituyen alrededor del 10% de toda la energía que absorbemos. La cantidad de AGCC en el colon y en la sangre son importantes para la inmunorregulación del hospedero. Algunos estudios reportan efectos positivos de los AGCC en pacientes con alteraciones inflamatorias del intestino, ya que estos individuos tienen concentraciones mucho menores de AGCC. Además, parece ser que la microbiota es capaz de modular los genes que afectan la disposición de la energía en los adipocitos. Los microbios y los vertebrados evolucionaron juntos a través de miles de años, y el funcionamiento normal del sistema digestivo e inmunológico depende de la presencia de la microbiota simbiótica.

Los microorganismos que conforman la microbiota intestinal, son considerados como probióticos, es decir microorganismos “en favor de la vida”, tal como lo definieron Isolauri *et al.* 2004. En este trabajo se realizaron los bioensayos con cuatro probióticos.

Los probióticos empleados fueron *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum* y *Bifidobacterium longum*. Para conocer el comportamiento bajo las condiciones de cultivo de estos microorganismos *in vitro*, se llevó a cabo el recuento bacteriano en placa (RBP) para determinar las Unidades Formadoras de Colonia

(UFC). Los resultados obtenidos (figura 15) mostraron que la cepa *L. acidophilus* fue la que mayor número de UFC presentó (652.66×10^9) seguido por *L. plantarum* (89.33×10^9), *B. longum* (59×10^9) y por último *L. casei* (35.33×10^9); en la cinética de crecimiento *L. acidophilus* fue la cepa que en menor tiempo llegó a su fase estacionaria, el resultados para esta cepa podría relacionarse puesto que rápido tuvieron crecimiento exponencial y en el recuento en placa recuperaron su viabilidad mayor a las otra cepas probióticas.

Una vez que se determinaron las unidades formadoras de colonia (UFC) se diseñó una metodología para emplear únicamente los metabolitos extracelulares de cada probiótico, a los cuales denominamos “factores extracelulares de probióticos” o FEP; esta decisión se tomó, considerando que las bacterias *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. plantarum* y *B. longum* son bacterias que en pacientes sanos y en el nicho adecuado se comportan como probióticos, pero en un persona con alteraciones de salud, es decir presencia de úlceras a nivel de colon, o bien inmunidad deficiente, éstas bacterias se comportan como microorganismos oportunistas, llegando a producir infecciones de consideración seria en riñones, páncreas entre otros (Pezilli y Fantini 2006).

Por lo cual en este trabajo se decidió trabajar sólo con los metabolitos extracelulares. Los metabolitos o factores extracelulares de probióticos (FEP) se emplearon en forma de liofilizados (LFEP).

Al evaluar la actividad biológica de los liofilizados de factores extracelulares de cada uno de los probióticos sobre el cultivo de las células HT-29, los resultados indican que los

cuatro LFEP presentan actividad inhibitoria sobre el cultivo de HT-29, sin embargo el LFE-*B. longum* fue el que presentó menor inhibición con respecto a la actividad inhibitoria observada por los LFE de los lactobacillus (figura 19), siendo el LFE-*L. acidophilus* y el LFE-*L. casei* los que mayor inhibición presentaron. La actividad inhibitoria de los LFE-*lactobacillus* a 7mg/mL es mayor a la observada por la droga doxorubicina-HCl a 1 µg/mL.

Será conveniente, que estos resultados se evalúen en modelos biológicos *in vivo*, para poder contar con evidencias más fehacientes y apegadas a la realidad, ya que en los modelos *in vitro* se realiza bajo condiciones muy estrechas y condicionadas que en un modelo biológico *in vivo*. Existen una serie de estudios en los cuales evalúan la actividad biológica de probióticos sobre cáncer de colon, sin embargo se emplean las bacterias consideradas probióticas, pero recordemos que las bacterias tienen un comportamiento “probiótico” sólo en un ambiente sano, y al no ser así, se comportan como bacterias oportunistas.

Baricault *et al.* 1995, estudiaron el efecto de las leches fermentadas sobre el crecimiento celular del cáncer de colon y encontraron que el 10-50% de las células HT-29 mostró una disminución en el crecimiento. Análisis posteriores revelaron que las actividades específicas del marcador específico para la diferenciación de células HT-29 tales como los péptidos dipeptidil se incrementaron. Los autores sugirieron que las células tumorales entraron en un proceso de diferenciación que conduce a crecimientos inferiores.

Lidbeck *et al.* 1991; demostraron una baja concentración de ácidos biliares secundarios en heces por la administración de leches fermentadas suplementadas con *L.acidophilus*, en oposición a la leche fermentada con *Lactococcus* en los seres humanos.

Hosada (1996) y Nadathur *et al* (1996) describen que la etapa de crecimiento en las bacterias también parece jugar un papel importante en antimutagenicidad. En la fase de crecimiento lineal, un profundo aumento en la actividad anti-mutagénica se produce, alcanzando un nivel máximo de actividad bacteriana que luego disminuye en la fase de crecimiento estacionario. Además del número y la fase de crecimiento es evidente que en otros factores influyen en la antimutogenecidad.

Fotiadis *et al.* 2008 y Biasco *et al.* (1991) demostraron que el crecimiento de bacterias que liberan enzimas carcinogénicas, se inhibe por bajo pH y probióticos (*L.acidophilus* y *B. bifidum*), reportaron pH bajo en heces fecales con baja proliferación de colonias en criptas así como la reducción de la formación de los ácidos biliares secundarios.

Kulkarin y Reddy (1994) con una alimentación para ratas con *B. longum* reportaron una inhibición en formación de cripta aberrante (FCA) en 50% de los animales tratados. Challa *et al* (1997) observaron una reducción del 23% en total colonización de FCA y 28% en total de cripta aberrante (AC) en ratas con una dieta suplementada con 0.5% de *B. longum* (1×10^8 células viables/g de alimento).

Singh *et al* (1997) evaluaron el efecto de *B. longum* en la carcinogénesis de colon utilizando ratas macho destetadas F344. Los resultados de su estudio de 40 semanas demostraron que la administración dietética de cultivos liofilizados de *B. longum* resultó en una supresión de la incidencia de tumores de colon y el número de tumores y también redujo el volumen del tumor.

En su revisión sobre la prevención de cáncer de colon por probióticos, Brandy *et al.* 2000, recogen un total de 24 observaciones sobre probióticos y tumores de colon, en la que se describe la reducción por derivados lácteos fermentados por bacterias de ácido láctico, probando una relación inversa entre el consumo de probióticos y aparición de adenocarcinoma o el desarrollo de tumores en el colon. También se reportaron que un mayor crecimiento de Bifidobacterias en el colon, el cual puede resultar en la inhibición del desarrollo de focos de criptas aberrantes (FCA) y por multiplicidad de las criptas, lo cual fue atribuido a la reducción de pH por colonias de microorganismos que fueron responsables de inhibir el crecimiento de *Escherichia coli* y *Clostridium*.

Comparando nuestros resultados con los estudios en donde evalúan la actividad de probióticos sobre células patógenas (Lidbeck *et al* (1991), Singh *et al* (1997); Fotiadis *et al* (2008). En los resultados que se obtuvieron en este proyecto, se demostró que las cepas de *Lactobacillus sp*, inhiben en mejor proporción el cultivo de HT-29 que al emplear los LFE-*B. longum* y esta inhibición sí presenta diferencia significativa con respecto al control (figura 19 y Tabla 10).

Matsuzakas (1998) demostró que *L. casei* Shirota tiene efectos anti-tumorales y anti-metastasis de células tumorales trasplantables, para suprimir la carcinogénesis inducida químicamente en los roedores y para inducir la producción de varias citoquinas, como el interferon-gamma, IL-1B y TNF-alfa que resultó en la inhibición del crecimiento del tumor y el aumento de la supervivencia de los ratones portadores de tumores. Resultados similares han sido reportados por Lee *et al.* 2004, para las cepas de *L. acidophilus* SNUL, *L. casei* YIT9029 y *B. longum* HY8001. Sun *et al.* 2005, demostraron de manera *in vivo* que el peptidoglicano de una especie de *Lactobacillus* fue capaz de reducir el crecimiento de células de cáncer de colon CT26 en ratones BALB/c a través de un aumento en el nivel de la apoptosis de células tumorales *in vitro*, lo que implica que la forma *in vivo* el efecto anti- mutagénicos pudo haber sido mediado por la respuesta inmune. Además de eso, los estudios recientes de Ghoneum *et al.* 2005, han demostrado que los probióticos pueden ser eficaces contra células Caco-2 de adenocarcinoma de colon; y Ghoneum y Gollapudi 2004, también lo demostraron contra una línea celular de cáncer de mama, lo que sugiere que la intervenciones terapéuticas de probióticos no necesariamente se limita a los canceres que afectan al tracto gastrointestinal.

Yamaguchi y Condeelis 2007, hacen énfasis en que los criterios utilizados para detectar las células cancerosas se han basado principalmente en una descripción biológica morfológica, y encuentra que un problema importante de tratamiento del cáncer es la metástasis, ya que migra a través de los vasos sanguíneos o linfáticos y forma tumores en múltiples sitios distantes. En su estudio de la motilidad celular y la invasión del cáncer ha generado una mayor comprensión de las propiedades mecánicas que intervienen en la

transformación maligna. Las evidencias nos muestran que la progresión del cáncer se caracteriza por la interrupción y/o reorganización del citoesqueleto (es decir, un andamio celular). Esto va acompañado de varias alteraciones moleculares que influyen en las propiedades mecánicas de las células, que consta de la formación de estructuras impulsado por la polimerización de actina conocidos como: filopodios, lamellipodia y invadopodios / podosomes (Yilmaz, *et al.* 2009).

Entre las herramientas empleadas en la presente investigación, para realizar el registro y análisis de las alteraciones de las células HT-29 en presencia de los LFE-probióticos, fueron el microscopio electrónico de barrido (MEB o SEM) y el microscopio de fuerza atómica (MFA). A través del MEB se analizó la topografía y se pudo medir ciertas características que presentan las células con tratamiento y sin tratamiento, una de estas características son las proyecciones (como los lamellopodios o invadopodios) características de células metastásicas.

En las observaciones efectuadas al microscopio electrónico de barrido de las muestras de células HT-29 cultivadas en presencia de LFE-*L. casei* (figuras 20 a 26) se observan las proyecciones (lamellopodios o invadopodios) características de las células de cáncer (figura 22), la presencia de las proyecciones o modificaciones del citoesqueleto celular son características de las células de diversos tipos de cáncer, como se observa en la figura 45, en esta figura se observa una micrografía al MEB o SEM modificada, la cual pertenece a célula escamosa de recubrimiento interno de la boca, la cual también presenta gran cantidad de proyecciones (lamellopodios o invadopodios).

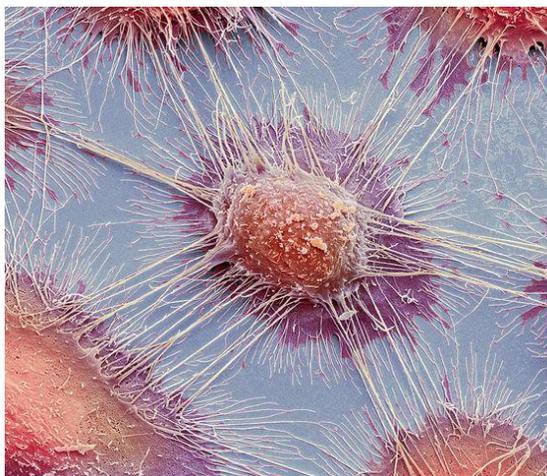


Figura 45. Células de cáncer de boca. Micrografía electrónica de barrido de color (SEM) de carcinoma de células escamosas (cáncer) células de una boca humana. Las muchas ampollas (protuberancias) y microvellosidades (pequeñas proyecciones) en la superficie de las células son típicas de las células cancerosas. Las células escamosas son un tipo de células epiteliales que recubren las cavidades del cuerpo, tales como la boca (2200X). (Science Photo Library, <http://fineartamerica.com/featured/6-mouth-cancer-cells-sem-science-photo-library.html>)

En la figura 24 y 25 se observan las micrografías obtenida de las células HT-29 cultivadas en presencia de LFE-*L. acidophilus* en estas imágenes se observan muy escasas protrusiones (lamellopodios o invadopodios), en la figura 25 se observa como estas protrusiones celulares se encuentran fraccionadas y son muy escasas. En la figura 26 se observa la micrografía al MEB o SEM de las células HT-29 cultivadas en presencia de LFE-*L. casei*, en esta imagen se observan escasas protrusiones en comparación con el control, pero son más abundantes en comparación con las células cultivadas en presencia del LFE-*L. acidophilus*.

A partir de las micrografías fue posible realizar una comparación del diámetro celular y la longitud de protrusiones, observando que las células de HT-29 cultivada en presencia de

LFE-*L. casei* disminuye aproximadamente el 50% el diámetro de la célula control, pero al cultivar las células en presencia de LFE-*L. acidophilus* la longitud de las protrusiones no presentan diferencia estadística con respecto al control, sin embargo estos son muy escasos comparado con el control, pero al cultivar las células en presencia del LFE-*L. casei* la longitud de estas protrusiones es mayor (Tabla 11 y figura 29).

Las micrografías obtenidas al microscopio electrónico de barrido fueron tomadas empleando tecnología de punta en este campo, empleando un SEM que permite analizar muestras húmedas; ya que hasta hace aproximadamente una década, la metodología para este tipo de análisis exigía realizar la deshidratación, y recubrimiento con oro del material biológico a analizar y además el obtener este tipo de micrografías podía llevarle al investigador largos periodos de trabajo, y la metodología implicaba el empleo de varios tipos de materiales, reactivos y equipos, algunos de estos materiales muy caros (láminas de oro para realizar el recubrimiento del material biológico y desecadores de punto crítico); sin embargo el microscopio electrónico de barrido empleado en este trabajo permiten economizar en tiempo y reactivos y realizar el análisis al material biológico en las condiciones de cultivo más reales, cabe recalcar que este equipo se logró tener acceso gracias al trabajo multidisciplinario que se realizó con el Dr. en física Jorge Luis Menchaca Arredondo, de la Facultad de Ciencias Físico-Matemáticas y la vinculación que él tiene con el PIIT-CINVESTAV-Monterrey, con esta vinculación se necesita hacer énfasis en la bondad que representa el realizar trabajo multidisciplinario.

Por otra parte, otra de las herramientas empleadas en este trabajo fue la obtención de micrografías al microscopio de fuerza atómica (MFA o AFM-por sus siglas en inglés). El AFM emplea un cantiléver que cuenta con una punta, la cual tiene contacto con el material a analizar, desde el nacimiento del AFM el área de estudio en el cual se empleaba era materiales no suaves, sin embargo en años recientes se fue introduciendo en el estudio de los materiales suaves, como lo son las células o el material biológico.

El presente trabajo representó el primer trabajo en el cual tanto el equipo multidisciplinario formado por los investigadores de la Facultad de Ciencias Biológicas y los investigadores de la Facultad de Físico-Matemáticas trataban de realizar el análisis morfométrico de las células HT-29; sin embargo este equipo multidisciplinario tenía experiencia en el análisis de células procariotas, las cuales son relativamente fáciles de analizar, ya que pueden fijarse al sustrato de análisis (Melendez *et al.* 2014); al iniciar los primeros ensayos representó un gran reto ya que las células HT-29 son relativamente muy grandes con respecto a las bacterias, y además de que una vez que se pudo determinar los parámetros de análisis de las células control (HT-29) al AFM, el siguiente paso fue más difícil ya que las células HT-29 cultivadas en presencia de LFE-*L. casei* o LFE-*L. acidophilus*, e incluso el tratamiento convencional la doxorubicina al tener efectos inhibitorios sobre el crecimiento de HT-29, como se observó en las micrografías al MEB, disminuyen las protrusiones (lamellopodios o invadopodios) y las células ya no pueden adherirse al sustrato (figuras 20 a 26) aunado a que la punta del cantiléver debe escanear estas células, esto dificultó el escaneo y análisis de las células, por lo que se debió de recurrir a varias estrategias de adhesión celular (Tabla 12).

De acuerdo con los resultados de la Tabla 12, y con respecto a los antecedentes se eligieron diez estrategias/sustratos: la albumina, etanol, poli-L-lisina y la placa fueron los que se observó, adherencia celular, pero no se pudo realizar escaneo al microscopio de fuerza atómica, ya que se seguían despegando al tener contacto con la punta. Algunas otras como la Polietilenimina, laminillas silanizadas y mica no presentaron ni crecimiento celular, siendo inmediatamente descartadas, ya que primero se tenía que observar el crecimiento celular, para después observar adherencia celular, de forma que la células no estuvieran flotando en el medio.

Como se ha descrito anteriormente en uno de los trabajos de Tomankova (2007) donde utilizo la Poli-L-Lisina [0.1%] como sustrato para la adherencia de células de cáncer utilizando Microscopía de Fuerza Atómica, “Study of Cancer Cells Used Atomic Force Microscopy”. En donde la Poli-L-Lisina es uno de los sustratos altamente referidos para la adherencia celular, en células de cáncer de colon no fue funcional ya que se observaba poco crecimiento pero sin adherencia celular fuerte. En otros trabajos también mencionan la utilización de Albumina como en el realizado por Sharma (2006) en “Albumin-derived nanocarriers: substrates for enhanced cell adhesive ligand display and cell motility.”

Sin embargo como en muchos otros trabajos, los autores mencionan que con el simple hecho de utilizar placas de cultivo celular de plástico fue más que suficiente para lograr la adhesión celular en otros trabajos fue innecesario el uso de algún sustrato para lograr la adherencia celular, como Lekka (2012) en “Atomic force microscopy: A tip for diagnosing cancer” y “Cancer cell recognition--mechanical phenotype”.

Estos datos nos invitan a pensar que el mejor sustrato para el cultivo de células y análisis al MFA dependerá del tipo de células que se desee analizar. De acuerdo a los resultados de la Tabla 12, el mejor tratamiento para adherir las células HT-29 control y células HT-29 cultivadas en presencia de LFE-*L. casei* fue el portaobjetos tratado con albumina sérica bovina [50%] y el portaobjetos previamente tratado con ciclo de lavado para vidrio y posteriormente tratado con Poli-L-Lisina, en ambos tratamientos fue posible observar las células adheridas (figura 32), más no fue posible el análisis ya que la punta del cantiléver al escanear las células por contacto para determinar la topografía y parámetros morfométricos rompía la célula tal como se observa en la figura 31; por lo cual fue necesario realizar una modificación a la punta lectora del cantiléver y se procedió a diseñar microesferas de vidrio y adherirlas a la punta lectora, este trabajo se realizó por el equipo de trabajo del Dr. en física Jorge L. Menchaca Arredondo, (figura 33).

Las modificaciones del sustrato para adhesión de las células HT-29 y la modificación a la punta lectora del cantiléver con la incorporación de la microesfera de vidrio, permitieron observar y analizar a las células HT-29 control (figuras 34, 35, 37 y 38) y en presencia del LFE-*L. casei* (figuras 36, 37 y 38). Con respecto a las células cultivadas en presencia de LFE-*L. acidophilus* no se lograron adherir al sustrato, esto probablemente se deba a la menor cantidad o ausencia de protrusiones en las células, tal como se observó en la micrografía al microscopio electrónico de barrido MEB o SEM (figura 24 y 25).

Una vez, que se tuvieron las condiciones ideales para el análisis de las células HT-29 control y las células HT-29 cultivadas en presencia del LFE-*L. casei* se realizó el análisis morfométrico de estas células, una vez escaneadas las células, los datos fueron analizados empleando el programa WSxM 5.0 Develop 8.1 y se pudo determinar el diámetro o ancho (figuras 35, 36, 37 y Tabla 13) y la altura de las células (figuras 35, 36, 38 y Tabla 13).

Con respecto a la altura se observa que la célula HT-29 cultivada en presencia del LFE-*L. casei* (HT-29+LFE - *L. casei*) disminuye su altura casi a la mitad con respecto a la célula control (HT-29), es decir se presenta como una célula “plana” y con respecto al ancho de las células, el promedio muestra que las células se vuelven más anchas con respecto al control (células HT-29), aumentando aproximadamente un tercio del ancho del control (HT-29 = 19.58 μ m y HT-29 + LFE-*L. casei* = 28.93 μ m), estos datos nos indican que la célula HT-29 cultivada en presencia del LFE-*L. casei* se “transforma” en una célula baja y extendida, tal como reportan las células entéricas sanas, a diferencia de las células de cáncer que entran en proceso de apoptosis, tal como se observa en la figura 46.

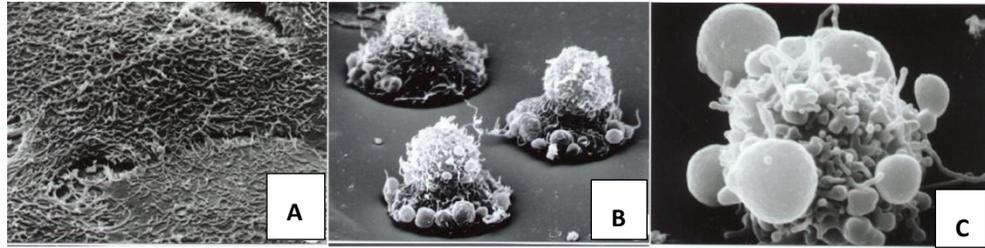


Figura 46.- Micrografías al MEB de células entéricas. En A se observa la morfología extendida de la célula entérica sana y presenta una topología, en B se observa la célula en proceso de apoptosis y en C se observa la célula apoptótica. (imagen tomada de Marlony W *et al.* 1998, Purdue Citometría de CD-ROM Series, volumen 4) http://www.cyto.purdue.edu/cdroms/cyto4/10_scope/index.htm.

Por otra parte, también se realizó el análisis morfométrico referente a la adhesión celular, al respecto existen pocos trabajos en los cuales se evalué esta propiedad de las células sanas con respecto a células cancerosas y células tratadas con alguna droga.

El análisis cuantitativo de las interacciones celulares con el medio ambiente extracelular es necesario para obtener una comprensión de cómo las células regulan la adhesión en el desarrollo y mantenimiento de los organismos multicelulares, y cómo los cambios en la adhesión celular contribuyen a las enfermedades.

El análisis de elasticidad se basa en determinar la fuerza aplicable a la célula individual cultivada sobre un sustrato y durante el análisis debe estar en una fase acuosa. El principio del análisis al AFM para determinar la fuerza de adhesión empleada para despegar la célula de un sustrato, se realiza de acuerdo a los siguientes pasos (figura 47), en la cual se emplea una punta del cantiléver sin microesfera adaptada.

Las etapas típicas en el experimento son: 1.- la punta conteniendo la célula se aproxima a la superficie (en verde), 2.- se realiza en contacto y es seguido por el de retorno (en azul) 3.- el nivel de fuerza cero se alcanza 4.- la célula es alargada por fuerzas adhesivas 5.- se forma un “hilo de adhesión-sujeción de membrana” y se estira hasta que se separa después de la extensión, en los resultados obtenidos (figura 41) se observa que a la célula HT-29 fue necesario aplicarle una fuerza de 1.61×10^{-17} joules y la fuerza aplicada a la célula HT-29 cultivada en presencia de LFE-*L. casei* fue de $24,600 \times 10^{-17}$ joules,

La determinación de la fuerza de adhesión de las células es importante para conocer y poder “controlar” un amplio espectro de procesos biológicos requiere controla la adhesión celular, tales el desarrollo embrionario, el montaje de los tejidos, la comunicación celular, la inflamación y la cicatrización de heridas, metástasis tumoral, el cultivo de células, y la infección e interacción viral y bacteriana. Desde el estudio de la biología celular, se conoce que proteínas están involucradas en los procesos de adhesión celular, sin embargo no está caracterizada la fuerza de adhesión desde el punto de vista del estudio biofísico del proceso de adhesión, célula-célula o célula-substrato, en el cual estará involucrado sin duda el citoesqueleto y una gran cantidad de proteínas transmembranales (Karp 2015). Para obtener una visión cuantitativo sobre el proceso de adhesión celular es importante el análisis al AFM como herramienta de estudio biológico, más allá de la información que nos brindan las micrografías obtenidas al microscopio electrónico de barrido. Otro parámetro analizado a las células HT-29 (control) y HT-29+LFE-*L. casei* fue la determinación del valor de elasticidad (también conocido como deformación o

Módulo de Young), el cual permite calcular cuan deformable es una célula. Para las líneas celulares sanas (células de referencia, es decir células normales o no tumorigénicas) se caracterizan por el Módulo de Young mayor que en comparación a las células de cáncer (Lekka *et al.* 1999).

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que las células de cáncer HT-29 presentan una rugosidad/elasticidad o Módulo de Young de 0.57 kPa y las células HT-29 cultivadas en presencia de LFE-*L. casei* presentan un valor de 3.60kPa, es decir estas últimas son células más elásticas en comparación con la célula de cáncer, este dato se interpreta como que fue necesaria aplicar 6 veces mayor fuerza a la célula HT-29+LFE-*L. casei*. Como se observa en nuestra medición del Módulo de Young con respecto a la línea celular HT-29 y *Lactobacillus casei*. Lo que significa que al analizar el módulo de Young (o módulo elástico) este dato indica que tan deformable es una célula cancerígena, y que en cuanto mayor sea el módulo de Young más rígida será la célula y a menor Módulo más elástico es la célula.

El cambio en la rigidez celular es una nueva característica de las células de cáncer que afecta a la forma en que se propagan. Existen pocos estudios en los cuales se han realizado la comparación de células sanas y la comparación de la elasticidad con células cancerosas. En un estudio reciente en el que evaluaron células de páncreas, pulmón, entre otras, encontraron que la rigidez celular de las células de cáncer metastásico es de más de 70 % más suave, con una desviación estándar más de cinco veces más estrecho, que las células benignas que recubren la cavidad corporal. Se encontraron diferentes tipos de

cáncer para mostrar una rigidez común. En este estudio también reportan que los resultados muestran que el análisis nanomecánico se correlaciona bien con las pruebas de inmunohistoquímica que se utilizan actualmente para la detección de cáncer (Lekka 2016 y Cross *et al.* 2008).

En cuanto a este parámetro nanomecánico, aún hay una necesidad de desarrollar un protocolo operacional estándar con el fin de poder comparar los resultados obtenidos en diferentes laboratorios (Dimitriadis *et al.*, 2002). Ya que la determinación de la rigidez de células en el contexto de la progresión del cáncer permitirá una detección más eficaz de los cambios relacionados con el cáncer.

El que una célula presente menor elasticidad o Módulo de Young, indica indirectamente una alta capacidad para modificar su citoesqueleto, lo cual le permitirá desplazarse a mayor velocidad y llegar a varios lugares del cuerpo, es decir realizar metástasis con mayor capacidad de propagación, sin duda los agentes antitumorales presentan gran capacidad para inhibir la formación de microtubulos, pero dichas drogas no sólo afectan las células malignas, también atacan a los microtubulos de las células sanas, lo que conlleva a un desgaste celular del paciente (Dalbeth *et al.* 2014).

Uno de los propósitos de este proyecto fue, caracterizar y analizar los cambios morfológicos y nanomecánicos de la línea celular HT-29 en presencia de liofilizados de factores extracelulares de probióticos por Microscopía de Fuerza Atómica, los resultados se concentran en la figura 43.

En este estudio las características y dimensiones morfológicas fueron determinadas por Microscopía de Fuerza Atómica, debido a la fácil preparación de las muestras y la alta resolución alcanzable, además de que este dispositivo no utiliza la aplicación de los colorantes para teñir las características morfológicas, por lo que es posible tener resultados detallados con un menor costo y una reducción del tiempo de investigación.

Dentro de los cambios morfológicos de la línea celular HT-29 en presencia de LFE-*L.casei* el ancho promedio resultante fue de 28.93 μm , estos valores indican que la línea celular HT-29 aumenta el ancho de su estructura celular cuando se encuentran en presencia de este tratamiento. A su vez, el valor de altura promedio fue de la célula HT-29 fue de 5.3475 μm , mientras que la línea de HT-29 cultivadas en presencia de LFEP-*L.casei* presentó un valor promedio de 3.5 μm es decir que mostraron una disminución en la altura.

La caracterización de las propiedades de adhesión de la estructura celular de HT-29 se realizó mediante la técnica de nanoindentación basada en espectroscopía de fuerzas. Se cuantificó el trabajo necesario para romper la adhesión que hay entre la punta del Microscopio de Fuerza Atómica y las células de HT-29, analizando el área bajo la curva de retracción de las curvas fuerza-distancia. En este trabajo, la adhesión mostrado por las células HT-29 control fue de 1.61 X10-17 joules y en presencian de LFEP-*L.casei* fue de 24600 X10-17 joules, los valores obtenidos representan una gran diferencia significativa con respecto a la adherencia que presenta HT-29 lo que implica una alteración fisicoquímica estructural que se asocia a la interacción de las moléculas de los

LFE-*L. casei* con la superficie celular de HT-29, lo que provoca una modificación de la adhesión por lo que la superficie celular de HT-29 en presencia de estos tratamientos.

Estos estudios demuestran que las propiedades de adhesión de las células se comportan de manera muy similar en función del tratamiento aplicado, ya que cada compuesto activo afecta y/o modifica componentes celulares.

A su vez la elasticidad de las células de cáncer de colon HT-29 y de estas en presencia de LFE-*L. casei*, los valores elásticos obtenidos fueron de 0.577 y 3.60 kPa respectivamente, los datos obtenidos indican un aumento de la rigidez en la estructura celular de las células HT-29, por lo que tienden a una rigidez celular, exhibiendo un comportamiento menos elástico con respecto a las células control, lo que representa una regeneración de la membrana celular, lo que significa que las células normales o no tumorigénicas o cánceres no malignas se caracterizan por el módulo de Young mayor que en comparación a las células de cáncer.

En la figura 44 se muestra las imágenes topográfica observadas en 3D, en “a” se observan dos células correspondientes a las células HT-29 control, y la topografía se observa con múltiples irregularidades topológicas y en la imagen “b” se observa la célula HT-29 + LFE-*L. casei* la cual muestra una topología regular o lisa, la cual se asemeja a la topología que presenta el colonocito murino, estas células también muestra una topología regular y lisa; este aspecto nos genera una nueva pregunta, ¿sí en las células HT-29 de cáncer de colon su actividad tumorigénica se revierte?

Los cambios en las dimensiones estructurales de las células HT-29 están relacionados con los efectos producidos por los probióticos, esto tiene mucha relación con lo descrito anteriormente por todos los estudios realizados con probióticos donde se demostraba una disminución tanto de las enzimas carcinogénicas, como el tamaño e inhibición de criptas aberrantes, reducción del volumen del tumor y anti-mutagénico.

Estos resultados nos proveen datos importantes para seguir con el estudio de estas células para elucidar que compuestos específicos son los que actúan en la inhibición del crecimiento de las células cancerosas, por otra parte llegar a establecer un protocolo para el estudio de células de cáncer de colon mediante microscopía de fuerza atómica ya que este microscopio conocido por ser un aparato tan sofisticado ya que nos brinda datos muy importantes sobre el estado de la célula y así poco a poco llegar a comprender el comportamiento de estas células malignas. La incorporación de la Microscopía de Fuerza Atómica en estudios microbiológicos es un campo relativamente joven, por lo que ha sido necesario desarrollar nuevas metodologías dirigidas al estudio de material biológico capaz de analizar las propiedades nanomecánicas de las células para la identificación de compuestos de la superficie celular.

En futuros trabajos consideramos que será importante determinar la familia de proteínas reguladoras WAVE2, estas regulan la formación de lamellopodios periféricos o invadopodios, que son necesarios para la migración celular general, mientras que WAVE1 parece promover la formación de fruncido de la membrana dorsal y la estabilización de lamellopodios periféricos. Los roles de WAVE 1 y 2 en células de cáncer fueron

estudiadas en líneas celulares de melanoma metastásico de ratón, en donde estas proteínas estaban sobre-expresadas y encontraron que WAVE 2 tiene un efecto mucho mayor sobre estas células que WAVE 1. Estos resultados indican que WAVE2 es un regulador primario de la invasión de células de melanoma y metástasis. WAVE 1 y 2 en las células HT-29 cultivadas en presencia de los LFE-probióticos ya sea de *L. casei*, *L. plantarum*.

L. acidophilus o bien *B. longum*, de acuerdo a los resultados obtenidos en la figura 19.

Dado que el diagnóstico precoz se ha demostrado ser el factor más importante en el resultado de pronóstico, de ahí el hecho de que el reconocimiento de células con propiedades (rugosidad, tamaño, elasticidad, adhesión y morfología de las células) mecánicas alteradas a través de AFM ha sido demostrado por varios grupos de científicos, todavía hay una necesidad de desarrollar un protocolo operacional estándar con el fin de poder comparar los resultados obtenidos en diferentes laboratorios.

También será necesario seguir trabajando en la evaluación *in vitro* e *in vivo* de la combinación simbiótica de probióticos y prebióticos, así también como en la evaluación de varios liofilizados de factores extracelulares de la combinación de varios probióticos, así como investigar medios que permitan llegar dichos LFE-P a diversos sitios a nivel del lumen intestinal así como extraintestinalmente y que permitan a futuro inhibir o disminuir la presencia del cáncer de colon en la población.

10. CONCLUSIONES

- Los liofilizados de factores extracelulares de probióticos inhiben el crecimiento *in vitro* de las células de cáncer colorrectal HT-29.
- El análisis morfométrico realizado al microscopio de fuerza atómica (AFM) indica que las células de cáncer colorrectal HT-29 cultivada en presencia de factores extracelulares de probióticos son células con mayor rigidez, mayor diámetro y menor altura en comparación con las células HT-29 no tratadas.
- El análisis topológico al microscopio electrónico de barrido (MEB) indica que las células de cáncer colorrectal HT-29 cultivada en presencia de factores extracelulares de probióticos disminuyen la cantidad y longitud de las protrusiones en comparación con las células HT-29 no tratadas.

11. PERSPECTIVAS

De acuerdo a los resultados obtenidos en el presente trabajo, se puede considerar de interés que en próximos trabajos se evalúe sobre la línea de cáncer colorrectal HT-29, la mezcla de diversos liofilizados de factores extracelulares de los probióticos aquí evaluados y poder determinar la mejor sinergia que inhiba el crecimiento *in vitro* de HT-29. Así mismo será de interés realizar el fraccionamiento de los metabolitos presentes en los factores extracelulares de cada probiótico aquí estudiado (*L. casei*, *L. acidophilus*, *L. plantarum* y *B. longum*), empleando la técnica de cromatografía en capa fina, de esta manera podríamos determinar el efecto biológico de cada una de las fracciones obtenidas e identificar los compuestos activos presentes mediante técnicas de resonancia magnética nuclear (RMN).

Los resultados obtenidos hasta el momento fueron realizados *in vitro*, pero en futuros trabajos será conveniente realizar el análisis *in vivo* tanto de los probióticos, así como de los liofilizados de los factores extracelulares de dichos probióticos para poder contar con una mayor fortaleza de los resultados, sin embargo dentro de estos trabajos *in vivo*, deberá realizarse diversos bioensayos para determinar si los LFE-P aquí evaluados solo tienen actividad preventiva, inhibitoria o regeneradora sobre las células a nivel de colon.

En este trabajo se generó una sinergia de diversas líneas de investigación con la intención de desarrollar un proyecto multidisciplinario que permita entender y explicar fenómenos fisicoquímicos que ocurren en los sistemas biológicos a través del uso de la Microscopía de Fuerza Atómica. Una de las perspectivas de estudio en la presente línea de investigación es generar un protocolo general de cómo trabajar con la línea celular HT-29, además de mencionar la modificación de la punta para el escaneo de las células al microscopio de fuerza atómica para lograr la mejor observación, medición y evaluación de las propiedades biofísicas de diversos tipos de células.

Una de las características de las células de cáncer es la formación de una gran cantidad de protrusiones, y en el presente trabajo se observó que el liofilizado de factores extracelulares de *L. casei* y *L. acidophilus* disminuyó la formación de dichas protrusiones. Será importante en próximos trabajos determinar los mecanismos fundamentales de la inhibición de las protrusiones, en vísperas de inhibir la migración celular en las primeras etapas de la metástasis celular. Así como realizar trabajos con un enfoque molecular que determinen que proteínas se inhiben o expresan durante el proceso metastásico en las primeras etapas, es decir a nivel de colon.

La formación de protrusiones está relacionado con la organización del citoesqueleto, específicamente la organización de los microfilamentos, en específico la organización de la actina F, y proteínas asociadas como filaminas, vimentinas, calmodulinas, entre otras, por lo cual se recomienda realizar investigaciones encaminadas a determinar a nivel citoesqueleto, la síntesis, concentración y organización de las proteínas asociadas, a través

de técnicas de secuenciación, expresión de proteínas, así como realizar el marcaje específico para las proteínas asociadas a citoesqueleto y analizar a través de microscopía empleando el tipo RAMAN de fluorescencia.

La detección temprana del cáncer se dificulta dado que al inicio de la transformación neoplásica, no puede detectarse con claridad la presencia de células cancerosas, sin embargo el tejido ya ha sufrido una serie de alteraciones, las cuales son menos perceptibles. Por consiguiente, no es posible la identificación del padecimiento hasta la siguiente etapa de la enfermedad, donde las células cancerosas presentan una serie de alteraciones mayores, tanto en su función como en su morfología. En la última década se ha descubierto que la membrana celular puede funcionar como un indicador de enfermedad, y se ha llegado a determinar que la superficie de la membrana refleja estas alteraciones.

En el caso de las células que sufren transformación neoplásica, se presentan cambios que afectan la naturaleza fosfolipídica de la bicapa, como resultado de la actividad aumentada de las enzimas proteolíticas secretadas hacia el medio, aunado al hecho de que las células transformadas generalmente poseen nuevas proteínas en la superficie celular, generando importantes cambios estructurales en las membrana neoplásicas. De acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo, proponemos que esta técnica de análisis de las células al microscopio de fuerza atómica y al microscopio electrónico de barrido puede permitir el análisis de esta enfermedad desde etapas tempranas de la

alteración celular, al detectar alteraciones biomecánicas y ultraestructurales de las membranas celulares.

Por lo cual se recomienda que se adapte una metodología que integre la técnica del microscopio de fuerza atómica con la línea celular de cáncer colorrectal HT-29, ya sea mediante la modificación de la punta del cantiléver para el escaneo de las células y bajo condiciones óptimas que permita su observación, medición y evaluación de las propiedades biofísicas de las células *in vitro*.

12. BIBLIOGRAFÍA

Artículos en Revistas

Andersson H, Asp N-G, Bruce A, Roos S, Wadstrom T, Wold AE. 2001. Health effects of probióticos and prebiotics: A literature review on human STUDIES. Scand Journal of Nutrition 45:58-75.

Armstrong B, Doll R. 1975. Environmental factors and cancer incidence and mortality in different countries, with special reference to dietary practices. International Journal of Cancer 15: 617-631.

Arroyave M. 2008. Nanoindentation based on force spectroscopy with an atomic force. Revista Ingeniería y Ciencia 4(8):85-98.

Ávila E. 2008. Tratamiento quirúrgico en colon. Gaceta Mexicana de Oncología 7(4): 31-33.

Ballas SK, Dover GJ, Charache S. 1989. Effect of hydroxyurea on the rheological properties of sickle erythrocytes *in vivo*. Am J Hematol 32(2):104-11.

Baricault L, Denariáz G, Hourí JJ, Bouley C, Sapin C, Trugnan G. 1995. Use of HT-29, a cultured human colon cancer cell line, to study the effect of fermented milks on colon cancer cell growth and differentiation. Carcinogenesis 16:245-252.

- Barrón P, Serrano C, Villareal L, Verduzco A, Morales M, Mata D. 2008. Inhibición del crecimiento axénico *in vitro* de *Entamoeba histolytica* por acción de probióticos. *Ciencias UANL* 11:235-290.
- Biasco G, Paganelli GM, Brandi G, Brillanti S, Lami F, Callegari C, Gizzi G. 1991. Effect of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* on rectal cell kinetics and fecal pH. *Italian Journal of Gastroenterology* 23(3):142.
- Biavati B, Vascovo N, Torreani S, Bottazzi V. 2000. Bifidobacteria: history, ecology, psicology and applications. *Annual Microbiology* 50:117-131.
- Binning G, Rohrer H, Gerber Ch, Weibel E. 1992. Surface Studies by Scanning Tunneling Microscopy. *Physical Review Letter* 49: 57
- Brady L, Gallaher D, Busta F. 2000. The role of probiotic cultures in the prevention of colon cancer. *Journal of Nutrition* 130:410- 4114
- Burns AJ, Rowland IR, 2000. Anti-carcinogenicity of probiotics and prebiotics. *Current Issues in Intestinal Microbiology* 1:1324.
- Challa A, Rao DR, Chawan CB, Shackelford L.1997. *Bifidobacterium longum* and lactulose suppress azoxymethane-induced colonic aberrant crypt foci in rats 3:517-21.
- Cross S, Jin YS, Tondre J, Wong R, Yu Rao, Gimzewski JK. 2008. AFM-based analysis of human metastatic cancer cells. *Nanotechnology* 19(38):384003.

- Dalbeth N, Lauterio TL, Wolfe HR. 2014. Mechanism of action of colchicine on treatment of gout. *Clinical Therapeutics* 36(10): 1465-1479.
- Dartsch P, Kolb H, Beckham M, Lang F. 1994. Morphological alterations and cytoskeletal reorganization in oposum kidney (OK) cells during osmotic swelling and volumen regulation. *Histochemistry and Cell Biology* 102:69-75.
- Dimitriadis E, Horkay F, Maresca J, Kachar B, Chadwick R. 2002. Determination of elastic moduli of thin layers of soft material using the Atomic Force Microscope. *Biophysical Journal* 82:2798–2810
- Dufrêne Y. 2008. AFM for nanoscale microbe analysis. *Analyst* 133(3):297-301.
- Erazo-Valle A. 2008. *Gaceta Mexicana de Oncología*. Sociedad Mexicana de Oncología, A. C. 12(4):213-222.
- Faria EC, Ma N, Gazi E, Gardner P, Brown M, Clarke NW, Snook RD. 2008. *Analyst* 133:1498-1500
- Fioramonti J, TheodorouV, Bueno L. 2003. Probiotics: what are they? What are their effects on gut physiology? *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* 5:711-24.
- Fishkind DJ, Wang Y. 1995. New horizons for cytokinesis. *Current Opinion in Cell Biology* 7:23-31.
- Forman M, Hursting S, Umar A, Barret J. 2004. Nutrition and cancer prevetion. *Annual Revision of Nutrition* 24:223-254.

- Fotiadis CI, Stoidis CN, Spyropoulos B, Zografos ED, 2008. Role of probiotics, prebiotics and synbiotics in chemoprevention for colorectal cancer. *World Journal of Gastroenterology* 14(42):6453-6457.
- Fuller R. 1989. Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology* 66:365-378.
- Ghoneum M, Hamilton J, Brown J, Gollapudi S. 2005. Human squamous cell carcinoma of the tongue and colon undergoes apoptosis upon phagocytosis of *Saccharomyces cerevisiae*, the baker's yeast, *in vitro*. *Anticancer Research* 24:1455-1463.
- Gibson GR, Roberfroi MB. 1995. Dietary modulation of the colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *Journal of Nutrition* 125:1401-1412.
- Gillor O, Etzion A, Riley MA. 2008. The dual role of bacteriocins as anti-and probiotics. *Applied Microbiology Biotechnology* 81(4):591-606.
- Gomez A, Malacata F. 1999. *Bifidobacterium spp.* and *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotic. *Trend Food Science Technology* 10:139-157.
- Guillot J. 2000. The pros and cons of probiotics-make probiotics work for poultry. *World Poultry* 16(7):18-21.
- Gupta V, Garg R, 2009. Probiotics. *Indian Journal of Medical Microbiology* 27:202-209.

- Hosada M, Hashimoto H, He D, Morita H, Hosono A. 1996. Effect of administration of milk fermented with *Lactobacillus acidophilus* LA-2 on faecal mutagenicity and microflora in human intestine. *Journal of Dairy Science* 79:745-749.
- Isolauri E, Salminen S, Ouwehand A. 2004. Microbial-gut interactions in health and disease. *Probiotics. Best practice & research. Clinical gastroenterology* 2:299-313.
- Jemal A, Thomas A, Murray T, Thun M. 2002. Cancer Statistics. *A Cancer Journal for Clinicians* 52(1):23-47
- Kulkarni N, Reddy S.1994. Inhibitory effect of *Bifidobacterium longum* cultures on the azoxymethane-induced aberrant crypt foci formation and fecal bacterial beta-glucuronidase. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 207(3):278-83.
- Lee G, Chwee T. 2007. Biomechanics approaches to studying human diseases. *Trends in Biotechnology* 25(3):111-118.
- Lee J, Shin J, Kim E, Kang I, Yim J, Kim H, Joo H, Woo J. 2004. Immuno-modulatory and antitumor affects *in vivo* by cytoplasmic fraction of *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium longum*. *Journal of Veterinary Science* 5:41-48.
- Lekka M, Gil D, Pogoda K, Dulińska-Litewka J, Jach R, Gostek J, Klymenko O, Prauzner-Behcicki S, Stachura Z, Wiltowska-Zuber J, Okoń K, Laidler P. 2011. Cancer cell detection in tissue sections using AFM. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2:151-6.

- Lekka M, Laidler P, Gil D, Lekki J, Stachura Z, Hryniewicz, AZ. 1999. Elasticity of normal and cancerous human bladder cells studied by scanning force microscopy. *European Biophysics Journal* 28(4):312-316.
- Lekka M, Pogoda K, Gostek J, Klymenko O, Prauzner-Bechcicki S, Wiltowska-Zuber J, Jaczewska J, Lekki J, Stachura Z. 2012. Cancer cell recognition--mechanical phenotype. *Micron* 43(12):1259-66.
- Lekka M. 2012. Atomic force microscopy: A tip for diagnosing cancer. *Nature Nanotechnology* 7:691–692.
- Lekka, M. 2016. La discriminación entre células normales y cancerosas Uso de AFM. *Bionanoscience* 6:65-80.
- Ley RE, Peterson DA, Gordon JL. 2006. Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. *Cell* 124:837-848.
- Li J, Sung CY, Lee N, 2016. Probiotics modulated gut microbiota suppresses hepatocellular carcinoma growth in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 113:1306–1315.
- Lidbeck A, Geltner Allingert U, Orrhage M, Ottovat L, Brismars B, Gustafsson J, Rafter J, Nord E. 1991. Impact of *Lactobacillus acidophilus* supplements on the faecal microflora and soluble faecal bile acids in colon cancer patients. *Microbial Ecology in Health and Disease* 4:81-88

- Lim C, Zhou E, Quek S. 2006. Mechanical models for living cells-a review Journal Biomechanics 39:195-216
- Liong MT, 2008. Roles of probiotics and prebiotics in colon cancer prevention: postulated mechanisms and *in vivo* evidence. International Journal of Molecular Science 9: 854-863.
- Lopez Brea M, Domingo D. 2007. Antibiotic therapy with probiotics. Revista Española de Quimioterapia 20:170-181.
- Matsumoto M, Benno Y. 2004. Consumption of *Bifidobacterium lactis* LKM512 yogurt reduces mutagenicity by increasing gut polyamine contents in healthy adult subjects. Mutation Research 568:147-153.
- Mennickent S, Green K. 2009. Los probióticos y su utilidad terapéutica. Ciencia Ahora 24:31-38.
- Melendez Anzurez FE, Barrón González MP, Rodríguez Garza R, Elizondo Herrera A, Menchaca Arredondo JL, Ovalle Reyna RL, 2014. Actividad antibacteriana de *Cinnamomum verum* y tetraciclina sobre *Porphyromonas gingivalis* y caracterización de propiedades morfométricas por microscopía de fuerza atómica. Revista CIENCIA-UANL. 17(70):189.
- Morgan G, Silva A, Sat D. 2008. Factores de riesgo para cáncer colorrectal. Colorectal risk factors. Instituto Jalisciense de Cancerología. Gaceta Mexicana de Oncología 7(4):245-256.

- Morgan G, Uribe A, Muñoz D. 2008. Colorectal risk factors de *Cancerología Gaceta Mexicana de Oncología* 7(4):263-670
- Moustakas A, Theodoropoulos PA, Gravanis A, Haussinger D, Stournaras C. 1998. The cytoskeleton in cell volume regulation. *Contributions to Nephrology* Karger Publishers 123:121-34.
- Nadathur R, Carney R, Gould J, Bakalinski T. 1996. Palmitic acid is the major fatty acid responsible for significant anti-N-methyl-N' -nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG) activity in yogurt. *Elsevier* 359(3):179-89.
- Ogawa T, S Hashikawa S, Asai Y, Sakamoto H, Yasuda K, Makimura Y. 1993. A new synbiotic, *Lactobacillus casei* subsp. *casei* together with dextran, reduces murine and human allergic reaction. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* 46(3):400-9.
- Pezzilli R, Fantini L. 2006. Los probióticos y pancreatitis aguda grave. *Journal of the Pancreas* 7(1):92-93.
- Reddy B, Hami S, Rao C. 1997. Effect of dietary oligofructose and inulin on colonic preneoplastic aberrant crypt foci inhibition. *Carcinogenesis* 18(7):1317-1374.
- Rex DK, Johnson DA, Anderson JC, Schoenfeld PS, Burke CA, Inadomi JM 2004 American College of Gastroenterology action plan for colorectal cancer prevention. *American Journal of Gastroenterology* 99(4):574-577.

- Rowland I, 2008. Probiotics and cancer—from *in vitro* to human studies. International Journal of Probiotics and Prebiotics 3:165-168.
- Saab MB, Bec N, Martin M, Estephan E, Cuisinier F, Larroque C, Gergely C. 2013. Differential effect of curcumin on the nanomechanics of normal and cancerous mammalian cells. Cell Biochem Biophys 65(3):399-411
- Sanz Y, Collado MC, Haros M, Dalmau J. 2004. Funciones metabólicas nutritivas de la microbiota intestinal y su modulación a través de la dieta: probióticos y prebióticos. Acta Pediátrica Española 62:520-526.
- Schlaepfer L, Mendoza-Espinoza J. 2010. Las plantas medicinales en la lucha contra el cáncer, relevancia para México. Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas 41:18-27.
- Schmit A, Hall MN. 1998. Signal in to the actin cytoskeleton. Annual Review of Cell Biology 14:305-338.
- Schrezenmeir J, De Vrese M. 2001. Probiotics, prebiotics and synbiotics: approaching definition. The American Journal of Clinical Nutrition 73:361-364.
- Screfumar O, Hosono A. 2000. Immediate effect of *Lactobacillus acidophilus* on the intestinal flora and faecal enzymes of rats and the *in vitro* inhibition of *Escherichia coli* coculture. Journal Dairy Science 83:931-939.
- Sedin DL, Rowlen KL. 2000. Adhesion forces measured by atomic force microscopy in humid air. Analytical chemistry 72(10):2183-9.

- Seksik P, Rigottier-Gois L, Gramet G, Sutren M, Pochart P, Marteau P, Jian R, Dore J. 2003. Alteration of the dominant faecal bacterial groups in patients with Crohn's disease of the colon. *International Journal in Gastroenterology* 52:237-242.
- Sharma R, Pereira M, Schwarzbauer J, Moghe P. 2006. Albumin-derived nanocarriers: substrates for enhanced cell adhesive ligand display and cell motility. *Biomaterials* 19:3589-98.
- Singh J, Rivenson A, Tomita M, Shimamura S, Ishibashi N, Reddy B. 1997. *Bifidobacterium longum*, a lactic acid-producing intestinal bacterium inhibits colon cancer and modulates the intermediate biomarkers of colon carcinogenesis. *Carcinogenesis* 18:833-841.
- Small JV, Rother K, Kaverina I. 1999. Functional design in the cytoskeleton. *Current Opinion in Cell Biology* 11:54-60.
- Spuul P, Ciufici P, Veillat V, Leclercq A, Daubon T, Kramer I, Génot E. 2014. Importance of RhoGTPases in formation, characteristics, and functions of invadosomes. *Small GTPases* 5(2):e28713.
- Sreefumar O, Hosono A. 2000. Immediate effect of *Lactobacillus acidophilus* on the intestinal flora and faecal enzymes of rats and the *in vitro* inhibition of *Escherichia coli* coculture. *Journal Dairy Science* 83:931-939.
- Stolz M. 2009. Early detection of aging cartilage and osteoarthritis in mice and patient samples using atomic force microscopy. *Nature Nanotechnology* 4:186-192.

- Sun J, Shi Y, Le W, Ma X. 2005. Distinct immune response induced by peptidoglycan derived from *Lactobacillus sp.* World Journal of Gastroenterology 11:6330-6337.
- Tapia M, Batina N, Maldonado E, Tanori J, Ramón E. 2009. Nanoscopic characterization of the membrane surface of the HeLa cancer cells in the presence of the gold nanoparticles: an AFM study. Revista Mexicana de Física 55(1):64–67.
- Thorn CF, Oshiro C, Marsh S, Hernández-Boussard T, McLeod H, Klein TE, Altman RB. 2011. Vías: doxorubicina. Farmacodinámica y efectos adversos farmacogenética y genómica, 21(7):440-446.
- Tirado L, Mohar A. 2008. Epidemiology of colorectal cancer. Gaceta Mexicana de Oncología Sociedad Mexicana de Oncología, A.C. 7(4):185-203.
- Valsiljevic T, Shah N. 2008. Probiotics from Metchnikoff to bioactives. International Dairy Journal 18:714-728.
- Verbelen, C, Dufrêne, YF. 2009. Direct measurement of Mycobacterium-fibronectin interactions. Integrative biology: quantitative biosciences from nano to macro 1(4):296-300.
- Willett W. 2001. Diet and Cancer: One View at the Start of the Millennium. Cancer Epidemiol Biomarkers Prevevention 10(1):3-8.
- Wong J, R.de Souza, C Kendall, A. Emam, D Jenkins. 2006. Colonic health: fermentation and short chain fatty acids. Journal of Clinical Gastroenterology 40:235-243.

Wottawah F, Schinkinger S, Lincoln B, Ananthakrishnan R, Romeyke M, Guck J, Käs J. 2005. Optical Rheology of Biological Cell. *Physical Review Letters*. 94(9):098-103.

Yamaguchi H, Condeelis J. 2007. Regulation of the actin cytoskeleton in cancer cell migration and invasion. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)* 1773(5):642-52.

Yilmaz M, Christofori G. 2009. EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion. *Cancer and Metastasis Reviews* 28: 15-33

Libros

- Badui S. 2012. La ciencia de los alimentos en la práctica. Pearson educación. México, pp.328.
- Brighton D, Wood M. 2005. Royal Marsden Hospital Handbook of Cancer Chemotherapy. Editorial Elsevier. United Kingdom, pp.535
- Devlin, T. M. 2004. Bioquímica, Cuarta edición. Editorial Reverté, Barcelona, pp.493-522.
- Dykstra, MJ, Reuss LE. 2011. Biological electron microscopy: theory, techniques, and troubleshooting. Springer Science - Business Media: North Carolina, USA, pp.45-65.
- Fuller R, Perdígón G. 2000. Probiotics 3: immunomodulation by the gut microflora and probiotics. Springer. United Kingdom. pp 12-14, 139-145
- Moreau MC, Gaboriau-Routhiau V. 2000. Influence of resident intestinal microflora on the development and functions of the intestinal-associated lymphoid tissue. Springer. United Kingdom, pp.69-114.
- Rakel D. 2009. Medicina Integrativa. Segunda Edición. Editorial Elsevier/Masson. USA, pp.842-847.
- Renau P, Faura M. 1994. Principios básicos del microscopio electrónico de barrido. Segunda edición. Editorial Universidad de la Coruña. España. pp:73-92

Ricci D, Braga P. 2004. Atomic Force Microscopy Biomedical Methods and Applications. Humana Press. Nueva Jersey USA, pp.15-37.

Ruiz A, Jiménez M, López M, Sampedro A. 1992. Fundamentos de biología e inmunología tumoral. Servicio de Publicaciones de la Universidad de Granada, Granada, pp.40-52

Wollowski I, Rechkemmer G, Pool- Zobel B. 2001. Protective role of probiotics and prebiotics in colon cancer. American Journal. New York Mc Graw Hill; USA, pp.98-100.

Capítulos de libros

Karp G. 2015. Elementos del citoesqueleto y movilidad celular. En: Biología Celular y Molecular conceptos y experimentos. Mac Graw Hill: USA, pp.318-339.

Ortega JE, Barrón González MP, Gracia Pinilla MA, Pérez E, López Aldrete A, Menchaca Arredondo J. 2014. Biological samples observed *in vitro* by Atomic Force Microscopy. En: Microscopy: advances in scientific research and education. A. Méndez-Vilas, Ed. Formatex, USA, pp. 131-140.

Tomankova, K. Kolarova H, Vujtek M, Zapletalova H. 2007. Study of cancer cells used atomic force microscopy. En: Modern Research and Educational Topics in Microscopy. A. Méndez-Vilas, Ed. Formatex, USA, pp. 23-28.

Material electrónico

Agrawal R, Lee K, Ponnayolu D. 2005. AFM Spectroscopy. ME 382: Micro/Nano Science and Engineering Disponible en: (http://scholar.google.com.mx/scholar?hl=es&as_sdt=0,5&as_vis=1&q=Agrawal+R,+Lee+K,+Ponnayolu+D.+2005.+AFM+Spectroscopy), (Accesado por última vez 25-oct-2016).

Arenas, JA. "Contribuciones de la física en la historia de la microscopía". Revista Digital Universitaria. 10 de julio 2005, Disponible en Internet: <http://www.revista.unam.mx/vol.6/num7/art70/int70.htm> (accesado por última vez 11 de julio de 2005).

FAO. Probióticos en los alimentos. Propiedades saludables y nutricionales y directrices para la evaluación. Disponible en: <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/009/a0512s/a0512s00.pdf>. (accesado por última vez 05-septiembre-2016).

FAO/OMS Consulta de Expertos sobre Evaluación de las Propiedades Saludables Nutricionales de los Probióticos en los Alimentos, incluida la Leche en Polvo con Bacterias Vivas del Ácido Láctico, 1-4 de octubre de 2002. <http://www.fao.org/3/a-a0512s.pdf> (accesado por última vez 16-junio-2016).

Gudur R, "In situ AFM Imaging of Nanoparticle-Cellular Membrane Interaction for a Drug Delivery Study" 2011. Florida International University, Electronic Theses and Paper 422, <http://digitalcommons.fiu.edu/etd/422>. (Accesado por última vez 26-octubre-2016).

INEGI, 2012. Estadísticas de Mortalidad. Cubos dinámicos. www.inegi.org.mx (accesado por última vez 23-mayo-2016).

Marlony W, Fais S and Fiorentini C. 1998. Morphological aspects of apoptosis. http://www.cyto.purdue.edu/cdroms/cyto4/10_scope/index.htm (accesado por última vez 13-octubre-2016).

NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Disponible en: <http://www.fmvz.unam.mx/fmvz/principal/archivos/062ZOO.PDF> (accesado por última vez 13-febrero-2016).

NORMA Oficial Mexicana NOM-181-SCFI-2010, Yogurt-Denominación, especificaciones fisicoquímicas y microbiológicas, información comercial y métodos de prueba. Disponible en: http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5167303&fecha=16/11/2010. (accesado por última vez 02-enero-2016).

OMS, 2008. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>(accesado por última vez 12-agosto-2016).

Reséndiz M y Castrellón-Urbe J. 2005. Microscopio de Fuerza Atómica. Encuentro de Investigación en Ingeniería Eléctrica. http://www.uaz.edu.mx/cippublicaciones/eninvie2K5/I%5CI_2Microscopiofa.pdf. (accesado por última vez 25-oct-2016).

Science Photo Library. 2014. Disponible en: <http://fineartamerica.com/featured/6-mouth-cancer-cells-sem-science-photo-library.html> (accesado 23 de octubre de 2016).

Tonello A. 2012. Consumo de alimentos prebióticos y probióticos y resultados intrínsecos de su consumo en mujeres de 30 a 40 años que asisten a un gimnasio de la ciudad de Rosario Disponible en:” <http://imgbiblio.vaneduc.edu.ar/fulltext/files/TC111885.pdf> (accesado última vez 18-oct-2016).

13. RESUMEN BIOGRÁFICO

Mariana Saldaña Falcón

Candidato para el Grado de:

Maestra en Ciencias con Especialidad en Microbiología General

Tesis: ANALISIS DE CELULAS HT-29 EN PRESENCIA DE FACTORES EXTRACELULARES DE PROBIÓTICOS A TRAVÉS DE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (MEB) Y MICROSCOPIA DE FUERZA ATÓMICA (AFM).

Campo de estudio: Ciencias Naturales

Datos Personales: Nacida en Monclova Coahuila, el 11 de septiembre en el año 1987, hija de Jorge Enrique Saldaña Cervantes y Laura Beatriz Falcón Romo

Educación: Egresada de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido Químico Bacteriólogo Parasitólogo.

Experiencia Profesional: Organización y coordinación de eventos científicos y académicos como; congresos, conferencias y visitas a estudiantes de escolaridad básica.

Capacitaciones de programas de Ciencia básica para maestros docentes.

Secretaria de Educación de Nuevo León